



**HAL**  
open science

## Cinq années d'expérience d'une RCP " moléculaire " dans la prise en charge des lymphomes B diffus à grandes cellules

Pierre Lebreton

► **To cite this version:**

Pierre Lebreton. Cinq années d'expérience d'une RCP " moléculaire " dans la prise en charge des lymphomes B diffus à grandes cellules. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-02640589

**HAL Id: dumas-02640589**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02640589>**

Submitted on 28 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.



Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Rouen

Année universitaire 2019 – 2020

**Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 13 février 2020 par

**Pierre LEBRETON**

Né le 30 mars 1990 à Pont-Audemer (Eure)

Discipline : hématologie option « maladies du sang »

**Cinq années d'expérience d'une RCP  
« moléculaire » dans la prise en charge des  
lymphomes B diffus à grandes cellules**

**Directeur de thèse :**

Monsieur le Professeur Fabrice JARDIN

**Jury de thèse :**

Monsieur le Professeur Hervé TILLY

Président du jury

Monsieur le Professeur Noël MILPIED

Examinateur

Madame le Docteur Liana VERESEZAN

Examinatrice

Monsieur le Docteur Florian CLATOT

Examinateur





Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Rouen

Année universitaire 2019 – 2020

**Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 13 février 2020 par

**Pierre LEBRETON**

Né le 30 mars 1990 à Pont-Audemer (Eure)

Discipline : hématologie option « maladies du sang »

**Cinq années d'expérience d'une RCP  
« moléculaire » dans la prise en charge des  
lymphomes B diffus à grandes cellules**

**Directeur de thèse :**

Monsieur le Professeur Fabrice JARDIN

**Jury de thèse :**

Monsieur le Professeur Hervé TILLY

Président du jury

Monsieur le Professeur Noël MILPIED

Examinateur

Madame le Docteur Liana VERESEZAN

Examinatrice

Monsieur le Docteur Florian CLATOT

Examinateur

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020**

**U.F.R. SANTÉ DE ROUEN**

-----

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**  
**Professeur Agnès LIARD**  
**Professeur Guillaume SAVOYE**

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

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

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

Mr Stéfán <b>DARMONI</b> communication	HCN	Informatique médicale et techniques de
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CHB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CHB	Radiothérapie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b> ( <i>surnombre</i> )	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mr Olivier <b>GULLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude <b>HOUDAYER</b>	HCN	Génétique
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HCN	Médecine interne

Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophtalmologie
Mr Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b> ( <i>disponibilité</i> )	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian <b>SCHWARZ</b>	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Hervé <b>TILLY</b> ( <i>surnombre</i> )	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Anatomie -Chirurgie Maxillo-Faciale

Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric <b>VERIN</b>	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HC	Rhumatologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

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

Mme Najate <b>ACHAMRAH</b>	HCN	Nutrition
Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel <b>BESNIER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent <b>MARGUET</b>	HCN	Histologie
Mme Chloé <b>MELCHIOR</b>	HCN	Gastroentérologie
Mr Thomas <b>MOUREZ</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Virologie
Mr Gaël <b>NICOLAS</b>	UFR	Génétique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia <b>ROLLIN</b>	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
Mr David <b>WALLON</b>	HCN	Neurologie
Mr Julien <b>WILS</b>	HCN	Pharmacologie



## PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry **WABLE** UFR Communication

Mme Mélanie **AUVRAY-HAMEL** UFR Anglais

## II - PHARMACIE

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mr Jérémy **BELLIEN** (PU-PH)

Pharmacologie

Mr Thierry **BESSON**

Chimie Thérapeutique

Mr Jean **COSTENTIN** (Professeur émérite)

Pharmacologie

Mme Isabelle **DUBUS**

Biochimie

Mr Abdelhakim **EL OMRI**

Pharmacognosie

Mr François **ESTOUR**

Chimie Organique

Mr Loïc **FAVENEC** (PU-PH)

Parasitologie

Mr Jean Pierre **GOULLE** (Professeur émérite)

Toxicologie

Mr Michel **GUERBET**

Toxicologie

Mme Christelle **MONTEIL**

Toxicologie

Mme Martine **PESTEL-CARON** (PU-PH)

Microbiologie

Mr Rémi **VARIN** (PU-PH)

Pharmacie clinique

Mr Jean-Marie **VAUGEUIS**

Pharmacologie

Mr Philippe **VERITE**

Chimie analytique

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile **BARBOT**

Chimie Générale et Minérale

Mr Frédéric **BOUNOURE**

Pharmacie Galénique

Mr Thomas **CASTANHEIRO MATIAS**

Chimie Organique

Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**

Physiologie

Mme Camille **CHARBONNIER (LE CLEZIO)**

Statistiques

Mme Elizabeth **CHOSSON**

Botanique

Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b> santé	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et mathématiques
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Marine <b>MALLETER</b>	Toxicologie
M. Jérémie <b>MARTINET</b> (MCU-PH)	Immunologie
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

### **PROFESSEURS ASSOCIES**

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mme Caroline <b>BERTOUX</b>	Pharmacie

### **PAU-PH**

M. Mikaël **DAOUPHARS**

### **PROFESSEUR CERTIFIE**

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

### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

Mme Alice <b>MOISAN</b>	Virologie
M. Henri <b>GONDÉ</b>	Pharmacie

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

M. Abdel **MOUHAJIR**

Parasitologie

M. Maxime **GRAND**

Bactériologie

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT

Mme Ramla **SALHI**

Pharmacognosie

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

Mme Cécile **BARBOT**

Chimie Générale et minérale

Mr Thierry **BESSON**

Chimie thérapeutique

Mr Abdeslam **CHAGRAOUI**

Physiologie

Mme Elisabeth **CHOSSON**

Botanique

Mme Marie-Catherine **CONCE-CHEMTOB**

Législation et économie de la santé

Mme Isabelle **DUBUS**

Biochimie

Mr Abdelhakim **EL OMRI**

Pharmacognosie

Mr François **ESTOUR**

Chimie organique

Mr Loïc **FAVENNEC**

Parasitologie

Mr Michel **GUERBET**

Toxicologie

Mme Martine **PESTEL-CARON**

Microbiologie

Mr Mohamed **SKIBA**

Pharmacie galénique

Mr Rémi **VARIN**

Pharmacie clinique

M. Jean-Marie **VAUGEOIS**

Pharmacologie

Mr Philippe **VERITE**

Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

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

#### MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

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

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

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

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

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

### ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

#### PROFESSEURS

Mr Paul **MULDER** (phar) Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med)

Génie Informatique

### **MAITRES DE CONFERENCES**

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med)  
905)

Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med)

Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** (med)

Neurosciences (Néovasc)

M. Sylvain **FRAINEAU** (med)

Physiologie (Inserm U 1096)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (med)

Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Nicolas **GUEROUT** (med)

Chirurgie Expérimentale

Mme Rachel **LETELLIER** (med)

Physiologie

Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med)

Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mr Frédéric **PASQUET**

Sciences du langage, orthophonie

Mme Christine **RONDANINO** (med)

Physiologie de la reproduction

Mr Youssan Var **TAN**

Immunologie

Mme Isabelle **TOURNIER** (med)

Biochimie (UMR 1079)

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

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*

*SJ - Saint Julien Rouen*

---

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

---

Ce travail de thèse n'a bénéficié d'aucun soutien, de quelque nature qu'elle soit, émanant d'unité de recherche ou du secteur industriel. À aucun moment, nous n'avons voulu mettre en avant un outil clinique, diagnostique ou thérapeutique.

## REMERCIEMENTS

---

Mes remerciements vont

À monsieur le **Professeur Hervé Tilly**, président de jury, dont l'aura passée et présente pèse sur les avancées actuelles dans le vaste monde du lymphome et de l'hématologie en général. Votre disponibilité, votre expertise, votre envie de partager, votre savoir sont autant de qualités m'ayant fait progresser pendant l'internat. Je vous remercie d'honorer ce jury.

À monsieur le **Professeur Fabrice Jardin**, directeur de thèse, médecin et chercheur émérite en hématologie clinique et fondamentale, plus encore dans le monde du lymphome, à qui j'adresse de profonds remerciements pour le sujet proposé, la relecture de ce travail, et son soutien personnel et professionnel durant ces années d'internat, qui me permettra d'exercer sereinement ma passion.

À monsieur le **Professeur Noël Milpied**, examinateur, qui m'a permis un séjour bordelais de six mois riches en tout point au sein de son équipe d'hématologie. Vous partagez votre expérience et vos opinions comme peu le font encore. Vous me faites l'honneur d'être membre du jury et de braver la fraîcheur normande, je vous en remercie.

À monsieur le **Docteur Florian Clatot**, examinateur, qui dès mes premiers pas d'internes m'a chaleureusement accueilli. Tes conseils personnels et professionnels m'aideront au quotidien. Merci d'avoir accepté de relire et juger ce travail.

À madame le **Docteur Liana Veresezan**, examinatrice, pour la relecture et la validité de ce travail, et pour son accueil et ses avis bienveillants.

À madame le **Docteur Dominique Pinther** et son équipe, pour m'avoir initié aux bases fondamentales de la cytogénétique, et pour les conseils prodigués pour le versant cytogénétique.

À madame le **Docteur Pascaline Etancelin** et à madame le **Docteur Claire Bracquemart**, pour m'avoir inculqué les principes généraux de la biologie moléculaire, et pour leurs conseils réalistes à ma pratique future.

À monsieur le **Docteur Philippe Ruminy** et madame le **Docteur Elodie Bohers**, pour leur disponibilité et leur enseignement des principes techniques et analytiques de la RT-MLPA et du séquençage haut débit.

À **Pierre-Julien Vailly**, pour son expertise bio-informatique. Et à l'ensemble de l'équipe du laboratoire INSERM U1245, à l'origine de l'ensemble des résultats de ce travail de synthèse.

À **Justine Lequesne**, soutien indispensable pour l'expertise statistique.

À madame le **Docteur Aspasia Stamatoullas-Bastard**, pour la relecture première de ce travail, et pour ces cinq années d'internat à écouter tes remarques pertinentes que l'on retient aisément, et pour l'accès à tes consultations.

À l'ensemble des praticiens hospitaliers en hématologie du centre Henri Becquerel (**Pascal, Emilie, Nathalie, Anne-Lise, Stéphane, Hélène, Vincent, Nathalie, Marie-Laure, Carole, Selma, Oana**) ainsi qu'aux **secrétaires, cadres, IDE** et **AS** du service, pour leur enseignement, leurs conseils parfois appuyés, leur accès aux consultations, leur disponibilité, leur soutien.

À l'ensemble des mes co-internes de spécialité (**Michaël, Marion, Vincent, Imène, Bénédicte, Daphné, Juliette, Alexandra, Pauline, Julie**), avec qui les relations tantôt amicales tantôt tumultueuses nous ont au final fait avancer. Egalement à tous les internes et séniors Rouennais, Bordelais et Havrais rencontrés durant mon cursus.

À **Sydney Dubois**, pour la qualité de ses travaux sur le sujet choisi, qui m'ont été très utiles.

À l'ensemble du **personnel d'oncologie du centre Henri Becquerel**, du **service d'immuno-hémato-onco-pédiatrique du CHU de Rouen** (notamment au **Professeur Vannier** et au



**Professeur Schneider)** et du **service d'hématologie biologique du CHU de Rouen (Sylvie, Gérard, Victor, Elsa, Catherine, Agnès, Pierre).**

A mes amis de toujours et de maintenant :

**Thibaut**, où seul un col de haute montagne nous aura (temporairement) séparer. Il m'arrive de repenser à nos histoires anciennes et récentes, cela me reconforte. Tu es pour moi un modèle de savoir, de réussite et d'humilité. Préserve le tant que tu pourras. A toute ta famille, d'une gentillesse rare et d'un soutien infailible.

**Emmanuel**, tu m'as transmis ta joie de vivre depuis le lycée, ce qui m'a conduit jusqu'ici aujourd'hui. Les milliers de kilomètres nous séparant actuellement ne sont pas des plus appréciables. L'important, que tu trouves ton bonheur !! Un bisou à toute ta superbe famille qui m'a soutenu dans les moments délicats.

**Jordan**, toujours plus... ton doigt s'en souvient encore. Tes parents et toi ont contribué à ma réussite actuelle. Chacun de tes passages en Normandie me ravissent.

**Tristan**, notre homonymie nous offre une superbe histoire d'amitié, faite de réussites et d'échecs.... Profite des terres dinannaises avec ta princesse.

**Guillaume**, que seul un aveugle n'aurait pas vu. Un plaisir non quantifiable de te connaître. Encore de nombreux petit-déjeuners d'internat à partager, de duatlons à gagner, et surtout d'une petite Louise à s'occuper ! Un grand merci pour la relecture de ce travail.

**Alexandre**, leclachu, après Conf+ et ses déboires, Monod+ nous attend !

**Florian**, en tant qu'ami cette fois, pour tes conseils réfléchis qui me canalisent et m'orientent vers la bonne direction. Un grand bonheur de partager nos points de vue. Pour les sorties sportives (triathlon, randonnée au chalet...) qui mine de rien, n'auraient jamais vues le jour sans ta famille et toi.

Aux femmes de mes amis : **Blandine, Iwette, Aurore, Agathe et Louise, Pauline, Anne** et ses trois enfants, **Abel, Sacha et Joachim**.

À mes amis de la petite reine, une seconde famille, qui a plus contribué à ralentir ce travail qu'à le construire ! **Gérard**, un second père pour moi, jamais je te remercierai assez pour tout ce que m'as apporté, tant sur l'aspect sportif que professionnel. **Marceau et Laurent**, pour vos conseils que j'ai toujours peiné à suivre. **Clément, Thomas** pour nos sorties et galères partagées depuis de nombreuses années, d'autres à venir !

À mon grand-père **Bernard** (et son épouse **Chantal**), dont la parole emplie de sagesse sait rassurer et instruire quiconque l'écoute.

À **Louis, Mathilde, Jean et Guillaume**, mes frères et sœur dont le courage et l'abnégation de ces dernières années sont un modèle pour tant d'autres. À **Camille**, ma belle-sœur. À vous tous, je tiens énormément.

À **Christine, Frédéric, Florent, Camille et Charlotte**, ma superbe belle-famille.

À **Pauline**, mon amie depuis deux ans, que j'aime et qui m'apporte toute l'attention que l'on peut souhaiter. Tout ce qui pourrait être écrit ici, je le pense chaque jour, dans l'intimité.

À mes **anciens amis** et **proches**.

À mon **père**, parti trop tôt.

À ma **mère**, partie trop tôt.

Aux **patients** et à l'humanité qu'ils suscitent à chaque instant.

## Table des matières

---

1	Introduction.....	3
1.1	Généralités sur les lymphomes B diffus à grandes cellules .....	3
1.1.1	Épidémiologie .....	3
1.1.2	Diagnostic.....	3
1.1.2.1	Clinique .....	3
1.1.2.2	Biologique .....	4
1.1.2.3	Iconographique.....	4
1.1.3	Thérapeutiques .....	6
1.1.3.1	Traitements de première ligne .....	6
1.1.3.2	Traitements des formes réfractaires .....	7
1.1.3.3	Thérapies innovantes et ciblées .....	8
1.1.3.3.1	Chimiothérapie .....	8
1.1.3.3.2	Anticorps monoclonaux .....	8
1.1.3.3.3	Thérapies ciblées.....	9
1.1.3.3.4	Immunomodulateurs .....	10
1.1.3.3.5	Immunothérapie (inhibiteur du check point).....	10
1.1.3.3.6	Thérapies géniques .....	11
1.2	Approche physiopathologique.....	11
1.2.1	Lymphopoïèse B.....	11
1.2.1.1	Lymphopoïèse B médullaire .....	11
1.2.1.2	Lymphopoïèse B périphérique.....	12
1.2.2	Immunopoïèse B .....	12
1.2.2.1	Follicules primaires .....	12
1.2.2.2	Contact avec l'antigène .....	12
1.2.2.3	Formation du centre germinatif .....	12
1.2.2.4	Hypermutation somatique.....	13
1.2.2.5	Commutation de classe .....	13
1.2.2.6	Différentiation terminale .....	13
1.3	Classification biologique des LBDGC.....	16
1.3.1	Approche anatomo-pathologique.....	16
1.3.2	Approche Cytogénétique .....	19
1.3.2.1	Caryotype conventionnel.....	19
1.3.2.2	FISH .....	20
1.3.3	Approche moléculaire.....	20
1.3.3.1	Ère pré-séquençage .....	21
1.3.3.2	RT-MLPA .....	22

1.3.3.3	Séquençage haut débit .....	23
1.4	Voies biologiques impliquées dans la lymphopoïèse et la lymphomagénèse .....	23
1.4.1	Voie Nf- $\kappa$ B .....	24
1.4.2	Voie du BCR.....	25
1.4.3	Voie NOTCH.....	26
1.4.4	Voie de l'apoptose et du cycle cellulaire.....	27
1.4.5	Voie de l'épigénétique .....	29
1.4.6	Voie de l'immunité et du microenvironnement tumoral.....	29
1.4.7	Voie des MAP-kinases .....	30
1.4.8	Voie JAK-STAT .....	31
1.5	Nouvelles classifications moléculaires.....	31
1.5.1	Selon Reddy et <i>al.</i> ....	32
1.5.2	Selon Chapuy et <i>al.</i> .....	32
1.5.3	Selon Schmitz et <i>al.</i> ....	33
1.5.4	Selon Dubois et <i>al.</i> .....	33
1.5.5	Lymphome B de haut grade (HGBCL).....	34
1.6	Médecine personnalisée dans les LBDGC .....	34
2	Hypothèse et objectifs .....	37
2.1	Problématique .....	37
2.2	Hypothèse.....	37
2.3	Objectif et critère de jugement principaux.....	37
2.4	Objectifs et critères de jugements secondaires.....	38
3	Matériels et méthodes .....	39
3.1	Design de l'étude .....	39
3.1.1	Constitution de la cohorte CAMELEON .....	39
3.1.2	Constitution de la cohorte d'analyse .....	39
3.2	Recueil de données.....	40
3.2.1	Caractéristiques générales.....	40
3.2.2	Anatomo-pathologie .....	40
3.2.2.1	Histologie .....	40
3.2.2.2	Immunohistochimie .....	42
3.2.3	Cytogénétique.....	42
3.2.3.1	Caryotype conventionnel.....	42
3.2.3.2	FISH .....	43
3.2.4	Biologie moléculaire.....	43
3.2.4.1	Méthode d'extraction d'ADN et d'ARN .....	43
3.2.4.2	Détermination de la COO.....	43
3.2.4.3	Séquençage haut débit et panel lymphoïdes.....	44

3.2.4.4	Profil mutationnel.....	46
3.2.4.5	Profils de CNV .....	47
3.2.4.6	Applicabilité des récentes classifications moléculaires .....	48
3.2.4.6.1	Selon Schmitz et al .....	48
3.2.4.6.2	Selon Chapuy et al.....	48
3.2.4.7	Analyse statistique.....	49
4	Résultats.....	50
4.1	Cohorte d'analyse.....	50
4.1.1	Caractéristiques générales.....	50
4.1.1	Résultats anatomo-pathologiques .....	52
4.1.1.1	Histologie.....	52
4.1.1.2	IHC .....	52
4.1.1	Résultats cytogénétiques.....	52
4.1.1.1	Caryotype conventionnel.....	52
4.1.1.2	FISH.....	53
4.1.2	Résultats moléculaires .....	54
4.1.2.1	Détermination de la COO.....	54
4.1.2.2	Profil mutationnel.....	56
4.1.2.2.1	Données techniques.....	56
4.1.2.2.2	Variants mutationnels.....	56
4.1.2.2.3	Caractéristiques mutationnelles .....	58
4.1.2.2.4	Profil de CNV .....	59
4.2	Détermination des facteurs prédictifs de réponse .....	61
4.2.1	Caractéristiques générales.....	61
4.2.2	Description des thérapies de rechute .....	63
4.2.3	Anatomo-pathologie .....	64
4.2.4	Résultats cytogénétiques .....	64
4.2.5	Résultats moléculaires .....	65
4.2.5.1	Profils mutationnels.....	65
4.2.5.2	Résultats de CNV.....	68
4.3	Impact de la rechute précoce / état réfractaire .....	69
4.4	Prélèvements multiples .....	70
4.5	Modulation thérapeutique selon les résultats CAMÉLÉON.....	71
4.5.1	Inhibiteur d'EZH2 .....	71
4.5.2	Inhibiteur d'HDAC .....	72
4.5.3	Inhibiteur d'XPO1.....	72
4.5.4	Inhibiteur de BTK.....	73
4.5.5	Inhibiteur de BCL2.....	74

4.6	Analyses en survie globale.....	74
4.6.1	Focus sur <i>MYD88</i> .....	75
4.6.2	Focus sur <i>TP53</i> .....	76
4.7	Applicabilité des récentes classifications.....	77
4.7.1	Selon Schmitz et al .....	78
4.7.2	Selon Chapuy et al.....	79
4.7.3	Selon Dubois et al et Reddy et <i>al</i> .....	80
5	Discussion.....	81
5.1	Analyse des résultats : intérêts, limites .....	81
5.1.1	Aspects anatomo-pathologiques .....	81
5.1.2	Aspects cytogénétiques .....	82
5.1.3	Aspects moléculaires.....	83
5.1.3.1	RT-MLPA .....	83
5.1.3.2	Séquençage haut débit .....	83
5.1.3.3	Application thérapeutique.....	86
5.2	Quels axes d'amélioration proposer ?.....	87
5.2.1	Communication inter-services et application en routine.....	87
5.2.2	Fiche de synthèse.....	87
5.2.3	Vers un lymphopanel version 3.....	88
5.2.4	RT-MiSeq.....	89
5.2.5	Séquençage haut débit .....	89
5.3	Doit-on pratiquer le séquençage haut débit à tout diagnostic de LBDGC ? .....	89
5.3.1	Oui, le profilage moléculaire bénéficie aux sujets porteurs d'un LBDGC !.....	90
5.3.2	Non, un profil moléculaire systématique n'est pas une arme supplémentaire en 2020 ! .....	93
6	Conclusion .....	96
7	Annexes .....	98
8	Références bibliographiques .....	100
9	Résumé.....	103

## Abréviations

---

<b>ADN</b> : acide désoxyribonucléique	<b>LBDGC-UC</b> : LBDGC non classé
<b>ADNc</b> : ADN complémentaire	<b>LBDGC-DE/-TE</b> : LBDGC double- ou triple expresseur
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>LDH</b> : lactate déshydrogénase
<b>AHAI</b> : anémie hémolytique auto-immune	<b>LLC</b> : leucémie lymphoïde chronique
<b>AID</b> : enzyme déaminase induite par cytidine	<b>LyB/T</b> : lymphocyte B/T
<b>AMM</b> : autorisation de mise sur le marché	<b>LYSA</b> : LYmphoma Study Association
<b>ARN</b> : acide ribonucléique	<b>LZ</b> : zone claire
<b>BCR</b> : récepteur B membranaire	<b>LZM</b> : lymphome de la zone marginale
<b>CAMÉLÉON</b> : caractérisation moléculaire des lymphomes à grandes cellules B en routine	<b>mARN</b> : ARN messenger
<b>CAR-T cell</b> : cellules T à récepteur antigénique chimérique	<b>miARN</b> : micro-ARN
<b>CG</b> : centre germinatif	<b>MCL</b> : lymphome à cellules du manteau
<b>CHG</b> : génotypage par hybridation comparative	<b>NGS</b> : séquençage haut débit
<b>CKI</b> : inhibiteurs du checkpoint	<b>OMS</b> : organisation mondiale de la santé
<b>CMH</b> : complexe majeur d'histocompatibilité	<b>OS</b> : survie globale
<b>CNV</b> : variant en nombre de copies	<b>PCR</b> : réaction de polymérase en chaîne
<b>COO</b> : phénotype cellulaire ( <i>cell of origin</i> )	<b>PD</b> : maladie progressive
<b>CPA</b> : cellule présentatrice d'antigène	<b>PFS</b> : survie sans progression
<b>CR</b> : rémission complète	<b>PMBL</b> : lymphome B primitif du médiastin
<b>CRP</b> : protéine réactive C	<b>PR</b> : rémission partielle
<b>CU</b> : rémission ( <i>cured</i> )	<b>PTI</b> : purpura thrombénique idiopathique
<b>DZ</b> : zone sombre	<b>RCP</b> : réunion de concertation pluridisciplinaire
<b>EBV</b> : virus d'Epstein-Barr	<b>RNA-seq</b> : séquençage ARN
<b>ECOG</b> : échelle de performance	<b>RR</b> : rechute / réfractaire ( <i>relapsed / refractory</i> )
<b>FFPE</b> : tissu fixé en paraffine/formol	<b>RT-MLPA</b> : rétrotranscription et amplification par ligation multiplexe
<b>FL</b> : lymphome folliculaire	<b>SNC</b> : système nerveux central
<b>GC</b> : centre germinatif	<b>TEP</b> : tomographie par émission de positons
<b>GEP</b> : profil d'expression génique	<b>TLR</b> : récepteur <i>toll-like</i>
<b>HGBCL</b> : lymphome B de haut grade	<b>UTR</b> : <i>untranslated region</i>
<b>HSM</b> : hypermutation somatique	<b>VAF</b> : fréquence allélique du variant
<b>Hot-spot</b> : cible « point chaud » (classique)	<b>VHB/C</b> : virus de l'hépatite B/C
<b>IHC</b> : immunohistochimie	<b>VIH</b> : virus de l'immunodéficience humaine
<b>IPI</b> : index pronostic international	<b>VM</b> : variant mutationnel
<b>IRM</b> : imagerie par résonance magnétique	<b>VS</b> : vitesse de sédimentation
<b>IZ</b> : zone intermédiaire	<b>vs</b> : <i>versus</i> (contre)
<b>LBDGC</b> : lymphome B diffus à grandes cellules	<b>WES</b> : whole exome sequencing
<b>LBDGC-ABC</b> : LBDGC de forme B activée	<b>WGS</b> : whole genome sequencing
<b>LBDGC-GC</b> : LBDGC issu du centre germinatif	<b>XXXi</b> : inhibiteur du gène XXX
<b>LBDGC-NOS</b> : LBDGC de forme non spécifique	

## Préambule

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) représentent la forme la plus fréquente des lymphomes non Hodgkiniens (40%), avec une incidence annuelle d'environ 5000 cas en France. Par leur mode de présentation clinique et biologique le plus souvent agressif, un traitement spécifique par immunothérapie et chimiothérapie doit rapidement être envisagé. Bien que le taux de rémission complète et durable soit d'environ 60%, les formes en rechute ou réfractaires présentent un pronostic péjoratif, avec une survie globale à 5 ans inférieure à 30%. Les facteurs prédictifs biologiques de réponse ou de la rechute ne sont à ce jour pas clairement identifiés. Historiquement, la distinction des LBDGC *germinal center* (GC) et des LBDGC *activated B cell* (ABC) obtenue par puces à ADN a été la première à établir un modèle d'expression génique différent selon les formes, avec un pronostic défavorable associé aux type ABC. Un troisième sous-type, le lymphome B primitif du médiastin (PMBL), était à l'inverse corrélé à une meilleure survie. L'impact thérapeutique selon le distingo GC, ABC et PMBL demeure toutefois limité. Par l'essor du séquençage haut débit, cette hétérogénéité biologique fait l'objet de récentes publications décrivant différentes stratégies de stratifications moléculaires. L'exploration des différentes voies biologiques impliquées dans le lymphomagénèse d'une part, l'analyse en génétique somatique des variations génomiques de ces mêmes voies d'autres part, permettraient d'établir de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblées selon le profil moléculaire obtenu. Dans ce contexte, l'unité INSERM1245 a développé en 2014 une réunion interdisciplinaire de caractérisation biologique des lymphomes à grandes cellules B en routine (**CA**ractérisation **MO**léculaire des **L**ymphom**ES** B en **rO**uti**NE** ou **CAMÉLÉON**), colligeant l'ensemble des données cliniques, histologiques, cytogénétiques et surtout moléculaires de patients porteurs d'un LBDGC. Cette réunion visait à établir un profil moléculaire personnalisé et à discuter de la potentielle éligibilité d'un patient à une thérapie ciblée. Notre travail de thèse décrit cinq années de réunions CAMÉLÉON, en tentant de déterminer des facteurs biologiques pronostiques et théranostiques.



# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 Généralités sur les lymphomes B diffus à grandes cellules

### 1.1.1 Épidémiologie

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) représentent l'hémopathie maligne la plus fréquente au sein des lymphomes non hodgkiniens (LNH), avec une incidence annuelle d'environ 5000 cas en France. Celle-ci croît avec l'âge, la moitié des diagnostics étant portés après 60 ans. Les LBDGC correspondent à une prolifération clonale et anarchique de globules blancs appelés lymphocytes B, se manifestant initialement par une masse unique ou multiples à croissance rapide, de localisation ganglionnaire ou extra-nodale. Le ratio homme / femme est équilibré, excepté pour les PMBL où l'incidence est supérieure chez la femme. Les formes pédiatriques sont rares. Bien qu'aucun facteur de risque isolé ne soit formellement identifié, les infections chroniques (VIH, hépatite C, EBV), l'immunodépression (VIH, greffe) ou encore l'exposition à des agents toxiques (pesticides tels que le lindane, chimiothérapies antérieures) sont autant de facteurs favorisants potentiels. Certaines formes de LBDGC proviennent de la transformation de LNH indolents (FL, LLC...). Ces deux dernières décennies ont vu l'incidence des LBDGC augmenter, en lien notamment avec des méthodes diagnostiques améliorées et une exposition accrue à de multiples facteurs environnementaux.

### 1.1.2 Diagnostic

#### 1.1.2.1 Clinique

La présentation clinique initiale est le plus souvent agressive avec une évolution sur quelques semaines ou mois. Les signes fonctionnels généraux sont fréquents (symptômes « B » : fièvre supérieure à 38°C, sueurs nocturnes, amaigrissement). Le syndrome tumoral domine le tableau, allant de simples adénopathies superficielles centimétriques à un envahissement d'organe rencontré dans 40% des cas, avec potentiel retentissement

fonctionnel (insuffisances respiratoire ou cardiaque, syndrome compressif type cave supérieur, hypertension intracrânienne...).

#### 1.1.2.2 Biologique

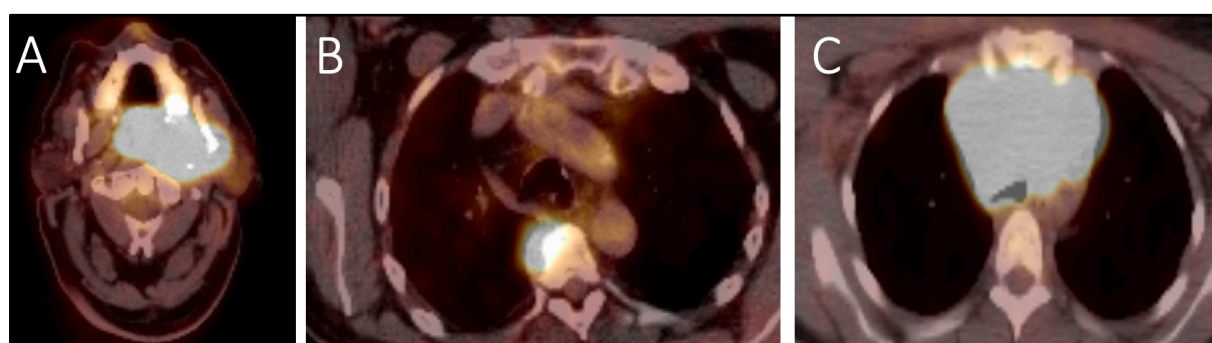
Il n'existe pas de marqueur biologique spécifique à visée diagnostique. Un syndrome inflammatoire est fréquent (VS ou CRP élevées). Des cytopénies peuvent être inaugurales, reflétant un envahissement médullaire, un phénomène dysimmunitaire (PTI, AHAI), inflammatoire ou carenciel. Un taux de LDH élevé et des stigmates de lyse tumorale biologique sont des témoins d'une intense prolifération cellulaire. Des signes de souffrance organique par compression (insuffisance rénale obstructive) ou par envahissement (cytolyse hépatique) sont également fréquents. Réalisée sur matériel tumoral ou sang périphérique, la clonalité B par PCR et électrophorèse peut aider l'histologiste à discerner une réaction inflammatoire lymphocytaire d'une véritable néoplasie lymphoïde. La détection d'ADN circulant libre et tumoral introduit la notion de biopsie « liquide », et serait amener à compléter le bilan diagnostique et serait un marqueur de maladie résiduelle. Cette technique reste toutefois non applicable en routine aujourd'hui.

#### 1.1.2.3 Iconographique

L'évaluation d'un syndrome tumoral périphérique ou profond se fait en première intention par tomodensitométrie (scanner) avec injection de produit de contraste iodé. Sa sensibilité est augmentée par un scanner avec émission de positons marqués au <sup>18</sup>Fluoro-Deoxy-Glucose (PET-scanner). Il représente l'examen de référence à la fois pour le diagnostic avec l'évaluation des lésions fixantes (SUV/SUV<sub>max</sub>) et le calcul du score de Deauville (tableau 1), et pour l'évaluation de la réponse tumorale selon les critères de Lugano et par le calcul du deltaSUV<sub>max</sub>. L'IRM cérébrale complète le bilan dans le cadre des LBDGC primitifs du SNC ou avec atteinte oculo-cérébrale.

Score de Deauville	TEP	Critères
1	Négative	Absence de fixation supérieure au bruit de fond
2	Négative	Fixation < médiastin
3	Négative	Fixation > médiastin et < foie. Si la fixation du compartiment du médiastin $\geq$ foie, l'activité de la lésion doit être comparée à la fixation hépatique : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fixation de la lésion &lt; fixation hépatique : score 2</li> <li>- Fixation de la lésion &gt; fixation hépatique : score 3</li> </ul>
4	Positive	Fixation modérée comparativement à celle du foie
5	Positive	Augmentation prononcée de la fixation comparativement à celle du foie

**Tableau 1:** Critères de réponse TEP de Deauville



**Figure 1 :** Exemples de PET-scanner ; (a) Hypermétabolisme pathologique cervical gauche LBDGC ; (b) hypermétabolisme osseux vertébral ; (c) hypermétabolisme d'une masse médiastinale correspondant à un PMBL.

L'association des données cliniques, biologiques et iconographiques permet le calcul du score pronostique IPI. Le score CNS-IPI évalue le risque de l'atteinte neuro-méningé.

Stades Ann-Arbor	Atteintes
I	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire sus- ou sous-diaphragmatique
II	Atteinte d'au moins deux aires ganglionnaires sus- ou sous-diaphragmatique
III	Atteinte ganglionnaire de part et d'autre du diaphragme
IV	Atteinte viscérale à distance d'un groupe ganglionnaire
E	Atteinte d'organe par contiguïté
B	Présence de symptômes B

**Tableau 2:** Stades Ann-Arbor

Critères IPI	Points IPI
ECOG $\geq$ 2	1
LDH sériques $\geq$ normes	1
Âge $\geq$ 60 ans	1
Stade Ann-Arbor III-IV	1
Atteintes extra-ganglionnaires $\geq$ 1	1

Score IPI 0-1 : bas ; IPI 2 : intermédiaire bas ; IPI 3 : intermédiaire haut ; IPI 4-5 : haut  
 Survie à 3 ans : IPI 0-1 : 91% ; IPI 2 : 81% ; IPI 3 : 65% ; IPI 4-5 : 59%

**Tableau 3:** Score pronostique IPI

### 1.1.3 Thérapeutiques

#### 1.1.3.1 Traitements de première ligne

L'objectif du traitement de première ligne pour un LBDGC est la rémission morpho-métabolique complète et persistante. Le régime standard utilisé avant les années 2000 était basé sur une polychimiothérapie de type CHOP (cyclophosphamide, hydroxy-doxorubicine, oncovin, prednisone), avec une efficacité en termes de survie globale et sans progression supérieure aux autres associations thérapeutiques<sup>1</sup>. Après deux essais de phase II convaincants, l'un en monothérapie et l'autre en association avec CHOP, l'adjonction au CHOP du rituximab, anticorps monoclonal ciblant le marqueur de surface B CD20, reste aujourd'hui la séquence de référence<sup>2</sup>. Toutefois, l'inclusion dans un essai clinique ouvert, en première ligne, doit être favorisée. Le traitement du sujet de moins de 80 ans est basé sur l'association R-CHOP21 à occurrence de 4 à 6-8 cycles, selon l'IPI. Pour les patients âgés de moins de 60 ans avec IPI faible (0 – 1), l'association R-ACVBP<sup>3</sup> offre des taux de rémission persistante supérieure au R-CHOP. Les LBDGC-SNC, plus rares et de pronostic plus réservé, bénéficient de drogues cytotoxiques pénétrant la barrière hémato-encéphalique (méthotrexate, aracytine haute dose)<sup>4</sup>. Après évaluation oncogériatrique, les sujets âgés de plus de 80 ans se voient proposer des schémas moins intensifs (R-miniCHOP, R-GEMOX, corticothérapie palliative...). L'intensification par autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, bien que non consensuelle, peut être proposée aux formes d'emblée agressive (HGBCL), à haut risque de rechute (IPI >1, deltaSUV < 66%) ou aux patients réfractaires primaires ou en rechute précoce. De même, un traitement plus intensif type R-hyperCVAD ou DA-EPOCH-R peut être envisagé pour les HGBCL, en association à une prophylaxie neuroméningée systématique<sup>5</sup>. La radiothérapie seule n'a pas montré

d'efficacité significative en termes de réponse complète<sup>6</sup>. Elle peut être envisagée sur des masses résiduelles localisées ou en situation palliative. En outre, il n'existe pas de recommandation pour un traitement d'entretien. La réponse au traitement est évaluée par PET-scanner. La maladie résiduelle sur ADN circulant n'est pas utilisée en routine. L'adaptation thérapeutique selon des facteurs tels que le volume tumoral métabolique, le phénotype GC ou non-GC ou les anomalies génétiques somatiques ont fait ou font actuellement l'objet d'évaluations prospectives.

