



HAL
open science

Évaluation de différents facteurs pronostiques dans les lymphomes B diffus a grandes cellules traités par R-CHOP

Antonin Bouroumeau

► **To cite this version:**

Antonin Bouroumeau. Évaluation de différents facteurs pronostiques dans les lymphomes B diffus a grandes cellules traités par R-CHOP. Médecine humaine et pathologie. 2020. dumas-03332298

HAL Id: dumas-03332298

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03332298>

Submitted on 21 Sep 2021

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance.

La propriété intellectuelle du document reste entièrement celle du ou des auteurs. Les utilisateurs doivent respecter le droit d'auteur selon la législation en vigueur, et sont soumis aux règles habituelles du bon usage, comme pour les publications sur papier : respect des travaux originaux, citation, interdiction du pillage intellectuel, etc.

Il est mis à disposition de toute personne intéressée par l'intermédiaire de [l'archive ouverte DUMAS](#) (Dépôt Universitaire de Mémoires Après Soutenance).

Si vous désirez contacter son ou ses auteurs, nous vous invitons à consulter la page de DUMAS présentant le document. Si l'auteur l'a autorisé, son adresse mail apparaîtra lorsque vous cliquerez sur le bouton « Détails » (à droite du nom).

Dans le cas contraire, vous pouvez consulter en ligne les annuaires de l'ordre des médecins, des pharmaciens et des sages-femmes.

Contact à la Bibliothèque universitaire de Médecine
Pharmacie de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

Année : 2020

**EVALUATION DE DIFFERENTS FACTEURS PRONOSTIQUES DANS LES
LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES TRAITES PAR R-CHOP**

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

Antonin BOUROUMEAU

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE
GRENOBLE

Le : 21/09/2020

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

Madame la Professeur TRAVERSE-GLEHEN Alexandra

Membres :

Madame la Professeur CALLANAN Mary

Madame la Docteur EMADALI Anouk

Madame la Professeur RUBBIA-BRANDT Laura

Monsieur le Docteur GRESSIN Rémy

Monsieur le Professeur SARTELET Hervé (Directeur de thèse)

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

EVALUATION DE DIFFERENTS FACTEURS PRONOSTIQUES DANS LES LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES TRAITES PAR R-CHOP

RÉSUMÉ :

Le Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) est un cancer très hétérogène, dont l'immunochimiothérapie de première ligne (R-CHOP) permet de traiter environ 60% des patients. Malgré les avancées cliniques, biologiques et moléculaires, il reste toujours difficile de prédire les LBDGC réfractaires ou chimio-résistants. La surexpression de c-MYC ou de p53, fréquemment retrouvée dans les LBDGC, a un impact pronostique encore incertain ; par ailleurs, CYCLON est une protéine surexprimée dans les lymphomes B agressifs en lien avec la résistance à l'anti CD20 *in vitro*. L'objectif de notre étude est de corrélérer l'expression de ces biomarqueurs avec la survie et les données clinico-pathologiques à partir d'une cohorte rétrospective de 97 LBDGC *de novo* traités par R-CHOP. Premièrement, les analyses statistiques ont montré que la surexpression de p53 (p53^{high}) est associée à un mauvais pronostic. Il a été aussi mis en lumière le rôle protecteur, sur la survie, d'un aspect en « ciel étoilé » en cas de LBDGC p53^{high} ou c-MYC positif. De plus, à partir des données NGS, ces trois variables ont pu être corrélées à un profil mutationnel spécifique en lien avec le renouvellement cellulaire. Indépendamment, nous avons montré que CYCLON et NPM1, protéine lui étant associée, sont en lien avec une survie diminuée en cas de localisations nucléaires atypiques. L'analyse multivariée a confirmé que ces dernières sont des facteurs pronostiques indépendants pouvant s'ajouter au score r-IPI (revised Index Prognosis) dans la stratification pronostique des LBDGC pour identifier ceux qui sont haut risque. Ainsi, nous avons identifié de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans les LBDGC.

MOTS CLÉS : LBDGC ; R-CHOP ; Pronostic ; Biomarqueurs ; CYCLON ; p53

FILIÈRE : Anatomie et Cytologie Pathologiques

EVALUATION OF DIFFERENT PROGNOSIS FACTORS IN R-CHOP TREATED DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMAS

ABSTRACT:

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) is a clinically heterogeneous hematological cancer. Standard first line immunochemotherapy (R-CHOP) cure about 60% of fit patients. Despite extensive clinical, biological and molecular investigations, there is still no specific procedure to accurately discriminate refractory/relapse (R/R) DLBCL cases. On the one hand, overexpression of c-MYC or p53 is frequently found in DLBCL, but its association with prognosis remains controversial. On the other hand, CYCLON, a novel nuclear germline factor overexpressed in aggressive B-Cell Lymphoma, has been related to anti CD20 resistance *in vitro*. The aim of this study is to explore the expression of these biomarkers and their correlation with outcomes, clinical or pathological features. We established a retrospective cohort of 97 *de novo* DLBCL treated by R-CHOP. In univariate analysis, p53 overexpression (p53^{high}) was associated with unfavorable outcomes and multivariate assessment showed that presence of a “starry-sky” pattern was correlated with better survival in p53^{high} and/or c-MYC-positive DLBCL. NGS data revealed that these variables were associated with a specific mutational profile involved in cell survival. Atypical localizations of CYCLON and NPM1, an associated oncoprotein, were both strongly associated with progression free survival. Multivariate analyses showed that these atypical localizations of CYCLON and NPM1 were statistically significant and independent prognostic factors that add to the revised Index Prognosis (R-IPI) score for risk stratification by identifying DLBCL with especially worse prognosis. Altogether, we identified several potential druggable targets in DLBCL.

KEYWORDS : DLBCL ; R-CHOP ; Prognostic ; Biomarkers ; CYCLON ; p53

Doyen de la Faculté : Pr. Patrice MORAND

Année 2019-2020

ENSEIGNANTS DE L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	APIEL Florent	Ophthalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
MCF Ass.MG	BENDAMENE Farouk	Médecine Générale
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
PU-PH	BLAISE Sophie	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Bactériologie-virologie
PU-PH	BOLLA Michel	Cancérologie-Radiothérapie
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastroentérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Nutrition
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PR Ass.MG	BOUCHAUD Jacques	Médecine Générale
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
MCU-PH	BOUSSAT Bastien	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	BOUZAT Pierre	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
PU-PH	BRAMBILLA Christian	Pneumologie
PU-PH	BRAMBILLA Elisabeth	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique-médecine de la douleur
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PR Ass.MG	CARRILLO Yannick	Médecine Générale
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie

CORPS	NOM-PRENO	Discipline universitaire
PU-PH	CHARLES Julie	Dermato-vénéréologie
MCF Ass.MG	CHAUVEY Marion	Médecine Générale
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophthalmologie
PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTTON Charles	Génétique
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Cancérologie
PU-PH	DEBATY Guillaume	Médecine d'Urgence
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
PU-PH	DEMONGEOT Jacques	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
PU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie viscérale et digestive
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaëtan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	GIOT Jean-Philippe	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
MCU-PH	GUZUN Rita	Nutrition
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	HALIMI Serge	Nutrition
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie-obstétrique

CORPS	NOM-PRENO	Discipline universitaire
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie – virologie ; Hygiène hospitalière
PU-PH	LANTUEJOL Sylvie	Anatomie et cytologie pathologiques
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU - PH	LE GOUELLEC Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénérologie
MCF Ass.MG	LEDOUX Jean-Nicolas	Médecine Générale
PU-PH	LEROY Vincent	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PU-PH	LETOUBLON Christian	Chirurgie viscérale et digestive
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
MCU-PH	LUPO Julien	Bactériologie-virologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Hygiène hospitalière
PU-PH	MALLION Jean-Michel	Cardiologie
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie ; Transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie-virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Histologie, embryologie et cytogénétique
MCU-PH	MONDET Julie	Histologie, embryologie et cytogénétique
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie-virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
MCU-PH	MORTAMET Guillaume	Pédiatrie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCF Ass.MG	ODDOU Christel	Médecine Générale
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PAILHE Régis	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hématologie ; Transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PR Ass.MG	PAUMIER-DESBRIERES Françoise	Médecine Générale
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie

CORPS	NOM-PRENO	Discipline universitaire
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie
PU-PH	PLANTAZ Dominique	Pédiatrie
PU-PH	POIGNARD Pascal	Bactériologie-virologie
PU-PH	POLACK Benoît	Hématologie
PU-PH	POLOSAN Mircea	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	RAMBEAUD Jean-Jacques	Urologie
PU-PH	RAY Pierre	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
MCU-PH	RENDU John	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	RIALLE Vincent	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	RIETHMULLER Didier	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
PU-PH	RIGHINI Christian	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	ROMANET Jean Paul	Ophthalmologie
PU-PH	ROSTAING Lionel	Néphrologie
MCU-PH	ROUSTIT Matthieu	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MCU-PH	ROUX-BUISSON Nathalie	Biochimie et biologie moléculaire
MCF Ass.MG	ROYER DE VERICOURT Guillaume	Médecine Générale
MCU-PH	RUBIO Amandine	Pédiatrie
PU-PH	SARAGAGLIA Dominique	Chirurgie orthopédique et traumatologie
MCU-PH	SATRE Véronique	Génétique
PU-PH	SAUDOU Frédéric	Biologie cellulaire
PU-PH	SCHMERBER Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
PU-PH	SCHWEBEL Carole	Médecine intensive-réanimation
PU-PH	SCOLAN Virginie	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	SEIGNEURIN Arnaud	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	STAHL Jean-Paul	Maladies infectieuses ; Maladies tropicales
PU-PH	STANKE Françoise	Pharmacologie fondamentale
MCU-PH	STASIA Marie-José	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	STURM Nathalie	Anatomie et cytologie pathologiques
PU-PH	TAMISIER Renaud	Physiologie
PU-PH	TERZI Nicolas	Médecine intensive-réanimation
MCU-PH	TOFFART Anne-Claire	Pneumologie
PU-PH	TONETTI Jérôme	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	TOUSSAINT Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	VANZETTO Gérald	Cardiologie
PU-PH	VUILLEZ Jean-Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	WEIL Georges	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
PU-PH	ZAOUÏ Philippe	Néphrologie
PU-PH	ZARSKI Jean-Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie

PU-PH : Professeur des Universités - Praticiens Hospitaliers
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers
PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale
PR Ass.MG : Professeur des Universités Associé de Médecine Générale
MCF Ass.MG : Maître de Conférences Associé de Médecine Générale

Remerciements

Au Professeur Traverse-Glehen. Pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse mais aussi pour ses remarques m'ayant permis d'aller plus loin dans mon travail de mémoire.

Au Professeur Rubbia-Brandt. Pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse, votre confiance au point de m'accepter dans votre équipe, en espérant en faire partie longtemps et vous rendre l'honneur que vous me faites. J'ai hâte d'apprendre et travailler à vos côtés.

A Mary Callanan. Pour sa confiance de m'avoir confié ce très beau projet, pour son travail et son investissement, pour avoir sans cesse apporté à ce projet ses idées et son approche scientifique et enfin pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury de thèse. Mais également à ton équipe à Dijon, pour la technique et l'interprétation des données NGS.

A Anouk Emadali. Pour son investissement et son temps dédiés à cette thèse, son aide, son envie de m'apprendre et de me faire partager ses connaissances, son intérêt dans la clinique et la pathologie, pour sa confiance pour initier ce projet qui aura duré plus de deux ans et enfin pour m'avoir fait l'honneur de faire partie de mon jury.

A Rémy Gressin. Pour son aide précieuse tout au long du projet, son esprit éclairé, son temps et ses idées toujours pertinentes, sa bonne humeur et l'honneur de faire partie de mon jury. Mais également à toute l'équipe d'hématologie clinique du CHU de Grenoble dont *Julie Depeisses* mais aussi *Lucile Bussot* sans qui ce travail n'aurait jamais abouti, je te remercie pour tes heures passées à recueillir les données cliniques et biologiques de l'ensemble des patients et je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière. Je tiens également à remercier l'équipe d'hématologie de l'institut Daniel Hollard pour leur aide précieuse.

A Hervé Sartelet. Pour sa bienveillance, sa confiance, ses conseils, son goût pour la recherche, son soutien, son temps, sa soif de transmettre, son apprentissage de la diplomatie et l'honneur de diriger ma thèse. En espérant pouvoir un jour partager à nouveau un travail de recherche avec vous, je vous souhaite le meilleur pour votre futur car vous le méritez vraiment.

A *Thierry Bonnefoix*. Pour son amour contagieux des statistiques et son esprit critique, pour son temps et ses idées apportés à ce projet mais aussi pour sa disponibilité quand j'en avais besoin.

A *l'équipe d'Anouk*. Pour m'avoir permis de découvrir la vie dans un laboratoire de recherche, vos explications et votre temps passé à me former, notamment *Sième* et *Samuel*.

A *Jean Breton et son équipe*. Pour avoir dirigé le Master 2 avec précision et m'avoir guidé tout au long de cette année. Je remercie également tous les intervenants du Master 2.

A *l'institut Daniel Hollard et au laboratoire du Docteur Ciapa*. Pour votre aide dans la constitution de la cohorte et votre contribution aux résultats de ma thèse.

A *l'ensemble de l'unité de pathologie moléculaire du CHU de Grenoble*. Pour leur aide et leur implication dans la réalisation des FISH, leur sympathie, leurs compétences notamment le Docteur *Anne McLeer* mais également toute l'équipe de biologie moléculaire.

A *l'ensemble du service d'anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Grenoble*. Je remercie l'ensemble des médecins du DACP de m'avoir transmis leurs connaissances et d'avoir pris du temps pour ma formation en pathologie, notamment le Professeur *Nathalie Sturm* qui a dirigé mon cursus d'interne avec intérêt.

Je tiens à remercier spécialement l'ensemble des secrétaires du DACP, *Corinne, Stéphanie, Léontine, Emeline, Charlotte* et *Stéphanie*. Je tiens aussi à remercier les aides laboratoires, *Nathalie* et *Karim* pour leur aide durant ces cinq années.

Enfin je tiens à remercier toutes les technicien(ne)s du DACP : je ne vais pas citer tous les prénoms mais je vous remercie de m'avoir aidé, soutenu, appris et accepté dans ce laboratoire. Je me dois quand même d'en remercier personnellement certaines. En premier lieu, *Edwige* et *Laurence* pour leur temps consacré à ce projet et leur aide si précieuse, comme en témoigne les doigts encore marqués d'*Edwige* avec la coloration par AgNOR et la connaissance parfaite de *Laurence* sur l'appareil de TMA et à savoir quand il « va sauter » ; sans vous, ce travail n'aurait jamais abouti et je vous en serai toujours reconnaissant. A *Guillaume* et *Manon*, pour votre bonne humeur et vos compétences mais aussi pour m'avoir soutenu ces dernières semaines.

Aux techniciennes de macroscopie (Sherifa, Estelle G, Elodie), notamment Karine, je te remercie pour ta bonne humeur communicative, ton courage, ta sincérité, ta personnalité et le temps partagé ensemble ; et Estelle B, pour ta générosité, ta gentillesse, ton soutien, ton professionnalisme, ton humour et ton envie d'apprendre et de bien faire.