#### 1.1.3.2 Traitements des formes réfractaires

Trente à 40% des patients seront réfractaires primaires ou en rechute à moins de 2 ans d'une première rémission. Le pronostic est alors péjoratif, avec une survie globale médiane de 6,3 mois<sup>7</sup>. Il n'existe pas de standard pour ces formes chimio-résistantes. De même, les définitions des réponses (PR, PD, SD) sont régulièrement révisées. Plusieurs régimes sont applicables (R-ICE : ifosfamide, carboplatine, étoposide ; R-DHAP : dexaméthasone, cytarabine, cisplatine ; R-GDP : gemcitabine, platine, dexaméthasone ; R-Bendamustine...). Le schéma R-DHAP offre une efficacité supérieure pour les formes GC en termes de réponse globale<sup>8</sup>. Comme en première ligne, l'inclusion dans un protocole de recherche clinique ouvert sur le centre de soins doit être proposée. L'autogreffe de cellules souches est proposée aux patients sensibles à la chimiothérapie de rattrapage et éligibles à cette séquence intensive, permettant une survie globale de 21% à 5 ans<sup>9</sup>. Le conditionnement pré-greffe est variable (BEAM, BAM, TEAM). Un traitement d'entretien n'est pas recommandé<sup>10</sup>. L'allogreffe de cellules souches peut être proposée, généralement en tandem ou en échec après autogreffe, en cas de donneur géno- ou phéno-identique disponible, avec conditionnement d'intensité réduite, escomptant sur l'effet *graft-versus-host* (greffon vs donneur). Les taux de morbi-mortalité d'une telle procédure sont élevés. Après autogreffe, l'allogreffe atteint des taux de survie globale d'environ 40% à 3 ans<sup>11</sup>. Le développement actuel des CAR-T cell apporte des résultats intéressants en situation de chimio-résistance<sup>12,13</sup>. Enfin, il existe de nombreuses thérapies ciblées en cours d'étude dans les LBDGC. Dans ce contexte, l'élaboration d'un profil moléculaire permettrait d'envisager une médecine personnalisée, au travers d'un ciblage de mutation somatique par des thérapies ciblées.

### 1.1.3.3 Thérapies innovantes et ciblées

Plusieurs molécules ont fait ou font l'objet d'évaluation prospective. Elles sont résumées selon les catégories suivantes : les chimiothérapies, les anticorps monoclonaux, les thérapies ciblées, les immunomodulateurs, les inhibiteurs du checkpoint et les thérapies géniques.

#### 1.1.3.3.1 Chimiothérapie

##### **Pixantrone**

La pixantrone est un analogue des anthracyclines pourvu d'un profil de toxicité cardiaque moindre. Ce produit a montré des taux de réponse globale compris entre 20 et 40% en situation multi-réfractaire, sans évènement cardiaque surajouté en comparaison aux anthracyclines classiques<sup>14</sup>. Cette option thérapeutique reste toutefois peu appliquée actuellement.

#### 1.1.3.3.2 Anticorps monoclonaux

##### **Obinutuzumab**

Il s'agit d'un anticorps anti-CD20 d'activité *in vitro* supérieur au rituximab. L'obinutuzumab (GA101) couplé à la chimiothérapie (ACVBP) en première ligne n'a toutefois pas permis d'améliorer significativement la survie sans progression à deux ans (essai GAINED).

##### **Polatuzumab-vedotin (PV)**

Anticorps anti-CD79B couplé à une chimiothérapie (MAE), cette molécule a montré des résultats encourageants en association au R-CHP ou G-CHP (G pour obinutuzumab), avec un taux de réponse complète de 77%<sup>15</sup>, indépendamment de l'IPI ou de l'anticorps anti-CD20 associé. L'essai POLARIX de phase III comparant R-CHOP au R-CHP + PV est en cours.

### 1.1.3.3.3 Thérapies ciblées

#### **Inhibiteurs d'EZH2**

EZH2 est une protéine régulatrice de l'épigénétique participant à la mono-, bi- ou triméthylation des lysines 3 (H3K9) et 27 (H3K27) des histones H3. Ces modifications induisent une répression transcriptionnelle de nombreux gènes acteurs majeurs dans le cycle et la prolifération cellulaires. Les inhibiteurs d'EZH2 permettent de reverser cet excès de méthylation. Le tazemetostat, chef de file des EZH2i, présente une activité clinique dans les formes réfractaires de LBDGC porteurs (40% de réponse globale) et non porteurs (18% de réponse globale) de mutations d'EZH2<sup>16</sup>. Plusieurs essais de phase précoce sont en cours, en monothérapie (NCT02875548) ou en association (EpiRCHOP). La proportion d'excès de méthylation des histones aurait un impact sur la réponse thérapeutique<sup>17</sup>.

#### **Inhibiteurs de BTK**

Les inhibiteurs de BTK (BTKi), dont l'ibrutinib, participent à l'inhibition du signal BCR et offrent une activité supérieure dans les formes ABC, notamment dans les formes avec mutations associées de *CD79B* et *MYD88*<sup>L265P</sup> <sup>18</sup>. L'association en première ligne au R-CHOP (essai PHOENIX) n'a pas atteint son objectif principal (survie sans évènement dans les formes ABC) comparativement au R-CHOP, avec toutefois un bénéfice pour les sujets < 60 ans.

#### **Inhibiteurs d'histone déacétylase**

L'acétylation est une modification post-traductionnelle correspondant à l'ajout d'un groupe acétyl sur les histones, action assurée par des enzymes dites acétylases et réversibles par des enzymes déacétylases (HDAC). Selon le gène ciblé et le site d'acétylation, ce mécanisme exerce un pouvoir activateur ou répresseur sur l'expression génique. Les inhibiteurs d'HDAC présentent une activité modeste dans les LBDGC en situation de rechute, avec une réponse globale de 18,9% en monothérapie<sup>19</sup> pour le mocetinostat. L'association à un inhibiteur de PI3K est en cours d'évaluation (CUDC-907).

### **Inhibiteurs de BCL2**

En plein essor d'utilisation dans les LLC et la LAM, le venetoclax (BCL2i) en combinaison au R-CHOP en première ligne présente un gain de survie sans progression pour les LBDGC avec expression immunohistochimique de BCL2 (seuil IHC > 50%), ce indépendamment de la COO (essai CAVALLI).

### **Inhibiteur d'XPO1**

XPO1 est une protéine cargo régulatrice centrale dans l'export nucléo-cytoplasmique de protéine diverses. Les mutations touchant le gène *XPO1* sont fréquentes dans les LBDGC, avec la mutation hot-spot (*XPO1*<sup>E571K</sup>). La protéine XPO1 fait l'objet d'un ciblage protéique en cours d'évaluation (essais selinda et selinexor).

#### 1.1.3.3.4 Immunomodulateurs

### **Lenalidomide**

Le lenalidomide favorise l'apoptose cellulaire par l'interaction complexe avec une ubiquitine ligase, le céréblon. L'utilisation en entretien après une première ligne chez le sujet de plus de 60 ans a montré un gain en survie sans progression, sans gain en survie globale (essai REMARC). L'essai SENIOR évaluant l'association du lenalidomide au R-CHOP n'a pas montré de gains de réponse supérieur au R-CHOP dans une population de LBDGC âgée (>80 ans). Une activité supérieure dans les formes ABC a en outre été démontrée en première ligne<sup>20</sup>.

### **Bortézomib**

Le bortézomib est un inhibiteur du protéasome. L'essai de phase III REMoDL-B évaluant l'ajout du bortézomib au R-CHOP n'a pas permis de montrer de gain en survie sans progression, indépendamment de la COO (intérêt théorique dans les formes ABC).

#### 1.1.3.3.5 Immunothérapie (inhibiteur du check point)

Classiquement utilisé dans le lymphome de Hodgkin classique (cHL) en situation de rechute ou réfractaire après brentuximab et/ou autogreffe, l'utilisation des inhibiteurs du check



point ou CKI dans les LBDGC en rechute a montré des premiers résultats décevants<sup>21</sup>. A l'image de l'échappement immunitaire fréquent dans les cHL, les PMBL y seraient d'avantage sensible, en lien avec les anomalies récurrentes de la voie PD1/PD-L1. Toutefois, l'évaluation prospective reste limitée devant leur faible incidence.

#### 1.1.3.3.6 Thérapies géniques

L'utilisation croissante des cellules CAR-T autologues CD19+ a permis de révolutionner la prise en charge de certaines formes chimio-réfractaires, avec des taux de réponse globale compris entre 52% et 82% (ZUMA-1<sup>12</sup>, JULIET<sup>13</sup>, TRANSCEND). L'AMM européenne est actuellement disponible après échec d'une deuxième ligne thérapeutique, comprenant généralement une autogreffe. Cette procédure demeure toutefois lourde à appliquer, et reste associée à des toxicités inflammatoire et neurologique immédiates sévères.

## 1.2 Approche physiopathologique

### 1.2.1 Lymphopoïèse B

#### 1.2.1.1 Lymphopoïèse B médullaire

La lymphopoïèse B est un processus biologique complexe et multi-étapes de maturation du lymphocyte B (LyB). La finalité est l'acquisition d'une spécificité immunitaire vis-à-vis d'un antigène donné, médiée par un récepteur membranaire B, le BCR. Les premières étapes sont médullaires, avec le réarrangement VDJ du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (*IGH*), puis des chaînes légères kappa (*IGK*) ou lambda (*IGL*). Cette étape est principalement régulée par les enzymes RAG1/RAG2, AID et TdT. Les réarrangements non fonctionnels entraînent la mort du lymphocyte par apoptose. Les lymphocytes fonctionnels, exprimant un BCR dit mature et naïf de tout antigène, rejoignent la circulation sanguine.

### 1.2.1.2 Lymphopoïèse B périphérique

Après une brève étape de maturation splénique permettant une élimination des LyB anergiques ou auto-réactifs, les LyB fonctionnels rejoignent la circulation lymphatique puis les structures ganglionnaires réparties sur les principaux territoires de drainage.

## 1.2.2 Immunopoïèse B

### 1.2.2.1 Follicules primaires

Le regroupement des LyB matures naïfs en région périphérique du ganglion forme le follicule primaire. Il est permis par l'expression de différents couples de chémokines (CXCR4-CXCR5-CXCL12-CXCL13) exprimés par la cellule et le micro-environnement ganglionnaire. Cette concentration maximise les chances de rencontre entre le LyB et un antigène.

### 1.2.2.2 Contact avec l'antigène

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), dont les cellules dendritiques, assurent le rôle de première présentation antigénique au LyB, stimulant le BCR et l'expression de chémokines amenant à la migration du LyB vers la zone para-corticale riche en lymphocyte T (LyT) CD4+ auxiliaires. Au sein d'un follicule dit secondaire, le pontage LyB – LyT CD4+ va permettre l'activation et la prolifération du LyB sous une forme soit plasmablastique soit centroblastique. Cette dernière permet la formation du centre germinatif.

### 1.2.2.3 Formation du centre germinatif

Le centre germinatif représente le haut lieu de maturation d'affinité du LyB pour son antigène sélectionné. Par l'expression finement régulée de nombreux gènes, la prolifération cellulaire du LyB est médiée selon sa localisation dans la zone sombre (DZ) ou la zone claire du centre germinatif. La DZ est le lieu d'une intense prolifération cellulaire (centroblaste) et

de modulation du BCR médiée par l'enzyme AID, appelée hypermutation somatique. La LZ est à l'inverse une région de faible prolifération cellulaire où les centrocytes régulés positivement par les LyT et les cellules folliculaires dendritiques seront amenés à la différenciation plasmocytaire et la commutation de classe. En cas de manque d'affinité centrocyte – LyT CD4+, le centrocyte subit une nouvelle maturation dans la DZ ou est détruit par apoptose.

#### 1.2.2.4 Hypermutation somatique

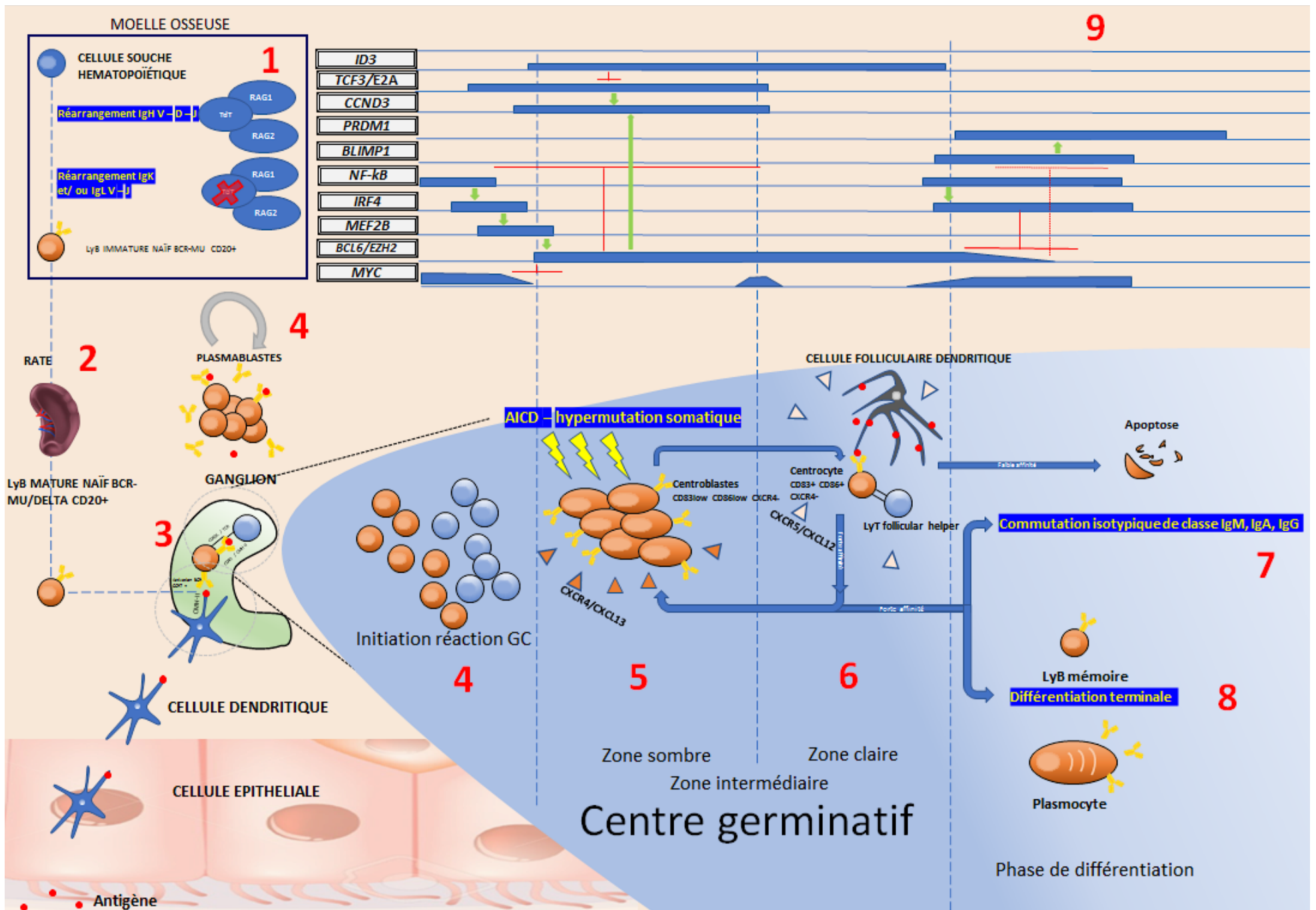
Ce processus est médié par l'enzyme AID au niveau de la zone sombre. Il induit de nombreuses cassures simple-brins de manière aléatoire sur certains locus géniques ciblés, dont les loci *IGH* et *IGL*. Le processus de réparation est aléatoire et amène à des mutations ponctuelles de ces mêmes loci, ou d'autres loci géniques amenant à une dysrégulation d'expression de ces mêmes gènes.

#### 1.2.2.5 Commutation de classe

La commutation de classe implique le centrocyte en aval de la réaction du centre germinatif. Également médiée en partie par AID, elle permet la spécialisation du LyB selon l'environnement cytokinique par réarrangement de l'istotype BCR. Les anticorps ainsi produits différeront selon une cause bactérienne (IgM), immuno-allergique ou parasitaire (IgE) ou virale (IgG).

#### 1.2.2.6 Différenciation terminale

Elle permet l'obtention de deux populations fonctionnelles. Le plasmocyte aura un rôle de sécrétion d'anticorps. Cette action est induite par l'épissage alternatif du locus IgH tronquant la portion membranaire du BCR, permettant une circulation systémique. Le LyB mémoire présente quant à lui une activité de surveillance immunitaire plus que sécrétoire (réponse immunitaire secondaire).

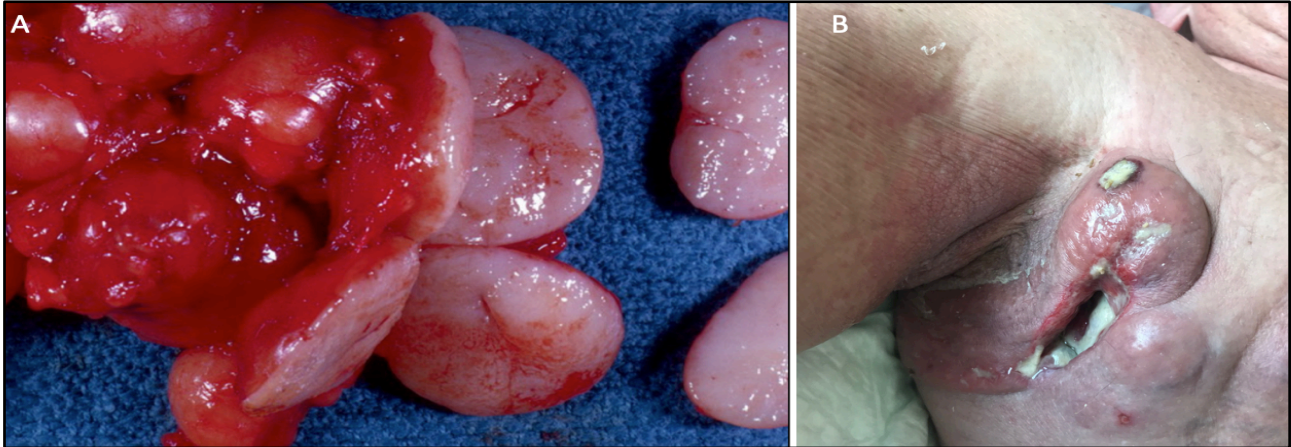


- (1) Le progéniteur commun lymphoïde subit dans la moelle osseuse un premier réarrangement du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (*IgH*), stade pro-B, puis des chaînes légères kappa ou lambda (*Igk* ou *Igλ*), stade pré-B. Cette étape est sous contrôle des enzymes RAG1/RAG2 et ARTEMIS. L'enzyme TdT augmente les possibilités recombinatoires par insertions aléatoires de nucléotides au stade pro-B. La perte d'expression de CXCR4 permet la circulation sanguine du LyB immature naïf.
- (2) Circulation et épuration splénique permettant une sélection négative des LyB anergiques / auto-réactifs ou avec réarrangement non fonctionnel, ainsi qu'une maturation locale (folliculaire ou marginale). Les LyB sont dits matures et naïfs.
- (3) Circulation sanguine puis lymphatique avec « homing » ganglionnaire par ligands/récepteurs spécifiques, et groupement des LyB pour formation du follicule primaire. Captation et présentation d'un antigène par les CPA (dont la cellule dendritique) au LyB puis au lymphocyte T CD4+ auxiliaire. Signaux de survie et de prolifération cellulaire par interaction BCR-antigène-TCR et CD40/CD40L. Première différenciation plasmablastique avec production d'une immunoglobuline IgM circulante de faible spécificité et prolifération clonale amenant au follicule secondaire, lieu de la réaction du centre germinatif (GC).
- (4) Phase initiale de la formation GC avec intense prolifération lymphocytaire B et T. Les lymphocytes B issus du follicule primaire et sans différenciation plasmablastique constituent la zone périphérique du centre germinatif (zone du manteau).
- (5) Le centre germinatif se scinde en trois parties : la zone sombre (DZ), la zone intermédiaire (ZI) et la zone claire (LZ). La zone sombre est un haut lieu de prolifération cellulaire (centroblastes), où se déroule la maturation d'affinité par hypermutation somatique médiée par AID (excision de bases, cassure simple-brin, réparation aléatoire par ADN polymérase). L'expression de CXCR4 avec affinité pour le CXCL13 permet le homing lymphocytaire dans la DZ.
- (6) La perte d'expression du CXCR4 et l'expression du CXCR5 (ligand CXCL12) permet la migration du LyB vers la LZ. Les LyB les plus affins pour l'antigène (centrocytes) seront positivement sélectionnés et ré-orientés soit vers la DZ au stade centroblaste pour un nouveau processus de maturation d'affinité, soit vers la région post-GC pour la différenciation terminale. Les centrocytes ne reconnaissant pas l'antigène présenté par les cellules folliculaires dendritiques sont éliminés par apoptose. A noter l'existence d'une zone intermédiaire marquée par la brève expression de *MYC*.
- (7) La commutation isotypique permet l'adaptation de l'immunoglobuline et du BCR au micro-environnement cytokinique via un réarrangement du locus IGH, médiée là encore par AICD. Les anticorps produits seront ainsi différents suivant le type de réponse immunitaire (IgM pour les infections bactériennes, IgE pour les infections parasitaires).
- (8) L'étape de différenciation terminale permet la sécrétion d'immunoglobulines (anticorps), par apparition d'un codon STOP tronquant les domaines d'attache transmembranaires. La cellule productrice de ces anticorps, le plasmocyte, sont relocalisés dans la moelle osseuse. D'autres centrocytes seront différenciés en cellules B mémoires circulantes, permettant une mise en contact ultérieure rapide de l'antigène connu.
- (9) La réaction GC est finement régulée par expression génique au sein du LyB. L'initiation de la réaction GC est soumise à l'expression de *MYC*, permettant une importante prolifération cellulaire. L'activité concomitante de NF-κB permet l'expression dans la zone sombre du facteur majeur de régulation GC, *BCL6*, via *IRF4* et *MEF2B*. *BCL6* entraîne l'inhibition de *MYC*. Les marqueurs de différenciation terminale que sont *BLIMP1/PRDM1* sont à ce stade bloqués. *EZH2*, modulateur épigénétique, est également exprimé, permettant une disponibilité de la chromatine et l'hypermutation somatique par AICD. La zone claire voit à nouveau une activité NF-κB qui entraînera soit l'orientation vers la différenciation terminale, soit une ré-entrée vers la DZ pour un nouveau cycle d'hypermutation somatique (avec brève re-expression de *MYC*), ou le cas échéant l'apoptose. L'expression de NF-κB active *IRF4* qui cette fois inhibe *BCL6*, permettant une sortie du CG et différenciation plasmocytaire par expression de *BLIMP1/PRMD1*. Flèche verte : activation ; T rouge : inhibition.

## 1.3 Classification biologique des LBDGC

### 1.3.1 Approche anatomo-pathologique

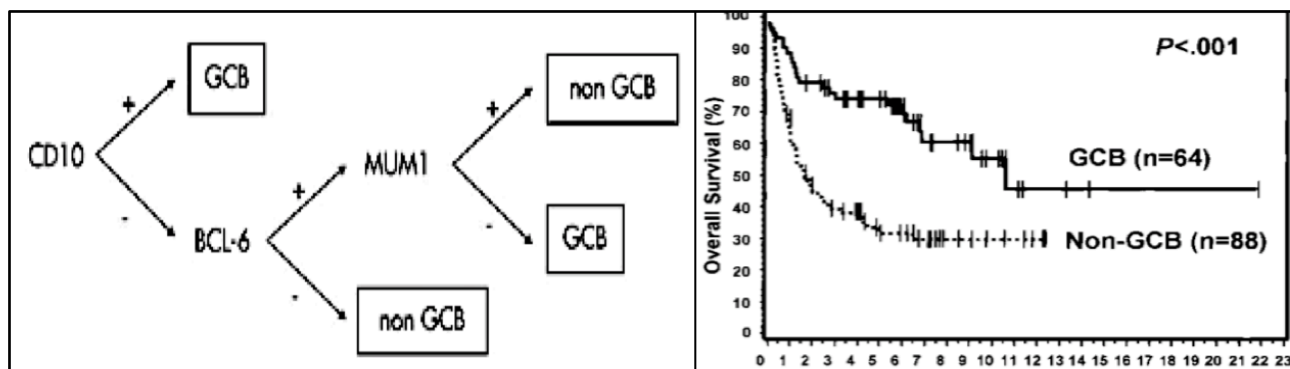
Le diagnostic de LBDGC est confirmé après analyse histologique et immuno-histochimique d'un prélèvement tumoral. Une relecture au sein du réseau de référence LymphoPath est favorisée. L'aspect microscopique classique est une prolifération tumorale avec une perte architecturale de la structure ganglionnaire ou d'organe par envahissement massif de LyB clonaux, associée ou non à de la nécrose et de la fibrose avec cellules en apoptose. Ces LyB tumoraux se présentent sous forme de grandes cellules au noyau dont la taille est égale à celle des macrophages ou deux fois supérieure à celle des lymphocytes normaux. L'atteinte médullaire, quand recherchée, est retrouvée dans 20% des cas, et objective un envahissement soit par de grandes cellules B, soit par de petits lymphocytes atypiques. Trois variants morphologiques sont historiquement décrits : centroblastique (le plus commun), immunoblastique et anaplasique, se différenciant par leur taille de noyau, leurs nucléoles, leur rapport nucléo-cytoplasmique, leur densité de chromatine et leur cytoplasme.



**Figure 2:** (A) Aspects macroscopiques d'adénopathies de LBDGC; (B) Atteinte ganglionnaire axillaire de LBDGC

L'immunophénotypage apporte un complément indispensable au diagnostic. Par affinité aux marqueurs de surface cellulaire d'anticorps marqué sur lames décolorées (immuno-histochimie) ou sur matériel liquide (cytométrie en flux), la combinaison de marquage positif permet une orientation diagnostique rapide à partir de biopsies de petite taille. Il ne renseigne pas sur l'architecture tumorale. Les LBDGC expriment de marqueurs pan-B tels que le CD19, le CD20, le

CD22, PAX5, BOB1 et OCT2. La majorité des cas expriment une immunoglobuline de surface, souvent IgM. Les marqueurs T sont négatifs. L'index de prolifération cellulaire Ki67 est généralement élevé (>40%, parfois >90%). Le CD5 est exprimé dans 10% des cas et impacte négativement le pronostic. Le CD30 est positif dans 10% des cas. La combinaison du CD10, de BCL6 et de MUM1 selon l'algorithme de Hans permet d'étayer le diagnostic en deux entités : LBDGC issus du centre germinatif (LBDGC-GC) ou LBDGC non-GC.



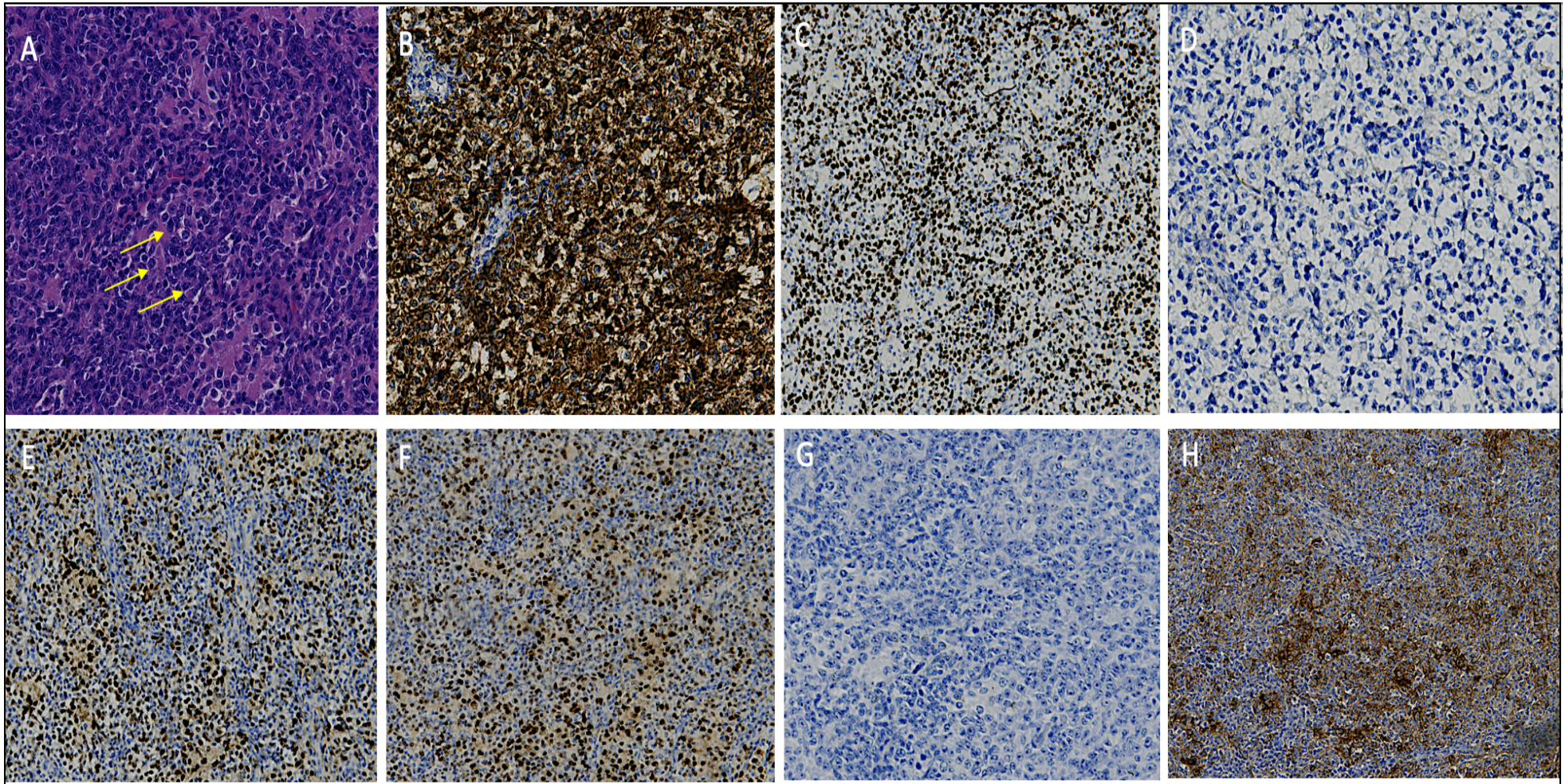
**Figure 3:** (A) Algorithme de Hans associant l'expression du CD10, de BCL6 et MUM1 (seuil : 30%) ; (B) Survie globale (année) selon la dichotomie GC/non-GC par IHC

Le diagnostic de LBDGC peut être mise en défaut en cas de prélèvement nécrotique, de LBDGC B riche en lymphocyte T, ou encore d'entités inclassables frontières entre des LBDGC primitif du médiastin (PMBL), de la zone grise, des formes de haut grade (HGBCL) ou de Burkitt (BL).

La classification de l'OMS 2008 distingue différents variants de LBDGC :

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- LBDGC, NOS</li> <li>- LBDGC riche en T</li> <li>- LBDGC primitif du médiastin (PMBL)</li> <li>- LBDGC type jambe</li> <li>- LBDGC primitif du système nerveux central (LBDGC-SNC)</li> <li>- LBDGC sur inflammation chronique</li> <li>- LBDGC non classable, intermédiaire entre le BL et le LBDGC-NOS</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- LBDGC EBV+ du sujet âgé</li> <li>- LBDGC intra-vasculaire</li> <li>- LBDGC ALK+</li> <li>- LBDGC associé à l'HHV8 / maladie de Castleman</li> <li>- LBDGC des séreuses</li> <li>- Lymphome de Burkitt (BL)</li> <li>- LBDGC non classable, intermédiaire entre le HL et le LBDGC-NOS</li> </ul> |
|---|--|

La distinction des phénotypes ABC, GC, PMBL par modèles d'expression génique (Nanostring – nCounter®) est recommandée. La classification de l'OMS 2016 apportent des précisions sur les formes frontières Burkitt-like abordées dans la section cytogénétique.



**Figure 4** Histologie et IHC d'un LBDGC non-GC (A) Coloration HES : envahissement massif par de grandes cellules au cytoplasme abondant, perte architecturale complète ; (B) marquage CD20 intense (marron) ; (C) marquage Ki67 intense (70%) ; (D) marquage CD10 négatif ; (E) marquage MUM1 positif focal (marron) ; (F) marquage BCL6 positif intense (70%)(marron) ; (G) marquage CD15 négatif ; (H) marquage CD30 positif faible (30%).



### 1.3.2 Approche Cytogénétique

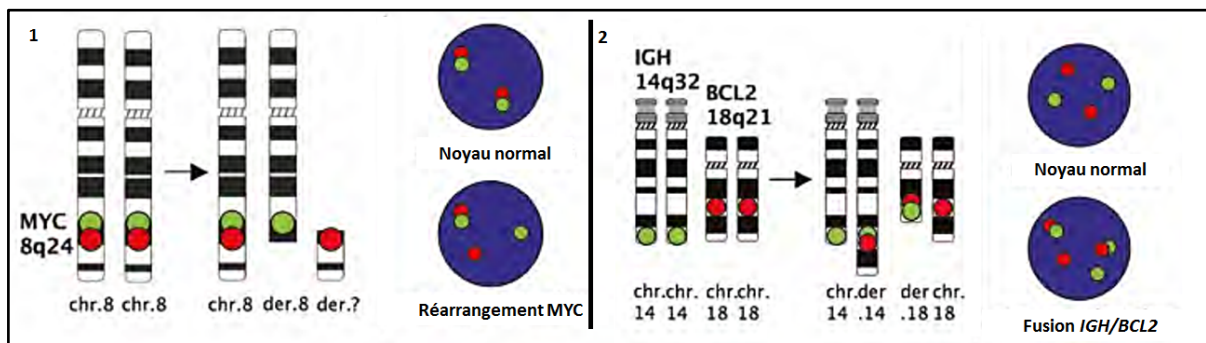
Outil central dans la prise en charge des LBDGC, la cytogénétique permet la mise en évidence de remaniements chromosomiques dits primaires (communs à la population clonale) et secondaires (évolution sous-clonale). Le caryotype conventionnel et la FISH métaphasique ou interphasique sont les examens de référence. Ils sont réalisés à partir de matériel tumoral frais prélevé en milieu stérile, avec mise en culture courte (17-24h). Ils recherchent des anomalies chromosomiques de structure (délétion, insertion, dérivé, réarrangement) ou de nombre (trisomie, monosomie, tétrasomie). Certaines anomalies récurrentes observées dans les LBDGC sont recherchées en cas de suspicion clinique.

#### 1.3.2.1 Caryotype conventionnel

Il demeure le seul examen pangénomique de routine, et permet une vision de l'ADN sous sa forme la plus condensée, les chromosomes, sous un délai court. Il est réalisé en bandes R ou G selon la méthode de dénaturation. Il est communément admis qu'un minimum de vingt mitoses est nécessaire pour rendre un caryotype sans anomalie. Certaines anomalies sont observées de manière récurrentes dans les LBDGC. Le locus *IGH* (14q32) est le plus fréquemment réarrangé. La translocation t(14 ;18)(q31 ;q32) juxtapose le gène *BCL2* avec le promoteur d'*IGH* et est retrouvée dans 40% des formes GC. *MYC* (8q34) est un partenaire classique d'*IGH*, d'*IGK* ou d'*IGL*, et définit les formes double- ou triple-hits en cas de réarrangement associé de *BCL2* et/ou *BCL6* (3q27). D'autres évènements impliquent les loci des chaînes légères kappa (2q12) ou lambda (22q11). Bien qu'aucune anomalie ne soit spécifique du phénotype cellulaire ou COO, les pertes du locus impliquant *PTEN* (10q23) orientent vers une forme GC, et les anomalies des loci contenant *PRDM1* (6q21) ou *FOXP1* (trisomie 3) vers un LBDGC-ABC. Des remaniements en 9p24 (*PD1/PD-L1/JAK2*) ou de 19p13 (*CIITA*) orientent vers un PMBL. Les pertes homo- ou hétérozygotes en 17p13 impliquant *TP53* sont retrouvées dans environ 20% des LBDGC.

### 1.3.2.2 FISH

La fluorescence par hybridation in situ (FISH) permet la détection de réarrangement chromosomique ciblé par marquage coloré via une sonde spécifique du locus. Ces sondes utilisent une stratégie de signal splité (réarrangement d'un gène ciblé, sans connaître le partenaire) ou de double fusion (translocation réciproque). La FISH est réalisée sur métaphase ou interphase. Les réarrangements habituellement recherchés dans les LBDGC impliquent *TP53*, *MYC*, *BCL2*, *BCL6* et les loci d'*IG*.



**Figure 5** Principe de la FISH. 1 : sonde break-apart avec signal splité par réarrangement MYC (1 signal rouge, 1 signal vert, 1 signal fusion); 2: Signal de fusion IGH/BCL2 (2 signaux rouge/vert)

La classification OMS 2016 intègre les données de FISH en incluant les réarrangements des loci *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6*. Leur présence définit un lymphome de haut grade (HGBCL), de présentation clinique agressive et associé à une moindre sensibilité à l'immunochimiothérapie. Les HGBCL inclus les anciennes formes double- ou triple-hits (*cf.* IHC). Les variants histologiques blastoïdes sans réarrangement de *MYC* sont classés en HGBCL, NOS.