A l'ensemble du service d'anatomie et cytologie pathologies du CH de Chambéry. Pour son aide et sa bienveillance, notamment le Docteur Jean Jacques Roux. Au Docteur Pocachard, je n'oublierai pas le matin où vous m'avez déposé l'Equipe sur mon bureau, je vous remercie même si vous ne supportez pas la bonne équipe de football. Mais aussi à l'ensemble des secrétaires et techniciennes, pour m'avoir appris à me servir d'un microtome, m'avoir permis de colorer mes premières lames, je vous remercie en regardant la fameuse « sonnette » que vous m'aviez transmise le soir de mon départ et que je garde près de moi.

A Hugo Gil. Pour sa bonne humeur, ses blagues et ses surnoms injustifiés mais aussi pour ses nombreuses parties de Fortnite, en espérant que de nombreux Top1 se réalisent après ces mots, je souhaite à toute ta famille et à toi la santé.

A Olivier Stephanov. Pour ses connaissances, sa bonne humeur, son soutien, sa loyauté, son temps à m'avoir accueilli et à avoir cueilli des champignons avec moi, je te souhaite du bonheur dans la suite de ta carrière et dans ta vie personnelle avec Marion.

A l'ensemble de mes co-internes. Pour les moments passés, de m'avoir appris les bases de la fonction d'interne en pathologie pour certains (Julie, Ségolène, Anne-Sophie, Bruno) et d'avoir su me faire confiance pour que je vous transmette ce que j'avais appris au cours de mes cinq années d'internat (Romane, Mona, Maureen, Amal, Nicolas). A Adeline, pour son intégrité et pour avoir partagé mes premiers stress en remplacement. Mais également pour les nombreuses parties de baby-foot et le soutien notamment avant les « pathologies ». Je vous souhaite le meilleur pour votre futur, en espérant pour les plus jeunes que j'ai pu vous conseiller au mieux et vous apporter des choses avant que je parte.

A l'ensemble des personnes que j'ai rencontrées durant mon cursus. Lionnel, Aurélie, Raphaëlle, Natacha, Geoffroy, Marion, Claudine et Sébastien pour ta bonne humeur et ta spontanéité ainsi que d'autres que j'oublie certainement et je m'en excuse.

A Julie. Pour ton côté entier, sensible et ta générosité. Je n'oublie pas les semestres passés ensemble et les nombreuses soirées avant ta thèse.

A Pierre-Henri. Pour être charentais car c'est rare, pour sa sincérité, sa personnalité, sa confiance, son amitié, son soutien et d'avoir partagé avec moi mes premières parties de hockey avec les Bruleurs de Loups. J'espère que ta carrière se passera bien et que tu resteras toujours celui que tu es, je souhaite que tu trouves le bonheur et espère être là pour le partager avec toi.

A Alexia. Je te remercie d'être toi. Pour mille et une choses parmi lesquelles m'avoir permis de devenir plus fort, m'avoir toujours soutenu ces dernières années, ta gentillesse et ton écoute m'auront fait grandir. Ne change pas, Tu es une personne rare, entière, spontanée et dévouée ; je te souhaite le meilleur à toi et toute ta famille.

A toutes les personnes que j'ai oubliées. Merci.

Aux fautes d'orthographe de mes remerciements. Pour leur avoir permis de s'y glisser à cause de l'émotion et à la fatigue de leur avoir permis d'y rester.

A mes proches amis, Louis, David et Julien. Pour toutes ces années passées ensemble. A *Louis*, j'admire ton intelligence et ta gentillesse. A *Julien*, j'admire ton courage, ta force et ton parcours ; ta mère et tes grands parents peuvent être fiers de toi. A *David*, j'admire ta gentillesse, ta générosité, ta simplicité et ton dévouement ; reste comme tu es. Je vous remercie pour votre soutien et tous ces souvenirs ; j'ai de la chance de vous avoir.

A Mamie et Papi. Pour la générosité dont vous avez fait preuve, je n'oublierai jamais les étés passés en votre compagnie. Je vous souhaite la santé et je serai là quoi qu'il arrive.

A Nono et Nana. Je pense à vous tous les soirs. Vous m'avez permis de surmonter mes soirées difficiles en me réconfortant de là-haut. J'espère pouvoir vous rendre fiers par ce travail.

A Adrien et Elly. Pour *Elly*, tu fais partie de la famille quoi qu'il arrive, je te remercie pour ta confiance et ton aide précieuse pour l'anglais. Tu es une belle personne et le fait que tu rendes heureux mon frère est essentiel pour moi et je t'en suis reconnaissant. Pour *Adrien*, être si loin de toi est difficile chaque jour. Je suis tellement fier de toi et je t'aime, c'est peut-être la première (et dernière) fois que je l'admets. Je

te remercie pour tous les moments partagés, nos heures de Playstation, nos batailles, nos mimiques en regardant le sport et nos disputes.

A mon père Patrick et à ma mère Silvia. J'aurai pu résumer, par pudeur, ces remerciements à deux mots : amour inconditionnel. Votre sens du sacrifice est un exemple pour moi, vous m'avez donné la meilleure éducation qu'il soit possible de recevoir. Si j'en suis arrivé là aujourd'hui, c'est entièrement grâce à vous, à votre temps passé à suivre ma scolarité, à votre soutien sans faille, à votre aide, à votre amour et à votre dévouement. Je vous aime et vous dédie entièrement ce travail ainsi qu'à *Adri*.

Table des matières

I.	Rappels anatomo-histologiques	16
A.	Présentation du système immunitaire	16
B.	Présentation du système lymphoïde	17
C.	La rate.....	18
D.	Les ganglions lymphatiques.....	19
II.	Généralités sur les lymphomes	21
A.	Les hémopathies malignes	21
B.	Notion de « cell of origin ».....	22
C.	Epidémiologie des lymphomes malins	22
D.	Lymphomes de Hodgkin et non Hodgkiniens.....	23
1.	Le lymphome de Hodgkin	23
2.	Les lymphomes non Hodgkiniens	25
E.	Classification des LNH B.....	26
III.	Les lymphomes B diffus à grandes cellules, NOS.....	29
A.	Définition	29
B.	Epidémiologie	29
C.	Etiologies	31
D.	Présentation clinique.....	31
E.	Diagnostic	33
F.	Aspects histopathologiques et morphologiques	34
G.	Immunohistochimie	38
1.	Confirmation diagnostique	38
2.	Biomarqueurs pronostiques.....	39
H.	Génétique	45
1.	Stratification des LBDGC selon la COO	45
2.	<i>MYC</i> , <i>BCL2</i> et <i>BCL6</i> dans les LBDGC, NOS	50

3.	Autres altérations cytogénétiques des LBDGC, NOS	53
4.	La génétique, base des nouvelles classifications	55
5.	La génétique, base des nouvelles thérapeutiques.....	57
I.	Détermination du stade de la maladie au diagnostic.....	58
1.	Bilan d'extension.....	58
2.	Place de l'imagerie	59
3.	Stade Ann Arbor	61
4.	Score IPI.....	63
J.	Traitement.....	66
1.	Traitement de première ligne	66
2.	Traitement de rattrapage	71
K.	Tableau récapitulatif des principaux facteurs pronostiques	74
IV.	Les autres sous-types de LNH B agressifs	75
A.	Les lymphomes B de haut grade (HGBL)	75
1.	HGBL DHL/THL.....	75
2.	HGBL, NOS.....	77
B.	LBDGC EBV positif, NOS	78
C.	LBDGC avec réarrangement de IRF4.....	80
D.	LBDGC de topographie particulière (extra-ganglionnaires)	80
1.	LBDGC cérébral primitif.....	80
2.	LBDGC « leg-type » (cutané primitif).....	81
3.	Les lymphomes B primitifs du médiastin (PMBL)	81
4.	LBDGC intravasculaire	82
E.	Lymphome B à grandes cellules riche en cellules T /histiocytes.....	83
V.	CYCLON : découverte de son rôle dans les LBDGC	84
VI.	Buts du travail	86
VII.	Evaluation de différents facteurs pronostiques connus dans les LBDGC.	88

VIII. Recherche de nouveaux facteurs prédictifs dans les LBDGC : CYCLON impliqué dans un réseau de protéines en lien avec la résistance au Rituximab ?	89
IX. Conclusions.....	90
X. Perspectives.....	92
Serment d'Hippocrate	105

I. Rappels anatomo-histologiques

A. *Présentation du système immunitaire*

Le système immunitaire a pour rôle principal la défense contre les agressions exogènes, y compris les agents infectieux qu'il doit être capable de reconnaître précocement puis d'éliminer. Pour ce faire, il allie deux volets : une immunité innée et une immunité acquise.

La première correspond à une réponse constitutive et immédiate mais non spécifique et non adaptative. Bien évidemment, il est extrêmement important que cette réponse immune puisse différencier les éléments du soi des éléments du non soi. Succinctement, l'immunité innée interne est médiée par des cellules capables de présenter l'antigène (monocytes, macrophages, cellules dendritiques), par des cellules capables de le détruire (action de phagocytose réalisée par les polynucléaires, les macrophages, les lymphocytes NK) mais également par les protéines du complément. En amont de ces processus, l'immunité de surface repose sur les barrières cutanéomuqueuses du corps humain, luttant également contre la pénétration des agents exogènes.

L'autre volet de la réponse immunitaire est l'immunité acquise, spécifique, car médiée par des lymphocytes portant à leur surface un récepteur spécifique (un épitope) à un seul antigène. Cette réponse est cependant limitée dans le temps mais elle reste en mémoire dans l'organisme, afin de pallier plus rapidement une éventuelle exposition ultérieure de l'antigène reconnu. L'immunité acquise peut être soit cellulaire, via les lymphocytes T et les cellules composant le complexe d'histocompatibilité, soit humorale, via les lymphocytes B puis les plasmocytes produisant un anticorps

spécifique d'un antigène. Les lymphocytes sont donc la pierre angulaire essentielle à la réponse immunitaire acquise.

B. Présentation du système lymphoïde

Ces lymphocytes dérivent du système lymphoïde, site des réponses immunitaires et de la maturation lymphocytaire. Cette dernière se déroule au sein des organes lymphoïdes primaires et secondaires.

Les organes lymphoïdes primaires, dits centraux (moelle osseuse et thymus), assurent la différenciation des cellules immunitaires. Le thymus est le lieu de maturation des lymphocytes T tandis que la moelle osseuse est le site principal d'hématopoïèse et participe à la maturation des lymphocytes B.

Les organes lymphoïdes secondaires, dits périphériques, sont les lieux de développement de la réponse immune acquise. C'est à ce niveau que les lymphocytes, après reconnaissance antigénique, sont activés et se différencient en cellules effectrices ou cellules mémoires. Ces formations lymphoïdes périphériques peuvent être :

- Non encapsulées : elles sont alors appelées Tissus Lymphoïdes Associés aux Muqueuses (MALT). On les retrouve notamment au niveau digestif (plaques de Peyer), oro-pharyngé (amygdales), bronchique et urinaire. Les MALT réagissent aux antigènes présents directement à la surface d'une muqueuse ;
- Encapsulées : ce sont la rate et les ganglions lymphatiques ; ils permettent aux cellules du système lymphoïde de reconnaître l'ensemble des antigènes d'origine tissulaire ou sanguin.

C. La rate

Elle est impliquée dans la réponse immunitaire acquise, assure l'immunosurveillance des antigènes présents dans le sang et l'élimination de certains déchets sanguins. C'est l'organe lymphoïde secondaire le plus volumineux et se compose essentiellement de pulpe rouge et de pulpe blanche (**Figure 1**).

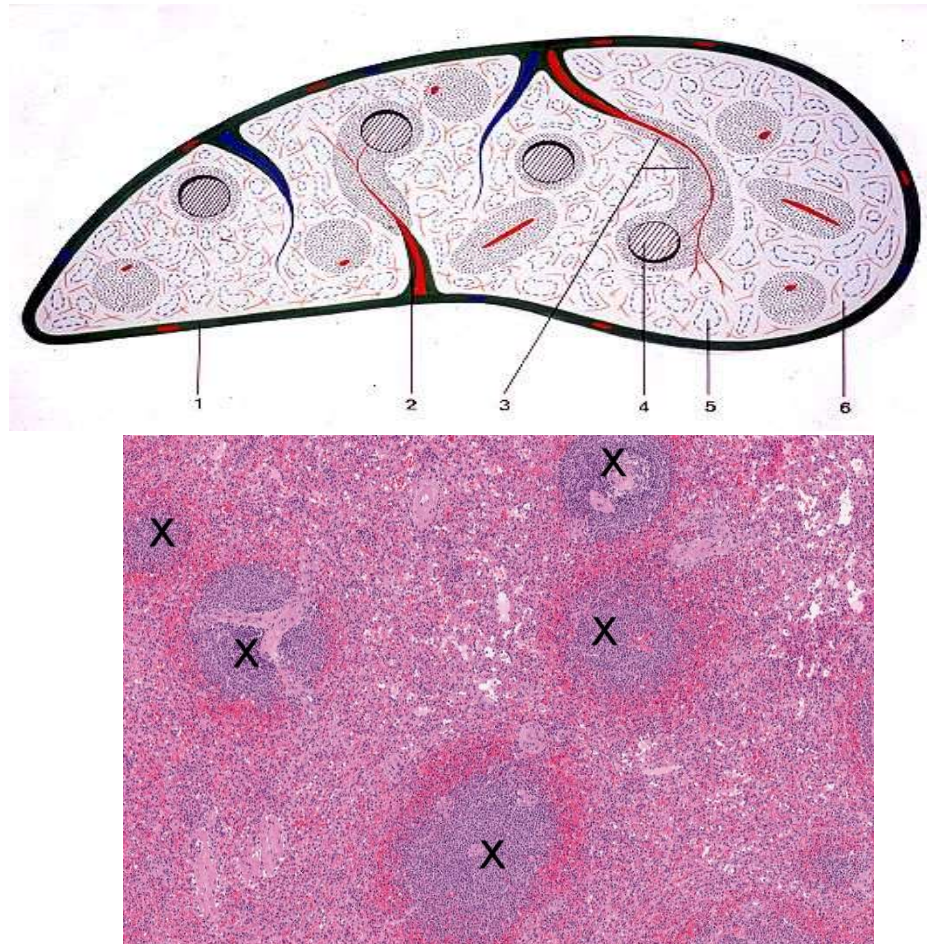


Figure 1. En haut, schéma micro-anatomique de la rate (d'après UCLouvain). En bas, aspect histologique d'une rate normale à faible grossissement avec une coloration standard HES (d'après UMFV). La rate est bordée d'une capsule (1) émettant des septas fibreux intra-parenchymateux (2). Le parenchyme splénique comprend la pulpe blanche qui correspond à des nodules lymphoïdes (corpuscules de Malpighi (4), marqués d'une croix noire sur l'image histologique) formant des manchons péri-artériolaires (3). La pulpe rouge est formée de sinusoides veineux (5) et de cordons cellulaires de Billroth (6).

D. Les ganglions lymphatiques

On dénombre 500 à 1000 ganglions lymphatiques, souvent groupés en aires ganglionnaires, au sein desquels, autour d'une capsule conjonctive, le parenchyme ganglionnaire est organisé en trois régions. On y retrouve du centre vers la périphérie, la médullaire ganglionnaire (renfermant des lymphocytes B et T, des plasmocytes et des macrophages) puis le paracortex (renfermant des lymphocytes T et des cellules dendritiques interdigitées) et enfin le cortex (**Figures 2 et 3**). Ce dernier est composé de follicules lymphoïdes primaires et secondaires. Un follicule lymphoïde est dit secondaire en cas d'activation antigénique, il respecte alors la logique architecturale suivante :

- Une zone du manteau périphérique limitée à une couche asymétrique de lymphocytes B naïfs et mémoires ;
- Un centre germinatif (CG) avec une zone sombre faite de centroblastes et une zone claire dans laquelle se mêlent des centrocytes, des macrophages à corps tingibles et des cellules dendritiques (**Figure 4**).