### 1.3.3 Approche moléculaire

Les données transcriptomiques ont conduit à la distinction de plusieurs sous-types moléculaires de LBDGC. Celles-ci sont obtenus par puces à ADN, par l'IHC et les mesures d'expressions géniques par NanoString (Lymph2Cx).

Les **LBDGC issus du centre germinatif (LBDGC-GC)** représentent près de 40% des formes diagnostiquées. La survie à 3 ans sous chimiothérapie associée au rituximab est proche de 80%<sup>22</sup>. Outre la translocation t(14;18)(q21;q32), des anomalies d'*EP300* et *CREBBP* (22%),

de *PTEN* (10%) et les translocations de *BCL6* sont des évènements récurrents. Les HGBCL avec réarrangements de *MYC*, *BCL2* et/ou *BCL6* sont le plus souvent de phénotype GC.

Les **LBDGC de cellularité B activé (LBDGC-ABC)** représentent 40% des cas, avec une prévalence plus élevée de sujets âgés<sup>22</sup>. La présentation clinique est agressive (atteinte oculo-cérébrale, testiculaire, mammaire, âge avancé) et le pronostic péjoratif (OS à 3 ans : 45%<sup>22</sup>) comparativement aux formes GC sous immuno-chimiothérapie. Le profil d'expression génique est en faveur d'une origine post centre germinatif, avec blocage de maturation au stade plasmocytaire. La voie Nf-κB est suractivée (mutations de *MYD88*, *CARD11*, délétions de *CDKN2A/B*). La signalisation BCR est amplifiée via divers mécanismes (mutation des corécepteurs *CD79A/CD79B*<sup>24</sup>, défaut d'apoptose du BCR). Les formes LBDGC-DE/-TE sont associées au phénotype ABC.

Les **LBDGC primitifs du médiastin (PMBL)**, d'incidence plus faible (5-10% des LBDGC), concernent le sujet jeune à prédominance féminine. L'atteinte clinique est remarquable par une atteinte médiastinale antérieure isolée, rarement disséminée et exceptionnellement associée à un envahissement médullaire. L'activation de la voie JAK-STAT, un échappement à la surveillance immunitaire, une hyperactivité de la voie Nf-κB et de la voie interféron via *IRF4* sont les principaux mécanismes biologiques intriqués<sup>25</sup>. Ce profil biologique présente des caractéristiques communes avec les lymphomes de Hodgkin classiques.

Les **LBDGC non classés ou UC**, sans profil génomique et transcriptomique spécifique.

#### 1.3.3.1 Ère pré-séquençage

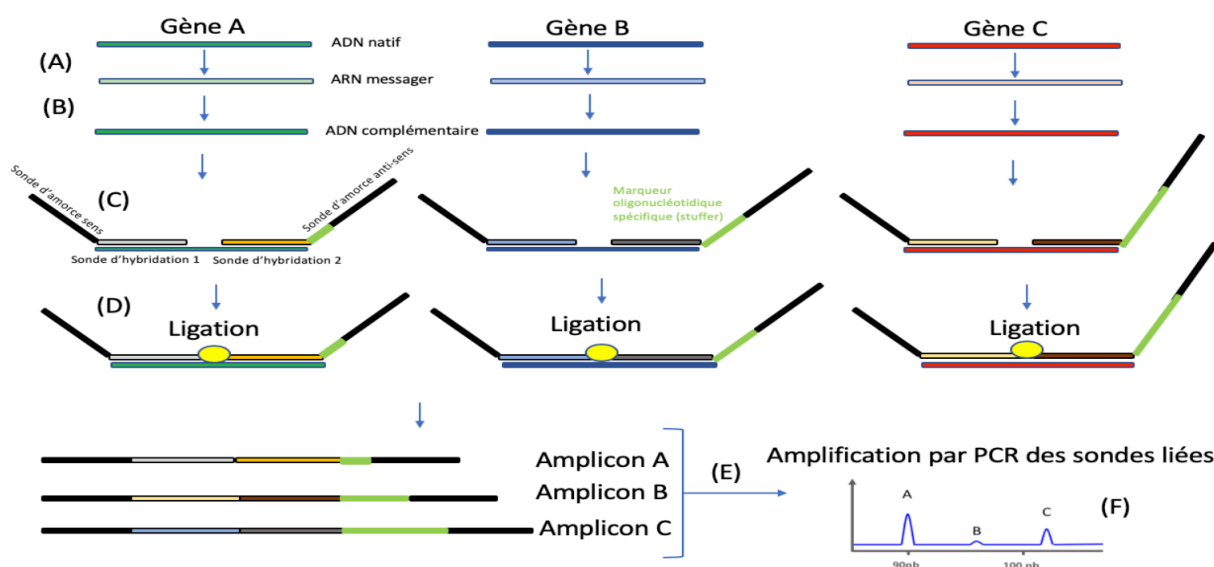
Au début des années 2000, les premières classifications moléculaires de LBDGC ont été permises par l'utilisation de micro-puces à ADN (Affymetrix). Se basant sur des modèles d'expression génique, elles ont permis une première détermination de la COO (GC/ABC). Le principe reposait sur la pose sur plaque solide de millions de fragments d'ADN complémentaire (oligonucléotides) marqués spécifiquement. L'impact pronostique péjoratif du profil ABC était pour la première fois avancé, et confirmé sous R-CHOP. Le sous-type PMBL sera déterminé selon le même principe quelques années plus tard. Difficilement applicable en routine clinique, cette méthode s'est vue supplantée par les algorithmes d'IHC, dont celui de Hans.

La technologie nCounter® - Nanostring est une technique d'analyse quantitative de transcrit d'ARN, s'affranchissant de l'étape de rétrotranscription requise pour les puces à ADN. La

détermination de COO se base sur un modèle bayésien (Lymph2Cx) à partir de l'expression différentielle de 21 gènes. Elle demeure également complexe à appliquer en laboratoire de routine.

### 1.3.3.2 RT-MLPA

La RT-MLPA permet la quantification de l'expression d'ARN à partir d'ADN complémentaire obtenu par rétro-transcription. Elle permet l'analyse transcriptomique d'un tissu donné à un instant donné. La faible taille des oligonucléotides d'amorces permet de travailler sur des ARN de qualité médiocre. Le développement de la RT-MLPA au sein de l'U1245 a permis une approche transcriptomique simplifiée des LBDGC. En 2015 sont rapportés les premiers essais concluant avec une corrélation de COO superposable au *gold-standard* des puces à ADN<sup>26</sup>. A partir d'un panel de 14 gènes ajusté secondairement à 21 gènes, un modèle bayésien a été développé à partir d'une cohorte de 50 LBDGC. Avec une corrélation d'environ 85% entre l'IHC et les puces ADN Affymetrix, la RT-MLPA confirmait sa puissance diagnostique et pronostique



**Figure 6** Principe de la RT-MLPA. (A) Transcription d'un gène par une ADN polymérase physiologique ; (B) Rétro-transcription par une enzyme de synthèse ; (C) Hybridation à l'ADN complémentaire de deux sondes oligo-nucléotidiques ; (D) Ligation des deux amorces ; (E) Amplification par PCR des amplicons obtenus ; (F) Migration des amplicons sur séquenceur capillaire, selon le poids moléculaire des stuffer, analyse des pics de fluorescence.

sur des effectifs plus larges, avec un impact de survie négatif pour le groupe ABC, en faisant une technique de référence selon la classification OMS de 2016. La seconde version permettait le distinguo des formes PMBL et non-PMBL.

### 1.3.3.3 Séquençage haut débit

Les premières données de séquençage à la recherche de mutation somatique remontent aux années 90 par la technique de Sanger. Avec des premiers travaux remontant à 2011<sup>27</sup>, le développement du séquençage haut débit (NGS) a permis de nombreuses avancées dans la compréhension biologique de la lymphomagénèse. Le principe de cette technique repose sur la détection de mutations ponctuelles à partir d'ARN (RNA-Seq) ou d'ADN (WGS, WES). La génération aléatoire de nombreuses séquences d'ADN courtes (bibliothèque) est suivie d'une étape d'amplification par PCR puis d'un traitement bio-informatique des données brutes. Le NGS est applicable sur matériel congelé, FFPE, ou plasma circulant. Les techniques de constitution de bibliothèques et les méthodes de séquençage varient suivant les modèles de séquenceurs (IonTorrent – Life Technologies®, MiSeq – Illumina®). Le rendu d'une anomalie somatique requiert de nombreux critères analytiques (couverture de base, profondeur de séquençage) ainsi qu'une validité biologique.

## 1.4 Voies biologiques impliquées dans la lymphopoïèse et la lymphomagénèse

Le processus de lymphopoïèse est complexe et engage la régulation d'expression de nombreux gènes au cours des différentes étapes. Ce chapitre vise à rappeler les principales voies biologiques impliquées à la fois dans la lymphopoïèse et lymphomagénèse, avec une description succincte de l'activité et rôle des différents gènes et protéines.

### 1.4.1 Voie Nf-κB

Le facteur transcriptionnel Nf-κB est un régulateur intracellulaire et nucléaire central impliqué dans l'adaptation immunitaire en réponse aux stimuli extérieurs (stress oxydatif, inflammation...). Son activité est régie par des kinases d'une part activatrices sous formes d'homo- ou hétéro-dimères (p65, RelB, c-Rel, p100/p52, p105/p50) avec domaine TAD (trans-activator domain), et d'autre part inhibitrices (« inhibitor of Nf-κB » ou IκBs, IκBα, IκBβ, IκBe, kinases précurseurs). Deux grandes voies se distinguent dans l'activation de NF-κB : la voie canonique, rapide, activée par les TLR et cytokines pro-inflammatoires, et la voie non canonique, lente, spécifique aux LyB déclenchée par des ligands de la famille TNF. Nf-κB joue un rôle central dans la réaction GC. Inhibée dans la zone sombre, elle est fortement activée dans la zone claire et permet l'interaction des cellules TFH avec les cellules dendritiques folliculaires via le CD40/CD40L et le BCR pour aboutir à la différenciation en cellules B mémoires ou plasmocytes. Plusieurs évènements oncogéniques aboutissent ainsi à une dysrégulation de Nf-κB, principalement dans les LBDGC-ABC<sup>28</sup>. La voie canonique induit une hyperactivité chronique du signal BCR par mutation des motifs ITAM du co-récepteur *CD79A/B* (20%), par mutations des exons du domaine hélice-hélice de *CARD11* (9%), par la mutation hot-spot *MYD88<sup>L265P</sup>*, par l'excès d'activité des protéines IRAK1/IRAK4, par des mutations/délétions de *TNFAIP3* régulant l'activité inhibitrice de A20, et par des mutations ou altérations d'expressions de gènes plus rares (*TRAF2*, *RANK*, *TRAF5*). La localisation nucléaire de la protéine p52 dans 30% des LBDGC-ABC et 10% des LBDGC-GC atteste d'anomalies de la voie non canonique<sup>29</sup>. Les mutations de *PRDM1/BLIMP1* bloquent la différenciation terminale plasmocytaire, conservant le phénotype B activé après réaction GC. Enfin, *BCL2* est amplifié dans 30% des formes ABC. La voie Nf-κB est également régulée par des ARN non-codants.

Gène	Locus	Protéine	Activité biologique	COO	Anomalie/mutation	Hot-spot	Thérapie	Référence
<b>MYD88</b>	3q22	MYD88	Localisation intra cytoplasmique Couplée au TLR Phosphorylation TRAF6/TAK1 via IRAK4/1, activation voie NF-κB	ABC (20-40%)	Gain de fonction (Activité IRAK1/4) Mutations différentes du hot-spot dans les formes GC Co-occurrence avec mutations <i>CD79B</i> (10%)	L265P	Sensibilité à l'Ibrutinib	Lee et al, 2016 Miao et al, 2019
<b>TNFAIP3</b>	6q23	A20	Ubiquitine-ligase Répresseur intra-cellulaire NF-κB	ABC	Perte de fonction par perte de copie (hétérozygote) Association aux mutations de <i>MYD88</i>		Résistance aux inhibiteurs du BTK/PI3K/NF-κB	Wenz et al, 2018
<b>CARD11</b>	7p11	CARD11	Constituant complexe CBM Activateur NF-κB	GC/ABC 7-18%	Gain de fonction Perte du rétro-contrôle négatif	E425K	Résistance aux BTKi/PI3Ki	Lenz et al, 2008
<b>PRDM1</b>	6q21	PRDM1	Différentiation plasmocytaire en association à BLIMP1	ABC	Perte de fonction Inactivation bi-allélique			Pasqualucci et al, 2018 Mia et al, 2019
<b>IRF4</b>	6p25	IRF	Différentiation plasmocytaire (post GC)	ABC	Gain de fonction		Lenalidomide	Pasqualucci et al, 2018 Salaverria et al, 2011
<b>PIM1</b>	6p21	PIM1	Pro-oncogène Régulation apoptose	ABC	Gain de fonction Hyperexpression Cible AID	S97 P81 E79	Pan PIM-kinase inhibiteur	Peters et al, 2016 Dubois et al, 2016

**Tableau 4** Gènes impliqués dans la voie NF-κB (liste non exhaustive)

### 1.4.2 Voie du BCR

Le BCR est le récepteur central du LyB impliqué dans la transduction d'un signal émanant du contact avec un antigène. Il assure le développement, la survie et la prolifération du LyB. Ce signal peut être « tonique » ou « chronique ». La voie tonique, indépendante de l'antigène, est suractivée dans les formes GC. Elle permet le maintien de l'homéostasie B cellulaire en stimulant la voie PI3K/AKT/mTOR. Celle-ci intervient dans la signalisation intracellulaire et joue un rôle central dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse. La voie chronique, dépendante de l'antigène est impliquée dans les formes ABC. Elle entraîne l'internalisation du BCR et l'amplification clonale du LyB par activation des voies PI3K, Nf-κB et MAP-kinases<sup>24</sup>. Le segment de chaîne lourde IgVH4 – 34 est retrouvé muté dans 31% des formes ABC<sup>30</sup>, et celui-ci est reconnu comme ayant une forte interaction avec les résidus glucidiques de nombreuses glycoprotéines autologues. Les mutations des sous-unités *CD79A* et *CD79B* sont l'apanage des formes ABC et reconnues comme événements oncogéniques

précoces. Elles entraînent une inhibition du signal tyrosine kinase LYN inhibiteur du BCR. Les mutations impliquant le récepteur BTK, co-récepteur du BCR, participe à l'activation de NF- $\kappa$ B. En aval du signal BCR, les délétions de *PTEN* sont retrouvées dans 10% des cas, réprimant l'activité inhibitrice sur la voie PI3K. Le gène *MIR17HG*, codant pour un miARN inhibiteur de *PTEN*, est amplifié dans 8% des formes GC.

Gène	Locus	Protéine	Activité biologique	COO	Anomalie/mutation	Hot-spot	Thérapie	Référence
<b><i>CD79A/B</i></b>	19q13/ 17q13	CD79A/B	Co-récepteur BCR Transduction du signal par phosphorylation motif ITAM	ABC	Mutation gain de fonction par excès d'activité ITAM (activité « chronique » BCR) Association aux mutations de MYD88	Y196	Everolimus (NCT018544606) PKCi (NCT01402440)	Xu et al, 2017 Kraan et al, 2013
<b><i>ID3</i></b>	1p36	ID	Inhibition de facteurs de transcriptions	BL	Mutation perte de fonction Perte d'inhibition, activation de la phase G1/S Association aux mutations de TCF3			Schmitz et al Dubois et al
<b><i>TCF3</i></b>	19p13	TCF3/E2A	Cycle cellulaire	BL	Perte de fonction			Rohde et al, 2017
<b><i>PLCG2</i></b>	16q24	PLCG2	Transduction du signal trans membranaire Activation voie NF- $\kappa$ B		Gain de fonction		BTK inhibiteur (ibrutinib)	Lampson et al, 2018
<b><i>ITPKB</i></b>	1q42	ITPKB	Fonction cellulaire B		Perte de fonction Perte de réponse au signal BCR			Dubois et al, 2016
<b><i>BTK</i></b>	Xq22	Bruton tyrosine kinase	Maturation cellulaire B Inflammasome		Gain de fonction		BTK inhibiteur (ibrutinib)	Singh et al, 2018

**Tableau 5** Gènes impliqués dans la voie BCR (liste non exhaustive)

### 1.4.3 Voie NOTCH

Les protéines NOTCH1 et NOTCH2 sont des récepteurs transmembranaires possédant un domaine intracellulaire clivable (PEST) qui, après migration nucléaire, régule la transcription de facteurs impliqués dans la voie NF- $\kappa$ B, *MYC* et les interactions intercellulaires. Les mutations impliquent le domaine PEST avec dysrégulation de son activité. *PBXW7*, *SPEN* et *DTX1* sont des gènes codant pour des protéines régulatrices inhibitrices de NOTCH, et sont cibles de mutations ponctuelles avec perte de fonction.



Gène	Locus	Protéine	Activité biologique	COO	Anomalie/mutation	Hot-spot	Thérapie	Référence
<b>NOTCH1</b>	9q34	NOTCH1	Protéine transmembranaire	ABC 6%	Mutation avec gain de fonction du domaine PEST	L2482		Arruga et al, 2018 Gu et al, 2016
<b>NOTCH2</b>	1p12	NOTCH2	Maturation cellulaire B, communication intercellulaire	UC 21%	Perte de fonction inhibitrice de <i>SPEN</i> et <i>DTX1</i>	R2400		Lee et al, 2018

**Tableau 6** Gènes impliqués dans la voie NOTCH (liste non exhaustive)

#### 1.4.4 Voie de l'apoptose et du cycle cellulaire

Parmi les protéines régulatrices de l'apoptose, *BCL2* est l'élément central durant la réaction GC. Une activité constitutive de cette dernière contribue à un défaut d'apoptose de lymphocytes non fonctionnels. Sa sur-expression est le fruit de mécanismes oncogéniques divers. Les translocations t(14 ;18)(q32 ;q21) sont retrouvées dans environ 40% des formes GC. La juxtaposition du promoteur *IGH* aboutit à l'hyperactivité de *BCL2*. Les formes ABC voient en revanche l'activité de *BCL2* augmentée par amplification ou gains de copie du gène.

Les anomalies de *TP53*, de mauvais pronostic, sont impliquées dans 8 à 24% des LBDGC. Les délétions homozygotes ou les mutations ponctuelles sont les mécanismes les plus fréquents. Des régions non codantes 3'UTR, cibles de miARNs, sont également sièges de mutations ponctuelles.

La dérégulation de *MYC*, contribue à une perte d'homéostasie de l'immunopoïèse, par plusieurs mécanismes. La surexpression de la protéine peut être le fruit d'une translocation *MYC* avec un promoteur *IG* (*IGH*, *IGL*, *IGK*) dans 50% des cas, ou non-*IG* (partenaire inconnu). L'expression de *MYC* est ainsi augmentée, plus encore en cas de partenaire *IG*. Les amplifications ou gains de copie de *MYC* sont retrouvés dans 11 à 30% des LBDGC, indépendamment de la COO. De mécanisme similaire à *TP53*, certaines régions 3'UTR seraient sujettes aux mutations empêchant la répression par certains miARNs.

Gène	Locus	Protéine	Activité biologique	COO	Anomalie/mutation	HS	Thérapie	Référence
<b>BCL2</b>	18q21	BCL2	Protéine anti-apoptotique Inhibition par BCL6 en phase GC	GC (15-25%) /ABC	Gain de fonction par translocation t(14;18)(q32;q21) pour les GC, amplification MYC+BCL2+/-BCL6 pour les ABC, réarrangement avec MYC (HGBCL), anomalie de la cible BCL6 ; Cible de AHSM  MYC-BCL2 réarrangés (HGBCL)		BCL2-inhibiteur (Vénétoclax)	Pasqualucci et al, 2018 Miao et al, 2019
<b>BCL6</b>	3q27	BCL6	Recrute le complexe SMRT-NCOR-HDAC3  Répresseur transcriptionnel de la phase GC (LZ et DZ) par inhibition CDKN2A/B, régulation apoptose (p53), blocage de la différenciation plasmablastique (BLIMP1) et inhibition BCL2	ABC/GC	Gain de fonction par translocation IG ou non-IG, par mutation exon 1 (non codant) et perte de régulation de IRF4, par mutation inactivatrice de CREBBP/EP300 (30%), par mutation activatrice de MEF2B (15%), par inactivation de FBXO11 (5%)			Pasqualucci et al, 2018
<b>CDKN2A/B</b>	9p21	p16INK4A p14ARF	Régulation cycle cellulaire (p14ARF active p53)	ABC 30%/20%	Perte de fonction  Délétion homozygote			Pasqualucci et al, 2018 Karubee et al, 2017
<b>CCND3</b>	6p21	CCND3	Cycle cellulaire via CDK4/6	BL HGBCL	Perte de fonction			Rohde et al, 2017 Schmitz et al, 2011
<b>FOXO1</b>	13q14	FOXO1	Co-maintien phase GC avec BCL6	ABC/GC 10%	Gain de fonction par perte du site d'inhibition activité PI3K/AKT/mTOR			Pasqualucci et al, 2018
<b>GNA13</b>	17q24	Gα13	Réaction GC  Migration cellulaire	GC	Perte de fonction  Défaut maturation GC et perte du homing GC  Association aux mutations BCL2			Healy et al, 2016
<b>MFHAS1</b>	8p23	MFHAS1	Pro-oncogène	PMBL	Gain de fonction  Partenaire IGH  Mécanisme lésionnel inconnu			Dubois et al, 2106
<b>MYC</b>	8q24	MYC	Prolifération cellulaire  Phase GC (DZ, IZ)	GC/ABC 4-14% (mut)  11-30% (amp)	Gain de fonction par réarrangement avec IG ou non-IG, amplification, mutations  MYC-BCL2 réarrangés (HGBCL)	T58	PET inhibiteur (NCT03255096)	Pasqualucci et al, 2018 Miao et al, 2019
<b>TP53</b>	17p13	p53	Suppresseur de tumeur (multiples régulations cycle cellulaire, apoptose)	GC/ABC C 20%	Perte de fonction par SNV (80%) – Faux-sens (10%)  Exons 5 – 8  Perte d'hétérozygotie  Protéine mutante  Mutation MDM2	R273H L194F R175H E285K	Transcription virale  Inhibition mutant  Ciblage protéine régulatrice (MDM2)	Monette et al, 2013 Levine et al, 2019
<b>XPO1</b>	2p15	XPO1	Transit nucléocytoplasmique de protéines centrales (p53, BRCA1, nucléophosmine)	PMBL	Perte de fonction	ER71K	Selinexor (NXT0314788 5)	Camus et al, 2017 Luo et al, 2018 Jardin et al

**Tableau 7** Gènes impliqués dans la voie de l'apoptose et du cycle cellulaire (liste non exhaustive)

### 1.4.5 Voie de l'épigénétique

L'épigénétique est la régulation complexe de l'expression génique sans altération de la séquence nucléotidique. De nombreux gènes sont impliqués dans la condensation de la chromatine et la modulation des histones, inhibant ou activant certaines régions cibles de l'ADN. Les mutations somatiques récurrentes impliquant des protéines de l'épigénétique (méthyltransférase, acétyltransférase, histone) sont retrouvés dans 80% des cas de LBDGC. Ces évènements surviennent de manière précoce durant la phase GC.

Gène	Locus	Protéine	Activité biologique	COO	Anomalie/mutation	HS	Thérapie	Référence
<i>ARID1A</i>	1p36	ARID1A	Formation nucléosome Modulation chromatine		Perte de fonction		HDAC inhibiteur	Pasqualucci et al, 2018
<i>CREBBP</i>	16p13		Acétyl transférase activant p53 et inhibant BCL6 et CIITA	GC 25%	Perte de fonction par insertion sur domaine AT Haplo-insuffisance	R144 6	HDAC inhibiteur	Pasqualucci et al, 2018
<i>EP300</i>	22q13	EP300	Acétyltransférase (AT) associée à CREBBP	GC 5%	Perte de fonction par insertion sur domaine AT		HDAC inhibiteur	Pasqualucci et al, 2018
<i>EZH2</i>	7q36	EZH2	Épigénétique Méthylation histone 3 lysine 27 (H3K27) : répression transcriptionnelle	GC (20%)	Gain de fonction (mutation du domaine SET) excès de tri-méthylation H3K27 et répression transcriptionnelle Association aux mutations <i>KMT2D</i> et <i>CREBBP</i>	Y646	Agent hypométhylant (Tazemetostat) NCT01897571 me3/me2 GSK343, GSK126	Dubois et al, 2016
<i>KMT2D</i>		KMT2D (MLL2)	Histone méthyltransférase (H3K4)	GC/AB C 30%	Perte de fonction, protéine tronquée (mutation biallélique)			Pasqualucci et al, 2018
<i>MEF2B</i>	19p13	MEF2B	Facteur de transcription Expression phase GC	GC	Gain de fonction Activation constitutive de BCL6			Ying et al, 2013 Miao et al, 2019

**Tableau 8** Gènes impliqués dans la voie de l'épigénétique (liste non exhaustive)

### 1.4.6 Voie de l'immunité et du microenvironnement tumoral

Soixante pour cent des LBDGC n'expriment pas le CMH de classe I (CMH-I), induisant un échappement immunitaire médié par les lymphocytes T. Le CMH-I est rendu anergique par des anomalies de *B2M* avec perte d'expression, plus fréquentes dans les LBDGC-GC (29%/15%, GC/ABC), ou sous-exprimé par des remaniements épigénétiques. Souvent

associées aux mutations de *CD58*, les anomalies de *B2M* sont des évènements tardifs reflétant les mécanismes d'échappement de la cellule tumorale au système immunitaire.

Le CMH-II est sous-exprimé dans 50% des LBDGC, et implique *CIITA*, sujet à des réarrangements chromosomiques ou à des mutations aberrantes par l'enzyme AID. La pérennité de la cellule tumorale au sein du microenvironnement est en outre favorisée par la sur-expression ou les remaniements du gène *PD-1/PD-L1* observés dans 27% des PMBL et 6% des LBDGC-ABC.

Le maintien des centrocytes et centroblastes au sein du centre germinatif est indispensable à leur survie, et est permis par les interactions de protéines de surface et leurs ligands environnementaux respectifs (couples *CXCR4/CXCL13* et *CXCR5/CXCL12*). Des anomalies de la protéine Gα13 (codé par *GNA13*) amènent à la perte de ce « homing » germinatif et une dissémination tumorale via perte d'expression de *CXCL12*.

Gène	Locus	Protéine	Activité biologique	COO	Anomalie/mutation	HS	Thérapie	Référence
<b><i>B2M</i></b>	15q21	B2M	CMH classe I	GC>ABC 29%	Perte de fonction Déletion homozygote			Pasqualucci et al, 2018 Cao et al, 2016
<b><i>CD58</i></b>	1p13		CMH classe I	ABC>GC 68/32%	Échappement immunitaire LyT Mutations <i>B2M</i> et <i>CD58</i> associées		Immunothérapie	
<b><i>CIITA</i></b>	16p13	CIITA	CMH classe II	PMBL GC>ABC 20/10%	Perte de fonction			Mottok et al, 2015 Pasqualucci et al, 2018
<b><i>TNFRSF14</i></b>	1p36	HVEM	Réaction GC	GC 30%	Perte de fonction			Boice et al, 2016 Pasqualucci et al, 2018
<b><i>CXCR4</i></b>	2q22	CXCR4	Migration cellulaire Interaction micro-environnement		Gain de fonction,			

**Tableau 9** Gènes impliqués dans la voie du microenvironnement et de l'immunité (liste non exhaustive)

#### 1.4.7 Voie des MAP-kinases

L'activation de la voie des MAP-kinases – ERK est sous l'activité indirecte du BCR via *PKCβ*. Les mutations ciblant cette voie sont le plus souvent gains de fonction, et touchent les gènes *KRAS*, *BRAF* et *MAP2K1*.

Gène	Locus	Protéine	Activité biologique	COO	Anomalie/mutation	Hot-spot	Thérapie	Référence
<b>BRAF</b>	7q34	B-RAF	Prolifération cellulaire Voies RAS/MAP/ERK kinases	GC 3-6%	Gain de fonction	V600E	BRAF inhibiteur	Dubois et al, 2016

**Tableau 10** Gènes impliqués dans la voie des MAP-kinases (liste non exhaustive)

### 1.4.8 Voie JAK-STAT

Des anomalies moléculaires de la voie JAK-STAT orientent vers un PMBL. Les mutations de *STAT6* et *SOCS1* induisent un défaut de dégradation protéosomique et activent de manière constitutive cette même voie. En outre, les remaniements du locus 9p impliquant *PD-1* (gène de mort cellulaire programmée) sont fréquemment rencontrés.

Gène	Locus	Protéine	Activité biologique	COO	Anomalie/mutation	Hot-spot	Thérapie	Référence
<b>SOCS1</b>	16p13	SOCS	Gène suppresseur de tumeur	PMBL	Perte de fonction inhibitrice			Schif et al, 2013
<b>STAT6</b>	12q13	STAT6	Régulation voie JAK-STAT	PMBL	Inactivation PTPN1 Activation JAK2	N147		Duois et al, 2016

**Tableau 11** Gènes impliqués dans la voie des JAK-STAT (liste non exhaustive)

## 1.5 Nouvelles classifications moléculaires

Bien que communément admise depuis une vingtaine d'année, la dichotomie GC/non-GC peine à peser sur la stratégie thérapeutique. Cette distinction est basée sur les données de profil d'expression génique et immuno-histochimiques. L'étoffement du paysage moléculaire des LBDGC, favorisé par le développement de séquençage haut débit, amène aujourd'hui à repenser cette classification. Les derniers essais modulant la stratégie thérapeutique selon la COO se sont avérés peu contributifs. De plus, 10 à 20% des formes demeurent non classées. Hormis pour les HGBCL, l'aspect moléculaire des LBDGC est succinctement abordé dans la classification OMS 2016. La complexité du paysage mutationnel induit une réflexion à l'échelle génomique (variants nucléotidiques, altérations du nombre de copie), transcriptomique (expression d'ARN messenger) et protéique (retentissement sur la fonction protéique). A partir d'imposantes cohortes de LBDGC et selon des techniques de *whole*

*exome sequencing, whole genome sequencing, gene expression profiling et RNA-sequencing*, plusieurs classifications moléculaires ont été proposées.

### 1.5.1 Selon Reddy et *al.*

Publié en 2017, les auteurs<sup>31</sup> ont séquencés mille-et-un génomes de LBDGC par des techniques de WES, RNA-seq, SNP-array et GEP (nCounter® - Nanostring), permettant la détection de plus de 150 gènes mutés. Certaines sont associées au phénotype, avec des mutations somatiques *d'EZH2, GNA13, SOCS1, STAT6* et *TNFRSF14* associées aux LBDGC-GC, et des mutations somatiques de *MYD88, PIM1* et *TBL1XR1* dans les LBDGC-ABC. D'autres gènes dits *drivers* sont en outre décrits. La modélisation pronostique est basée sur ces anomalies somatiques de 150 gènes, en association à la COO et aux réarrangements de *MYC*. Les réarrangements de *MYC* (GC ou ABC) et les mutations de *CD79B* et *ZFAT* étaient associés à un haut risque pronostique. La complexité technique et statistique de cette modélisation génique rend difficile son application en routine.

### 1.5.2 Selon Chapuy et *al.*

A partir de données de WES, de CNV et de séquençage ciblé pour la détection de translocations, l'équipe de Chapuy<sup>32</sup> s'appuie sur les données de mutations et de CNV d'une cohorte de 304 LBDGC au diagnostic et propose en 2018 une classification moléculaire en 5 clusters listés dans le tableau 12.

Cluster	COO	CNV	SNV	MYD88 <sup>L265P</sup>	Clinique	Pronostic	Cible thérapeutique
<b>C0</b>	??	0	0	0	B riche en T	N/A	0
<b>C2</b>	ABC/ GC	-17 -9p21	<i>TP53</i> isolé	+		Défavorable	Cycle cellulaire Apoptose
<b>C1</b>	ABC	0	<i>BCL6 NOTCH2</i> <i>PD-L1</i> NF-κB	Autre (75%)	LZM transformé ?	Favorable	Immunité NOTCH
<b>C5</b>	ABC	+18q	<i>CD79B</i> <i>ETV6 PIM1</i>	+++	SNC, testis, extra-nodal	Défavorable	BCR/TLR, BCL2
<b>C3</b>	GC	-10q23	<i>BCL2 CREBBP EZH2 PTEN TNFRSF14</i>	-	FL	Défavorable	JAK-STAT BRAF, BCR/PI3K
<b>C4</b>	GC	0	Histone modifier <i>CD58, BCL2, RHOA, GNA13, BRAF, STAT3, NF-κB</i>	+		Favorable	

**Tableau 12** Clusters moléculaires selon Chapuy et al.

### 1.5.3 Selon Schmitz et al.

En 2018, partant d'une cohorte de 574 LBDGC<sup>33</sup>, les données de séquençage et de GEP ont permis de définir 4 sous-groupes moléculaires décrits ci-dessous. L'analyse ne reflétait toutefois pas la vie « réelle » avec un excès de LBDGC-ABC et LBDGC-UC (50%). Les analyses de survie étaient également difficilement extrapolables, du fait de l'effectif restreint de certains sous-groupes et l'hétérogénéité du traitement de première ligne (240 patients sous R-CHOP).

Cluster	Distribution (%)	Altérations génétiques	GEP	COO	Pronostic	Cible thérapeutique
<b>Non classés</b>	54.4	TET2	N/A	GC>ABC>U C	N/A	N/A
<b>MCD</b>	8	<i>CD79B/MYD88<sup>L265P</sup></i>	Blocage plasmocytaire Signature MYC	ABC	Défavorable	Inhibition BCR ou TLR
<b>BN2</b>	14.8	<i>NOTCH2</i> <i>BCL6</i> réarr.	Transformation LZM ? Signature MYC	ABC (41%) GC (19%)	Favorable (ABC)	Inhibition <i>BCL2/NOTCH/BCR</i>
<b>N1</b>	2.1	<i>NOTCH1</i>	Aspect plasmocytaire	ABC	Défavorable	Inhibition <i>NOTCH</i> ou de checkpoint
<b>EZB</b>	21.8	<i>EZH2</i> <i>BCL2</i> réarr.	Phénotype GC	GC	Inhibition	Inhibition <i>EZH2</i> ou <i>BCL2</i>

**Tableau 13** Classification moléculaire selon Schmitz et al.

### 1.5.4 Selon Dubois et al.

Avancée plus récemment<sup>34</sup>, cette quatrième classification intègre des données de NGS, de CGH array, d'IHC et de FISH issues d'une cohorte de 213 patients traités par R-chimiothérapie et applique une méthodologie statistique complexe par analyse en

composante indépendante. Il en ressort une classification de 28 sous-classes regroupées en cinq clusters (CA, CB, CC, CD, CU pour *undetermined*). Les données comparatives aux travaux de Schmitz et Chapuy associent le cluster CA au phénotype GC et au groupe EZB, le cluster CB au phénotype ABC et au groupe MCD/BN2, le cluster CC aux formes GC et ABC avec anomalies de TP53, et le cluster CD aux PMBL retrouvés dans le groupe STS.

### 1.5.5 Lymphome B de haut grade (HGBCL)

Anciennement décrits comme LBDGC-DH/-TH, la classification OMS 2016 définit les HGBCL sur des critères morphologiques (Burkitt-like) ou de FISH par la présence de réarrangements de *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6*. Ces formes particulièrement agressives incitent à adapter la stratégie thérapeutique en proposant des séquences plus intensives associées ou non à des thérapies ciblées. Dans ce contexte, plusieurs équipes se sont penchées sur leur signature moléculaire. A partir d'une cohorte de 928 sujets (RemoDEI-B), l'application d'une signature moléculaire de haut grade a permis de définir 83 patients comme tels<sup>35</sup>. Des variants communs aux formes CG sont retrouvés (*KMT2D*, sur-expression de *BCL2*) ainsi que des réarrangements des *MYC* (48%). Les mutations de *TCF3* et *ID3* sont moins fréquentes, suggérant un mécanisme différent des BL. A partir d'une cohorte de 157 LBDGC-GC dont 25 LBDGC-DH/-TH, une seconde équipe<sup>36</sup> a défini une signature « double hit » selon un modèle comprenant 104 gènes, dont *MYC*, *DDX3X*, *CREBBP*, *BCL2*, *EZH2* ou encore *TP53*. Ce profil suggérait une origine de la zone intermédiaire du centre germinatif.

## 1.6 Médecine personnalisée dans les LBDGC

L'élaboration d'un profil moléculaire spécifique et le développement cette dernière décennie de nombreuses thérapies ciblées introduisent la notion de médecine personnalisée. En oncologie « solide », certaines mutations ponctuelles font partie intégrante de la discussion thérapeutique. Les mutations de *BRAF*<sup>V600E</sup> dans le mélanome ou de *EGFR* dans l'adénocarcinome pulmonaire permettent un ciblage thérapeutique via des molécules antagonistes spécifiques. Cependant, l'impact d'une RCP moléculaire sur le devenir du patient (réponse globale, survie) reste débattu. Une méta-analyse incluant 570 essais de phase II et plus de 32000 patients, entre 2010 et 2012, rapport des taux de réponse



globale, PFS et OS supérieurs après recours à diverses thérapies ciblées<sup>37</sup>. Cette étude est toutefois limitée par la forte hétérogénéité des tumeurs et des thérapies appliquées. En outre, la définition du concept de « médecine personnalisée » passait par le ciblage d'anomalie phénotypique (sur-expression protéique) ou génétique (mutations). Or, les anomalies phénotypiques présentent une valeur théranostique probablement inférieure aux anomalies génétiques somatiques. Pour exemple, les mutations d'*EGFR* sensibilisent l'action des inhibiteurs d'EGFR, contrairement à l'hyperexpression de la protéine EGFR. L'essai SHIVA de phase II<sup>38</sup>, regroupant huit centres français, a évalué de manière comparative et prospective l'intérêt d'une thérapie ciblant les voies PI3K/AKT/mTOR, RAF/MEK et les récepteurs hormonaux. Le ciblage thérapeutique était basé sur des anomalies somatiques de cancers solides. L'objectif principal d'une amélioration de 10 – 15% de la PFS en faveur du groupe « ciblage » n'a pas été atteint. L'hétérogénéité tumorale (cancers solides de tout type), la considération isolée d'une mutation, l'utilisation en monothérapie d'un traitement ciblé et enfin le nombre de lignes thérapeutiques antérieures sont avancées comme causes d'échec.