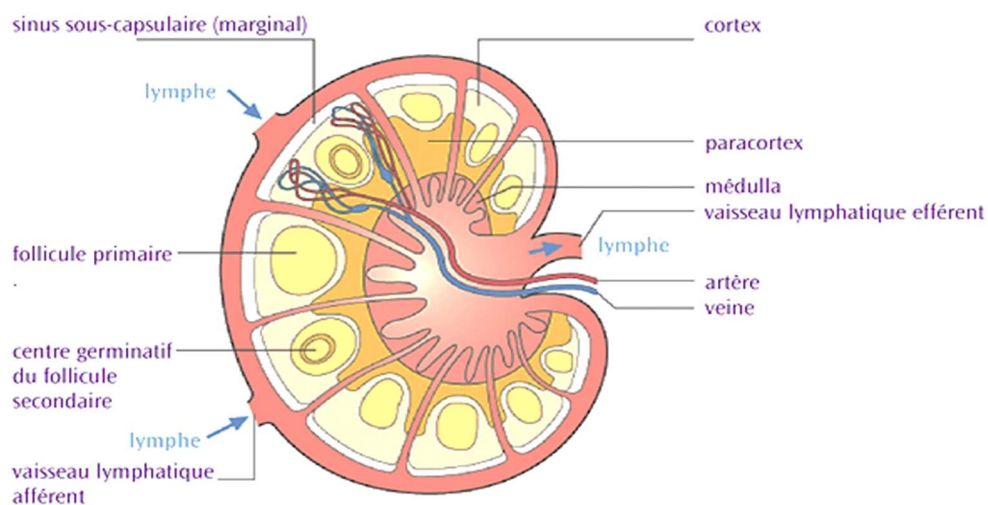


Figure 2. Structure anatomique d'un ganglion lymphatique (d'après Lymphome Canada).

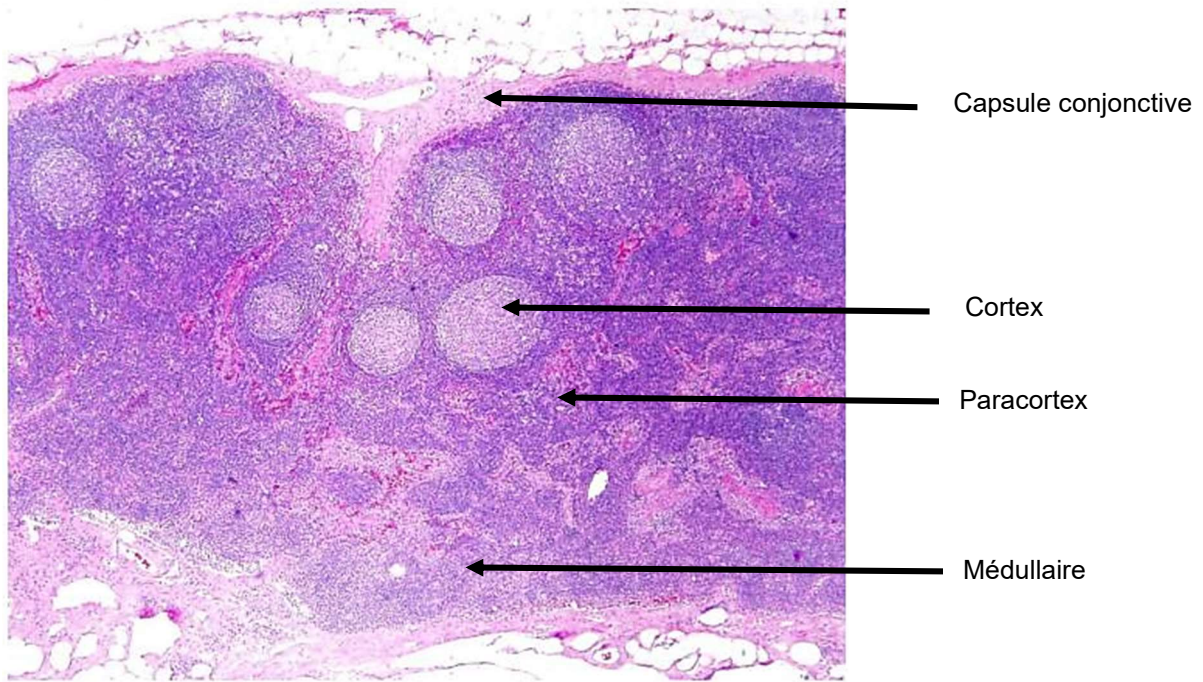


Figure 3. Aspect histologique d'un ganglion normal à faible grossissement, HES (Pathology Outlines).

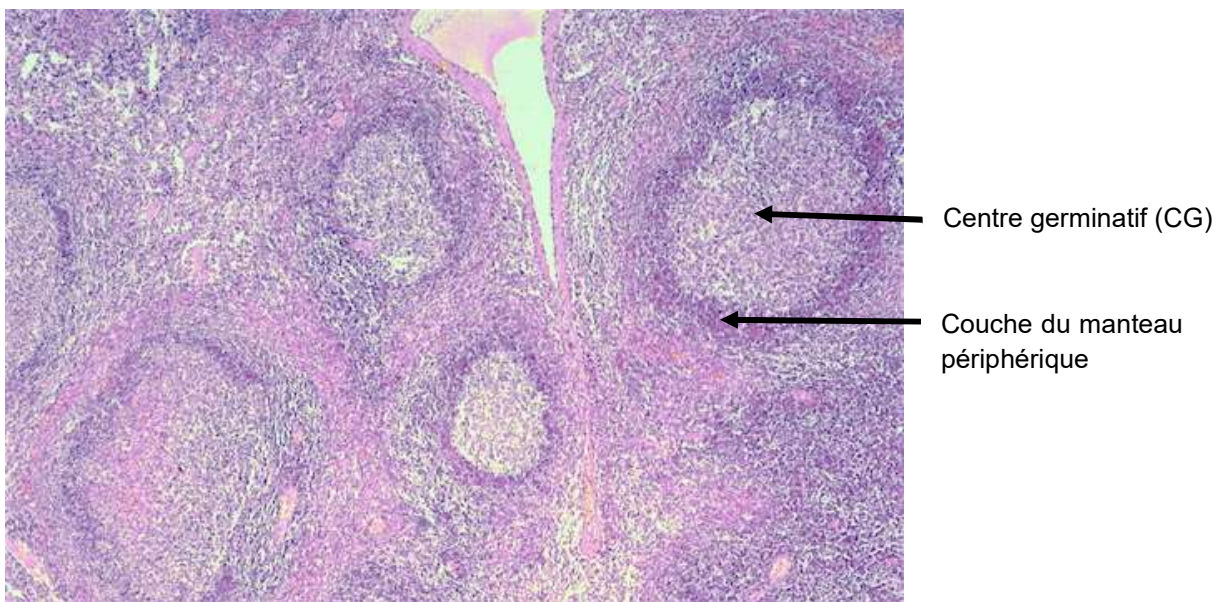


Figure 4. Follicules lymphoïdes à faible grossissement, HES (Pathology Outlines).

II. Généralités sur les lymphomes

A. Les hémopathies malignes

Elle repose sur la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2016 [1], qui se base sur les données cliniques, les aspects histologiques, le phénotype immunohistochimique et le profil génétique des tumeurs afin de diviser les hémopathies malignes en :

- Tumeurs myéloïdes dérivant des progéniteurs myéloïdes de la moëlle osseuse, pouvant emprunter la lignée érythroïdique, granulocytaire, mégacaryocytaire ou mastocytaire,
 - Tumeurs dendritiques ou histiocytaires
 - Tumeurs lymphoïdes à partir des progéniteurs lymphoïdes B (issus de la moëlle osseuse) et T (issus du thymus), mais également à partir de cellules lymphocytaires B ou T matures. On distingue les leucémies, proliférations clonales de cellules tumorales issues de la moëlle osseuse hématopoïétique, des lymphomes, prolifération clonale de cellules tumorales au sein d'un organe lymphoïde secondaire.