En hématologie, la leucémie myéloïde chronique est un modèle de ciblage thérapeutique, où la standardisation des ITK actifs sur le transcrite *BCR-ABL* a révolutionné la prise en charge. Dans les leucémies aiguës myéloïdes, les mutations hot-spot de *FLT3*, *IDH1/IDH2* ou *TP53* amènent actuellement à proposer des thérapies ciblées, rattrapant un pronostic initialement défavorable.

L'hétérogénéité biologique des LBDGC limite l'application en routine du principe de médecine personnalisée. La détermination de la COO remonte à une vingtaine d'années, et conserve un intérêt principalement pronostique en première ligne. Nous l'avons vu, certaines voies biologiques sont différemment impactées selon le phénotype GC, ABC ou PMBL. Différents essais ont évalué l'intérêt d'une association R-chimiothérapie avec une thérapie ciblée. En première ligne, l'essai REMOld-B<sup>39</sup> a évalué l'ajout du bortézomib au R-CHOP. Le phénotype GC/ABC était déterminé en temps réel et permettait l'ajout du bortézomib à partir du second cycle. Les résultats en survie globale et sans progression se sont avérés négatifs, pour l'ensemble de la cohorte (n=918) et pour les sujets ABC. Cet essai a permis toutefois de démontrer la faisabilité de la détermination en temps réel par méthodes moléculaires de la COO. L'essai de phase III PHOENIX<sup>40</sup> comparant de manière randomisée l'ajout de l'ibrutinib au R-CHOP s'est également révélé négatif avec une survie

sans évènement similaire au groupe placebo. Des résultats encourageants étaient toutefois remarquables chez les patients de moins de 60 ans, soulignant la toxicité de cette association chez les sujets âgés ou fragiles. Enfin, par appariement à 564 patients de la cohorte GOYA, l'essai de phase II CAVALLI<sup>41</sup> associant vénétoclax au R-CHOP (n= 208 LBDGC) a montré une efficacité supérieure chez les patients expresseurs de BCL2 (*cut-off* >50%), indépendamment de la COO. En rechute, l'impact du phénotype GC/non-GC est débattu, renforçant l'utilité d'un profilage moléculaire. Le régime R-DHAP bénéficie d'avantage aux patients de phénotype GC (étude CORAL<sup>8</sup>).

## **2 HYPOTHESE ET OBJECTIFS**

---

### **2.1 Problématique**

Les facteurs prédictifs de réponse des LBDGC aux traitements standards ne sont pas clairement identifiés. L'application exponentielle du NGS a permis la mise en avant de l'extraordinaire hétérogénéité biologique de cette pathologie. Pour autant, l'obtention d'un profil moléculaire est loin d'être systématique en routine et son intérêt pour le clinicien est non reconnu. Tout d'abord parce qu'aucun essai clinique prospectif n'a pu démontrer une supériorité significative d'une thérapie ciblée au traitement standard, en première ligne. Ensuite, parce que la mise en place du NGS en routine nécessite un plateau technique adapté, un pôle technicien qualifié et une expertise biologique. A l'instar de l'oncologie médicale, où la biologie moléculaire impacte le choix d'une thérapie ciblée (ex : anti-ALK dans le cancer du poumon, amplification de *HER2* dans le cancer du sein, mutation de *KRAS* et cetuximab dans le cancer du côlon), l'équipe INSERM1245 et le pôle de biopathologie du centre Henri Becquerel ont développé en 2014 une réunion multi-disciplinaire de caractérisation moléculaire des lymphomes diffus B à grandes cellules en routine, CAMÉLÉON. Associant l'expertise du clinicien, de l'anatomo-pathologiste, du cytogénéticien et du moléculariste, elle avait pour premier objectif l'élaboration d'un profil moléculaire spécifique d'un patient. Le cas échéant, une proposition théranostique était formulée.

### **2.2 Hypothèse**

L'établissement de profil moléculaire d'une cohorte de LBDGC en routine clinique permettrait, à partir de anomalies génétiques acquises (mutation ponctuelle, altération du nombre de copie), d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la réponse à une immuno-chimiothérapie de première ligne standard.

### **2.3 Objectif et critère de jugement principaux**

L'objectif principal de notre travail est de déterminer la valeur prédictive d'un profil moléculaire établi au diagnostic sur l'obtention ou non d'une rémission complète, au sein

d'une cohorte rétrospective de LBDGC-NOS. Le critère de jugement principal était l'obtention de la rémission complète après une première ligne d'immuno-chimiothérapie.

## 2.4 Objectifs et critères de jugements secondaires

Nous déterminons plusieurs objectifs secondaires :

À partir des résultats de RT-MLPA et d'IHC, déterminer la COO des LBDGC de notre cohorte d'analyse (ABC, GC, PMBL, UC) et comparer les profils moléculaires des LBDGC-ABC et LBDGC-GC selon l'obtention de la rémission ou non.

Analyser les données de survie de notre cohorte d'analyse, des sous-groupes en rechute et en rémission, des formes GC, ABC, PMBL, UC, et selon la présence ou non d'anomalies de *TP53* et *MYD88*.

Décrire les profils mutationnels et de CNV des patients ayant bénéficié de plusieurs discussions en RCP CAMÉLÉON.

Évaluer la relation entre la prescription de thérapies ciblées et le profil moléculaire adapté ou non, ainsi que la transmission des résultats au clinicien de routine.

Appliquer les classifications biologiques de Chapuy et *al*, de Schmitz et *al*, de Reddy et *al*, et de Dubois et *al* sur notre cohorte d'analyse.

## 3 MATERIELS ET METHODES

---

### 3.1 Design de l'étude

#### 3.1.1 Constitution de la cohorte CAMELEON

Il n'était pas imposé au clinicien ou au biologiste de critères strictes d'inclusion dans la réunion CAMÉLÉON. Il devait toutefois s'agir d'une hémopathie lymphoïde B prouvée en histologie et pour lequel un prélèvement exploitable était disponible. Les sujets étaient inclus d'emblée au décours d'un diagnostic "commun", ou au contraire devant des particularités de prise en charge (atteinte d'organe atypique, patient réfractaire, prélèvements multiples). Les réunions étaient programmées en aval de l'ensemble des techniques nécessaires. Cliniciens, anatomo-pathologistes, cytogénéticiens et molécularistes se réunissaient alors, validant ou infirmant le diagnostic de LBDGC-NOS. Un profil biologique cytogénétique et moléculaire était établi et critiqué. Selon les anomalies mises en évidence, une proposition thérapeutique et théranostique ainsi qu'une évaluation pronostique étaient avancées. Une fiche RCP sous format PDF® était rédigée. Celle-ci était éventuellement incluse dans le dossier médical du patient. La validité du profil moléculaire et la proposition théranostique étaient sous l'égide du Professeur F. Jardin (unité INSERM1245, centre Henri Becquerel).

#### 3.1.2 Constitution de la cohorte d'analyse

Nous avons réalisé une étude rétrospective, descriptive et comparative à partir de données colligées de manière prospective. Les données étaient issues soit du dossier médical informatisé du patient, soit de la plate-forme informatique CAMÉLÉON. La conception de cette dernière est le fruit d'une réflexion visant à centraliser les données cliniques, anatomo-pathologiques, cytogénétiques et moléculaires, et constituer ainsi un support informatique à la RCP CAMÉLÉON. Nous avons constitué une cohorte d'analyse issue de la cohorte CAMÉLÉON.

Nos critères d'inclusion étaient un diagnostic histologique de LBDGC-NOS, un âge supérieur à 18 ans, et au moins un passage en RCP CAMÉLÉON.

Les critères d'exclusions comprenaient les hémopathies pédiatriques et les sujets mineurs, les FL, les BL, les MCL, les LLC, et les LBDGC transformés. Les données d'IHC, de

cytogénétique ou de biologie moléculaire n'impactaient pas la sélection des sujets. Afin de répondre à notre objectif principal, nous avons scindé notre population d'intérêt en deux sous-groupes :

- Un groupe CU (pour *cured*) incluant les patients ayant présenté une rémission morpho-métabolique après une première ligne thérapeutique ;
- Un groupe RR (pour *relapsed or refractory*) incluant les patients ayant présenté un état réfractaire ou une rechute précoce ou tardive après une première ligne thérapeutique.

Applicable depuis mai 2018, nous avons tenu compte du règlement général sur la protection des données (RGPD).

## **3.2 Recueil de données**

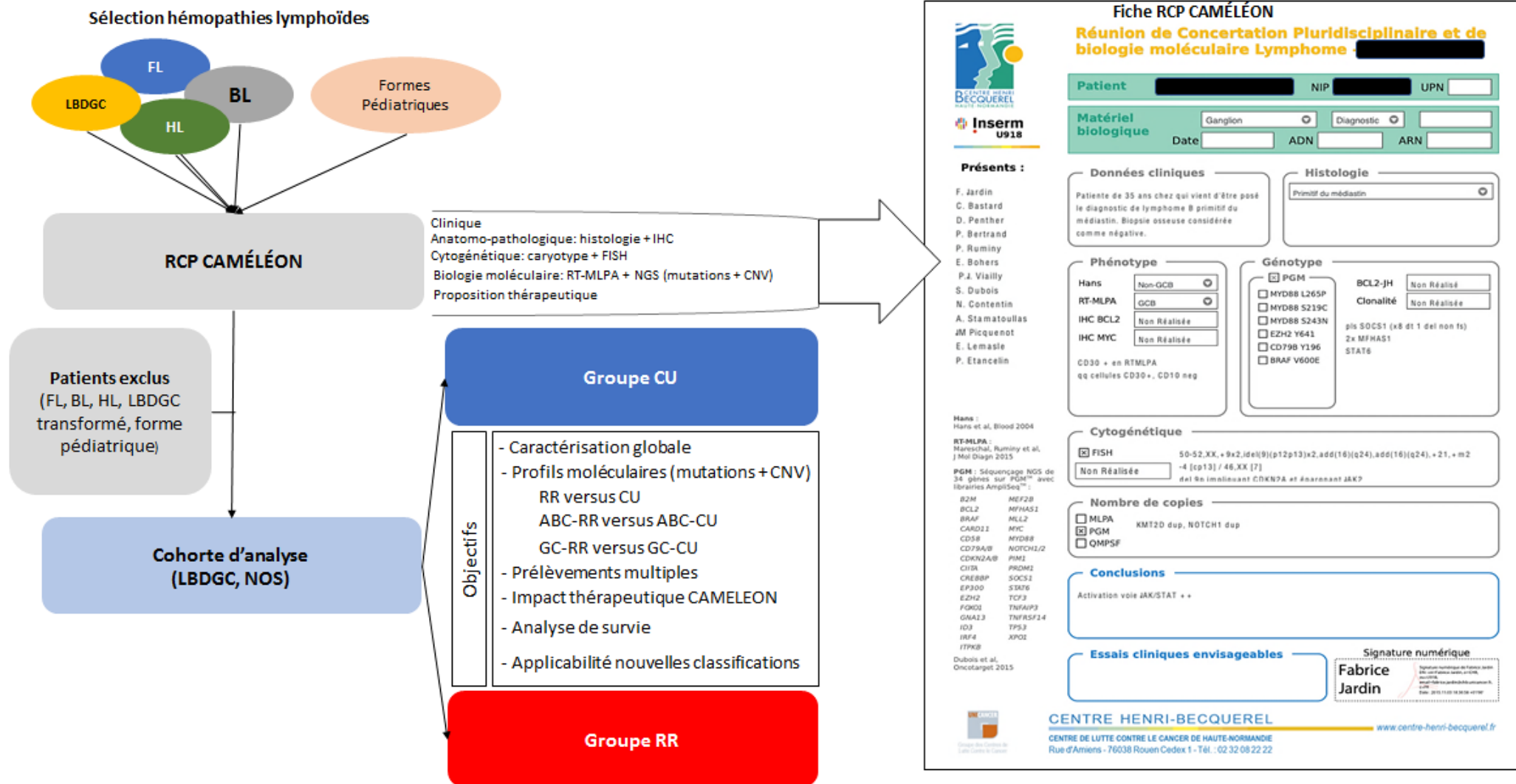
### **3.2.1 Caractéristiques générales**

Les caractéristiques générales étaient renseignées dans le dossier médical informatisé du patient (centre Henri Becquerel) en date du premier prélèvement. Nous avons recueilli les données cliniques (âge, sexe, ECOG, stade Ann-Arbor, score IPI, atteintes ganglionnaires et extra-ganglionnaires, traitement de première ligne) et biologique (LDH). Pour les patients n'ayant pas eu de prélèvement analysé au diagnostic, les caractéristiques générales étaient celle en date de la discussion CAMELEON.

### **3.2.2 Anatomo-pathologie**

#### **3.2.2.1 Histologie**

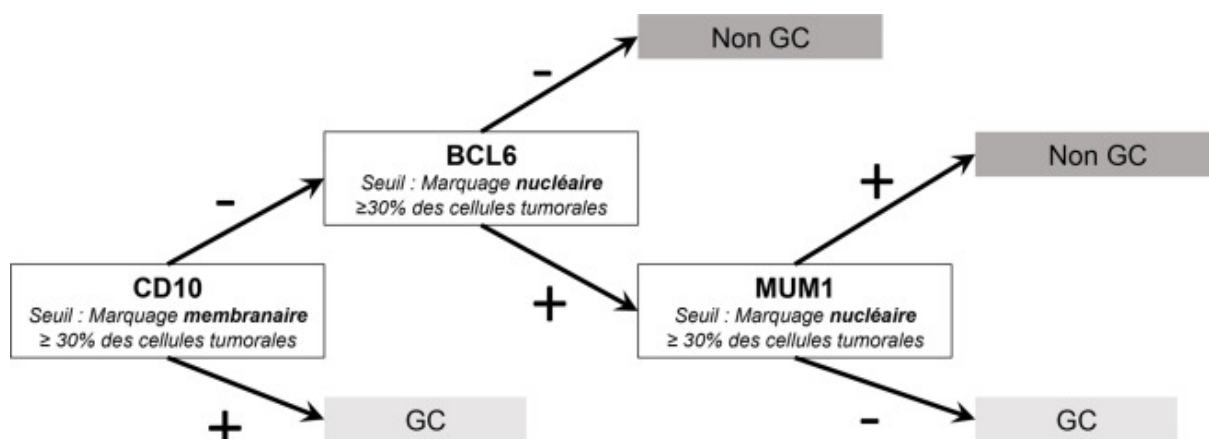
Le diagnostic histologique correspondait à un LBDGC-NOS selon la classification OMS de 2008. La relecture centralisée était assurée par les docteurs J-M. Picquenot et L. Veresezan (service de biopathologie, Centre Henri Becquerel). Pour le recrutement des sujets de la cohorte d'analyse, les formes histologiques LBDGC-NOS et PMBL ont été confondues.



**Figure 7** Flowchart : à partir d'une base de patients CAMÉLÉON, sélection des patients porteurs d'un LBDGC-NOS. Description des caractéristiques générales de la cohorte d'analyse, puis profils comparatifs selon le statut rémission/rechute. Mise en page de la fiche CAMÉLÉON exposée.

### 3.2.2.2 Immunohistochimie

La COO était déterminée selon l'algorithme de Hans (immunomarquages du CD10 – BCL6 – MUM1). La co-expression de MYC (>50%) et BCL2 (>40%) et/ou BCL6 définissait les LBDGC-DE/-TE. Selon les données cliniques et cytogénétiques, une FISH interphasique pouvait être réalisée à la recherche de réarrangement de *MYC*, *BCL2* et *BCL6*.



**Figure 8** Détermination de la COO selon l'algorithme de Hans

### 3.2.3 Cytogénétique

La validité des techniques et du résultat étaient assurées par le Docteur Pinther et le Docteur Bastard (service de biopathologie, Centre Henri Becquerel).

#### 3.2.3.1 Caryotype conventionnel

Réalisé en bandes R, il recherchait les anomalies précédemment décrites selon la clinique (atteinte médiastinale, atteinte neuro-méningée) ou les antécédents cytogénétiques (rechute). Étaient principalement décrites dans ce travail les anomalies qualitatives tels que les réarrangements et translocations de *BCL2* (18q21), de *MYC* (8q24), de *BCL6* (3q27), de *IGH* (14q32), de *IGK* (2p11), de *IGL* (22q11), de *TP53* (17p13), de *PDL1* (9p24), de *REL* (2p16), et les anomalies quantitatives (triploïdie, (near)tétraploïdie, hypodiploïde, délétions). Nous avons classé les caryotypes selon leur complexité ( $\geq 3$  anomalies cytogénétiques), la présence d'une anomalie du locus 17p, l'absence d'anomalie, ou un non rendu ou échec technique.



### 3.2.3.2 FISH

La FISH métagasique et interphasique utilisait des sondes de type break-apart ou dual fusion selon le type de réarrangement recherché. Nous avons recueilli les données de FISH disponible pour les gènes *MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *IGH* ainsi que les délétions de *TP53*. Nous avons précisé, quand disponible, le partenaire de *MYC* (*IG* ou non-*IG*). Nous avons comparé les données cytogénétiques impliquant *TP53* et les réarrangements de *MYC* selon les sous-groupes décrits (COO, RR/CU).

## 3.2.4 Biologie moléculaire

### 3.2.4.1 Méthode d'extraction d'ADN et d'ARN

L'ADN génomique était extrait à partir de matériel inclus en paraffine (FFPE) ou congelé. En cas de bloc FFPE, un prélèvement en zone tumorale était sélectionné et un kit de réparation industriel (QIAmp DNA FFPE, Qiagen, Venlo, Pays-Bas) était utilisé. Le matériel congelé était issu de fragments tissulaires dont l'ADN extrait était conservé à -20°C et utilisable ultérieurement. L'ARN était extrait à partir de matériel congelé et stocké à -80°C.

### 3.2.4.2 Détermination de la COO

La RT-MLPA était appliquée en première intention pour déterminer la COO (ABC, GC, PMBL, UC). Deux versions étaient utilisées. La première version (v1) classait les LBDGC en GC, ABC ou UC. La seconde version (v15) classait les LBDGC selon le statut PMBL ou non-PMBL, ces derniers étant ensuite définis en GC, ABC ou UC. Le tableau 14 liste les gènes appliqués pour chacune des deux versions. La validité de la méthode et des résultats était assurée par le docteur P. Ruminy (unité INSERM 1245, Centre Henri Becquerel). En cas d'échec technique ou d'absence de donnée, la COO était déterminée en deuxième intention par IHC selon l'algorithme de Hans. En cas d'échec ou de non réalisation de l'une des deux méthodes, le LBDGC était classé en UC.

RT-MLPA v1 14 gènes	<b>GC:</b> <i>NEK6, LMO2, BCL6, MYBL1, TNFRSF19</i> <b>ABC:</b> <i>IRF4, IGHM, FOXP1, TACI, CCND2</i> <b>Double-hit :</b> <i>MYC, BCL2</i> <b>Contrôles :</b> <i>CCND1, CD20</i>
RT-MLPA v15 21 gènes	<b>GC:</b> <i>NEK6, LMO2, MME, ITPKB, MAML3, MYBL1</i> <b>ABC:</b> <i>IRF4, IGHM, FOXP1, LIMD1, TNFRSF14</i> <b>PMBL :</b> <i>FCER2 (code CD23), TNFRSF8 (code CD30), MAL</i> <b>EBV :</b> <i>EBER1</i> <b>Divers :</b> <i>CCND1, CRBN, MYC, CD5, MS4A1 (code pour CD20), MYD88<sup>L265P</sup></i>

**Tableau 14** Version 1 (v1) et version 2 (v15) de RT-MLPA avec gènes ciblés correspondant.

### 3.2.4.3 Séquençage haut débit et panel lymphoïdes

Le NGS a été réalisé à partir de technologies différentes utilisant deux séquenceurs disponibles au sein de l'unité INSERM U1245 :

- La technologie PGM (pour *Personal Genome Machine*) – Ion Torrent (Life Technologies®, Carlsbad, États-Unis) dont le principe reposait sur la constitution puis l'amplification de librairies d'ADN sur billes magnétiques au sein de microgouttelettes d'huile. La variation de pH induite par l'incorporation successive des bases nucléotidiques A, T, G, C permettait la détermination de la séquence nucléotidique.
- La technologie MiSeq d'Illumina®, où les librairies d'ADN constituées étaient amplifiées « en pont » sur support solide. La séquence nucléotidique était déterminée par émission de fluorescence après incorporation des nucléotides A, T, G et C.

Le séquençage haut débit était ciblé sur des régions exomiques des gènes d'intérêt. Deux panels de gènes lymphoïdes (lymphopanel) ont été développés au sein de l'unité. Le tableau 15 liste les gènes propres et communs des lymphopanel version 1 (v1) ou version 2 (v2). Les versions v1 et v2 ont été fusionnées afin de générer un lymphopanel commun de 39 gènes cibles.

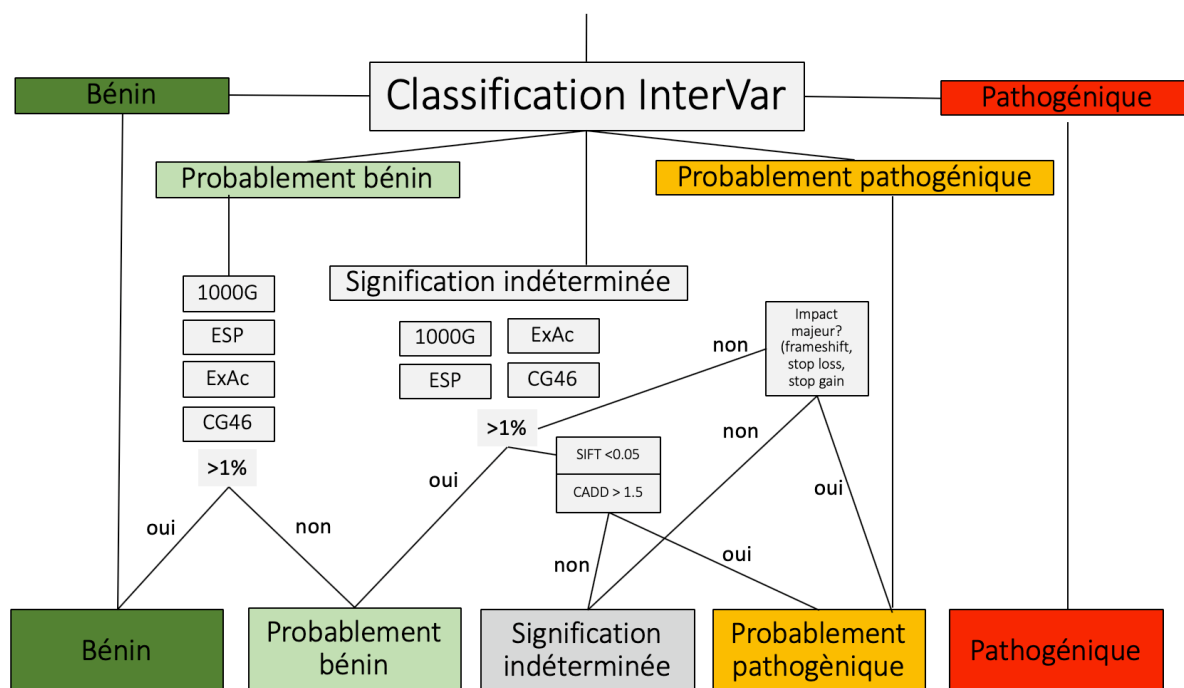
		Lymphopanel commun		
		Gènes spécifiques lymphopanel v1	Gènes communs lymphopanel v1 et v2	Gènes spécifiques lymphopanel v2
Amplicons		872	N/A	751
Couverture base (kb)		87.7	N/A	85.1
Gènes (n)		3	31	5
Voies biologiques	Immunité		<i>B2M, CD58, CIITA, TNFRSF14</i>	
	NOTCH		<i>NOTCH1, NOTCH2</i>	
	Apoptose Cycle cellulaire	<i>MFHAS1</i>	<i>CDKN2A, CDKN2B, FOXO1, GNA13, MYC, XPO1, BCL2, TP3</i>	<i>CCND3</i>
	Nf-κB		<i>CARD11, PIM1, PRDM1, TNFAIP3, MYD88, IRF4</i>	
	Épigénétique	<i>KMT2D</i>	<i>EP300, EZH2, CREBBP, MEF2B</i>	<i>ARID1A</i>
	MAP-Kinase		<i>BRAF</i>	
	JAK-STAT		<i>SOCS1, STAT6</i>	
	BCR	<i>ITPKB</i>	<i>CD79A, CD79B, ID3, TCF3</i>	<i>BTK, PLCG2</i>
	Microenvironnement			<i>CXCR4</i>

**Tableau 15** Gènes sélectionnés dans les lymphopanel version 1 (v1) et version 2 (v2) selon les voies biologiques

L'analyse des données brutes de séquençage différait selon l'automate. Le logiciel Torrent Suite™ 4.0 convertissait les données issues du PGM – Ion Torrent, avec alignement des bases à un génome de référence (hg19) via un premier algorithme de « base calling ». Cette première étape générait un fichier numérique exploitable. La technologie MiSeq utilisait le logiciel SAV (*Sequencing Analysis Viewer*) qui sélectionnait les variants d'intérêt partir de quatre modèles de « variant calling ».

Ce premier traitement était suivi d'une seconde analyse bio-informatique commune aux deux méthodes de séquençage. La pathogénicité des variants était évaluée selon un algorithme appliqué via un logiciel d'analyse bio-informatique développé au sein du laboratoire U1245 (GenerateReport, P-J. Viailly, Unité INSERM1245, centre Henri Becquerel). La validité biologique finale était assurée par le Dr E. Bohers et le Dr. P. Étancelin (Unité INSERM1245, centre Henri Becquerel).

## Détection d'un variant mutationnel



**Figure 9** Détermination de la pathogénicité d'un variant selon l'algorithme *GenerateReport*. Les variants classés « bénins », « probablement pathogéniques » ou « pathogéniques » n'étaient pas reclassés. Les variants « probablement bénins » étaient reclassés en « bénin » ou « probablement bénins » selon la fréquence allélique dans la population générale (> ou < 1%). Les variants « indéterminés » étaient classés en « probablement pathogéniques » selon le type de mutation (décalage cadre de lecture, codon stop gain/perte) ou selon des scores de pathogénicité (SIFT, CADD). Bases de données génomiques et bio-informatiques : ESP (Exome Sequencing Project), ExAc (Exome Aggregation Consortium), CG46 (version ANNOVAR), 1000G (1000 Genome Project).

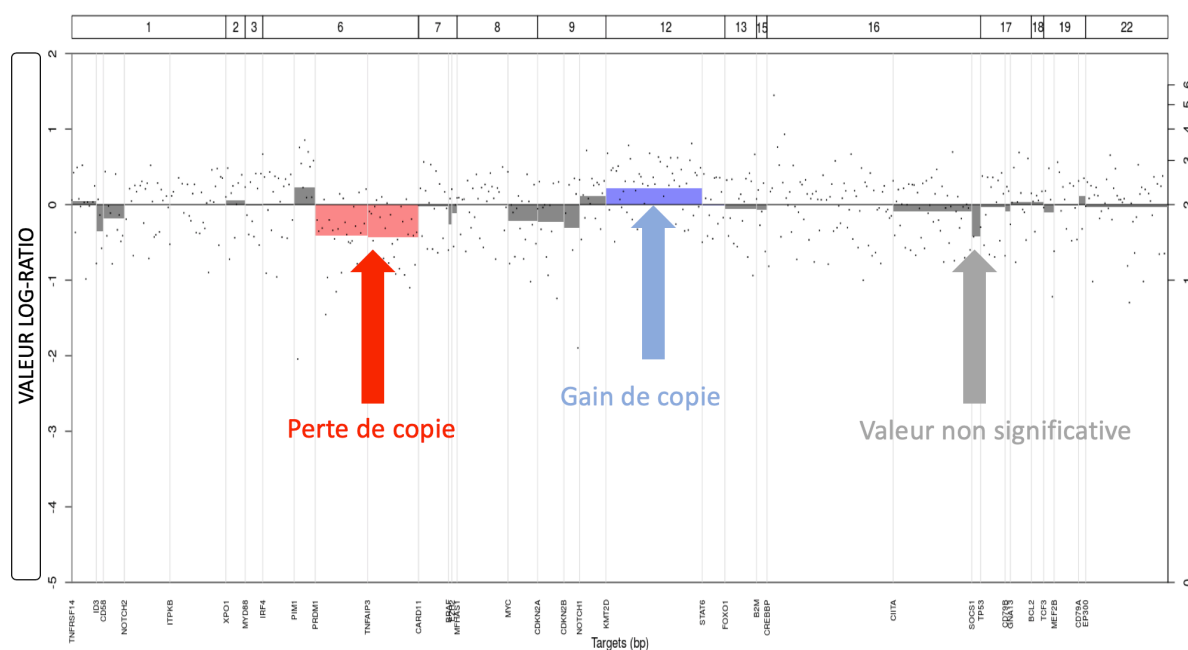
### 3.2.4.4 Profil mutationnel

Nous décrivons dans un premier temps le paysage mutationnel de la cohorte d'analyse. Les 39 gènes d'intérêt ont été catégorisés selon neuf voies biologiques définies précédemment<sup>42</sup>. Une mutation pouvait correspondre à un *single nucleotide variant* (SNV), à un gain ou une perte de codon STOP, à des insertions/délétions (*indel*) de petites tailles, avec ou sans décalage du cadre de lecture (*frame-shift*). Un variant mutationnel (VM) était défini par la présence d'une ou plusieurs mutations sur un même gène, et correspondait à un évènement statistique. Le prélèvement utilisé pour l'analyse moléculaire était par défaut celui du diagnostic. Dans le cas où aucun prélèvement au diagnostic n'était présent, les prélèvements de rechute étaient utilisés. Afin de répondre à notre objectif principal, nous avons comparé les profils mutationnels selon la COO (ABC, GC, PMBL, UC) et selon le statut

CU et RR. Nous avons comparé les profils moléculaires issus de prélèvements réalisés à des temps différents (diagnostic/rechute, rechute/rechute).

### 3.2.4.5 Profils de CNV

Les données de NGS ont permis de déterminer les anomalies en nombre de copies des gènes ciblés. L'algorithme bio-informatique appliqué est basé sur des tests statistiques et traitement de données complexes. Les anomalies « CNV » correspondaient à des délétions (homo- ou hétérozygotes) ou des gains et amplifications de copie. Un seuil statistique significatif ( $p < 0.05$ ) était requis pour la validité bio-informatique d'un CNV. Le résultat, rendu en log-ratio pour une référence diploïde à  $n=2$ , était présenté sous forme d'histogramme coloré selon la perte (rouge) ou le gain (bleu) de copie du gène. Un CNV correspondait à un évènement statistique.



**Figure 10** Exemple de rapport de CNV (selon lymphopanel v1) ; en rouge, délétion de *PRDM1* et *TNFAIP3* ; en bleu, gain de copie de *KMT2D* ; en gris, CNV non significatifs ; en ordonnée, valeur du CNV en log-ratio.

Nous décrivons les CNV de notre cohorte d'analyse, puis comparons leur incidence selon le statut RR/CU.

### 3.2.4.6 Applicabilité des récentes classifications moléculaires

Nous basant sur les variants mutationnels et les CNV rapportés dans la littérature, nous avons évalué l'applicabilité de deux récentes classifications moléculaires de LBDGC sur notre cohorte d'analyse.

#### 3.2.4.6.1 Selon Schmitz et al

Décrites précédemment, les catégories BN2, MCD, N1, EZB et STS ont permis de classer certains sujets de notre cohorte. Tous les patients porteurs de la mutation hot-spot *MYD88*<sup>L265P</sup> étaient inclus dans le groupe MCD. Les *MYD*<sup>non-L265P</sup> et CNV impliquant *MYD88* étaient exclus. Le groupe BN2 incluait les sujets avec variant mutationnel ou CNV de *CARD11*, avec ou sans réarrangement *BCL6*. Le gène *BCL6* n'étant pas inclus dans le lymphopanel commun, les données caryotypiques ont été utilisées pour les évènements en lien. Le groupe N1 incluait exclusivement les anomalies de *NOTCH1*. Le groupe EZB se basait sur les anomalies d'*EZH2*, *KMT2D*, *CREBBP* et *BCL2*. Enfin, le groupe STS incluait les anomalies de *STAT6* et *SOCS1*. Nous avons comparé le statut RR/CU selon les sous-groupes ainsi constitués. Nous avons classé les sujets de manière arbitraire, à « main levée », sans démarche statistique ou informatique. Les gènes retenus de la publication devaient être communs à notre lymphopanel, et étaient sélectionnés selon leur degré de significativité rapporté dans l'étude.

#### 3.2.4.6.2 Selon Chapuy et al

Nous avons classé les sujets de notre cohorte d'analyse selon les clusters 1, 2, 3, 4 et 5. Les sujets du groupe C1 présentaient une anomalie de *BCL6* visible sur caryotype, puisque non inclus dans le lymphopanel. Le C2 incluait les patients mutés *TP53*. Le groupe C3 incluait les sujets porteurs des variants de *BCL2*, *CREBBP* et *EZH2*. *CD58* était le seul gène retenu pour le C4, *CD79B*, *MYD88* et *PIM1* pour le C5. Comme précisé dans le paragraphe précédent, nous n'avons pas eu recours aux outils statistiques. Les gènes retenus de la publication devaient

être communs à notre lymphopanel, et étaient sélectionnés selon leur degré de significativité rapporté dans l'étude.

#### 3.2.4.7 Analyse statistique

Analyse de survie : la survie sans progression correspondait au délai entre la date du diagnostic et la date de la première rechute documentée ou du décès, toute cause confondue. La survie globale correspondait au délai entre la date du diagnostic et la date de décès, toute cause confondue. L'estimation des courbes de survie a été déterminée selon la méthode de Kaplan-Meier et comparées par test du log-rank pour chaque facteur (analyse univariée).

La rémission complète était définie par l'absence de réévolutivité tumorale documentée à 2 années du traitement de première ligne. Le PET-scanner confirmait la rémission selon les critères de Lugano avec un score de Deauville compris entre 1 et 3 et des cibles ganglionnaires inférieures à 1,5 centimètre.

Un sujet considéré en rechute ou réfractaire était défini par l'occurrence d'une rechute durant ou à distance du traitement de première ligne, et requérant une nouvelle ligne thérapeutique. Au sein de cette catégorie, nous avons distingué les sujets réfractaires primaires et les sujets en rechute tardive, définis respectivement par l'absence de réponse ou la progression tumorale en cours d'un traitement de première ligne ou à moins de 24 mois, et par une rechute après un minimum de 24 mois suivant la date du diagnostic après une première rémission complète.

Pour les variables quantitatives, si la variable quantitative ne suit pas une loi normale, elle est décrite comme "non normale", le test utilisé est alors un test non paramétrique de Wilcoxon Mann Whitney. Sinon, elle est décrite "normale", le test utilisé est celui de Student.

Pour les variables qualitatives, le test utilisé est un test du Chi<sup>2</sup>, ou test de Fisher si l'effectif d'au moins un groupe est inférieur à 5.

Une valeur de  $p$  inférieure à 5% (risque alpha) était considérée comme significative.

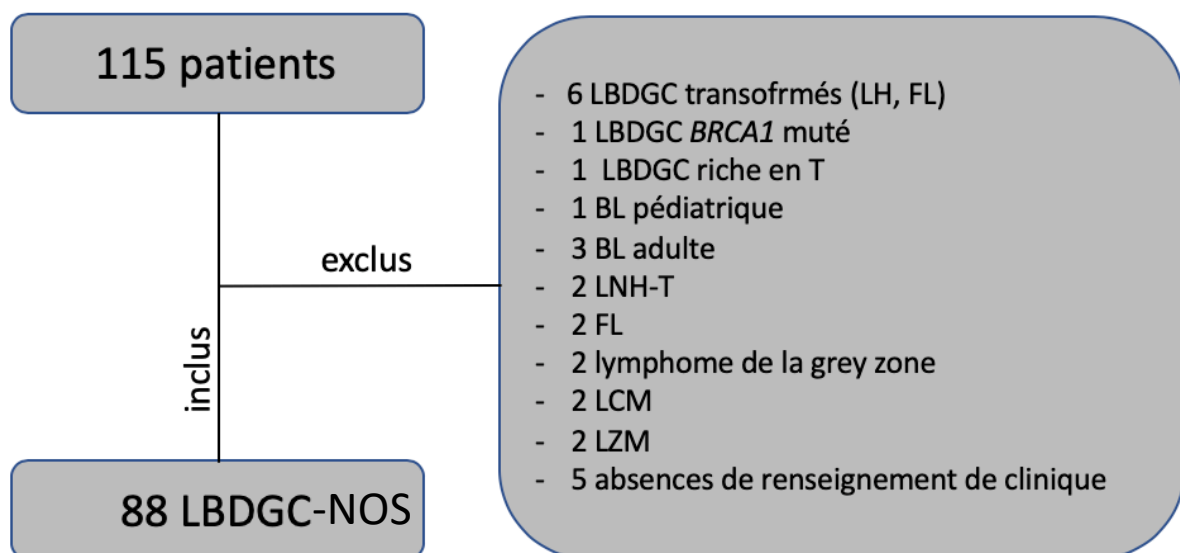
## 4 RESULTATS

---

### 4.1 Cohorte d'analyse

#### 4.1.1 Caractéristiques générales

Cent-quinze patients ont été inclus au cours de 22 réunions CAMÉLÉON entre novembre 2014 et mars 2019 (moyenne patients/réunion : 5.2 ; extrêmes : 1 – 16). L'ensemble des RCP s'est tenu au centre Henri Becquerel. Vingt-sept patients dont le diagnostic histologique ne correspondait pas à un LBDGC-NOS ont été exclus, comprenant entre autres un cas de LBDGC avec mutation constitutionnelle de *BRCA1* et six cas de LBDGC transformés (FL, HL).