Auparavant, les différentes classifications établies ne prenaient en compte que les aspects morphologiques et cytologiques des hémopathies malignes. Mais, avec les découvertes récentes et notamment les avancées sur le plan génétique et moléculaire, il a été démontré que de nombreuses tumeurs ne pouvaient être différenciées en se basant uniquement sur leur aspect histologique. Ainsi, il est maintenant acquis qu'une tumeur peut présenter une hétérogénéité morphologique et fonctionnelle, ceci pouvant être par exemple secondaire à des mutations épigénétiques [2].

B. Notion de « cell of origin »

Dorénavant, la notion de « cell of origin » (COO) est à la base de toute tumeur solide ou toute hémopathie maligne [2]. La COO est définie comme la cellule normale qui acquiert la première mutation oncogénique (**Figure 5**).

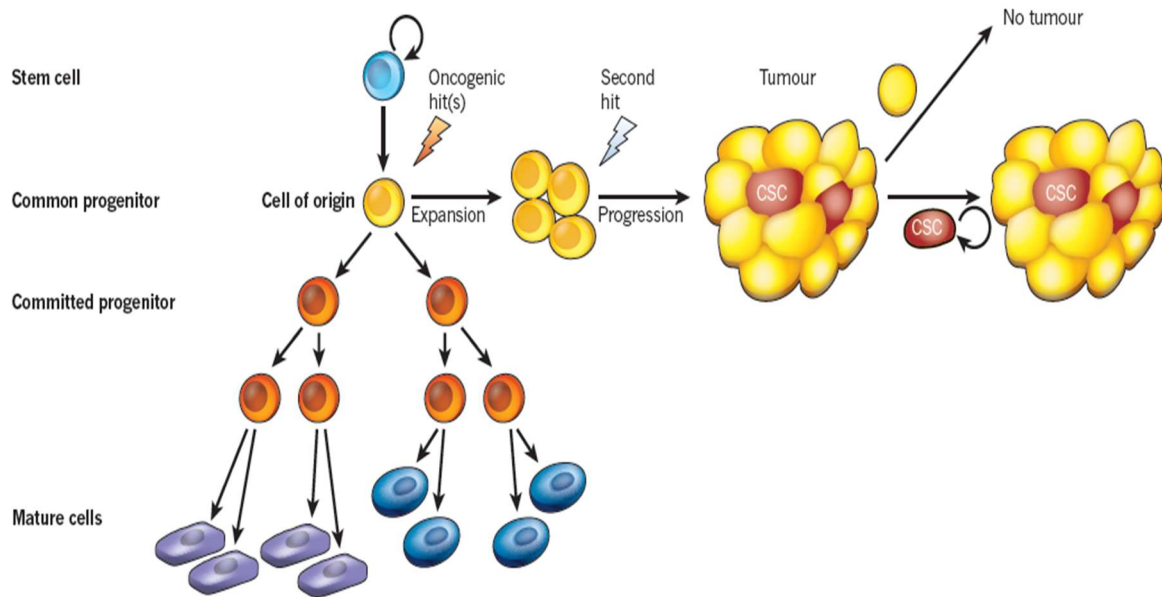


Figure 5. Notion de COO et évolution tumorale, d'après Visvader. La COO est la cellule sur laquelle a lieu la première mutation oncogénétique entraînant la tumorigenèse.

L'évolution des découvertes sur les hémopathies malignes a donc permis de faire émerger de nouvelles entités. Ainsi, afin d'harmoniser les diagnostics, certains groupes comme le Pathology Working Group of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph) [3], proposent des classifications pour faire le lien entre anciennes et nouvelles entités, ceci afin d'assurer une continuité des soins.

C. Epidémiologie des lymphomes malins

Actuellement, en France, les lymphomes comptent pour 3 à 5% de l'ensemble des cancers chez l'adulte. On estime l'incidence des lymphomes malins à plus de

16000 nouveaux cas par an, les plaçant au 6^{ème} rang des cancers les plus fréquents [4]. De plus, cette incidence est en constante augmentation ces dernières années.

Ces chiffres se vérifient dans d'autres pays , avec par exemple, plus de 83 000 nouveaux cas de lymphomes en 2018 aux Etats-Unis [5]. La prévalence des lymphomes (traités ou en rémission) est quant à elle estimée à plus de 845 000 personnes aux Etats-Unis.

Les facteurs de risque de survenue de lymphome sont peu connus : ainsi, dans une grande majorité des cas, aucune étiologie particulière n'est mise en évidence. Cependant, quelques facteurs environnementaux (exposition à des substances chimiques ou à des radiations), immuns (contexte d'immunosuppression, pathologie auto-immune sous-jacente) ou infectieux (EBV, VIH) peuvent être impliqués dans la tumorigenèse des hémopathies malignes.

D. Lymphomes de Hodgkin et non Hodgkiniens

On distingue deux grands types de lymphomes : les lymphomes de Hodgkin (LH) représentant 10% des lymphomes [6] et les lymphomes Non Hodgkiniens (LNH), que l'on sépare en lymphomes B et lymphomes T.

1. Le lymphome de Hodgkin

Il est défini par une population cellulaire tumorale unique et minoritaire, constituée de cellules de Reed-Sternberg, disposées dans un fond inflammatoire.

La cellule de Reed-Sternberg provient d'une cellule lymphocytaire B du CG ou post centre germinatif (PCG). Elle se distingue par ses caractéristiques cytologiques

puisque'il s'agit d'une cellule de grande taille, à noyau clair, parfois polylobé (en miroir, **Figures 6 et 7**) et par son phénotype immunohistochimique (CD30 et CD15 positifs, CD20 et CD3 négatifs). Cependant, ni elle ni ses variants (cellule de Hodgkin, cellule lacunaire), ne sont pathognomoniques du LH. Le LH est séparé des autres lymphoproliférations à cellules B en raison de sa présentation anatomoclinique particulière, de son évolutivité et de sa thérapeutique spécifique.

Le LH est divisé en LH classique comprenant 4 sous types histologiques, et en LH nodulaire à prédominance lymphocytaire (également appelé paraganulome nodulaire de Poppema) qui diffère de par son évolutivité et son traitement du LH classique. La classification de Lukes-Rye sépare le LH classique en 4 types, dont les formes les plus fréquentes sont le LH scléro-nodulaire (type II, environ 80% des LH) et le LH à cellularité mixte (type III, 15% des LH). Les deux autres types, le LH riche en lymphocytes (type I) et le LH à déplétion lymphocytaire (type IV) sont plus rares.

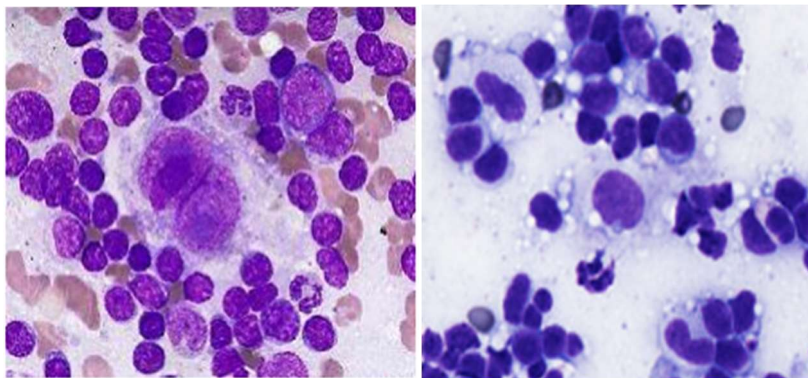


Figure 6. Aspect cytologique, coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa), d'une cellule de Reed Sternberg avec un noyau bilobé en « miroir » (à gauche) et d'une cellule de Hodgkin (à droite).