**Figure 11** Constitution et sélection de la cohorte d'analyse

Les sujets présentaient un score IPI et un stade Ann-Arbor avancés, avec un ECOG globalement conservé (ECOG 0 – 1 : 68%). L'atteinte ganglionnaire concernait plus d'un patient sur deux et l'envahissement médullaire 14% des cas. Les atteintes extra-nodales les plus fréquentes étaient osseuses (19,3%), pulmonaires (17%), digestives (13,6%) et neuro-méningées (13,6%). Les LBDGC-ABC constituaient la majorité de notre cohorte (48,9%), suivis d'un tiers de LBDGC-GC. Le régime R-CHOP et assimilés (R-miniCHOP, essai SENIOR) était majoritairement appliqué pour 60 sujets (68,1%). Quatre patients ont bénéficié en



première ligne d'une intensification thérapeutique par autogreffe conditionnée par BEAM (Bicnu, étoposide, aracytine, melphalan) dans ou selon le protocole GAINED.

Caractéristiques cliniques		Cohorte d'analyse n (%)
Nombre de patients		88
Âge médian (extrêmes)		64 (20 – 93)
Sexe	Homme	52 (59)
	Femme	36 (41)
IPI	0-1	24 (27)
	2-5	64 (63)
Stade Arbor	I-II	24 (27)
	III-IV	64 (63)
LDH	Normales	37 (42)
	Élevées	51 (58)
ECOG	0-1	60 (68)
	2-4	28 (32)
Histologie	DLBCL, NOS	67 (76,2)
	PMBL	10 (11,4)
	LBDGC, CD30+	4 (4,6)
	LBDGC, CD5+	3 (3,4)
	LBDGC plasmoblastique	1 (1,1)
	LBDGC riche en T	1 (1,1)
	LBDGC, EBV+	2 (2,2)
COO	ABC	43 (48,9)
	GC	30 (34)
	PMBL	7 (8)
	UC	8 (9,1)
Régime 1 <sup>ère</sup> ligne	R-CHOP	51 (57,9)
	R-miniCHOP	9 (10,2)
	R-ACVBP*	20 (22,7)
	R-ACVBP + autogreffe	4 (4,5)
	Essais**	13 (14,7)
	Prévention NM***	48 (54,5)
Nature prélèvement	FFPE	43 (48,9)
	Congelé	37 (42)
	N/A	8 (9,1)
Site prélèvement	Ganglion	51 (57,9)
	Extra-ganglion	31 (35,2)
	N/A	6 (6,9)
Timing prélèvement	Diagnostic ou rechute	77 (87,5)
	Rechute seule	11 (12,5)

**Tableau 16** Caractéristiques générales de la cohorte d'analyse. \*R-ACVBP incluait les patients traités dans ou selon le protocole GAINED; \*\*GO29044, SENIOR, REMARC, CAVALLI, PHOENIX, LNH 09-1B, LNH 98-2B ; \*\*\*Prévention neuro-méningée par injection intra-thécale de méthotrexate, aracytine et corticoïdes +/- méthotrexate haute dose.

La durée de suivi médiane était de 39 mois (extrêmes : 1 – 212). Le recueil de données a été clôturé et actualisé en juin 2019. Au sein de la cohorte d'analyse, les médianes d'OS et de PFS étaient respectivement de 7,02 et 5,54 années.

#### 4.1.1 Résultats anatomo-pathologiques

##### 4.1.1.1 Histologie

La forme LBDGC-NOS sans caractéristique supplémentaire était majoritaire (n=67, 76,1%), suivie des PMBL (n=10, 11,3%), des LBDGC CD30+ (n=4, 4,5%), des LBDGC CD5+ (n=3, 3,4%), d'un LBDGC plasmablastique, d'un LBDGC riche en T et de deux LBDGC, EBV+ du sujet âgé.

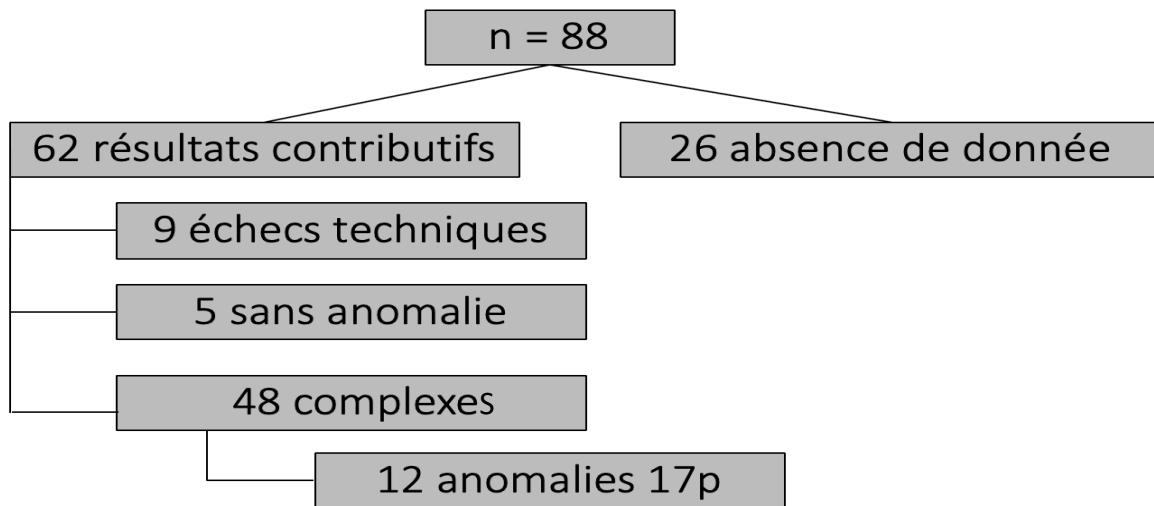
##### 4.1.1.2 IHC

L'algorithme de Hans était rendu pour 84 patients (95,4%), classant 30 sujets en LBDGC-GC et 54 en LBDGC-nonGC. Les données n'étaient pas disponibles pour 4 sujets. Onze patients présentaient un LBDGC-DE par marquage associés de MYC (>50%) et BCL2 (>40%), dont un avec sur-expression de BCL6 (LBDGC-TE, #11).

#### 4.1.1 Résultats cytogénétiques

##### 4.1.1.1 Caryotype conventionnel

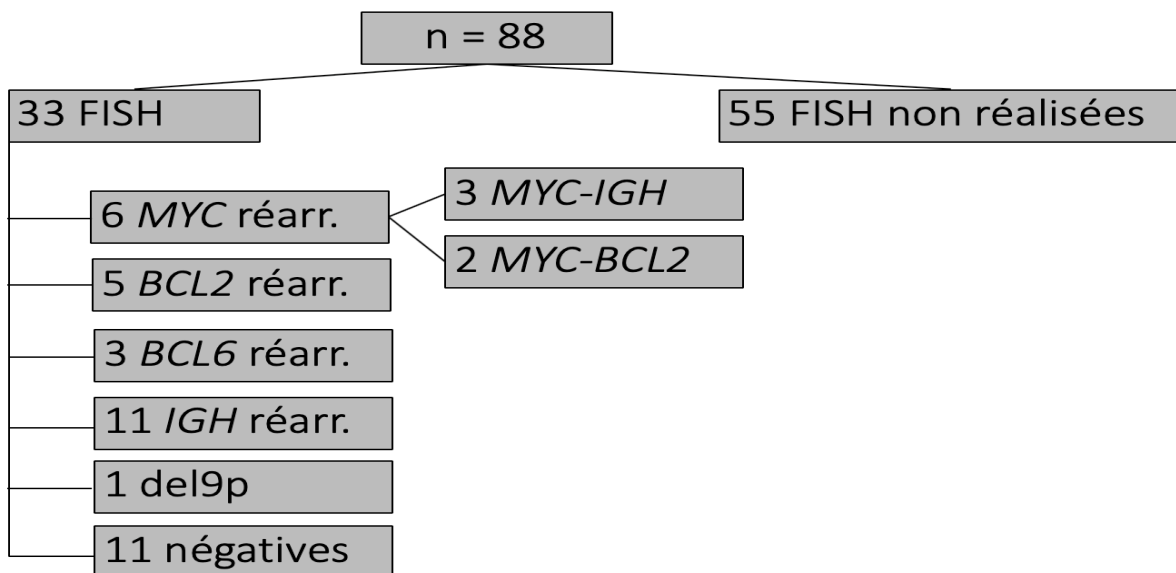
Les données étaient disponibles pour 62 sujets (70%). Quatre-vingt-dix pour cent des formules rendues décrivaient des clones pathologiques complexes diploïdes (n=11), hyperdiploïdes (n=23), triploïdes / (near)-tétraploïdes (n=7) et hypodiploïdes (n=7). Vingt-cinq pour cent des caryotypes complexes contenaient une anomalie de *TP53*.



**Figure 12** Résultats de caryotype conventionnel sur la cohorte d'analyse

#### 4.1.1.2 FISH

La technique était réalisée sur bloc FFPE en secteur d'anatomo-pathologie ou sur matériel frais en secteur cytogénétique. Trente-trois patients ont bénéficié d'une analyse par FISH. Deux patients (#43, #50) présentaient un réarrangement de *MYC* et *BCL2* associés, répondant aux critères diagnostiques de HGBCL. Le partenaire de *MYC* était *IGH* (#50) ou non identifié (#43).

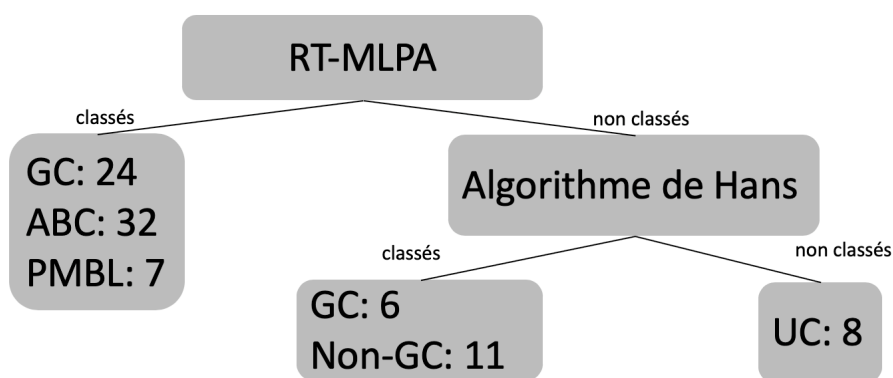


**Figure 13** Résultats de FISH sur la cohorte d'analyse. Réarr : réarrangement ; del : délétion

## 4.1.2 Résultats moléculaires

### 4.1.2.1 Détermination de la COO

Le phénotype cellulaire était déterminé chez 80 patients (90,9%). La RT-MLPA a permis de classer 63 patients (71,5%), avec 24 formes GC, 32 formes ABC et 7 formes PMBL. Seize patients ont été classés selon la v1 (GC : n=5, ABC : n=11), et 47 selon la v15 (GC : n=19, ABC : n=21, PMBL : n=7). Les sujets non-classés en RT-MLPA s'expliquaient par l'absence de technique pour 15 sujets, ou par échec technique pour 2 sujets. Parmi les 25 patients non classés en RT-MLPA, 17 ont été classés selon l'algorithme de Hans, majoritairement en LBDGC-nonGC (11/17).

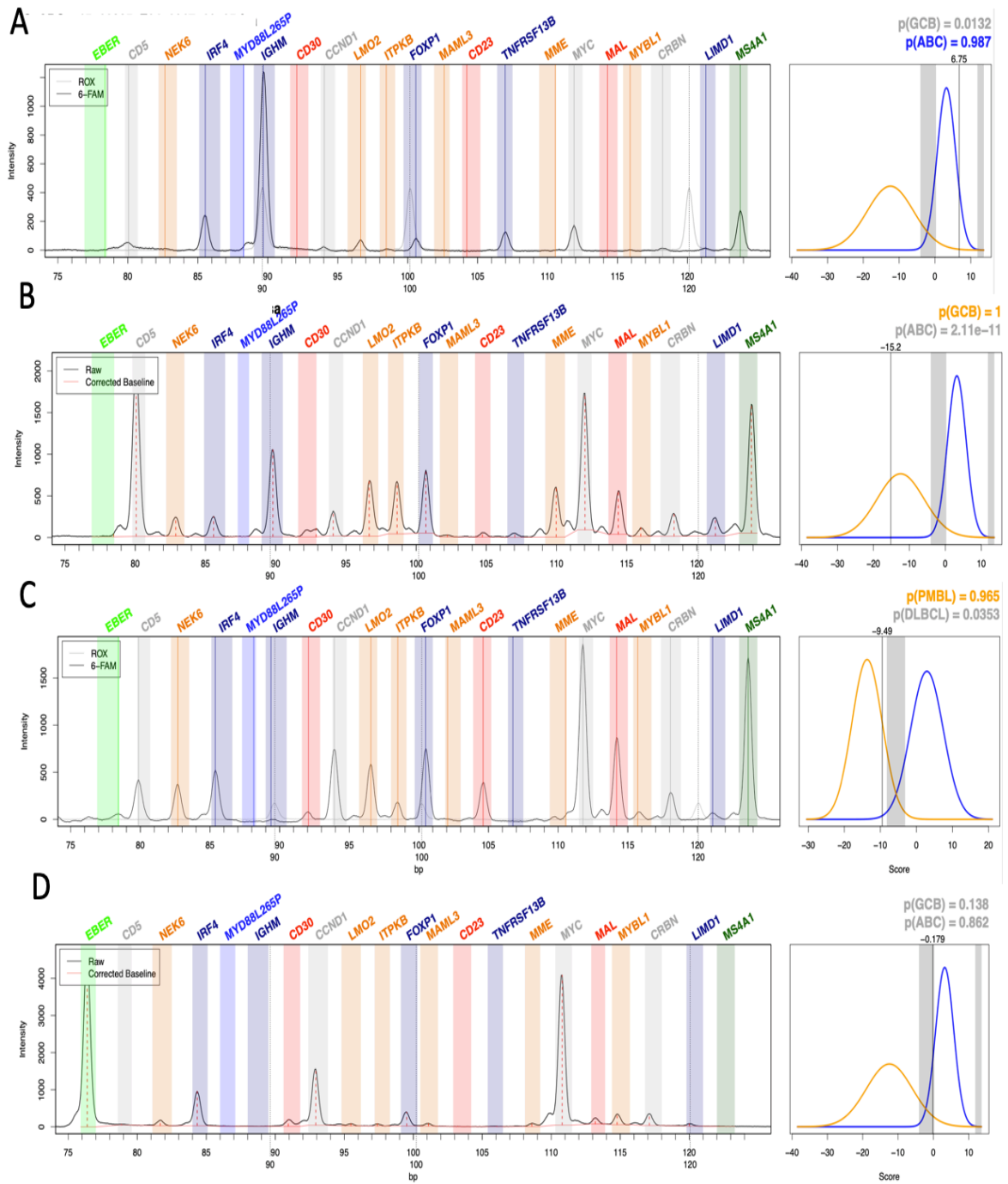


**Figure 14** Détermination de la COO selon la séquence RT-MLPA (v1 – v15) – Hans. Le nombre de sujets classés est précisé selon le phénotype obtenu.

Après exclusion des sujets sans donnée de RT-MLPA, la COO obtenue par cette dernière corrélait aux données du Hans pour 51 sujets (80,9%). Quinze pour cent des formes ABC et 33% des formes GC obtenues en RT-MLPA étaient reclassées en GC et en ABC selon le Hans, respectivement.

	ABC	GC	PMBL	Total
Non-GC	27	6	6	39
GC	5	18	1	24
Total	32	24	7	63

**Tableau 17** Corrélation de la COO entre le Hans et la RT-MLPA parmi les sujets classés en RT-MLPA.



**Figure 15** Résultats de RT-MLPA selon la v15. A : #79 classé en ABC avec sur-expression de *IRF4* ; B : #82 classé en GC avec sur-expression de *MYC* et *MS4A1* ; C : #74 classé en PMBL avec expression de *MAL* et *CD23* ; D : #86 non-classé (échec technique)

#### 4.1.2.2 Profil mutationnel

##### 4.1.2.2.1 Données techniques

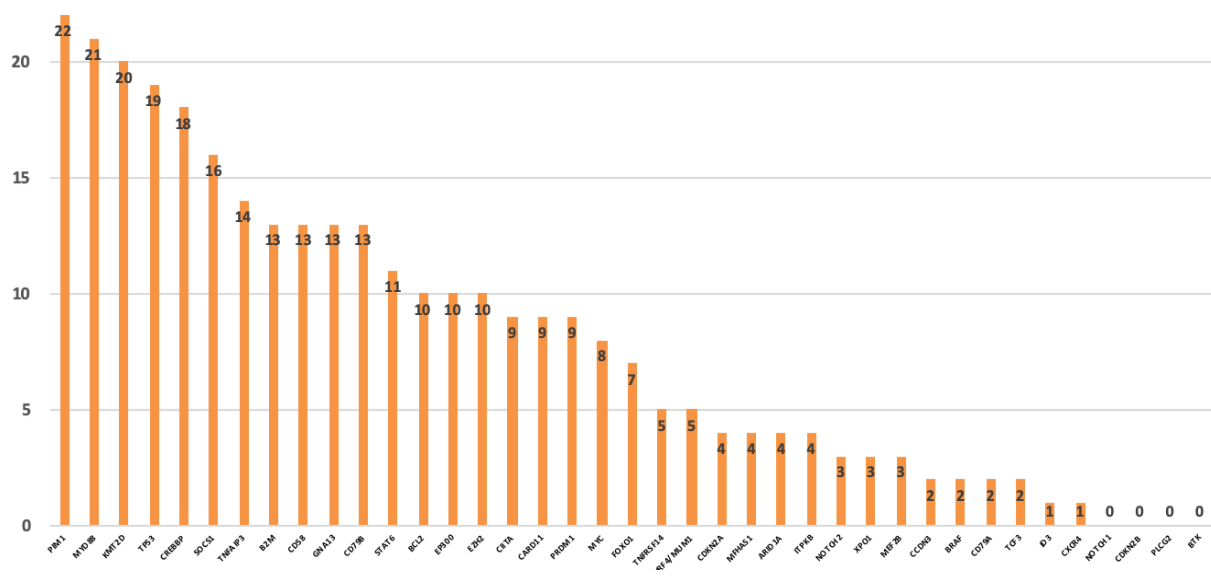
La profondeur médiane de séquençage était de 514X (130 – 5128). Les prélèvements ont été réalisés dans 90,7% sur le séquenceur PGM. Le lymphopanel v1 a été appliqué pour 67 sujets (77,9%). Deux patients n'ont pas bénéficié d'analyse moléculaire, par échec technique (#35) ou absence de réalisation (#24).

	Lymphopanel v1	Lymphopanel v2	Total
PGM (Ion Torrent®)	65	13	78
MiSeq (Illumina®)	2	6	8
Total	67	19	86

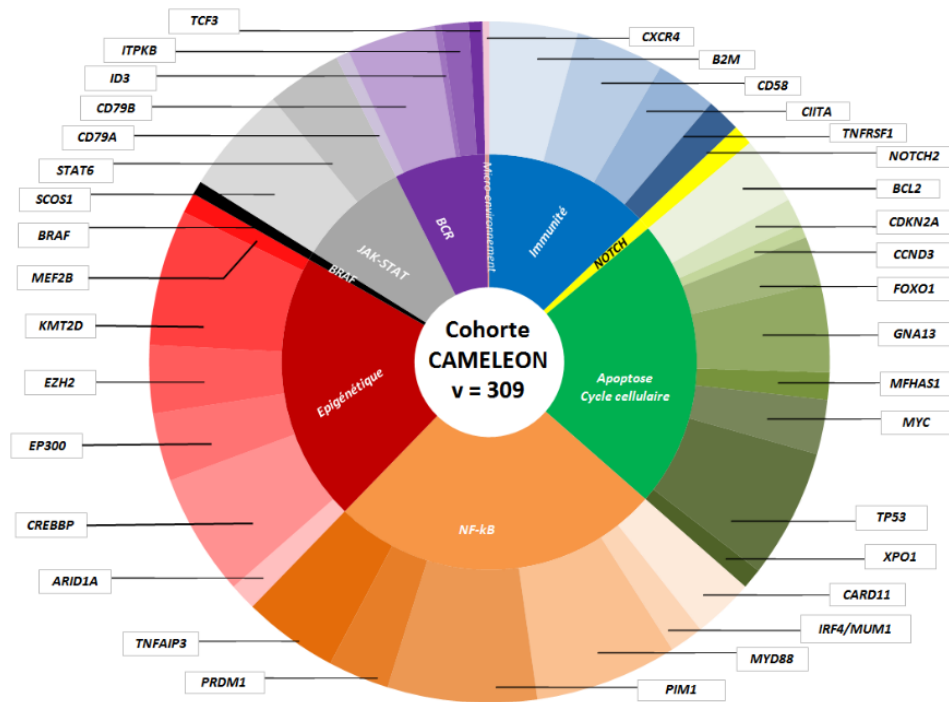
**Tableau 18** Données techniques des automates de séquençage et des panels lymphoïdes appliqués

##### 4.1.2.2.2 Variants mutationnels

Les données produites par NGS étaient disponibles pour 86 sujets, dont 42 LBDGC-ABC, 30 LBDGC-GC, 6 PMBL et 8 LBDGC-UC. Trois-cent-neuf variants mutationnels (VM) ont été mis en évidence, soit un ratio de 3,59 VM/sujet.



**Figure 16** Répartition des VM de la cohorte d'analyse selon leur valeur absolue précisée au sommet des histogrammes.



**Figure 17** Répartition des VM ordonnés selon les voies de l'immunité (bleu), de NOTCH (jaune), de l'apoptose – cycle cellulaire (vert), de NF-κB (orange), de l'épigénétique (rouge), des MAP-kinases (noir), de JAK-STAT (gris), du BCR (violet) et du micro-environnement (rose).

Six gènes (*TP53*, *MYD88*, *PIM1*, *KMT2D*, *CREBBP* et *SOCS1*) impliquaient 116 variants (37,6%), tandis que 14 gènes (*CDKN2A/B*, *NOTCH1/2*, *XPO1*, *ARID1A*, *MEF2B*, *CD79A*, *ID3*, *ITPKB*, *TCF3*, *PLCG2*, *BTK*, *CXCR4*) étaient chacun impliqués pour moins de cinq prélèvements. Aucune mutation de *NOTCH1*, *PLCG2*, *BTK* et *CDKN2B* n'était détectée.

Les voies NF-κB (25,8%), de l'apoptose et du cycle cellulaire (22,6%) et de l'épigénétique (21%) étaient les plus fréquemment atteintes. Les voies du micro-environnement (<1%), de NOTCH (<1%) et des MAP-kinases (<1%) étaient peu impliquées.

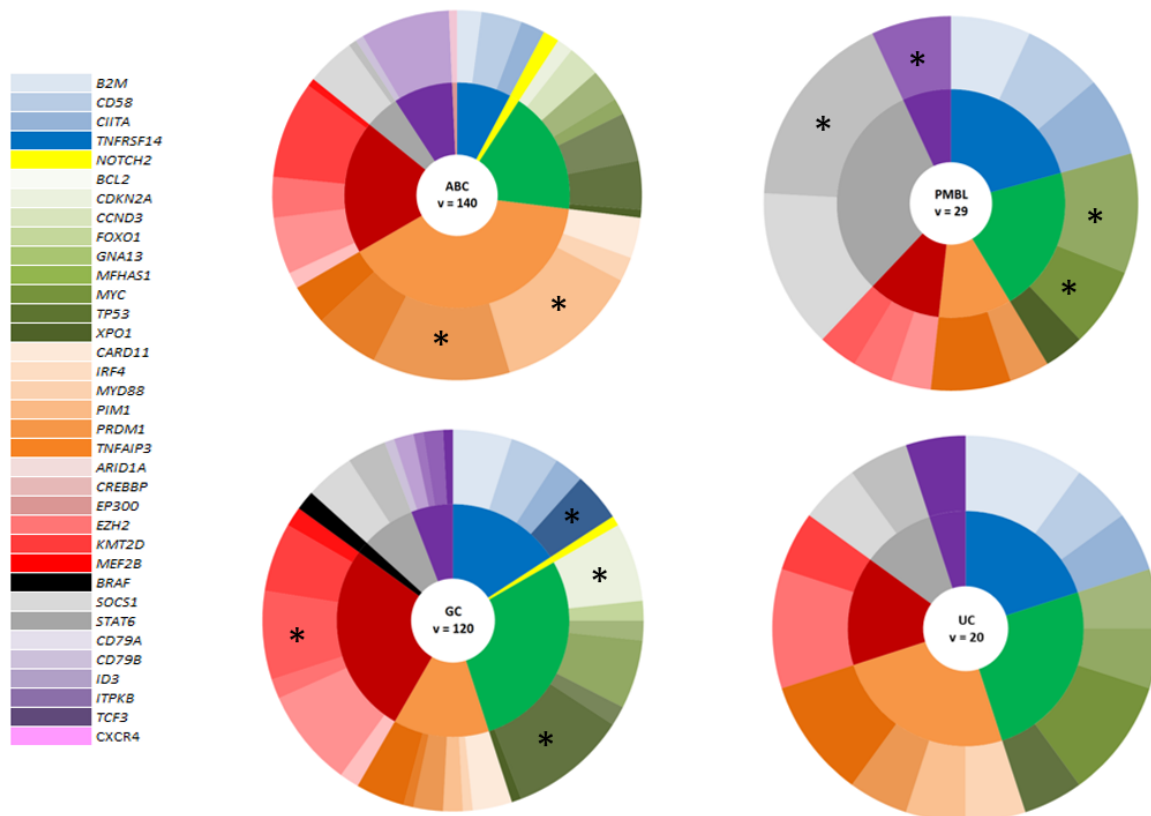
Parmi les LBDGC-ABC, 140 variants ont été détectés chez 43 sujets, avec une VAF médiane de 40%. La voie NF-κB impliquait 40% des variants avec des mutations de *PIM1* (39,5%,  $p=0,021$ ) et *MYD88* (41,9%,  $p=0,0012$ ) significativement associées au phénotype ABC.

Les 120 variants des LBDGC-GC impliquaient les voies de l'apoptose – cycle cellulaire et de l'épigénétique pour 28% et 27% des sujets respectivement. Les variants de *BCL2* (26,7%,  $p=0,03$ ), de *EZH2* (30%,  $p=0,00035$ ), de *TP53* (40%,  $p=0,025$ ) et de *TNFRSF14* (16,7%,  $p=0,021$ ) étaient significativement associés aux formes GC.

Vingt-neuf variants ont été détectés parmi les sept sujets porteurs d'un PMBL (ratio : 4,1 VM/sujet). Les voies JAK/STAT (31%), de l'épigénétique (21%), et de l'apoptose – cycle

cellulaire (21%) impliquaient la majorité des variants mutationnels. L'incidence des variants *STAT6* (71,4%,  $p=0,0009$ ), *ITPKB* (28,6%,  $p=0,019$ ), *MFHASH1* (28,6%,  $p=0,00059$ ) et *GNA13* (42,9%,  $p=0,014$ ) était significativement supérieure pour les PMBL.

Avec en moyenne 2,5 variants par cas, les LBDGC non classés ne présentaient pas d'anomalies spécifiques,



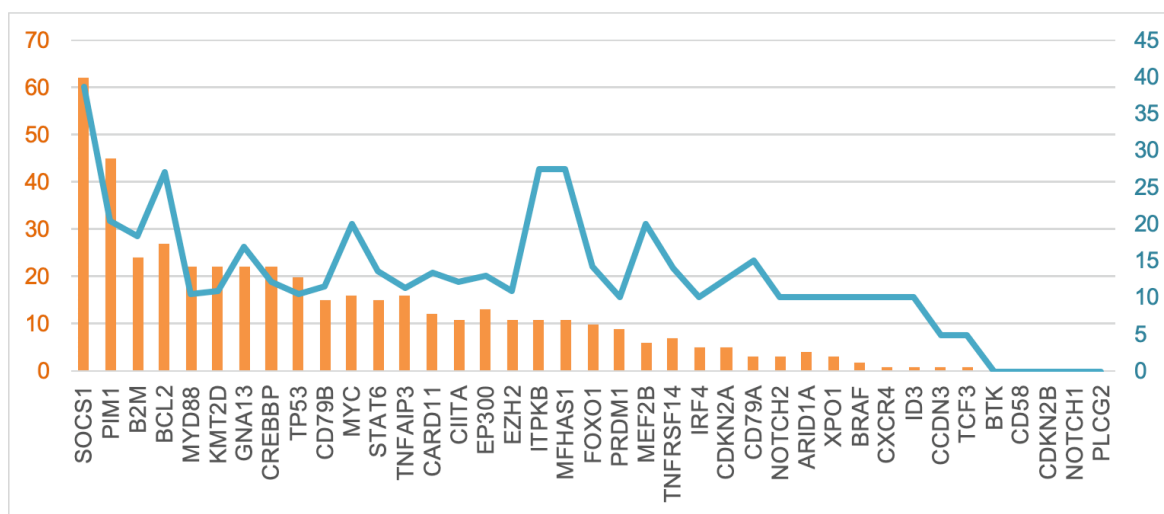
**Figure 18** Répartitions des VM selon la COO et les voies biologiques. Les différences inter-groupes significatives sont marquées d'un astérisque. Le nombre de variants (v) est indiqué pour chaque sous-type cellulaire.

#### 4.1.2.2.3 Caractéristiques mutationnelles

Cinq-cent-neuf mutations ont été détectées sur l'ensemble des régions exomiques explorées. La VAF médiane était de 33,9%. Celle-ci ne différait pas selon la COO. Les mutations étaient des SNV dans 64% des cas, des gains (9%) ou pertes (5%) de codon STOP, des délétions frameshift (8%) ou des mutations du site d'épissage (5%). Cent-vingt mutations (23%) concernaient les gènes *SOCS1* et *PIM1*. La fréquence mutationnelle était définie par le ratio du nombre mutation sur le nombre de variant multiplié par 10. Des gènes sujets à



l'action de l'enzyme AID (hypermutation somatique aberrante) tels que *PIM1*, *B2M*, *BCL2*, *MYC*, *MFHAS1*, *ITPKB* et *MEF2B* présentaient un ratio supérieur à 10.

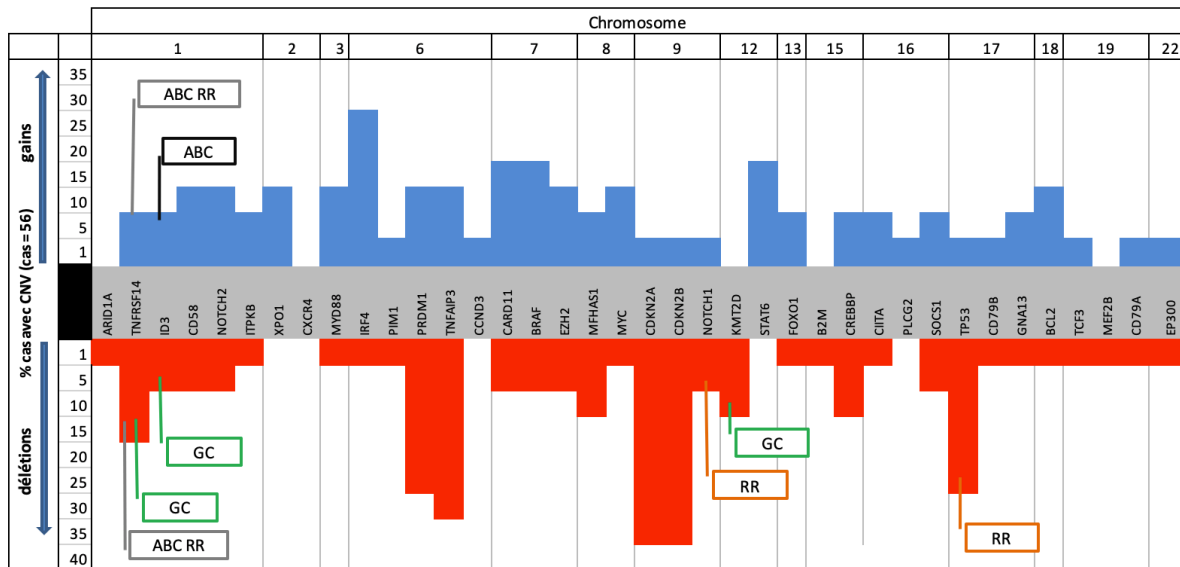


**Figure 19** Incidence des événements mutationnels et fréquence associée selon les gènes. En ordonnée gauche (orange), proportion de sujets (%) présentent au moins une mutation du gène concerné. En ordonnée droite (bleu), fréquence mutationnelle définie par le ratio [nombre de mutation / nombre de variants] x 10.

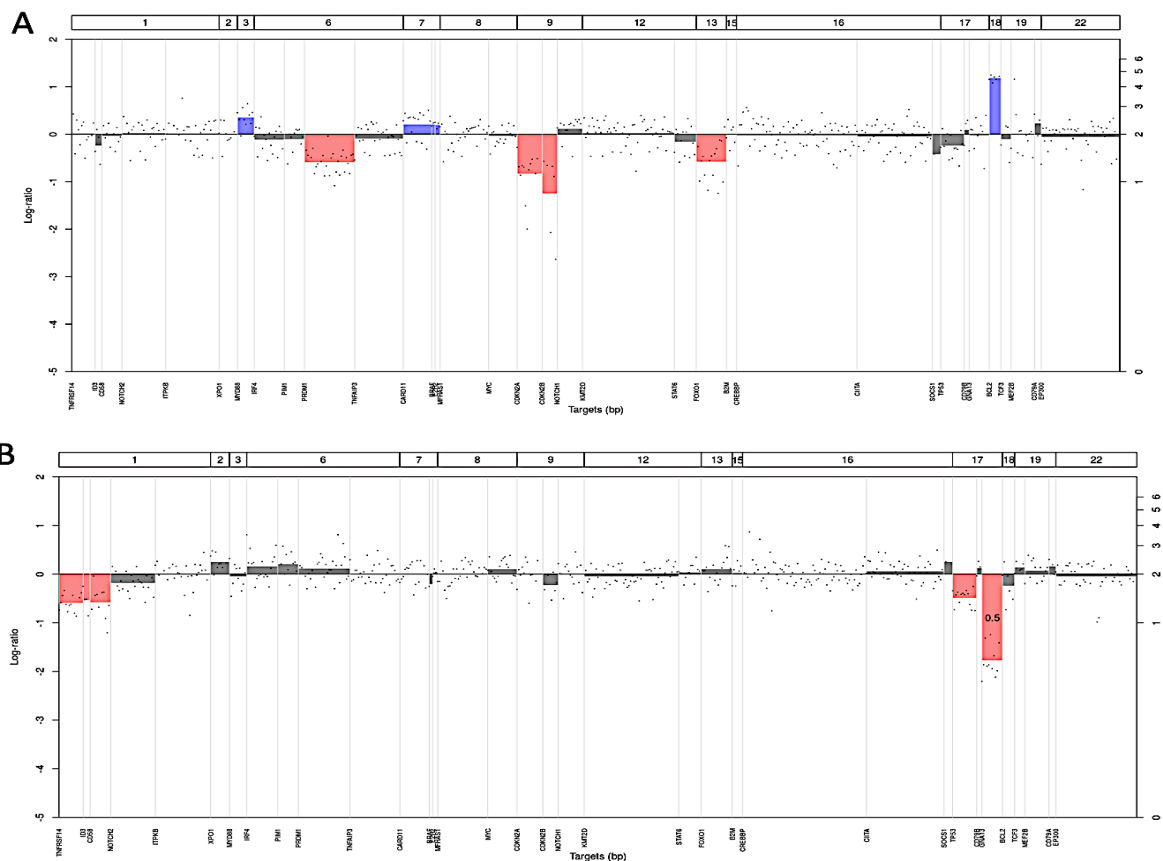
#### 4.1.2.2.4 Profil de CNV

Cinquante-six sujets (63,6%) ont bénéficié d'une analyse de CNV. Trois-cent-cinquante CNV (178 gains de copie et 172 pertes de copie) ont été détectés, soit un ratio moyen de 6.25 CNV/sujet. Les CNV de *TP53* (n=14), *CDKN2A* (n=22), *CDKN2B* (n=20), *PRDM1*(n=16), *TNFRSF14* (n=10) *TNFAIP3* (n=19) impliquaient 58.7% des pertes de copies homo- ou hétérozygotes. *TNFRSF14* (ABC : 3,3% vs GC :41,2%,  $p<0,05$ ), *KMT2D* (ABC : 3,3% vs GC : 29,4%,  $p<0,05$ ) et *ID3* (ABC : 0% vs GC : 17,6%,  $p<0,05$ ) étaient délétés de manière significative selon la COO.