Sa survenue suit une courbe à deux pics, l'un chez l'adolescent et l'adulte jeune, et l'autre après 75 ans, avec une discrète prédominance chez les hommes. Son incidence tend à diminuer au cours des dernières années et elle est estimée à 2,61 cas pour 100 000 habitants en France [7]. Le facteur de risque le plus connu est une infection préalable à EBV, que l'on peut mettre en évidence par une technique

d'hybridation in situ avec la sonde EBER. Cliniquement, le LH est un lymphome peu agressif, de bon pronostic, dont les taux de survie à 5 ans sont de 85% en France.

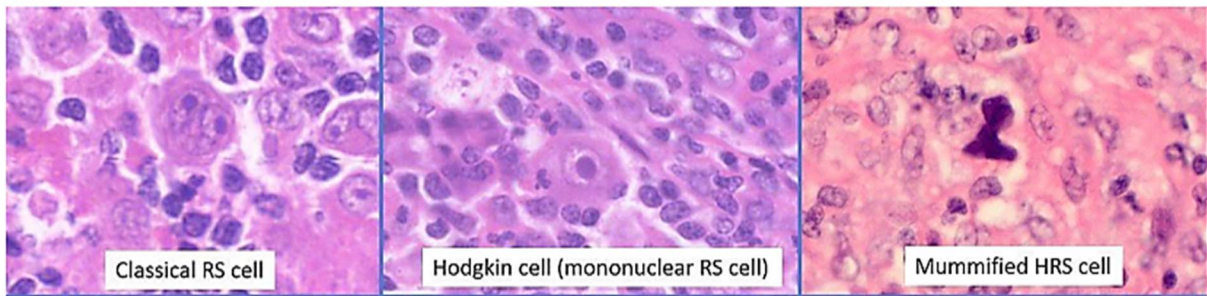


Figure 7. Aspect histologique à l'HES d'une cellule de Reed Sternberg (à gauche) et de ses variants (cellule de Hodgkin (au milieu) et cellule momifiée (à droite)). D'après Matthew Pugh – FRCPath.

2. Les lymphomes non Hodgkiniens

Ils dérivent d'une cellule lymphocytaire pouvant être une cellule souche de la lignée B ou T mais aussi un lymphocyte B ou T mature. Les LNH représentent la majeure partie des lymphomes de l'adulte. La classification OMS de 2016 en recense environ 60 types différents, démontrant leur diversité clinique, histologique et moléculaire. On sépare les LNH en deux grands groupes, selon l'origine B ou T de la cellule tumorale d'origine. D'un côté les LNH T présentent un phénotype immunohistochimique « T », classiquement CD3 positif et CD20 négatif. Les LNH B ont quant à eux un profil de lignée B, CD20 positif et CD3 négatif.

Les données de survie sont également très variables selon le type de lymphome. Certains LNH sont peu agressifs, répondant bien à la première ligne de traitement de référence tandis que d'autres, très agressifs, conduisent à de nombreux échecs thérapeutiques, à des rechutes parfois nombreuses et à un taux de mortalité important.

E. Classification des LNH B

Les LNH B dérivent d'un lymphocyte B, quel que soit son stade de différenciation cellulaire (du lymphocyte B naïf jusqu'au plasmocyte). De ce fait, on dénombre, dans la classification de l'OMS 2016, près de 40 types de LNH B (**Tableau 1**) dont voici ci-dessous les principaux [8] (**Figure 8**) :

- Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) sont des lymphomes agressifs. C'est la forme la plus fréquente de LNH de l'adulte (environ 30%). Les multiples sous-types seront décrits ultérieurement, la cellule d'origine pouvant être issue du CG ou du PCG. Il est important de scinder ce grand groupe en deux catégories :
 - Les LBDGC NOS (Not Otherwise Specified) sont des proliférations diffuses de grandes cellules B dont les diagnostics différentiels ont été éliminés
 - Les autres proliférations lymphomateuses diffuses à grandes cellules B regroupent de nombreuses entités (se conférer au chapitre spécifique).
- Le lymphome folliculaire, dérivant d'une cellule B du CG, est le deuxième LNH le plus fréquent chez l'adulte (environ 15%).
- Le lymphome du manteau, comptant pour 7% des LNH de l'adulte, ayant pour origine une cellule B issue de la zone du manteau.
- Le lymphome de Burkitt, forme très agressive et fréquente chez l'enfant, plus rare chez l'adulte ; il dérive d'une cellule B du CG.
- La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus observée chez l'adulte : elle est composée de petits lymphocytes B naïfs ou matures.
- Le lymphome de la zone marginale ou du MALT qui se développe à partir d'un lymphocyte B PCG.

Mature B-cell neoplasms	
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma	<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Monoclonal B-cell lymphocytosis*	Primary cutaneous follicle center lymphoma
B-cell prolymphocytic leukemia	Mantle cell lymphoma
Splenic marginal zone lymphoma	In situ mantle cell neoplasia*
Hairy cell leukemia	Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>	Germinal center B-cell type*
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>	Activated B-cell type*
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>	T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Lymphoplasmacytic lymphoma	Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Waldenström macroglobulinemia	Primary cutaneous DLBCL, leg type
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*	EBV ⁺ DLBCL, NOS*
μ heavy-chain disease	EBV ⁺ <i>mucocutaneous ulcer*</i>
γ heavy-chain disease	DLBCL associated with chronic inflammation
α heavy-chain disease	Lymphomatoid granulomatosis
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*	Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Plasma cell myeloma	Intravascular large B-cell lymphoma
Solitary plasmacytoma of bone	ALK ⁺ large B-cell lymphoma
Extrasosseous plasmacytoma	Plasmablastic lymphoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*	Primary effusion lymphoma
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)	HHV8 ⁺ DLBCL, NOS*
Nodal marginal zone lymphoma	Burkitt lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>	<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
Follicular lymphoma	High-grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements*
In situ follicular neoplasia*	High-grade B-cell lymphoma, NOS*
Duodenal-type follicular lymphoma*	B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma
Pediatric-type follicular lymphoma*	

Tableau 1. Classification OMS 2016 des tumeurs lymphoïdes B matures (1).

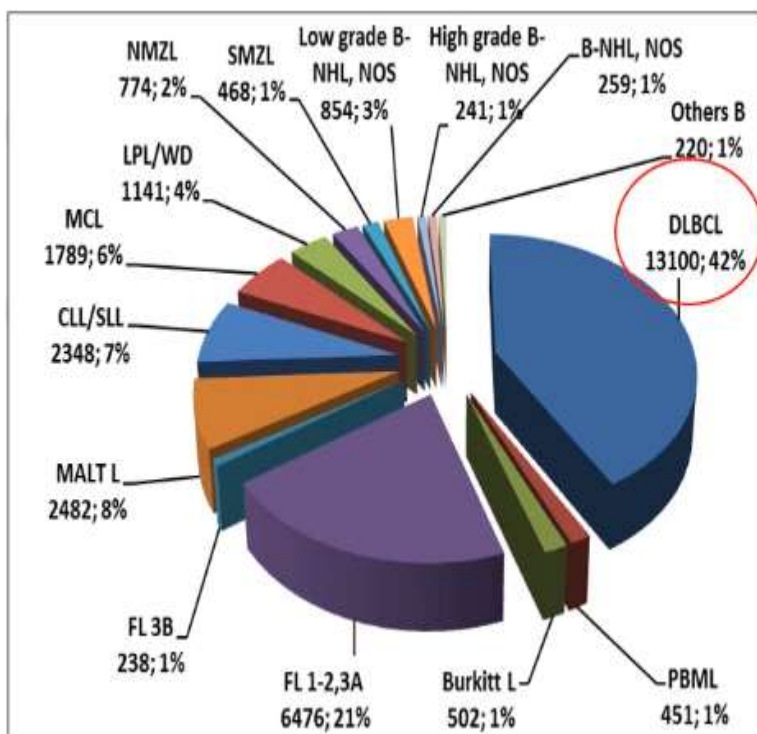


Figure 8. Répartition des principaux types de LNH selon leur fréquence (8).