*MYC* (n=8), *CARD11* (n=10), *IRF4* (n=14), *PIM1* (n=11), *BRAF* (n=9) étaient les principaux gènes amplifiés ou avec gains de copie. Le CNV *ID3* était associé de manière significative aux formes ABC (ABC : 10% vs GC : 0%,  $p<0,05$ ).



**Figure 20** Fréquence des CNV. La fréquence (%) est relative au nombre de résultats CNV disponibles (n= 56 sujets). En bleu, les gains de copie, en rouge, les pertes de copie. Encadrés, les CNV associés de manière significative au sous-groupe précisé.



**Figure 21** Extraits de profils CNV ; (A) Sujet #14 avec délétions (rouge) de *CDKN2A/B*, *PRDM1* et *FOXO1*, et gains (bleu) de *MYD88*, *CARD11* et *BCL2* ; (B) Sujet #38 avec délétions de *CD58*, *TNFRSF14*, *ID3*, *GNA13* et *TP53*. En ordonnée, le log-ratio de la profondeur d'anomalie de copie ; en abscisse, le locus chromosomique (haut) et le gène impliqué (bas)

## 4.2 Détermination des facteurs prédictifs de réponse

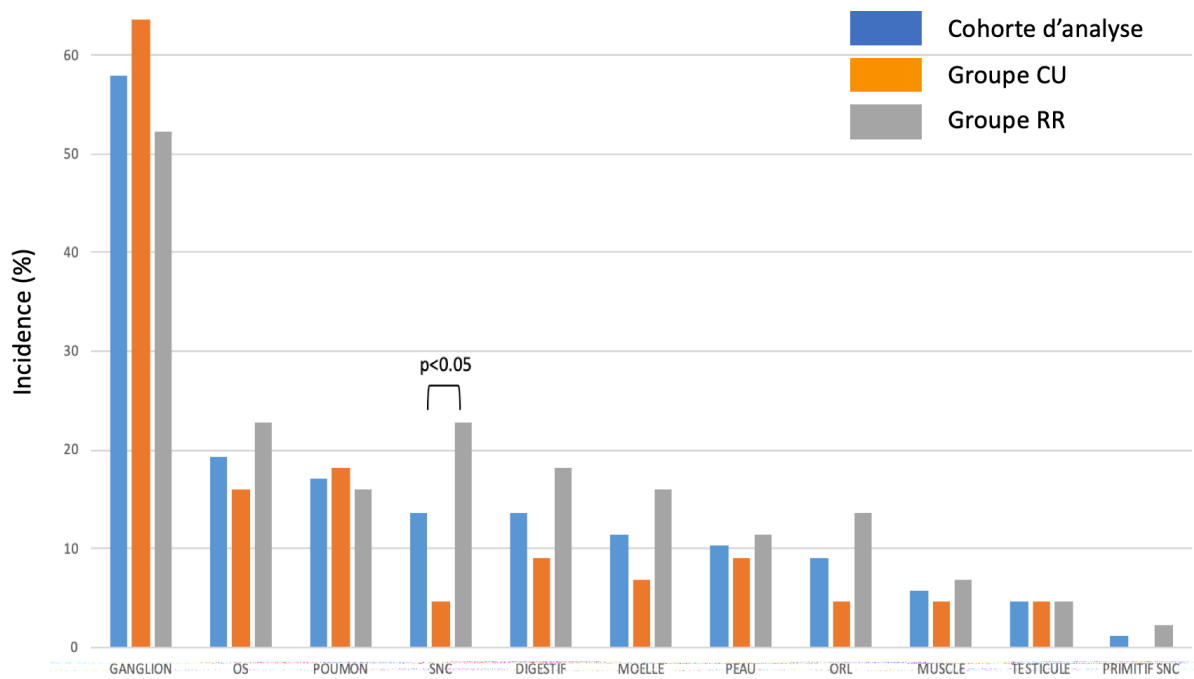
### 4.2.1 Caractéristiques générales

La dichotomie des patients selon le statut CU (*cured*) ou RR (*relapsed, refractory*) a permis de classer 44 patients dans chaque groupe.

Caractéristiques cliniques		Groupe CU n (%)	Groupe RR n (%)	p
Âge médian (extrêmes)		59 (20 – 93)	66 (23 – 85)	<b>0,04</b>
Sexe	Homme	25 (56,8)	27 (61,3)	0,83
	Femme	19 (43,1)	17 (38,6)	
IPI	0-1	17 (38,6)	7 (15,9)	<b>0,031</b>
	2-5	27 (61,4)	37 (84,1)	
Stade Ann-Arbor	I-II	15 (34,1)	9 (20,5)	0,23
	III-IV	29 (65,9)	35 (79,5)	
LDH	Normale	18 (40,9)	19 (43,2)	1
	Élevées	26 (59,1)	25 (56,8)	
ECOG	0-1	32 (72,7)	28 (63,6)	0,44
	2-4	12 (27,3)	16 (36,4)	
COO	ABC	17 (38,6)	26 (59,1)	0,31
	GC	18 (40,9)	12 (27,3)	
	PMBL	4 (9,1)	3 (6,8)	
Régime 1 <sup>ère</sup> ligne	UC	5 (11,4)	3 (6,8)	0,82
	R-CHOP	25 (56)	26 (59)	
	R-miniCHOP	2 (4,5)	7 (15,9)	
	R-ACVBP*	15 (34)	5 (11,3)	
	R-ACVBP + autogreffe	2 (4,5)	2 (4,5)	
Essais**	Essais**	8 (18,1)	5 (11,3)	0,36
	Prévention NM***	27 (61)	21 (47,7)	0,19
Nature prélèvement	FFPE	23 (52,2)	20 (45,4)	0,66
	Congelé	18 (40,9)	19 (43,1)	
	N/A	3 (6,9)	5 (11,5)	
Site prélèvement	Ganglion	25 (56,8)	26 (59)	0,72
	Extra-ganglion	19 (43,1)	17 (38,6)	
	N/A	0	1 (	
Timing prélèvement	Diagnostic seul	44 (100)	23 (52,2)	
	Rechute seule	0	10 (22,8)	
	Rechute + Rechute	0	1 (2,2)	
	Diagnostic + Rechute	0	10 (22,7)	

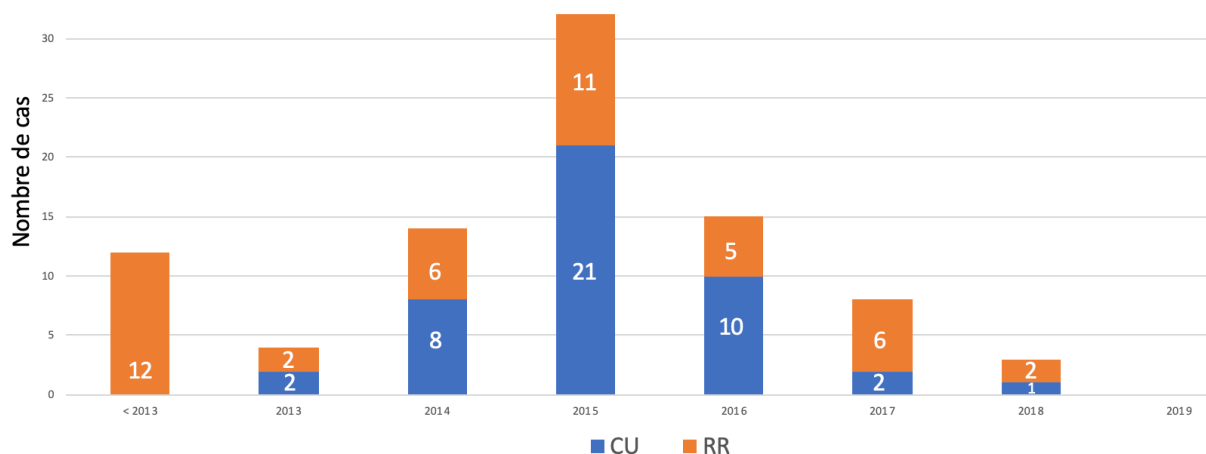
**Tableau 19** Caractéristiques générales des sujets selon le statut RR et CU. \*R-ACVBP incluait les patients traités dans ou selon le protocole GAINED; \*\*GO29044, Senior, Remarc, Cavalli, Phoenix, LNH 09-1B, LNH 98-2B ; \*\*\*Prévention neuro-méningée par injection intra-thécale de méthotrexate, aracytine et corticoïdes +/- méthotrexate haute dose

La séquence R-(mini)CHOP21 (1 séquence tous les 21 jours) était le régime thérapeutique le plus appliqué (68,1%). La séquence R-ACVBP était significativement plus appliquée dans le groupe CU (34% vs 11.3%,  $p < 0,05$ ). L'incidence de la prévention neuro-méningée ne différait pas entre les deux groupes. Les patients du groupe RR présentaient un âge médian et un score IPI supérieurs, ainsi qu'une atteinte neuro-méningée plus fréquente (22.7% vs 4.5%,  $p < 0,05$ ).



**Figure 22** Incidence des atteintes d'organe parmi les sujets de la cohorte d'analyse, les sujets CU et RR

La durée de suivi médiane était de 31 mois pour le groupe RR (extrêmes : 1 – 212) et de 40 mois pour le groupe CU (extrêmes : 3 – 64). Trente-deux décès (36,3%) ont été enregistrés, 2 (4,5%) dans le groupe CU et 30 (68,1%) dans le groupe RR.



**Figure 23** Nombre de sujet discutés en RCP CAMÉLÉON selon la date du premier diagnostic de LBDGC et le statut CU ou RR.

#### 4.2.2 Description des thérapies de rechute

Les sujets du groupe RR (n=44) ont bénéficié en médiane de trois lignes thérapeutiques (extrêmes : 1 – 9). Hors greffe de cellules souches, l'utilisation d'un anticorps monoclonal (rituximab, polatuzumab, MEDI-551, brentuximab) associé ou non à une chimiothérapie était majoritaire (67%). Quinze sujets RR (34%) ont bénéficié d'une intensification par autogreffe conditionnée par BEAM en deuxième ligne en cas de chimiosensibilité. Deux sujets (4,5%) ont bénéficié d'une allogreffe, dont un conservant une rémission complète et un décédé d'évolutivité neuro-méningée précoce. Vingt pour cent des traitements de rattrapage comportaient des thérapies ciblées. Ces dernières ont été utilisées en médiane en quatrième ligne thérapeutique (extrêmes : 2 – 7).

	Régime	Nombre sujets (RR)
Anticorps monoclonaux +/- chimiothérapie	R-CHOP	1
	R-ACVBP	1
	R-DHAOX	10
	R-ICE	8
	R-HAD	2
	R-GEMOX	11
	R-BENDAMUSTINE-ARACYTINE	2
	R-MPV	6
	R-DIAM	6
	R-ENDOXAN	1
	MEDI551-ICE	2
	BIBLOS	3
	PIXANTRONE	1
	POLATUZUMAB	2
	BRENTUXIMAB-VEDOTIN	2
Greffe de cellules souches hématopoïétiques	Autogreffe	15
	Allogreffe	2
Immunothérapies	CAR T Cell	1
	GATA2	1
Thérapies ciblées	BTKi	7
	EZHi	5
	XPOi	5
	HDACi	1
	BCL2i	2
Autre	Radiothérapie	6

**Tableau 20** Régimes thérapeutiques de rattrapages. GATA2 : essai clinique associant nivolumab (anti-PD1), l'obinutuzumab (anti-CD20) et le vénétoclax (BCL2i).

#### 4.2.3 Anatomo-pathologie

Les LBDGC-NOS sans autre caractéristique histologique ou immunohistochimique étaient réparties de manière homogènes (34 vs 33, RR vs CU). L'expression du CD30 et du CD5 ne différait pas entre les deux populations. Le phénotype cellulaire selon l'algorithme de Hans ne différait pas ( $p=0,31$ ). Les données d'expression de MYC, BCL2 et/ou BCL6 permettaient de définir 6 LBDGC-DE/-TE au sein du groupe CU, 4 au groupe RR, dont une forme LBDGC-TE.

#### 4.2.4 Résultats cytogénétiques

L'incidence des anomalies impliquant *TP53* détectées sur caryotype était supérieure dans le groupe RR (38,4% vs 10,3% pour le groupe CU,  $p=0,02$ ). Les résultats de FISH ne montraient pas de différence d'incidence significative entre les deux populations.

		CU	RR
Caryotype	Disponible	29	26
	Complexe	22	23
	Anomalie 17p	3	9
FISH	<i>MYC-IGH</i>	0	5
	<i>MYC-nonIGH</i>	0	2
	<i>BCL2</i>	2	6
	<i>BCL6</i>	3	2
	<i>MYC+BCL2</i>	0	2
	Del17p	1	2

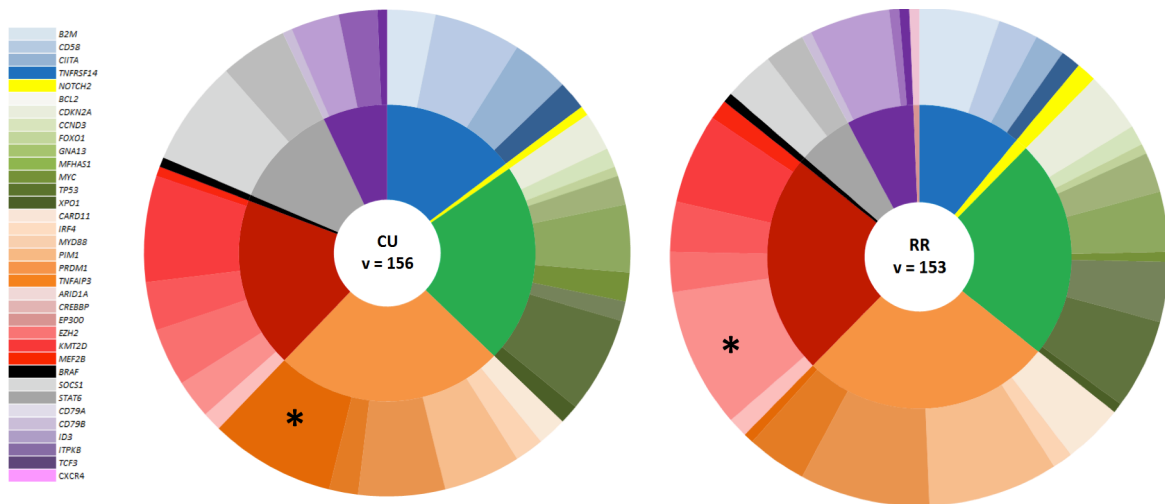
**Tableau 21** Données comparatives de cytogénétiques selon le statut RR et CU.

Les réarrangements de *MYC* concernaient 7 sujets, tous du groupe RR. Le partenaire était *IGH* pour 5 cas, indéterminé sinon. Deux sujets présentaient un réarrangement associé de *MYC* et *BCL2* (#43, #50), définissant un HGBCL.

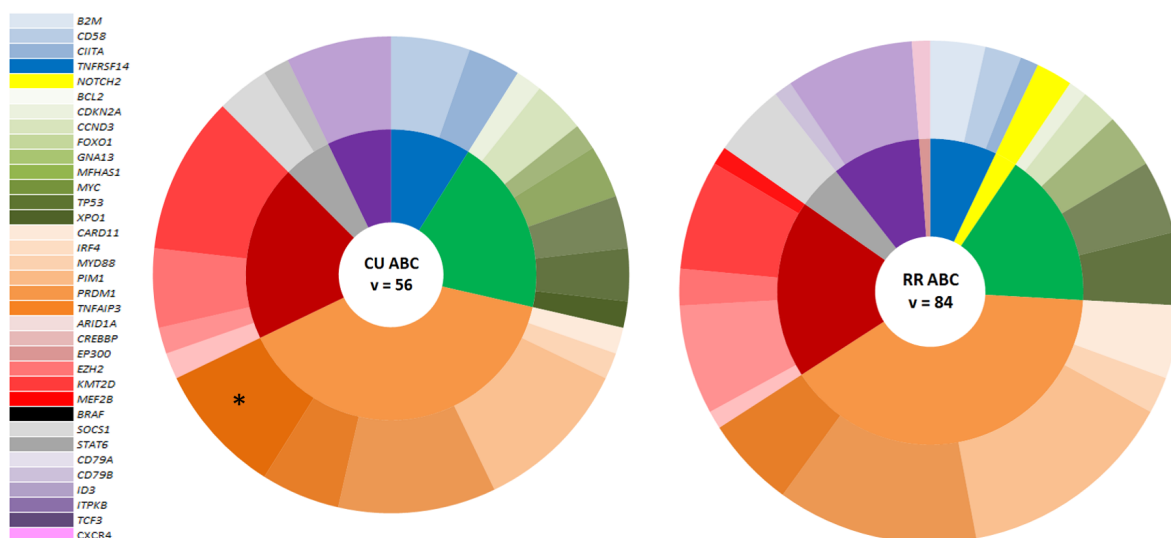
## 4.2.5 Résultats moléculaires

### 4.2.5.1 Profils mutationnels

Le nombre de variants mutationnels ne différait pas selon le statut CU (n=156) ou RR (n=153). Selon les huit voies biologiques, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les sujets CU et RR. En analyse univariée des variants mutationnels, *TNFAIP3* était significativement associé au groupe CU (29,5% vs 2,3%,  $p < 0,001$ ). À l'inverse, le gène *CREBBP* était associé au groupe RR (31,8% vs 9,1%,  $p = 0,016$ ).



**Figure 24** Répartition des variants mutationnels selon les groupes CU et RR. Les différences significatives sont marquées d'un astérisque.

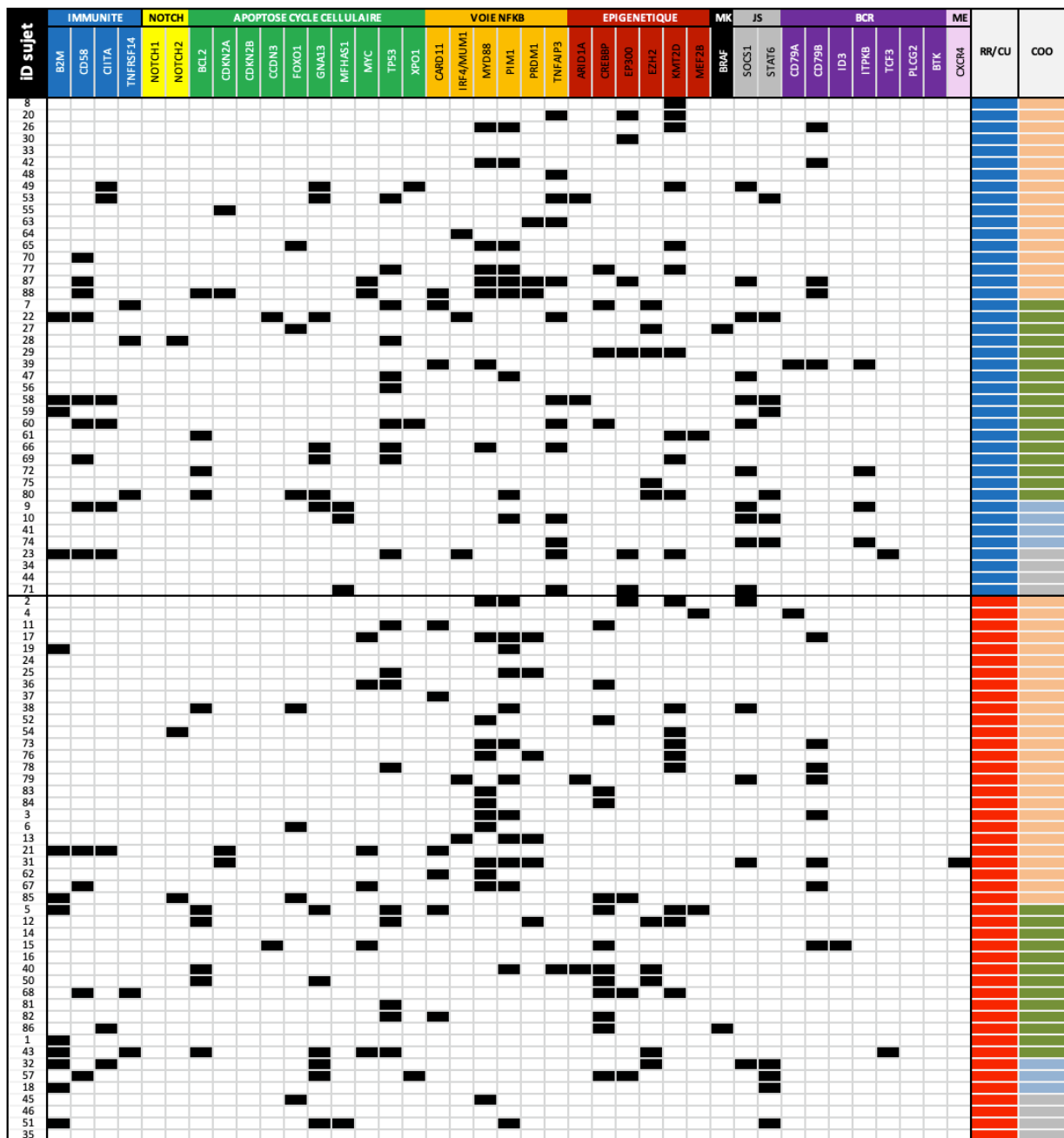


**Figure 25** Répartition des variants mutationnels selon le statut LBDGC-ABC-CU et LBDGC-ABC-RR. Les différences significatives sont marquées d'un astérisque.

Les analyses en sous-groupes selon la COO et les statut CU/RR étaient limitées par des effectifs restreints, et n'ont été réalisées qu'en univarié.

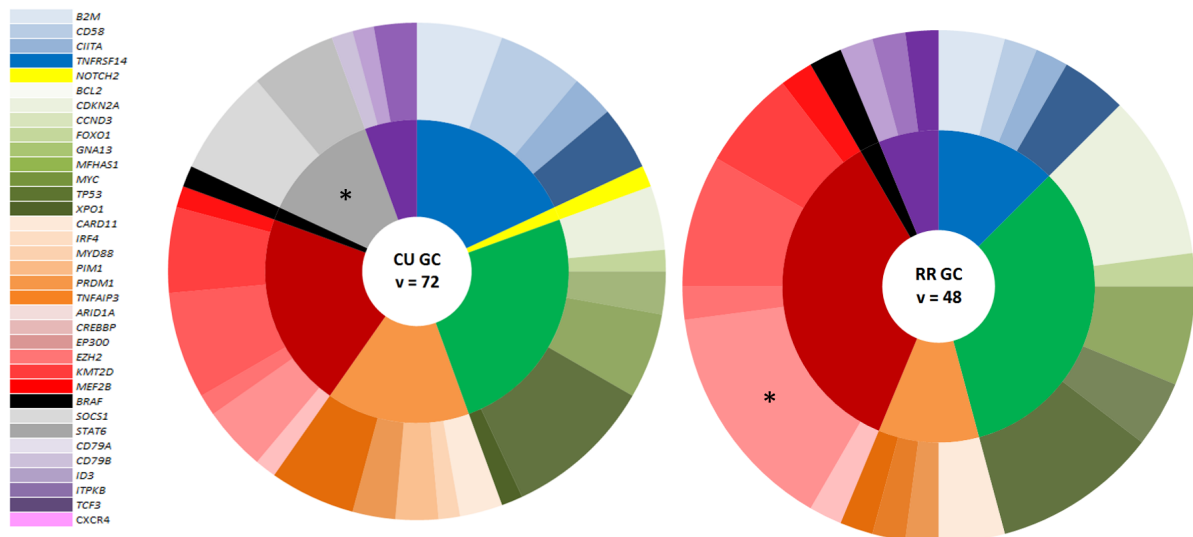
Parmi les LBDGC-ABC, le ratio de variant par sujets était identique selon le statut CU et RR. Seule l'incidence de *TNFAIP3* différait de façon significative en faveur du groupe CU (5 vs 0, CU vs RR ;  $p < 0,001$ ).





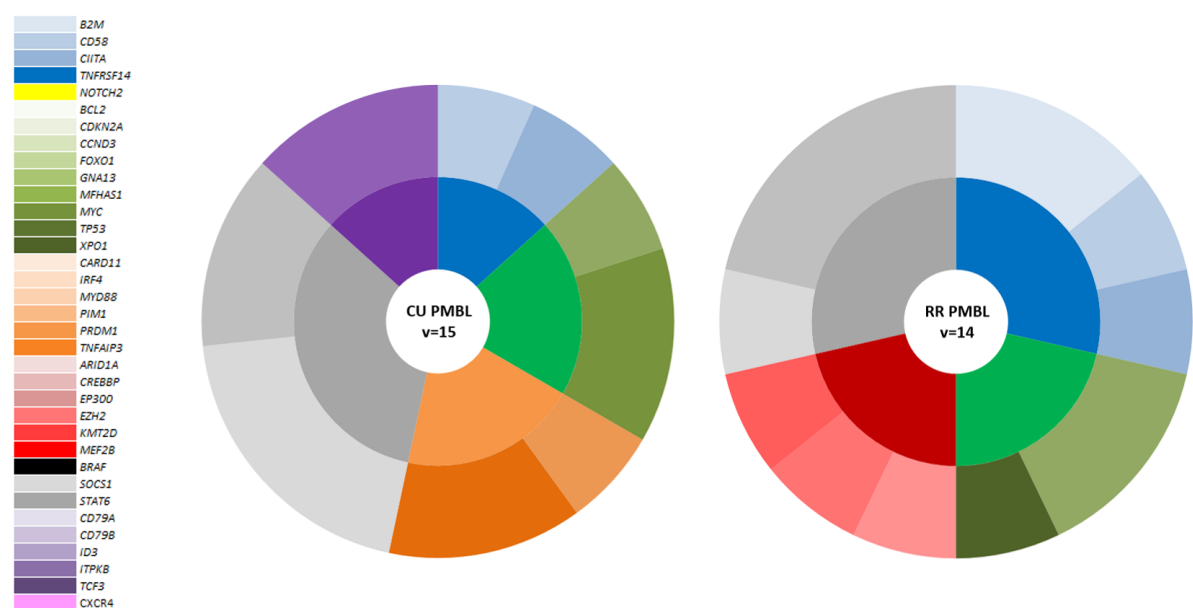
**Figure 26** Heat map des variants mutationnels somatiques selon les voies biologiques et leurs gènes en abscisse, selon le sujet (ordonnée gauche), le statut CU (bleu) et RR (rouge) et le phénotype cellulaire ABC (rose), GC (vert), PMBL (bleu ciel) et UC (gris)(ordonnée droite). MK : MAP-kinases ; JS : JAK-STAT ; ME : micro-environnement

Pour les LBDGC-GC, la voie JAK-STAT impliquait un nombre de variants supérieur dans le groupe CU (9 vs 0, CU vs RR,  $p=0,017$ ). *CREBBP* était plus fréquemment muté chez les sujets LBDGC-GC-RR (16.7% vs 58.3%,  $p=0,045$ ).



**Figure 27** Répartition des variants mutationnels selon le statut LBDGC-GC-CU et LBDGC-GC-RR. Les différences significatives sont marquées d'un astérisque.

Les profils PMBL-CU et PMBL-RR ne montraient pas de différence significative.



**Figure 28** Répartition des variants mutationnels selon le statut PMBL-CU et PMBL-RR.

#### 4.2.5.2 Résultats de CNV

Les résultats de CNV étaient disponibles pour 26 sujets du groupe CU et 30 du groupe RR, avec un ratio par patient superposable à 6,2 CNV.

Les 26 patients CU étaient pour 38% des formes ABC, 42% des formes GC, 8% des formes PMBL et 12% des UC. Les 164 CNV comprenaient 77 pertes de copies et 87 gains. Les pertes de copie de *NOTCH1* prédominaient dans le groupe CU (11.5% vs 0%,  $p < 0,05$ ).

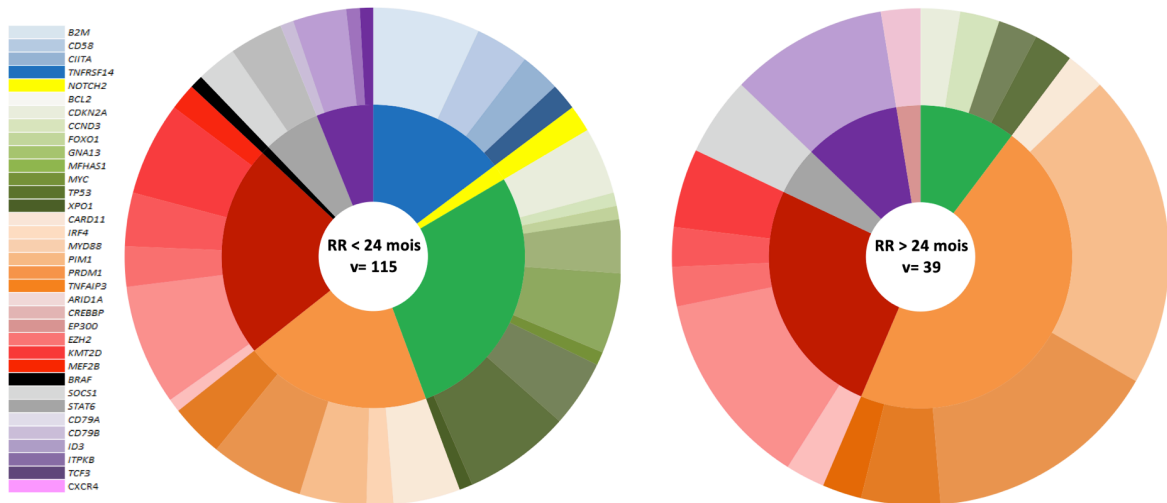
Les 30 patients RR étaient pour 66% des LBDGC-ABC, 20% des LBDGC-GC, 7% des PMBL et 7% des LBDGC-UC. Les 186 CNV se répartissaient en 85 gains et 101 pertes de copies. Les pertes de copie *TP53* étaient plus fréquentes dans le groupe RR ( $n=11$  (36%),  $p=0,04$ ). Il n'a pas été mis de différence en termes d'incidence globale entre les formes GC-RR et GC-CU. Les anomalies de *TNFRSF14* étaient plus fréquentes dans le groupe ABC-RR comparativement au groupe ABC-CU (30% vs 0%,  $p < 0,05$ ). La survie globale des 56 sujets ne différait pas selon les pertes de copies de *TP53* ( $p=0,12$ ) et de *CDKN2A* ( $p=0,39$ ).

		LBDGC-CU	LBDGC-RR	LBDGC-GC	LBDGC-ABC	PMBL
Histologie		N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Cytogénétique	Caryotype		17P ( <i>TP53</i> )			
	FISH		<i>MYC</i> , <i>TP53</i>			
Biologie moléculaire	Voies biologiques	JAK-STAT	N/A	N/A	N/A	N/A
	VM	<i>CIITA</i> , <i>TNFAIP3</i>	<i>CREBBP</i>	<i>BCL2</i> , <i>EZH2</i> , <i>PIM1</i> , <i>TP53</i> , <i>TNFRSF14</i>	<i>MYD88</i>	<i>STTA6</i> , <i>ITPKB</i> , <i>MFHAS1</i> , <i>GNA13</i>
	CNV (rouge : déletion ; bleu : gain ou amplification)	<i>NOTCH1</i>	<i>TP53</i>	<i>TNFRSF14</i> , <i>ID3</i> , <i>KMT2D</i>	<i>ID3</i>	

**Tableau 22** Résumé des caractéristiques biologiques différentielles significatives ( $p < 0,05$ ) selon le statut RR/CU (colonne grise claire) et selon la COO (colonne grise foncée)

### 4.3 Impact de la rechute précoce / état réfractaire

La cohorte RR comprenait 12 sujets en rechute tardive ( $\geq 24$  mois) et 32 sujets en rechute précoce ou réfractaires primaires ( $< 24$  mois). Le ratio moyen de variants par patient ne différait pas (3,2/sujets ( $\geq 24$  mois) versus 3,6/sujets ( $\leq 24$  mois)). Les rechutes tardives ne présentaient pas d'anomalie de l'immunité et une incidence des variants de *TP53* trois fois moindre (8,3% versus 25%,  $p=0,66$ ). Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative sur l'incidence des VM selon les rechuteurs précoces ou tardifs.

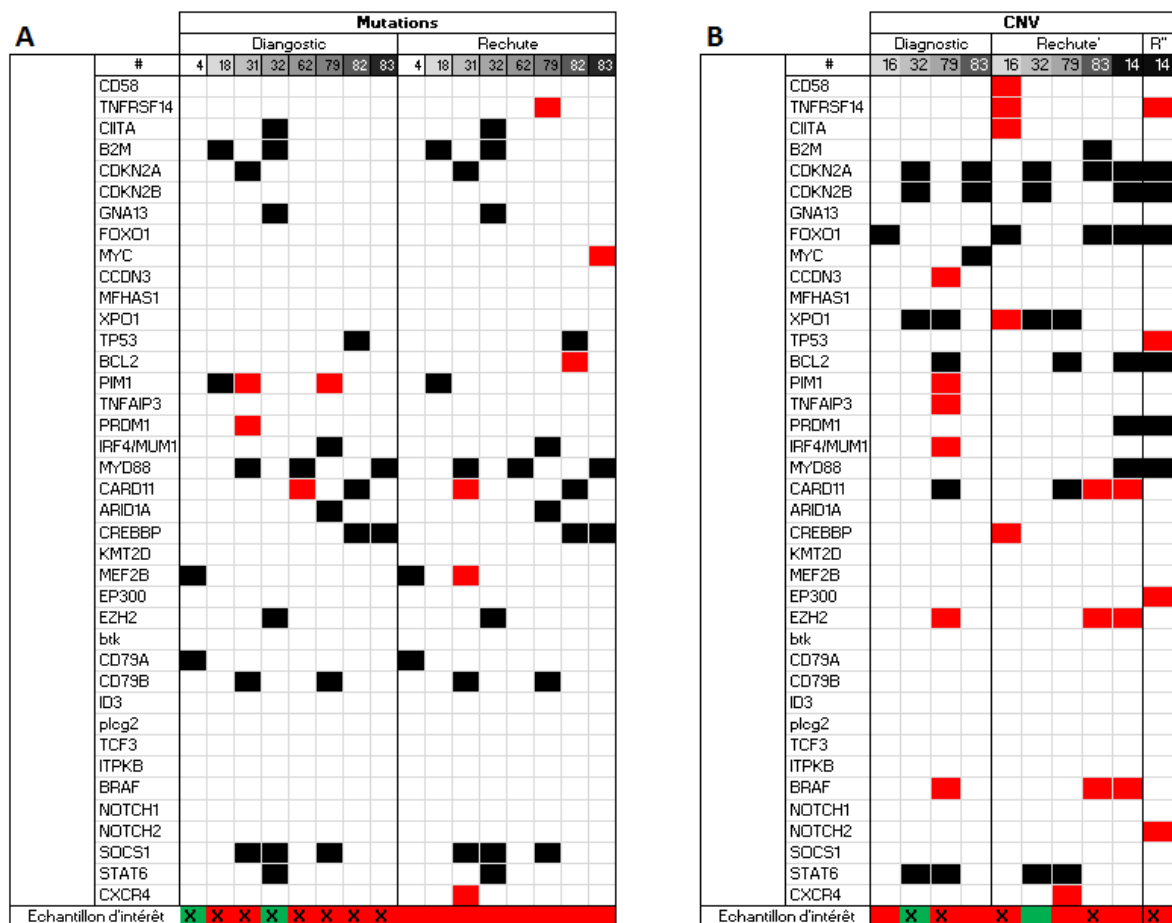


**Figure 29** Profil de variants mutationnels selon le statut « réfractaire primaire ou rechute précoce » (gauche) et « rechute tardive » (droite)

#### 4.4 Prélèvements multiples

Onze sujets ont bénéficié d'une double analyse moléculaire. Les doubles profils de variants mutationnels étaient issus de prélèvements réalisés au diagnostic et à la rechute et un analyse réalisée au décours de deux rechutes distinctes. Dix-sept pour cent de l'ensemble des variants détectés différaient ainsi selon le moment du prélèvement, avec des mutations exclusives de *PIM1* (2), *PRDM1* (1) et *CARD11* (1) au diagnostic, et de *TNFRSF14* (1), *MYC* (1), *BCL2* (1), *CARD11* (1) et *MEF2B* (1) à la rechute. Un sujet (#29) a bénéficié d'une double analyse au diagnostic, avec une corrélation de VM entièrement superposable.

Six patients ont bénéficié d'une analyse double en CNV, dont un à l'occasion de deux rechutes successives. Trente-huit pour cent des CNV différaient selon le moment de l'analyse avec 8 CNV mis en évidence à la première analyse et 14 à l'analyse ultérieure.



**Figure 30** Sujets avec prélèvements multiples. (A) Profil mutationnel comparatif selon le timing du prélèvement ; (B) Profil de CNV selon le timing du prélèvement ; En ordonnée supérieure, numéro du sujet ; en ordonnée inférieure, l'échantillon est marqué d'un « x » si utilisé pour notre analyse comparative, annoté rouge si profils différents, annoté vert si identique. Les anomalies somatiques sont indiquées en noir si stable entre deux prélèvements, en rouge sinon. Rechute' : première rechute ; R'' : seconde rechute.

## 4.5 Modulation thérapeutique selon les résultats CAMÉLÉON

Les principales thérapies ciblées utilisées étaient des EZH2i (tazemetostat), des HDACi (CUDC-907), des XPO1i (selinexor), des BTKi (ibrutinib), et des BCLi (vénétoclax).

### 4.5.1 Inhibiteur d'EZH2

Cinq patients ont bénéficié d'un EZHi, le tazemetostat en monothérapie dans le cadre d'un essai clinique (EISAI), tous du groupe RR (#11 #14 #19 #78 #82). Les caractéristiques biologiques des patients sont résumées dans le tableau 23.

iD	COO	VM	CNV	Ligne	Timing RCP	Réponse
#11	ABC	TP53 muté CREBBP muté	EZH2 EP300 MYD88	6	RCP avant TTT	PD
#14	GC		CDKN2A/B EP300 TP53 EZH2 MYD88	4	RCP avant TTT	PR (1 année)
#19	ABC		EZH2 CREBBP	6	RCP avant TTT	PD
#78	ABC	TP53 muté	CREBBP MYD88 EZH2	5	RCP avant TTT	PD
#82	GC	TP53 muté CREBBP muté		3	RCP après TTT	PD

**Tableau 23** Profil biologique des sujets ayant bénéficié d'EZH2i. Les CNV sont précisées en bleu (perte) ou rouge (gain) de copie. Ligne : correspond à la ligne thérapeutique durant laquelle la thérapie ciblée a été administrée. iD : référence sujet.

Dix-huit sujets porteurs d'une anomalie d'EZH2 ont été détectés dans la cohorte d'analyse (10 VM, 8 CNV). Parmi eux, 4 sujets (22%) ont bénéficié d'un EZHi, dont aucun patient porteur d'une mutation d'EZH2.

#### 4.5.2 Inhibiteur d'HDAC

Un sujet (#14) a reçu un modulateur d'histone déacetylase en association à un inhibiteur de PI3-kinase (protocole CUDC-907), en cinquième ligne thérapeutique. Décrit dans le tableau précédent, son profil biologique était péjoratif, avec en outre des anomalies cytogénétiques ajoutées telles qu'une trisomie 3, une translocation t(8 ;14) et une délétion 17p. Aucune activité clinique ou morfo-métabolique de l'HDACi n'a été en évidence pour ce patient.

#### 4.5.3 Inhibiteur d'XPO1

Cinq patients ont bénéficié du selinexor, en monothérapie ou en association à l'immuno-chimiothérapie dans le cadre d'essais cliniques (SADAL : selinexor + dexaméthasone ; SELINDA : selinexor + rituximab, gemcitabine, cisplatine et dexaméthasone).

iD	COO	VM	CNV	Ligne	Timing RCP	Protocole	Réponse
#4	ABC	Absence de profil biologique		2	RCP après TTT	SELINDA	PD
#14	GC		<i>CDKN2A/B</i>	3	RCP avant TTT	SADAL	PR
#19	ABC	<i>TP53</i> muté		3	RCP après TTT	SADAL	PD
#79	ABC	<i>TP53</i> muté	<i>XPO1</i>	3	RCP après TTT	SADAL	PD
#82	GC	<i>TP53</i> muté <i>CREBBP</i> muté	<i>XPO1</i>	3	RCP après TTT	SADAL	PR

**Tableau 24** Profil biologique des sujets ayant bénéficié d’XPO1i

Quinze patients présentaient des anomalies du gène *XPO1* (3 variants mutationnels, 12 CNV dont 11 amplifications). Deux patients avec anomalie d’*XPO1* ont bénéficié du selinexor, avec 50% de réponse globale (n=1 patient). Aucun patient porteur de la mutation hot-spot d’*XPO1*<sup>E571K</sup> n’a bénéficié du selinexor (2 patients CU, 1 patient multi-réfractaire).

#### 4.5.4 Inhibiteur de BTK

Sept patients ont reçu de l’ibrutinib (BTKi), en monothérapie ou en association à la chimiothérapie (protocole BIBLOS associant l’ibrutinib au R-CHOP). Excepté une prescription tenant compte de la conclusion CAMÉLÉON, le rationnel d’administration était basé sur l’atteinte oculo-cérébrale.

iD	COO	Profil	CNV	Ligne	Protocole	Timing RCP	Réponse
#11	ABC	<i>TP53</i>	<i>MYD88</i>	5	Monothérapie	RCP avant TTT	PD
#31		<i>MYD88</i> <sup>L265P</sup>		3		RCP avant TTT	PR
#79				2	BIBLOS	RCP après TTT	RC
#21				4		RCP avant TTT	PD
#62		<i>MYD88</i> <sup>L265P</sup>		6	Monothérapie	RCP après TTT	PD
#67		<i>MYD88</i> <sup>L265P</sup>		3		RCP avant TTT	PR
#78		<i>TP53</i>	<i>MYD88</i>	3		RCP avant TTT	PD

**Tableau 25** Profil biologique des sujets ayant bénéficié de BTKi

#### 4.5.5 Inhibiteur de BCL2

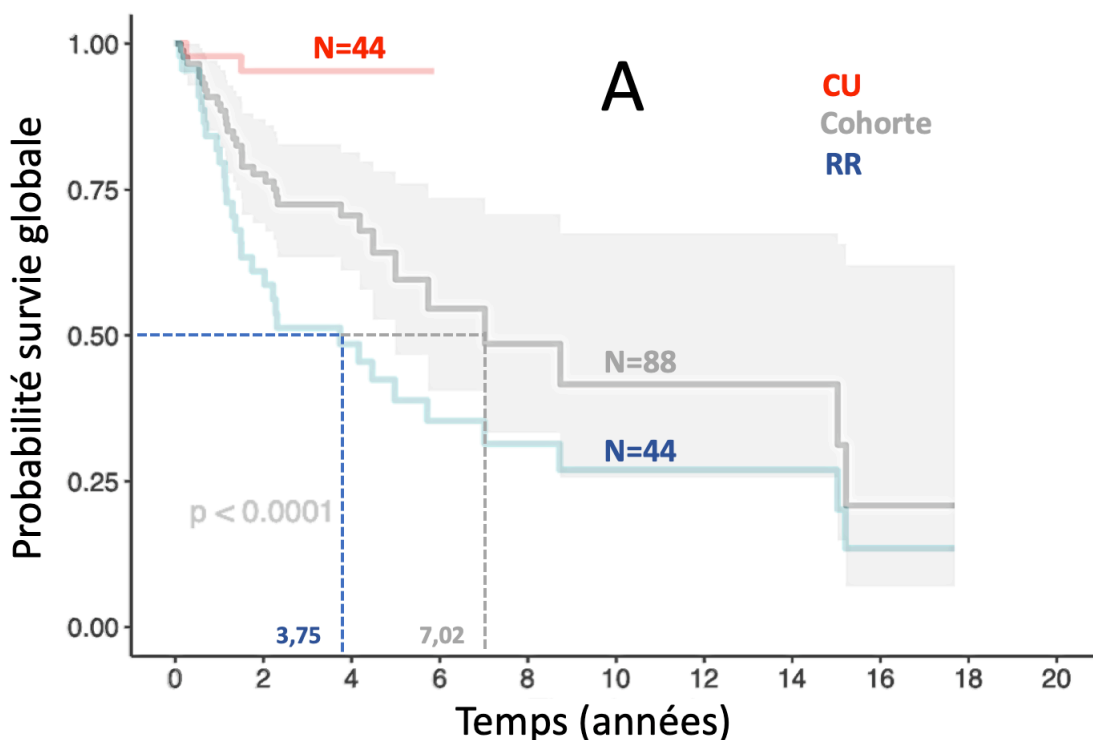
Trois patients ont bénéficié du vénétoclax, dans le cadre des protocoles GATA (atezolizumab + obinutuzumab + venetoclax) et CAVALLI (R-CHOP + venetoclax).

iD	COO	VM	CNV	Ligne	Protocole	Timing RCP	Réponse
#14	GC		Gain copie BCL2 Anomalie chr. 18	7	GATA	RCP avant TTT	PR
#30	GC			1	CAVALLI	RCP après TTT	RC
#57	ABC			6	GATA	RCP avant TTT	PD

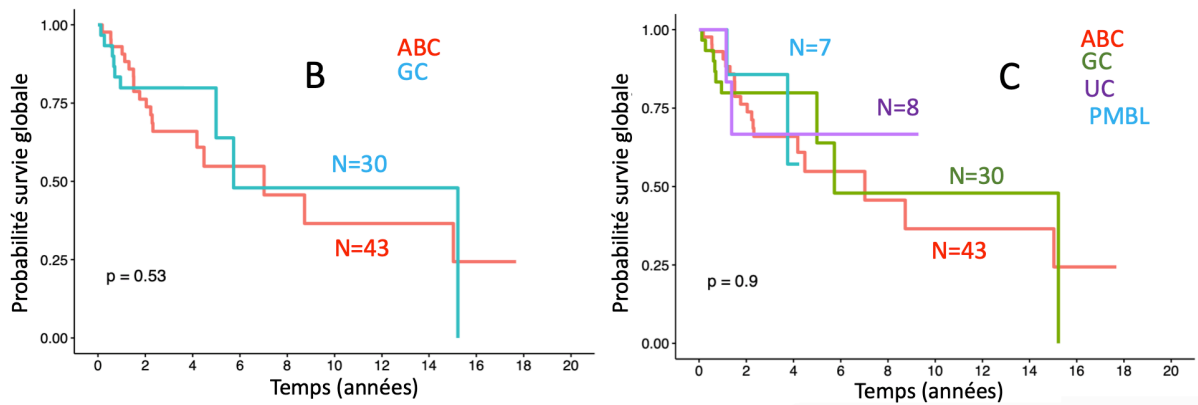
**Tableau 26** Profil biologique des sujets ayant bénéficié de BCL2i

#### 4.6 Analyses en survie globale

La survie globale de notre cohorte d'analyse est de 89,7%, 77,7% et 59,6% à 1, 2 et 5 ans, respectivement, avec une survie médiane de 7,02 années. Par définition, la PFS n'était pas comparée selon la rémission. La survie globale était supérieure dans le groupe CU (OS à 5 ans : 95% vs 38,9%, CU vs RR,  $p < 0,0001$ ) Les phénotypes cellulaires GC, ABC, PMBL et UC n'influençaient pas les survies globales et sans progression.

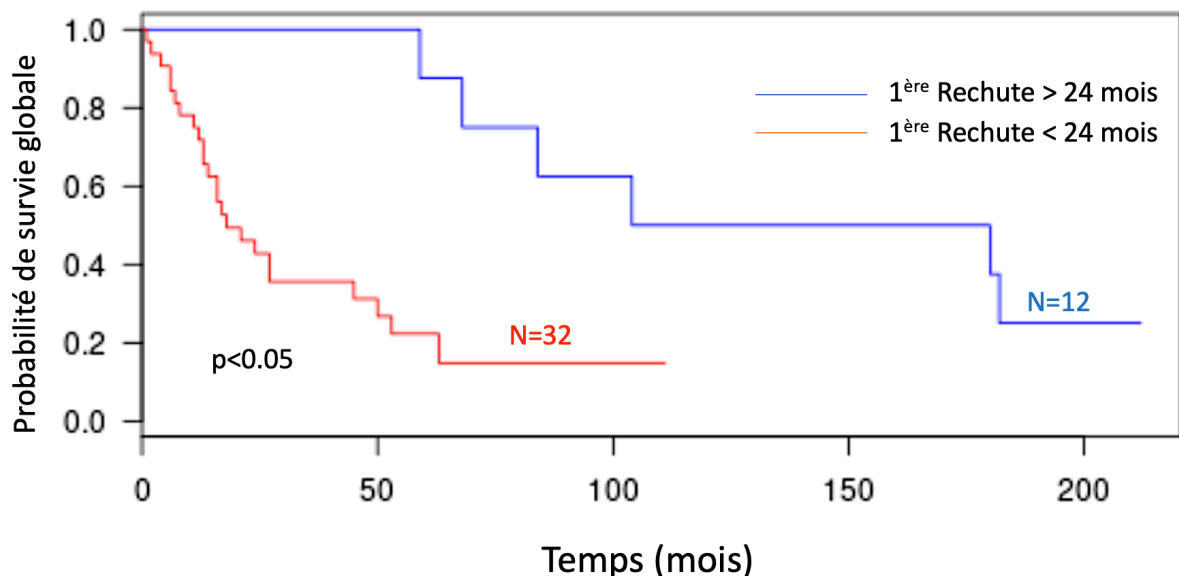






**Figure 31** Données de survie globale. (A) Superposition de la cohorte d'analyse (gris), du groupe RR (bleu) et du groupe CU (rouge), avec des survies médianes respectives de 7.02 années, 3.75 années et non atteintes. Comparaison des phénotypes GC/ABC (B) et GC/ABC/PMBL/UC (C). Le nombre de sujets N est précisé pour chaque sous-groupe. La valeur  $p$  est précisée pour chaque graphe.

Sous réserve des effectifs et de la durée de suivi médiane, la survie globale était supérieure en cas de rechute après 24 mois.



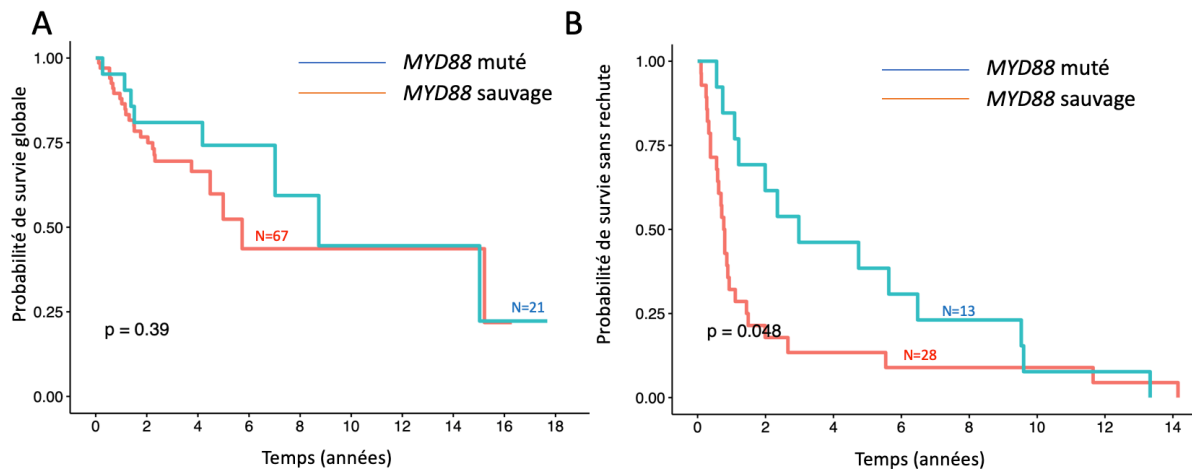
**Figure 32** Survie globale selon le statut « réfractaire primaire ou rechute précoce » et « rechute tardive »

#### 4.6.1 Focus sur *MYD88*

Les variants de *MYD88* ont été détectés chez 21 sujets (23,8%). Parmi eux, 24% présentaient une atteinte du système nerveux central, tous du groupe RR. Dix-huit sujets (85,7%) présentaient un phénotype ABC.

La co-occurrence des mutations de *MYD88* et de *CD79B*, de *PIM1* et de *PRDM1* était retrouvée dans 47%, 57% et 24%, respectivement. Le variant hot-spot *MYD88*<sup>L265P</sup> (chr3:g.38182641T>C) concernait 14 patients (66,6%), sans différence d'incidence selon le statut RR ou CU.

En termes de CNV, huit sujets *MYD88* mutés étaient porteurs d'un gain de copie de *MYD88*. Les sujets mutés *MYD88* présentaient une survie sans progression significativement supérieure aux patients non mutés (PFS à 2 ans : 61,5% vs 40,0%,  $p=0,048$ , cf. figure 34).



**Figure 33** Survies selon le statut *MYD88* : (A) OS sur la cohorte d'analyse ; (B) PFS sur le groupe RR

Parmi les LBDGC-ABC, l'incidence de sujets *MYD88* mutés ne différait pas selon le statut CU et RR (35.3% vs 46.2%, CU vs RR). Nous n'avons pas comparé le statut *MYD88* selon les formes GC, PMBL ou UC, par manque d'évènement.

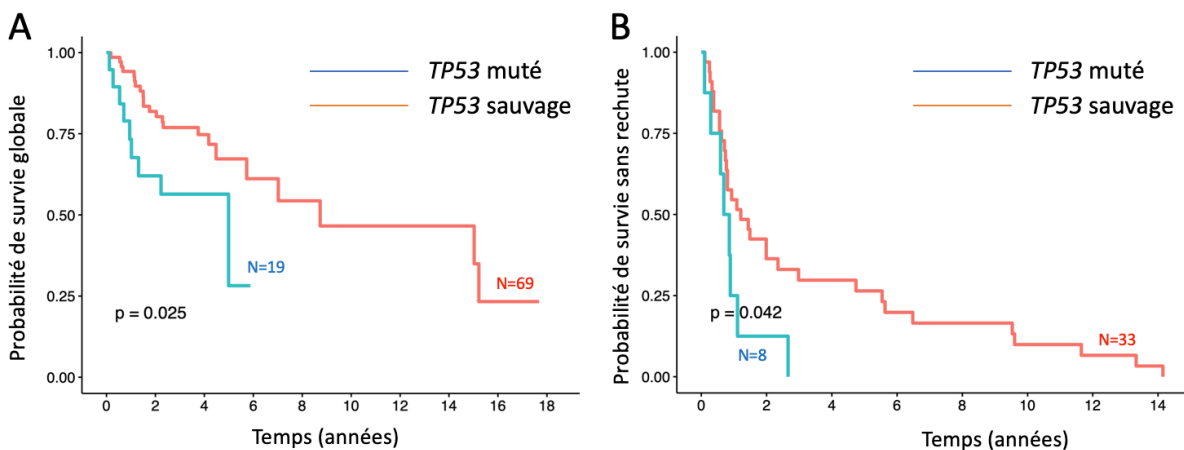
#### 4.6.2 Focus sur *TP53*

Vingt-sept patients présentaient une ou plusieurs anomalies de *TP53*. Dix-neuf variants mutationnels dont 7 associés à une délétion homozygote de *TP53* ont été mis en évidence. Les LBDGC-GC présentaient des mutations de *TP53* plus fréquentes que les LBDGC-ABC (40% vs 14%,  $p=0,024$ ). En revanche, l'incidence ne variait pas selon les groupes RR (n=9) et CU (n=10). Les délétions et pertes de copie de *TP53* étaient plus fréquentes dans le groupe RR (11.5% vs 36.7%,  $p=0,046$ ).

CU					V157F (72%)* R175G (29%) N131I (71%) H178D (26%) R181H (38%) Délétion frameshift	S215R (29%)*	Y236C (29%) R248W (12%)									E326
EXONS TP53	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11					
RR				G105V (52%)* T125K (43%)	A159V (92%)		R248Q(89%)* R248Q(39%)* R248Q(94%)* R248Q(25%)	E286K (83%) Délétion non frameshift*								
Domaine protéique	TAD			DBD			DBD			DT						

**Figure 34** Répartitions des variants de TP53. Séparation selon les groupes RR/CU et selon les exons de TP53 (E1>E11) avec fréquence allélique indiquée (%). Correspondance des exons avec les domaines protéiques correspondants. TAD : domaine de transactivation; DBD: domaine de liaison à l'ADN; DT: Domaine de tétramérisation. En noir, les *single nucleotide variant*, en rouge les mutations non-sens, en bleu les mutations faux-sens. Les CNV de TP53 associés sont marqués d'un astérisque.

Le groupe de patients mutés TP53 présentait des survies globale (81,9% vs 62%,  $p=0,025$ ) et sans progression (36,4% vs 12,5%,  $p=0,042$ ) inférieures comparativement aux sujets non mutés (figure 36).



**Figure 35** Survies selon le statut TP53 : (A) OS sur la cohorte d'analyse ; (B) PFS sur le groupe RR

## 4.7 Applicabilité des récentes classifications

Dix-neuf (48%) et 26 (66%) gènes du lymphopanel commun ont permis de classifier nos sujets selon Chapuy et al et Schmitz et al, respectivement.



colonnes correspondent aux sujets. Ceux-ci sont regroupés selon les groupes MCD (co-occurrence de mutations *MYD88*<sup>L265P</sup> et *CD79B*), BN2 (variant *CARD11* et réarrangement de *BCL6*), EZB (anomalie d'*EZH2*, *BCL2* et *KMT2D*), N1 (mutations de *NOTCH1*) et STS pour *STAT6* et *SOCS1*. Le statut RR/CU est comparé entre les 5 sous-groupes et la valeur *p* est précisée selon le groupe.

#### 4.7.2 Selon Chapuy et al

Suivant cette classification, 84 sujets (73,8%) de la cohorte d'analyse ont été classés en appliquant les anomalies de 26 gènes et les réarrangements impliquant *BCL6* (3q27) détectés en cytogénétique. Nous avons successivement classé les sujets dans le cluster C1 (réarrangements cytogénétiques de *BCL6*), le cluster C2 (VM et CNV de *TP53*), le cluster C3 (VM de *BCL2* et *CREBBP*), le cluster C4 (VM de *CD58*) et le cluster C5 (VM de *MYD88*, *CD79B* et *PIM1*).

Le C1 présentait des anomalies de *CARD11* pour l'ensemble des sujets. Trois sujets étaient porteurs d'une mutation *MYD88*<sup>non-L265P</sup>.

Nous n'avons inclus dans le C2 que les patients porteurs d'anomalies de *TP53* (VM et/ou CNV). Les formes GC y étaient majoritaires (63%).

Nous n'avons inclus dans le groupe C4 que les VM impliquant *CD58*.

Le C5 comprenait 77% de LBDGC-ABC, avec une majorité des sujets porteurs du hot-spot *MYD88*<sup>L265P</sup>.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence en termes d'incidence des sujets RR ou CU au sein des clusters.



## 5 DISCUSSION

---

Notre travail rapporte cinq années de profilage biologique par NGS d'une cohorte de 88 LBDGC en routine clinique. À notre connaissance, un tel screening moléculaire en « vie réelle » est une première en France. Plusieurs anomalies moléculaires ont été associées à une réponse après l'immunochimiothérapie standard en première ligne, répondant à notre objectif principal. Nos résultats toutefois sont à interpréter avec prudence compte tenu des limites inhérentes à notre population sélectionnée, nos effectifs limités, notre méthodologie et les incertitudes liés aux données produites par le NGS. Nous discutons dans un premier temps de la pertinence et des limites de nos résultats, en évoquant les difficultés méthodologiques rencontrées. Nous proposons ensuite plusieurs axes d'amélioration concrets dans l'optique d'une application de la RCP CAMÉLÉON en routine. Enfin, nous discutons de l'intérêt du séquençage haut débit pour tout LBDGC.

### 5.1 Analyse des résultats : intérêts, limites

Cent-quinze patients ont été discutés entre 2014 et 2019, soit un flux annuel d'environ vingt patients (dix-huit en excluant les formes non-LBDGC). Notre cohorte d'analyse bénéficie d'une homogénéité histologique. De par l'absence de critère d'inclusion clairement défini dans CAMÉLÉON, notre cohorte représente un échantillonnage approximatif de la vie réelle. L'omission des LBDGC discutés en RCP conventionnelle d'hématologie ( $\approx 100 - 150$  cas annuels) et n'ayant pas bénéficié d'une expertise moléculaire représente le principal biais de sélection.

#### 5.1.1 Aspects anatomo-pathologiques

La majorité des dossiers inclus ont bénéficié d'une relecture centralisée au CHB ou au CHU de Rouen. Le résultat définitif apparaissait de manière lisible sur la fiche synthèse, et tenait compte de la classification OMS de 2008. Bien que certaines caractéristiques aient été précisées (CD30, CD5), nous ne les avons pas considérées comme suffisantes pour les différencier d'un LBDGC-NOS. Les actualisations proposées par la classification OMS

2016/2017 ont pu amener à la non détection de certaines formes aujourd'hui mieux reconnues (formes de haut grade). La distinction de ces sous-types n'offre toutefois que peu d'alternatives thérapeutiques au traitement standard, et ne sont pas indispensables au clinicien. A posteriori, la considération de la classification OMS 2016/2017 des formes dites de haut grade, avec réarrangement en FISH de *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6*, ou sans réarrangement avec présentation blastoïde, présente un intérêt diagnostique et thérapeutique. Deux sujets du groupe RR ont été diagnostiqués comme HGBCL avec réarrangements de *MYC* et *BCL2*. Les réarrangements isolés de *MYC* concernaient 4.5% de notre cohorte, une incidence corroborant la littérature récente<sup>43</sup>. La FISH n'était pas réalisée à titre systématique sur la cohorte d'analyse, et venait confirmer une anomalie suspectée sur caryotype ou compléter une demande du clinicien. Ses indications au diagnostic sont actuellement sujettes à débat, entre application systématique et surcoût économique engendré, ciblage exclusif des formes GC ou expresseurs protéiques de *MYC*. Enfin, les compléments d'IHC (*BCL2*, *MYC*, *BCL6*) étaient pratiqués de manière aléatoire et ne présentaient que peu d'intérêt dans l'attitude thérapeutique, l'impact pronostique péjoratif des formes LBDGC-DE/-TE étant limité au sous-type GC<sup>44</sup>.

### 5.1.2 Aspects cytogénétiques

Les données cytogénétiques étaient exhaustives, avec une majorité de caryotypes complexes et hyperdiploïdes. Concordant avec la littérature et les récentes recommandations du groupe francophone de cytogénétique hématologique, seules les anomalies 17p incluant *TP53* étaient prédictives de la rechute. Les réarrangements de *BCL2* (18q21), *IGH* (14q32), *PD-L1* (9p) et *REL* (2p16) n'ont pas été étudiés de manière isolée. Les remaniements et anomalies de *BCL6* ont été appliqués pour la stratification en sous-groupe selon Chapuy et *al.*



### 5.1.3 Aspects moléculaires

#### 5.1.3.1 RT-MLPA

Le phénotype cellulaire défini par RT-MLPA corrèle à 80% avec les données d'IHC (confirmé sur notre cohorte) et 85% avec les données obtenues par puces à ADN. Notre stratégie de détermination de la COO par RT-MLPA, puis IHC en cas d'échec a permis de classer 90,9% de notre cohorte, dont l'ensemble des PMBL. Certains sujets n'ont pas été classés en RT-MLPA. Cela s'explique soit par échec de technique pour deux patients, soit par l'absence de matériel disponible pour les sujets restants. La RT-MLPA présente les avantages d'un coût limité (5€), d'une simplicité et d'une reproductibilité techniques, ainsi que d'un court délai de rendu de résultat. Sa haute sensibilité en fait une technique peu avide en ARN (20 – 50ng d'ARN), qui plus est de qualité médiocre (travail sur matériel FFPE). Son application en routine imposerait, comme le NGS, un temps supplémentaire technique en secteur de routine.

#### 5.1.3.2 Séquençage haut débit

Le séquençage haut débit a permis la production de volumineuses données informatiques (*big data*) permettant de détecter au moins un variant mutationnel chez 97% des sujets et des variants en nombre de copie pour 63% des sujets. Les manipulations ont été réalisées par l'équipe de recherche U1245, sur deux séquenceurs (PGM et MiSeq) utilisant deux panels lymphoïdes différents.

L'application majoritaire du séquenceur PGM se justifiait par son utilisation quotidienne, autant en secteur de recherche qu'en biologie de « routine ». Cette technologie a initialement permis le développement des lymphopanel 1 et 2 (Ampliseq Designer). Toutefois, la démocratisation du séquenceur Illumina® - MiSeq est en cours, avec les avantages d'une diminution des d'artéfacts liés aux homopolymères (séquences d'ADN répétées), et permettant l'utilisation de code barre spécifique sur les fragments de librairies (UMI pour *unique molecular identifier*). Le passage de la version 1 à 2 se justifiait par la faible incidence d'anomalie de certains gènes inclus dans la version 1 (*ITPKB*), du manque d'impact

théranostique (*MFHAS1*) ou à l'inverse d'un poids trop important pour l'ensemble des données générées (*KMT2D*). La seconde version intégrait des gènes au potentiel théranostique (*BTK*), pronostique et physiopathologique (*CCND3*, *CXCR4*).

Une médiane de profondeur de séquençage de 500X peut être considérée comme un seuil minimale et acceptable. La limite de détection obtenue permet la mise en évidence de variants avec une VAF minimale de 10%, et ce en présence d'un matériel tumoral plus ou moins riche. Ces notions de profondeurs de séquençage, de modèle d'automate, de reproductibilité, de répétabilité, introduisent la nécessité de contrôle de qualité (COFRAC), inaliénables à l'optique d'une application en routine.

Nous avons procédé aux analyses comparatives en discernant les variants mutationnels des CNV. Il ne paraissait en effet pas pertinent de confondre VM et CNV, certains gènes tels que *TP53* étant fréquemment mutés sur un allèle et co-délétés sur le second allèle.

Nous nous sommes affranchis du phénomène d'hypermuation somatique aberrant lié à l'enzyme AID en considérant un variant mutationnel comme un gène muté à une ou plusieurs reprises. Ainsi, les gènes classiquement soumis à l'action aberrant d'AID tels que *PIM1*, *B2M*, *SOCS1*, *MYC* et *BCL2* présentaient une fréquence mutationnelle élevée.

La classification des variants moléculaires selon les huit voies biologiques a permis dans un premier temps de confirmer notre stratégie de détermination de la COO, avec la voie NF- $\kappa$ B (*MYD88*, *PIM1*) impliquée dans les formes ABC, les voies de l'apoptose (*BCL2*, *TP53*) et de l'épigénétique (*EZH2*) dans les formes GC et la voie JAK-STAT (*STAT6*) dans les formes PMBL. Répondant à notre objectif principal, quatre gènes étaient prédictifs de la réponse thérapeutique. Les variants mutationnels de *TNFAIP3* étaient prédictifs de la réponse à une première ligne d'immunochimiothérapie standard. *TNFAIP3* est un gène régulateur de la voie NF- $\kappa$ B agissant en tant que répresseur sur les protéines de la famille IKK. Les mutations de *TNFAIP3* sont principalement observées dans les formes ABC, avec co-occurrence fréquente de la mutation hot-spot *MYD88*<sup>L265P</sup>. Nous avons défini les mutations de *TNFAIP3* comme marqueur prédictif de rémission pour les formes ABC. Celles-ci étaient principalement des mutations de type *frameshift* (indel), tronquant en partie la protéine codante. Elles peuvent de manière ponctuelle être observées dans les formes GC. Les variants mutationnels de *CREBBP* étaient associés à un risque significatif de rechute ou état réfractaire. En association avec *EP300*, *CREBBP* exerce une activité répressive sur *BCL6* par acétylation. Cette perte d'activité amène à un défaut d'apoptose durant la réaction du

centre germinatif. Les variants de *CREBBP* correspondaient à des SNV ou des mutations du site d'épissage. L'incidence des mutations de *CREBBP* correspond à celles rapportées dans la littérature (9 – 18%, (17 – 18%)<sup>29,45</sup>. Comme *TNFAIP3*, aucune valeur thérapeutique n'est attribuée à la perte de fonction de *CREBBP*.

L'analyse en CNV était moins systématisée avec 56 sujets (63%) impliqués. Seul le séquenceur PGM a produit les données de CNV. La complexité de l'analyse bio-informatique (interprétation des log-ratio) ne nous a pas permis de quantifier les délétions (homozygotes vs hétérozygotes) ou les amplifications de copies géniques. Les délétions de *TP53* et de *NOTCH1* étaient prédictifs de la rechute et de la rémission, respectivement. Les délétions de *CDKN2A/CDKN2B*, classiquement observées dans les formes ABC, étaient réparties de manière homogène entre les formes GC et ABC. Peu d'études rapportent l'impact pronostique des CNV sur la réponse au traitement des LBDGC. Les délétions associées de *TP53* et *CD58* sont associées à un pronostic défavorable<sup>46</sup>. Les récentes classifications moléculaires intègrent les données de CNV. Le cluster CC (Dubois et al.) est défini par des anomalies de *TP53* associés à différents CNV dont 1q42, 18q21, 8q24, 13q31 et 18p associées à une survie sans progression inférieure<sup>32</sup>.

Nos résultats concernant les variants mutationnels de *MYD88* sont en revanche discordant avec la littérature. Classiquement associés à une atteinte neuro-méningée (ce que nous confirmons) et un pronostic péjoratif, nous mettons un gain en termes de survie sans progression des mutations de *MYD88*<sup>L265P</sup> et de *MYD88*<sup>non-L265P</sup>. Ce résultat pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité des variants *MYD88*<sup>L65P</sup> et *MYD88*<sup>non-L265P</sup> ou encore la relative faible incidence d'atteinte neuro-méningée dans ce sous-groupe (23%).

Définie comme objectif secondaire, l'application à notre cohorte des sous-groupes moléculaires décrits selon Reddy et al, Dubois et al, Chapuy et al, Schmitz et al s'est avérée complexe et imprécise. L'exhaustivité des panels lymphoïdes utilisés par les auteurs différait tant sur les plans qualitatif que quantitatif. Les données transcriptomiques (RNA-seq) et la complexité du modèle statistique (factorisation matricielle non négative) ne permettaient pas de confondre nos résultats avec ceux de Reddy et al et Dubois et al. De plus, l'absence du gène *BCL6* dans le lymphopanel nous a contraint à nous baser sur les anomalies cytogénétiques du locus 3q27. Certains gènes de notre lymphopanel commun n'ont pas été utilisés par les différents auteurs. Rappelons toutefois que ces classifications ont été proposées trois à cinq ans après l'initiation de la RCP CAMÉLÉON.

Enfin, la considération des analyses moléculaires à deux temps de suivi distants a permis de confirmer une reproductibilité par la superposition des profils de variants mutationnels (17% de variation). Cette similarité est moins marquée pour les CNV (38% de variation). Ces résultats sont à pondérer selon le site de prélèvement, le type de séquenceur utilisé et la richesse en cellules tumorales du prélèvement initial.

### 5.1.3.3 Application thérapeutique

La RCP CAMÉLÉON ne définissait pas d'objectif thérapeutique. En l'absence de consentement et d'essai prospectif ouvert, le ciblage moléculaire thérapeutique selon les conclusions de la RCP n'était pas licite. Seuls deux patients porteurs d'une mutation hot-spot d'*XPO1* ont bénéficié d'une thérapie ciblée et orientée selon l'anomalie décrite (*XPOi* : selinexor). L'intérêt porté à la conclusion de la RCP CAMÉLÉON n'était toutefois pas rapporté, la RCP conventionnelle ayant précédé la RCP CAMÉLÉON. Les conclusions de la RCP CAMÉLÉON ont été appliquées par une unique RCP conventionnelle, avançant l'intérêt de l'ibrutinib chez un sujet avec envahissement neuro-méningé porteur d'une mutation *MYD88*<sup>L265P</sup> en situation multiréfractaire.

La communication entre secteurs clinique et biopathologique était limitée par l'inclusion non systématique de la fiche synthèse dans le dossier médical patient informatisé (19% de notre cohorte, inclusions limitées aux années 2014 et 2015), par le stockage des données sur une plate-forme indépendante au secteur clinique, ou encore par la non-association de la RCP CAMÉLÉON avec la RCP d'hématologie conventionnelle hebdomadaire.

De nombreux travaux rapportent l'intérêt d'un screening moléculaire orientant un ciblage thérapeutique. L'intérêt d'une telle approche est encore débattue, avec des résultats discordants issus de cohortes le plus souvent hétérogène en termes d'histologie, d'outil diagnostique (IHC, CGH array, NGS), de type d'anomalie (phénotypique, génotypique) et de traitement appliqué. En outre, la prévalence des hémopathies malignes est négligeable, et n'inclut aucun cas de LBDGC. À partir d'une cohorte de 13 sujets traités par R-CHOP, un travail similaire rapporte l'association des mutations de *MYD88* et *TP53* détectée par NGS au risque de rechute. A partir de données de WES sur une cohorte de 143 LBDGC en rechute ou

réfractaire (Wenz et al, ASH2019, abstract 919), deux des cinq gènes les plus fréquemment mutés dans l'étude (*KMT2D* (34.3%), *IGLL5* (25.9%), *CREBBP* (22.4%), *TP53* (21%) et *HIST1H1E* (19.6%)) étaient inclus dans notre lymphopanel commun. Dans cette même étude, deux gènes présentent une incidence différente au diagnostic et à la rechute (*NCOR*, 3.3/13.3% ; *ACTB*, 0.5%/6.3% ; diagnostic/rechute).

## 5.2 Quels axes d'amélioration proposer ?

### 5.2.1 Communication inter-services et application en routine

L'organisation des RCP CAMÉLÉON nécessitait la disponibilité de nombreux intervenants, à une date programmée de manière aléatoire et non systématisée. L'intégration de cette discussion au sein de la RCP d'hématologie conventionnelle hebdomadaire permettrait une expertise clinique élargie. Elle familiariserait le clinicien aux actualités moléculaires des LBDGC. En outre, l'intégration de la fiche synthèse dans le dossier médical personnalisé à titre consultatif pourrait être bénéfique au clinicien.

### 5.2.2 Fiche de synthèse

Le résultat histologique devrait tenir compte de la classification OMS 2016/2017. Les marquages immunohistochimiques complémentaires tels que BCL2, BCL6 ou MYC devraient faire l'objet d'une discussion collégiales, tout comme la réalisation de la FISH. La réalisation de cette dernière devrait tenir compte du mode de présentation clinique (agressif, bulky, envahissement neuro-méningé, stade IV, état chimio-réfractaire), des éventuels marquages IHC (statut MYC expresseur fort), du phénotype cellulaire (GC > non-GC) et des anomalies cytogénétiques mises en évidence sur caryotype.

Une présentation en mode fermé (oui/non/non recherché) des anomalies impliquant *BCL6* (3q), *BCL2* (18q), *TP53* (17p), *IGH* (14q), *MYC* (8q) et *JAK/PD1-PDL1* (9p) pourrait être d'intérêt. L'intérêt d'une FISH systématique est discutée précédemment.

### 5.2.3 Vers un lymphopanel version 3

Les récentes entités moléculaires reconnues et les résultats de notre travail nous amènent à proposer une évolution du lymphopanel appliqué à notre cohorte d'analyse. Certains gènes rarement ou pas mutés sont d'emblée exclus.

#### **Voie NF-κB :**

- Maintien de *PIM1*, *IRF4*, *CARD11*, *PRDM1*, *MYD88* et *TNFAIP3*
- Ajout de *BCL10*, de *MALT1* (complexe CBM)
- *MYD88*<sup>L265P</sup> en ddPCR pour suivi en maladie résiduelle

#### **Voie de l'immunité :**

- Maintien de *B2M*, *CD58*, *CIITA* et *TNFRSF14*
- Ajout de *PD1/PDL1*

#### **Voie de l'apoptose et du cycle cellulaire :**

- Maintien de *BCL2*, *CDKN2A*, *CCND3*, *FOXO1*, *MYC*, *XPO1*
- *TP53* ; si non muté, NGS ciblé sur exons de *TP53* avec profondeur >10-20000X
- Suppression de *CDKN2B*, *MFHAS1*
- Ajout de *BCL6*, *PTEN*, *RHOA*, *ACTB*
- *XPO1*<sup>E571K</sup> en ddPCR pour suivi en maladie résiduelle

#### **Voie de l'épigénétique :**

- Maintien de *CREBBP*, *EP300*, *EZH2*
- *EZH2*<sup>Y641F</sup> en ddPCR pour suivi en maladie résiduelle
- Suppression de *KMT2D*, de *MEF2B*
- Ajout de *TET2*, *NCOR*

#### **Voie des MAP-kinases :**

- Suppression de *BRAF*

#### **Voie NOTCH :**

- Maintien de *NOTCH1/NOTCH2*

#### **Voie du BCR :**

- Suppression de *BTK*, *PLCG2* et *ITPKB*
- Maintien de *CD79A*, *CD79B*

#### **Voie du micro-environnement :**

- Maintien de *CXCR4*

#### HGBCL :

- Maintien d'*ID3*, *TCF3*, *CCND3*

L'actualisation d'un lymphopanel doit tenir compte des difficultés techniques de séquençage de chaque gène, de la pertinence en routine clinique et du coût engendré.

#### 5.2.4 RT-MiSeq

Une troisième version de RT-MLPA est en cours d'évaluation. Elle combine RT-MLPA et NGS (MiSeq – Illumina®), et permettra, à partir de l'utilisation d'une centaine de sondes spécifiques et d'UMI, de différencier les formes lymphoïdes B, T, riche en T, cHL, FL, LCM.... La faisabilité de cette technique « pan-diagnostic » lymphoïde est en cours de comparaison prospective au diagnostic histologique en double aveugle (essai local EMAIL).

#### 5.2.5 Séquençage haut débit

La technologie MiSeq – Illumina® se substitue progressivement au PGM – Ion Torrent en analyse de routine. Elle bénéficie de temps de préparation et de manipulation plus court, et permet l'usage d'un « barecoding » moléculaire (UMI pour *unique molecular identifier*). Elle s'affranchit en outre de nombreux artéfacts rencontrés sur PGM (régions riche en nucléotides GC, séquences répétées ou homopolymères).

Pour suppléer au NGS, la technique de *dropped digitale* PCR (ddPCR) est une méthode de forte sensibilité (0,05%) permettant la détection d'une mutation connue au sein d'un tissu tumoral ou d'une biopsie liquide. La possibilité d'une détection sur plasma des variants tels que *MYD88*<sup>L265P</sup>, *XPO1*<sup>E571K</sup> et *EZH2*<sup>Y641N</sup> en font une option envisageable dans le cadre du suivi en maladie résiduelle.

### 5.3 Doit-on pratiquer le séquençage haut débit à tout diagnostic de LBDGC ?

Malgré l'exhaustivité des dernières classifications moléculaires, répondre de manière fermée à cette interrogation nous paraît présomptueux. Les résultats sont hétérogènes, issus de

cohorte solides mais évaluée de manière rétrospectives, et dont la caractérisation phénotypique par puces à ADN n'est actuellement pas transposable en routine clinique. Le traitement des données, l'analyse bio-informatique et les modélisations statistiques complexes impliquent en outre un lien étroit entre clinicien, biologiste et ingénieur bio-informaticien expert.

### 5.3.1 Oui, le profilage moléculaire bénéficie pour tout patient porteur d'un LBDGC !

#### **Au diagnostic ou en rechute ?**

Soixante-pour cent des sujets en première rémission complète ne tireront pas d'avantage à une stratification moléculaire, quelle qu'elle soit. L'enjeu réside dans l'identification de sujets à même d'en bénéficier. Les formes à haut risque de rechute (HGBCL, envahissement neuro-méningée) du sujet jeune (< 70 ans) constituerait un premier argument en faveur d'un profilage moléculaire tumoral en première intention. En rechute, déterminer une cible moléculaire permettrait aux sujets « *unfit* » ou âgés de bénéficier d'une thérapie ciblée en monothérapie, ou associée à des doses moindres de chimiothérapie, dont les effets toxiques sont amplifiés pour cette population. Cependant, la rationalité du NGS lymphoïde chez le sujet âgé doit systématiquement être posée, avec une balance bénéfice/risque parfois déséquilibrée et une absence d'alternative thérapeutique selon le contexte clinique.

#### **Limites de l'arsenal thérapeutique**

L'intensification thérapeutique par chimiothérapie (R-DHAP, RDHAox, R-ICE) suivie d'une autogreffe reste le standard de traitement des formes RR. Cette option, réservée aux sujets de moins de 70 ans et « *fit* », est grevée d'une morbi-mortalité non négligeable. Le recours aux thérapies ciblées orientées selon une ou plusieurs anomalies moléculaires permettrait de limiter certaines toxicités et de limiter les hospitalisations prolongées (aplasie prolongée). Le NGS représente actuellement l'outil central dans la progression à la fois de la compréhension des mécanismes complexes de la lymphomagenèse, et également dans le développement d'alternatives thérapeutiques à la chimiothérapie que sont les multiples thérapies ciblées.



### **Littérature et screening moléculaire**

La littérature rapportent des conclusions discordantes sur l'impact pronostique d'un screening moléculaire en oncologie. La première expérience portait sur une cohorte de 66 sujets porteurs de cancers métastatiques pour lesquels le ciblage de l'anomalie moléculaire confirmée par puces à ADN, IHC et FISH permettait un gain de PFS<sup>47</sup>. Cette étude n'incluait toutefois aucun LBDGC, et la méthodologie appliquée limitait son extension en routine. D'autres essais avancent l'intérêt d'un profilage moléculaire (I-PREDICT, MOSCATO, M-PACT) résumés dans le tableau 27. Toutefois, l'exclusion des hémopathies et l'absence d'analyse systématique en séquençage haut débit n'apportent pas toutes les réponses sur le profilage moléculaire des LBDGC.

### **Expérience locale**

Notre travail démontre la faisabilité technique d'un NGS en routine, sous réserve de l'absence d'impératif temporel puisque par définition sans objectif thérapeutique associé. Dans ce contexte a été développée l'essai prospectif RT3 (*Real Time Tailored Therapy*) visant à caractériser sous un délai de 38 jours (correspondant au J1 du cycle 3 de la chimiothérapie d'induction par R-CHOP) le profil moléculaire de LBDGC-NOS au diagnostic. Les inclusions sont à ce jour complètes.

Autre applicabilité du NGS, le suivi de la maladie résiduelle par quantification de l'ADN circulant libre ou tumoral pourrait être envisager à moyen terme dans le diagnostic et le suivi. Elle représente une méthode peu invasive et reflète d'avantage l'hétérogénéité tumorale qu'une biopsie solide. Plusieurs résultats sont en faveur d'une décroissance de la quantité d'ADN tumoral circulant (VAF d'une mutation) avec la réponse morpho-métabolique observée sur PET-scanner. Cette technique présente toutefois de nombreuses contraintes pré-analytiques (conditionnement et traitement du prélèvement, timing de prélèvement).

Essai	Année / type	LBDGC	Néoplasie	Matériel / technique	Voies biologiques	Sujets ciblés	Sujets traités/n (%)	Gain survie / réponse	Biais / spécificité	Référence
D von Hoff	2010 Prospectif	non	Tumeurs solides	FFPE / FISH, IHC, puces ADN		86	66 (76%)	Oui (PFS)	-Méthodologie (Ratio PFS1/PFS2)	D Von Hoff (2010)
M-PACT	2016	non	Tumeurs solides	Biopsie per-cutanée / NGS	PI3K RAS/RAF/MEK Réparation ADN	60	21 (35%)	N/A		Do et al (2016) <sup>48</sup>
Schwaederle	2010-2012 Méta-analyse		Tumeurs solides, hémopathies	IHC		8078	8060 (99%)	Oui (PFS, OS, réponse)	-Hétérogénéité tumorale -Pas e NGS	Schwaederle et al, JCO (2015) <sup>37</sup>
I-PREDICT	2019 Prospectif	non	Tumeurs solides	Tissu tumoral, ctDNA / NGS, IHC	EBFR, BRCA, cycle cellulaire, EGFR, RET	149	73 (48%)	Ou (PFS)	-Méthodologie (Ratio PFS1/PFS2) -Ratio mutations ciblables/non ciblables (< ou > 50%)	Sicklick et al, 2019 <sup>8</sup>
SHIVA	2015/2017 Prospectif	non	Tumeurs solides	NGS, CNV, IHC	PI3K/AKT :mTor RAS/RAF/MEK	496	195 (39%)	Non		Le Tourneau et al (2015) <sup>38</sup>
MOSCATO-01	2017 Prospectif	non	Tumeurs solides	NGS, CGH	ALK, cycle cellulaire, MAP, apoptose	843	199 (24%)		-Méthodologie (Ratio PFS1/PFS2)	Massard et al 2017 <sup>50</sup>
PROFILER	2019 Prospectif		NGS, aCGH	FFPE		1980	163 (8%)	Oui (13% PR)		
SAFIR					PIK3CA or AKT1					André et al (2014) <sup>51</sup>
CAMELEON	2014-2019 Rétrospectif	oui	non	FFPE, congelé / IHC, NGS, cytogénétique	NF-kB, epigenetique, BCR, apoptose, MAP, microenvironnement, JAK-STAT, immunité	88	13 (15%)	N/A	-Projet descriptif	N/A

**Tableau 27** Revues traitant du ciblage moléculaire : PFS2/PFS1 : ratio évaluant le gain de PFS entre la PFS1 (obtenue après une ligne thérapeutique précédente) à celle obtenue après thérapie ciblée (PFS2), considéré significatif pour une valeur supérieure 1.3.

### 5.3.2 Non, un profil moléculaire systématique n'est pas une arme supplémentaire en 2020 !

#### **Absence de bénéfice en cas de rémission persistante**

Soixante pour cent des sujets en première rémission complète ne bénéficieront pas d'un screening moléculaire. Dans un souci économique, un souci éthique et une complexité du stockage de données produites, il est urgent de définir au mieux le profil clinico-biologique (aspect moléculaire exclu) susceptible de bénéficier d'un tel profilage au diagnostic et/ou à la rechute.

#### **Frontières de la génétique somatique et de la génétique constitutionnelle**

L'exploration moléculaire systématique peut confronter le biologiste à des difficultés d'interprétation, notamment en cas de suspicion d'anomalie constitutionnelle (VAF élevée, absence d'ADN comparatif non tumoral). Ceci imposerait l'orientation du prélèvement en secteur génétique, avec consentement éclairé du patient. La qualité du prélèvement initial, la conservation des résultats produits et la comparaison à ces derniers et aux bases de données de références (COSMIC, ClinVar, IARC) sont autant d'éléments contribuant à une interprétation correcte.

#### **Sécurité et stockage de données, réglementation, coût**

Une activité à temps plein bio-informaticienne est indissociable de la production en masse de données brutes de séquençage haut débit (*big data*). L'enrichissement de bases de données locales (i.e. *Generate Report*) passe par l'utilisation des résultats antérieurement produits (confirmation des mutations initiales par séquençage Sanger). La durée et les modalités de conservation de ces données moléculaires est floue. Inscrire cette technologie de séquençage dans un cadre thérapeutique soumettrait l'équipe de laboratoire à la réglementation en vigueur sous l'égide du comité d'accréditation française (COFRAC), ainsi qu'au respect de la réglementation généralisée des données personnelles (RGPD).

Bien qu'en constante diminution depuis une dizaine d'années, il est à redouter que le coût financier du NGS effectue un rebond, devant la course à l'armement des automates et de leur capacité exponentiellement croissante de production, de stockage et d'analyse des données (séquençage de troisième génération). À titre informatif, et selon le référentiel des actes innovants hors nomenclature, le prix forfaitaire d'un NGS s'échelonnait en 2019 de

882,90€ à 2205,90€ (R452, R453, R454, RIHN 2019). Associons à cette problématique économique le coût engendré par la prescription de thérapies ciblées, d'un prix nul ou dérisoire dans le cadre d'un essai prospectif à parfois plusieurs milliers d'euros mensuels sinon.

### **Enjeux moléculaires**

L'absence de classification moléculaire consensuelle, les résultats produits à partir de cohortes incluant une majorité de sujets sélectionnés, et le manque de reproductibilité à l'échelle individuelle sont autant d'arguments à l'encontre d'une stratégie systématisée de profilage moléculaire. Les derniers résultats d'essais de phase II et III (REMoDL-B<sup>52</sup>, RICOVER60<sup>44</sup>, PHOENIX<sup>40</sup>, ROBUST<sup>53</sup>) se sont avérés décevants, par l'absence d'impact d'une thérapie orientée selon le phénotype cellulaire. A l'instar des leucémies aigües myéloïdes où le ciblage moléculaire inverse des pronostics initialement péjoratifs (inhibiteur de FLT3, d'IDH), établir des essais prospectifs sur la détection d'un unique variant moléculaire dans les LBDGC semble présenter de nombreuses limites. De plus, les variants d'impact pronostique majeur (*TP53*, *MYD88*) ne présentent actuellement aucune valeur théranostique.

Le retentissement fonctionnel d'une anomalie somatique sur la structure et/ou la fonction protéique n'est pas systématiquement élucidé. En découle des questionnements sur l'objectif d'une thérapie ciblée sur une anomalie, entre suppléance d'une fonction protéique altérée ou inhibition d'un signal en excès.

L'exploration par NGS dans les LBDGC cible principalement la séquence d'ADN exonique. Les régions codantes non explorées, non codantes non explorées et l'épigénétique sont autant de régions non explorées dont l'impact sur la cellule lymphomateuse sont peut reconnues.

Les méthodes d'analyse moléculaire sont hétérogènes entre les différents laboratoires. Selon les méthode de conservation, d'extraction d'ADN et d'ARN, le matériel utilisé (ADN congelé, ADN sur FFPE, ADN sur matériel frais), les résultats sont sujets à variation. Le Groupe des biologistes moléculaires des hémopathies malignes tend à harmoniser ces pratiques<sup>54</sup>. Malgré cela, l'interprétation et la validité finale du résultat demeure la propriété de chaque biologiste moléculariste, et il n'existe à ce jour aucun réseau structuré fiable permettant de débattre aisément d'un cas complexe au niveau national.

Enfin, l'utilisation croissante des CAR-T cell (axicabtagene ciloleucel, tisagenlecleucel, lisocabtagene) chez l'adulte en troisième ligne thérapeutique est en plein essor d'utilisation. L'activité antigénique des lymphocytes modulés anti-CD19 semblent indépendante d'un profil phénotypique (COO) ou moléculaire (HGBCL)<sup>12,13</sup> donnés, infirmant l'utilité d'un profil moléculaire dans ce cas précis.

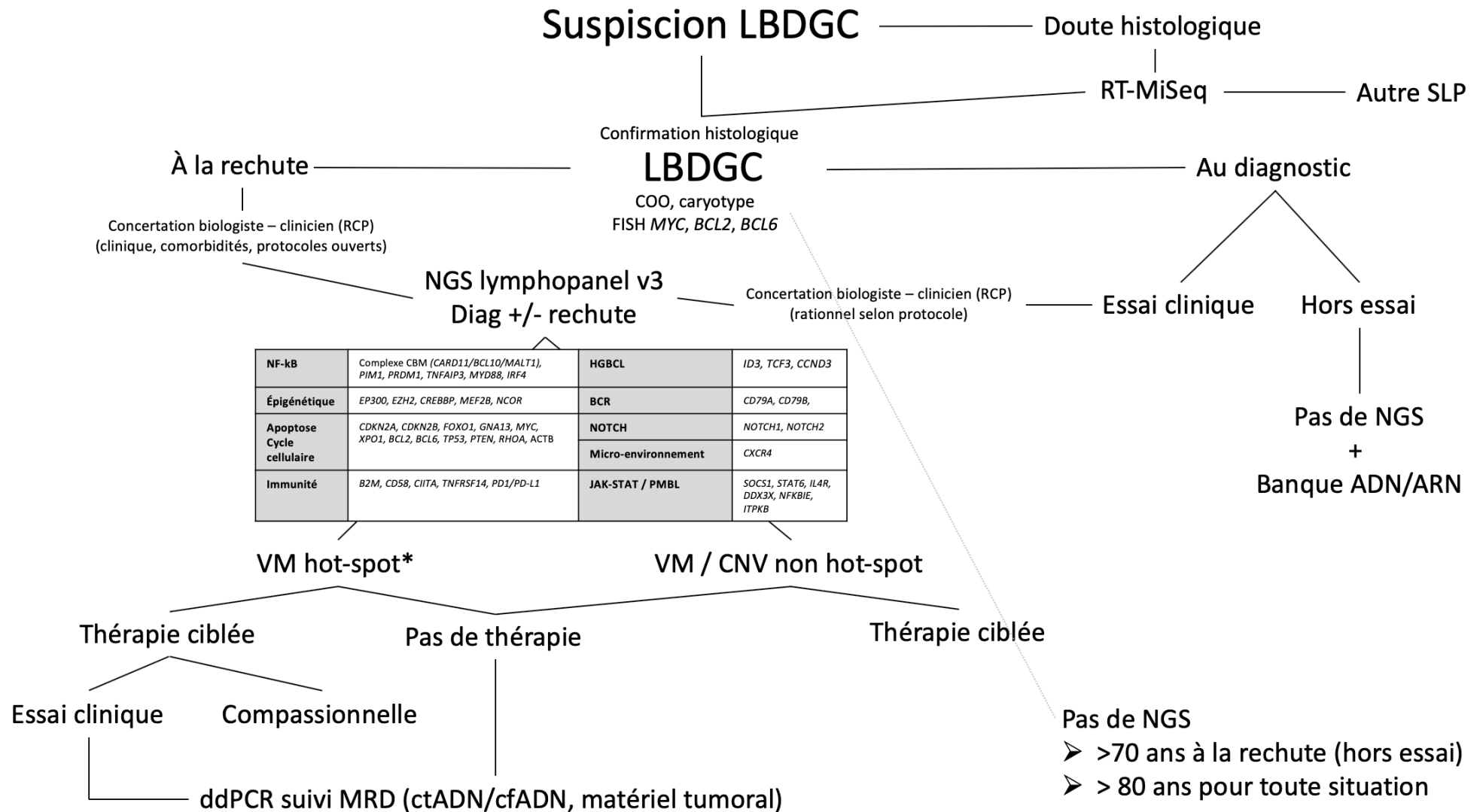
## 6 CONCLUSION

---

Notre travail apporte certaines précisions sur l'application du séquençage haut débit dans les LBDGC. Il démontre sa faisabilité en routine clinique, au prix d'un important investissement matériel et humain. Il soutient l'application de la RT-MLPA pour déterminer la COO. Il confirme l'association de certaines anomalies génomiques somatiques (mutations ou anomalies quantitatives) à l'évolution de la maladie, avec toutefois des effectifs et évènements restreints. Néanmoins, l'exploration génomique des LBDGC en routine n'est qu'à son commencement. Le concept de médecine personnalisée via la proposition d'un traitement A ciblant l'anomalie A reste aujourd'hui un phantasme inassouvi de l'hématologue. L'hétérogénéité des classifications moléculaires proposées et leur transposition limitée en pratique quotidienne en est le premier frein. La corrélation d'une anomalie génomique détectée avec son retentissement sur la structure et la fonction protéique n'est pas systématiquement déterminée. Le coût économique engendré par le développement technologique du séquençage haut débit (automate de troisième génération) va contraindre chaque acteur de la prise en charge à raisonner sa prescription. Bien qu'éloignés de l'aspect clinique, le stockage des données et l'analyse bioinformatique offre une complexité d'un nouveau genre, dans un contexte de réglementation européenne relative à la protection des données à l'échelon individuelle.

Enfin, dans l'optique de développer de manière harmonieuse l'application en routine des explorations génomiques, dans le LBDGC comme toute autre hémopathie lymphomateuse, il paraît indispensable d'associer en permanence cliniciens, bio-informaticiens et molécularistes, et de ne pas évincer une discipline au dépend d'une autre. C'est dans cette optique qu'a été promu par le LYSA l'essai RT3 visant à établir de manière prospective et rapide un profil moléculaire personnalisé, de manière à proposer un complément de thérapie selon l'éventuelle anomalie détectée.

En conclusion, nous proposons une adaptation du lymphopanel (« version 3 ») ainsi qu'un arbre décisionnel sur la place que pourrait avoir une RCP CAMÉLÉON en routine.



**Figure 38** Algorithme décisionnel du NGS. \*hot-spot : *MYD88*<sup>L265P</sup>, *EZH2*<sup>Y641F</sup>, *XPO1*<sup>E571K</sup>

## 7 ANNEXES

	Variants mutationnels				CNV			
	CU (44)	GC (30)	ABC-CU (17)	GC-CU (18)	CU (26)	GC (17)	ABC-CU (10)	GC-CU (11)
	RR (44)	ABC (43)	ABC_RR (26)	GC-RR (12)	RR (30)	ABC (30)	ABC-RR (20)	GC-RR (6)
CD58	0,23	0,79	0,37	0,62	0,79	0,29	0,73	0,69
TNFRSF14	1	0,0095	1	1	0,1	0,0022	0,03	0,2
CIITA	0,48	0,68	0,55	1	1	0,61	0,69	0,77
B2M	0,55	0,15	0,27	1	1	1	1	1
CDKN2A	1	0,14	1	1	0,89	0,89	0,81	1
CDKN2B	1	0,13	0,17	0,27	1	0,31	0,81	0,74
GNA13	1	0,027	0,15	1	0,78	0,13	1	1
FOXO1	1	1	1	0,5	1	0,6	0,51	0,35
MYC	0,27	0,46	1	0,15	0,35	0,71	0,19	0,51
CCND3	1	0,17	1	1	0,46	1	1	1
MFHAS1	0,62	1	1	1	0,33	0,087	0,31	0,11
XPO1	1	1	0,4	1	0,2	0,61	0,54	0,11
TP53	1	0,024	1	1	0,046	1	0,21	0,28
BCL2	0,74	0,013	1	0,21	0,53	0,58	1	0,11
PIM1	0,46	0,0071	0,89	1	0,053	0,63	0,37	1
TNFAIP3	0,00075	0,79	0,0064	0,62	0,13	0,82	1	0,8
PRDM1	0,48	0,072	1	0,4	0,53	0,75	1	0,8
IRF4	1	0,64	1	1	0,061	0,83	0,34	0,6
MYD88	0,32	0,0011	0,7	0,5	0,85	0,85	1	1
CARD11	0,48	1	0,63	1	0,2	0,61	0,091	1
CREBBP	0,016	0,16	0,21	0,045	0,77	0,61	0,38	0,2
KMT2D	0,8	0,87	0,6	1	1	0,018	1	0,28
MEF2B	1	0,56	1	1	0,49	1	1	0,35
EP300	0,74	0,69	0,37	1	0,46	0,45	1	1
EZH2	1	0,00015	1	1	0,57	0,53	0,35	1
BRAF	1	0,17	1	1	0,24	0,36	0,14	1
CD79A	1	1	1	1	1	0,6	1	0,35
CD79B	0,55	0,06	1	1	0,21	0,13	1	0,6
ID3	1	0,41	1	0,4	0,26	0,044	0,25	0,51
PLCG2	1	0,13	0,17	0,27	0,46	1	1	1
TCF3	1	0,41	1	0,4	1	0,6	1	0,35
ITPKB	0,12	0,17	1	0,5	0,45	0,17	0,1	0,58
NOTCH1	1	0,13	0,17	0,27	0,041	0,13	1	1
NOTCH2	1	1	0,51	1	0,88	0,29	0,73	1
SOCS1	0,17	1	1	0,066	0,49	0,67	0,69	0,43
STAT6	0,52	0,15	0,4	0,13	1	0,081	0,54	1
ARID1A	1	1	1	1	0,46	0,36	1	1
CXCR4	1	0,13	0,17	0,27	1	1	1	1
BTK	1	1	1	1	0,49	1	1	1

**Annexe 1** Valeur statistique  $p$  en analyse univariée qualitative selon la présence ou non d'une mutation ou d'un CNV (délétion ou amplification). Les groupes comparés par colonne sont spécifiés d'une couleur (vert ou orange) associée au  $p$  lorsque celui-ci est significatif





## 8 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Fisher, R. I. *et al.* Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1002–1006 (1993).
2. Coiffier, B. *et al.* CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **346**, 235–242 (2002).
3. Récher, C. *et al.* Intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab versus standard CHOP plus rituximab for the treatment of diffuse large B-cell lymphoma (LNH03-2B): an open-label randomised phase 3 trial. *The Lancet* **378**, 1858–1867 (2011).
4. Gavrilovic, I. T., Hormigo, A., Yahalom, J., DeAngelis, L. M. & Abrey, L. E. Long-Term Follow-Up of High-Dose Methotrexate-Based Therapy With and Without Whole Brain Irradiation for Newly Diagnosed Primary CNS Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4570–4574 (2006).
5. Chiappella, A. *et al.* Are We Ready to Treat Diffuse Large B-cell and High-Grade Lymphoma According to Major Genetic Subtypes?: *HemaSphere* **3**, e284 (2019).
6. Reyes, F. *et al.* ACVBP versus CHOP plus Radiotherapy for Localized Aggressive Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1197–1205 (2005).
7. Crump, M. *et al.* Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood* **130**, 1800–1808 (2017).
8. Hagberg, H. & Gisselbrecht, C. Randomised phase III study of R-ICE versus R-DHAP in relapsed patients with CD20 diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) followed by high-dose therapy and a second randomisation to maintenance treatment with rituximab or not: an update of the CORAL study. *Ann. Oncol.* **17**, iv31–iv32 (2006).
9. Philip, T. *et al.* Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1540–1545 (1995).
10. Gisselbrecht, C. *et al.* Rituximab Maintenance Therapy After Autologous Stem-Cell Transplantation in Patients With Relapsed CD20<sup>+</sup> Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Final Analysis of the Collaborative Trial in Relapsed Aggressive Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **30**, 4462–4469 (2012).
11. van Kampen, R. J. W. *et al.* Allogeneic Stem-Cell Transplantation As Salvage Therapy for Patients With Diffuse Large B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma Relapsing After an Autologous Stem-Cell Transplantation: An Analysis of the European Group for Blood and Marrow Transplantation Registry. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1342–1348 (2011).
12. Locke, F. L. *et al.* Long-term safety and activity of axicabtagene ciloleucel in refractory large B-cell lymphoma (ZUMA-1): a single-arm, multicentre, phase 1–2 trial. *Lancet Oncol.* **20**, 31–42 (2019).
13. Schuster, S. J. *et al.* Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **380**, 45–56 (2019).
14. Barrenetxea Lekue, C. *et al.* Pixantrone beyond monotherapy: a review. *Ann. Hematol.* **98**, 2025–2033 (2019).
15. Tilly, H. *et al.* Polatuzumab vedotin in combination with immunochemotherapy in patients with previously untreated diffuse large B-cell lymphoma: an open-label, non-randomised, phase 1b–2 study. *Lancet Oncol.* **20**, 998–1010 (2019).
16. Morschhauser, F. *et al.* INTERIM REPORT FROM A PHASE 2 MULTICENTER STUDY OF TAZEMETOSTAT, AN EZH2 INHIBITOR, IN PATIENTS WITH RELAPSED OR REFRACTORY B-CELL NON-HODGKIN LYMPHOMAS. *Hematol. Oncol.* **35**, 24–25 (2017).
17. Dubois, S. *et al.* Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: Implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? *Oncotarget* **6**, (2015).
18. Lionakis, M. S. *et al.* Inhibition of B Cell Receptor Signaling by Ibrutinib in Primary CNS

Lymphoma. *Cancer Cell* **31**, 833-843.e5 (2017).

19. Batlevi, C. L. *et al.* A phase 2 study of mocetinostat, a histone deacetylase inhibitor, in relapsed or refractory lymphoma. *Br. J. Haematol.* **178**, 434–441 (2017).
20. Nowakowski, G. S. *et al.* Lenalidomide Combined With R-CHOP Overcomes Negative Prognostic Impact of Non-Germinal Center B-Cell Phenotype in Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Phase II Study. *J. Clin. Oncol.* **33**, 251–257 (2015).
21. Ansell, S. M. *et al.* Nivolumab for Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Patients Ineligible for or Having Failed Autologous Transplantation: A Single-Arm, Phase II Study. *J. Clin. Oncol.* **37**, 481–489 (2019).
22. Lenz, G. *et al.* Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 13520–13525 (2008).
23. Klapper, W. *et al.* Patient age at diagnosis is associated with the molecular characteristics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **119**, 1882–1887 (2012).
24. Davis, R. E. *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **463**, 88–92 (2010).
25. Mottok, A. *et al.* Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. *Blood* **132**, 2401–2405 (2018).
26. Mareschal, S. *et al.* Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase–Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J. Mol. Diagn.* **17**, 273–283 (2015).
27. Morin, R. D. *et al.* Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood* **122**, 1256–1265 (2013).
28. Compagno, M. *et al.* Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- $\kappa$ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **459**, 717–721 (2009).
29. Pasqualucci, L. & Dalla-Favera, R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **131**, 2307–2319 (2018).
30. Young, R. M., Shaffer, A. L., Phelan, J. D. & Staudt, L. M. B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Semin. Hematol.* **52**, 77–85 (2015).
31. Reddy, A. *et al.* Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell* **171**, 481-494.e15 (2017).
32. Chapuy, B. *et al.* Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* **24**, 679–690 (2018).
33. Schmitz, R. *et al.* Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1396–1407 (2018).
34. Dubois, S. *et al.* Refining diffuse large B-cell lymphoma subgroups using integrated analysis of molecular profiles. *EBioMedicine* **48**, 58–69 (2019).
35. Sha, C. *et al.* Molecular High-Grade B-Cell Lymphoma: Defining a Poor-Risk Group That Requires Different Approaches to Therapy. *J. Clin. Oncol.* **37**, 202–212 (2019).
36. Ennishi, D. *et al.* Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **37**, 190–201 (2019).
37. Schwaederle, M. *et al.* Impact of Precision Medicine in Diverse Cancers: A Meta-Analysis of Phase II Clinical Trials. *J. Clin. Oncol.* **33**, 3817–3825 (2015).
38. Le Tourneau, C. *et al.* Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **16**, 1324–1334 (2015).
39. Leonard, J. P. *et al.* Randomized Phase II Study of R-CHOP With or Without Bortezomib in Previously Untreated Patients With Non-Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **35**, 3538–3546 (2017).
40. Younes, A. *et al.* Randomized Phase III Trial of Ibrutinib and Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone in Non-Germinal Center B-Cell Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **37**, 1285–1295 (2019).
41. Morschhauser, F. *et al.* IMPROVED OUTCOMES IN PATIENTS (PTS) WITH BCL2-

POSITIVE DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA (DLBCL) TREATED WITH VENETOCLAX (VEN) PLUS R-CHOP: RESULTS FROM THE PHASE 2 CAVALLI STUDY.

*Hematol. Oncol.* **37**, 135–137 (2019).

42. Dubois, S. *et al.* Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin. Cancer Res.* **22**, 2919–2928 (2016).

43. Rosenwald, A. *et al.* Prognostic Significance of *MYC* Rearrangement and Translocation Partner in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J. Clin. Oncol.* **37**, 3359–3368 (2019).

44. Pfreundschuh, M. *et al.* Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60). *Lancet Oncol.* **9**, 105–116 (2008).

45. Young, R. M. *et al.* Taming the Heterogeneity of Aggressive Lymphomas for Precision Therapy. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **3**, 429–455 (2019).

46. Cao, Y. *et al.* Mutations or copy number losses of *CD58* and *TP53* genes in diffuse large B cell lymphoma are independent unfavorable prognostic factors. *Oncotarget* **7**, (2016).

47. Von Hoff, D. D. *et al.* Pilot Study Using Molecular Profiling of Patients' Tumors to Find Potential Targets and Select Treatments for Their Refractory Cancers. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4877–4883 (2010).

48. Do, K., Coyne, G. O. & Chen, A. P. An overview of the NCI precision medicine trials—NCI MATCH and MPACT. *Chin. Clin. Oncol.* **4**, 8 (2015).

49. Sicklick, J. K. *et al.* Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study. *Nat. Med.* **25**, 744–750 (2019).

50. Massard, C. *et al.* High-Throughput Genomics and Clinical Outcome in Hard-to-Treat Advanced Cancers: Results of the MOSCATO 01 Trial. *Cancer Discov.* **7**, 586–595 (2017).

51. André, F. *et al.* Comparative genomic hybridisation array and DNA sequencing to direct treatment of metastatic breast cancer: a multicentre, prospective trial (SAFIR01/UNICANCER). *Lancet Oncol.* **15**, 267–274 (2014).

52. Davies, A. *et al.* Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemoimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **20**, 649–662 (2019).

53. Vitolo, U. *et al.* ROBUST: First report of phase III randomized study of lenalidomide/R-CHOP (R<sup>2</sup>-CHOP) vs placebo/R-CHOP in previously untreated ABC-type diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* **37**, 36–37 (2019).

54. Sujobert, P. *et al.* Definition of a minimal genes set for mature lymphoid blood diseases. *Hématologie* **24**, 27–59 (2018).

## 9 RESUME

---

**Introduction** : le diagnostic de lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) repose aujourd’hui sur des données d’anatomo-pathologie et de FISH. De nouvelles classifications moléculaires sont actuellement proposées sur la base de mutations somatiques récurrentes et d’altération du nombre de copies (CNV), permettant d’envisager à terme une médecine personnalisée. Leur application en pratique quotidienne demeure toutefois limitée, de par la complexité/coût des techniques ou encore l’interprétation des données de séquençage haut débit (NGS). Dans ce contexte a été instauré une réunion inter-disciplinaire de profilage biologique de LBDGC en routine (CAMÉLÉON). Après cinq années d’application, nous tentons d’une part de déterminer des facteurs moléculaires prédictifs de la sensibilité d’un LBDGC à une immunochimiothérapie de première ligne, d’autre part de démontrer son applicabilité en routine clinique.

**Matériel et méthode** : nous réalisons une étude monocentrique rétrospective incluant des cas de LBDGC-NOS disectés en réunion CAMÉLÉON. Le cell-of-origin (ABC, GC, primitifs du médiastin ou PMBL, indéterminé ou UC) a été déterminée par RT-MLPA ou immunohistochimie. Le séquençage haut débit a été réalisé à partir d’un « lymphopanel » de 39 gènes sur séquenceurs PGM (Ion torrent – Life technologies®) ou MiSeq (Illumina®) à partir de biopsies tumorales solides. L’incidence des variants mutationnels somatiques (VM) et des variants en nombre de copie (CNV) a été comparée selon le statut en rémission (CU) ou en rechute/réfractaire (RR). Nous avons en outre évalué la relation entre les profils moléculaires ainsi établis et les diverses thérapies ciblées appliquées. Un risque statistique alpha de 5% est retenu comme significatif.

**Résultats** : 88 cas de LBDGC-NOS ont été inclus entre 2014 et 2019, avec un âge médian de 64 ans (20 – 93), et présentaient un score IPI élevé ( $\geq 2$  : 63%). 44 sujets étaient en rémission complète à 2 ans, 44 en rechute ou réfractaires primaires. Les traitements de première ligne reçus étaient soit du R-CHOP (68,1%), R-ACVBP (27,2%) ou autres (4,7%). Les formes ABC étaient majoritaires (48%), principalement parmi les RR (59,1%). 86 patients ont bénéficié du NGS. Les VM de *TNFAIP3* étaient plus fréquentes dans le groupe CU (29,5% vs 2,3%,  $p < 0,001$ ). Inversement, les VM de *CREBBP* étaient plus fréquemment associées au groupe RR (58,3 vs 16,6%,  $p = 0,016$ ). 350 CNV ont été détectés parmi 56 sujets (63%). Les délétions de *TP53* étaient plus fréquentes dans le groupe RR ( $p = 0,04$ ). *A contrario*, les pertes ou gains de copies de *TNFRSF14* étaient associés à la rémission au sein des LBDGC de type ABC ( $p = 0,03$ ). Les thérapies ciblées utilisées étaient les suivantes : le tazemetostat (*EZH2*), le vénétoclax (*BCL2*), le selinorex (*XPO1*), l’ibrutinib (*BTK*) et le CUDC-907 (*HDAC*) chez respectivement 5 (5,6%), 3 (3,4%), 5 (5,6% dont 2 avec la mutation hot-spot *XPO1*<sup>E571K</sup>), 7 (7,9%) et 1 (1,1%) sujets.

**Conclusion** : notre travail démontre la valeur prédictive de certaines anomalies génomiques acquises, ainsi que la faisabilité du profilage moléculaire d’une cohorte LBDGC en routine. Dans un contexte de classification de plus en plus complexe, du faible nombre de facteurs théranostiques bien établis et du coût des analyses, le profilage moléculaire doit être réalisé préférentiellement chez les patients éligibles à un essai clinique et évaluer de manière prospective. C’est l’un des objectifs de l’essai RT3 actuellement promu par le LYSA.

**Mots-clés** : lymphome B diffus à grande cellule, séquençage haut débit, profil moléculaire, médecine personnalisée, génétique somatique