CLL/SLL, chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma ; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma ; FL, follicular lymphoma ; LPL/WD, lymphoplasmacytic lymphoma/Waldenström macroglobulinemia ; MALT, mucosa-associated lymphoid tissue ; MCL, mantle cell lymphoma ; NMZL, nodalmarginal zone lymphoma ; PBML, Primary Mediastinal B-cell Lymphoma ; SMZL, splenic marginal zone lymphoma.

Les LNH B dérivent donc le plus souvent d'un lymphocyte du CG ou PCG, c'est-à-dire un lymphocyte ayant préalablement été activé par un antigène [9]. Cette notion de COO, préalablement expliquée, est encore une fois à la base des classifications actuelles autour des LNH B car elle permet d'expliquer la physio pathogénie de ces proliférations (**Figure 9**).

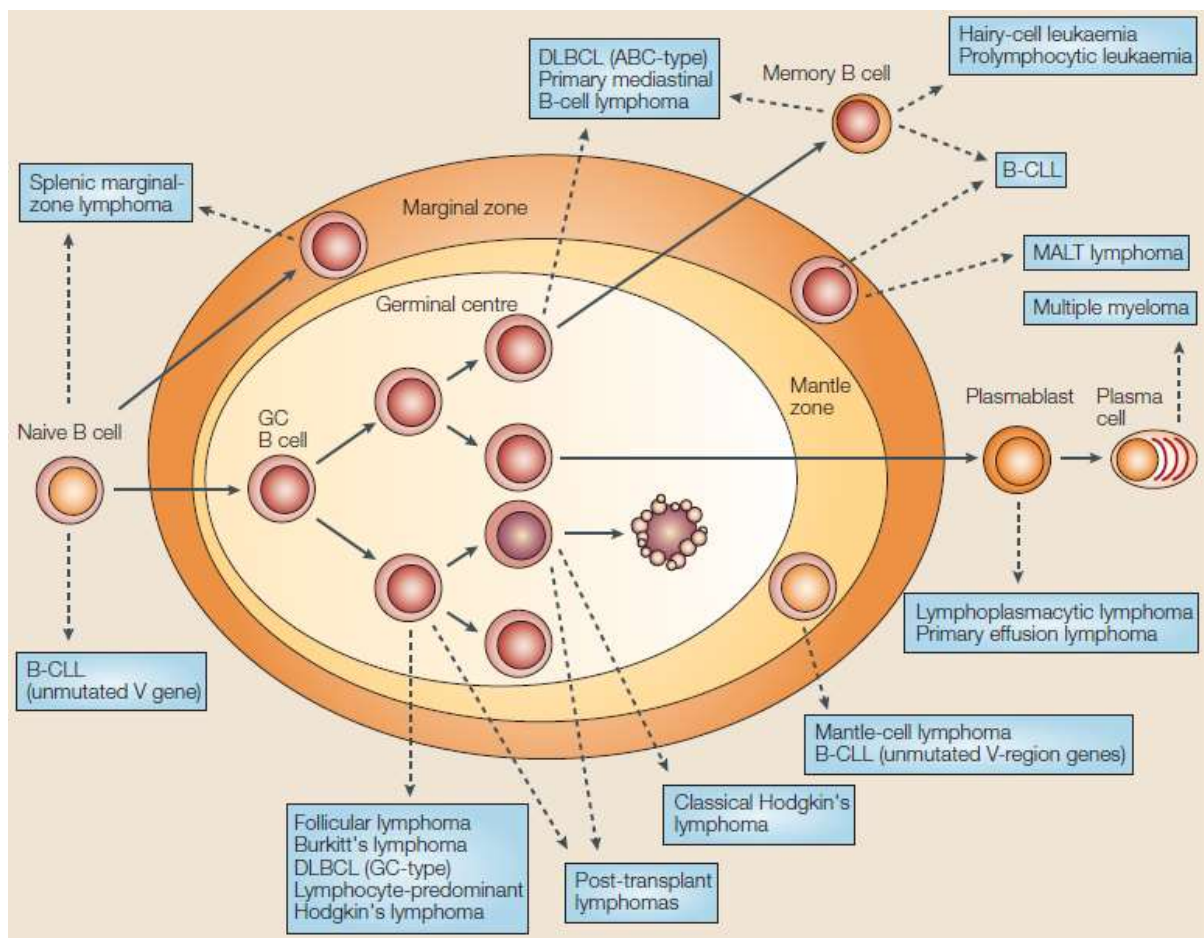


Figure 9. Origine cellulaire des lymphomes B, d'après Küppers (9) (GC=CG / DLBCL=LBDGC).

Les flèches pleines indiquent les étapes de maturation lymphocytaire B alors que les flèches en pointillés mentionnent les types de lymphomes B possibles selon la cellule d'origine. Il est à noter que certains types de lymphomes peuvent avoir plusieurs origines cellulaires ; c'est notamment le cas des LBDGC qui peuvent dériver de cellules du centre germinatif (LBDGC sous type GCB) ou de cellules déjà passées par le CG (LBDGC sous type ABC).

III. Les lymphomes B diffus à grandes cellules, NOS

A. Définition

Le LBDGC NOS se définit comme une prolifération tumorale d'architecture diffuse composée de cellules B matures de taille moyenne à grande (c'est-à-dire dont le noyau est supérieur à 2 fois la taille d'un petit lymphocyte normal) et ne rentrant dans aucune des catégories spécifiques listées dans la dernière classification OMS 2016 [1] (voir ci-après, chapitre IV).

B. Epidémiologie

Pour rappel, le LBDGC représente environ 25% des LNH et est donc le lymphome le plus fréquent [1,10]. Ces chiffres se confirment en France puisque *Laurent et al.* ont même montré sur une cohorte de plus de 32 000 diagnostics de lymphomes entre 2010 et 2013, que 32,4% des cas étaient des LBDGC [8]. Au Royaume-Uni, *Smith et al.* au cours de deux études récentes, ont rapporté un taux annuel de LBDGC de 7,9 cas pour 100 000 personnes par an [11], faisant de ce type histologique l'hémopathie maligne la plus fréquente [12]. Cependant, il est à noter que l'incidence des LBDGC varie selon le pays et l'origine ethnique des patients ; ainsi en Europe, tous pays confondus, l'incidence du LBDGC est estimée à 4 cas pour 100 000 habitants par an [13].

Le LBDGC peut toucher toutes les tranches d'âge mais sa prévalence est nettement plus importante après 40 ans, comme en témoigne un âge médian au diagnostic entre 65 et 70 ans selon les séries ; voilà pourquoi le LBDGC est appelé le lymphome de la « personne âgée ». Chez l'enfant en effet, ce diagnostic existe mais

reste rare. En revanche, après 70 ans, le LBDGC compte pour plus de la moitié des diagnostics de lymphomes [11].

Ce type histologique touche aussi bien l'homme que la femme, avec une discrète prédominance masculine [11,14] (**Figure 10.A**).

En terme de pronostic, le LBDGC est considéré comme un lymphome agressif, avec une survie globale à 5 ans (OS = Overall Survival) autour de 50% selon les séries [10,11]. Il compte parmi les hémopathies malignes de plus mauvais pronostic. Cependant, dans une étude rétrospective récente, *Sant et al.* ont souligné l'impact des progrès thérapeutiques dans la prise en charge des LBDGC en Europe, avec une amélioration des plus importantes parmi toutes les hémopathies malignes : en dix ans, l'espérance de survie à 5 ans est passée de 42% (période 1997-1999) à 55% (période 2006-2008) (13,14) (**Figure 10.B**).

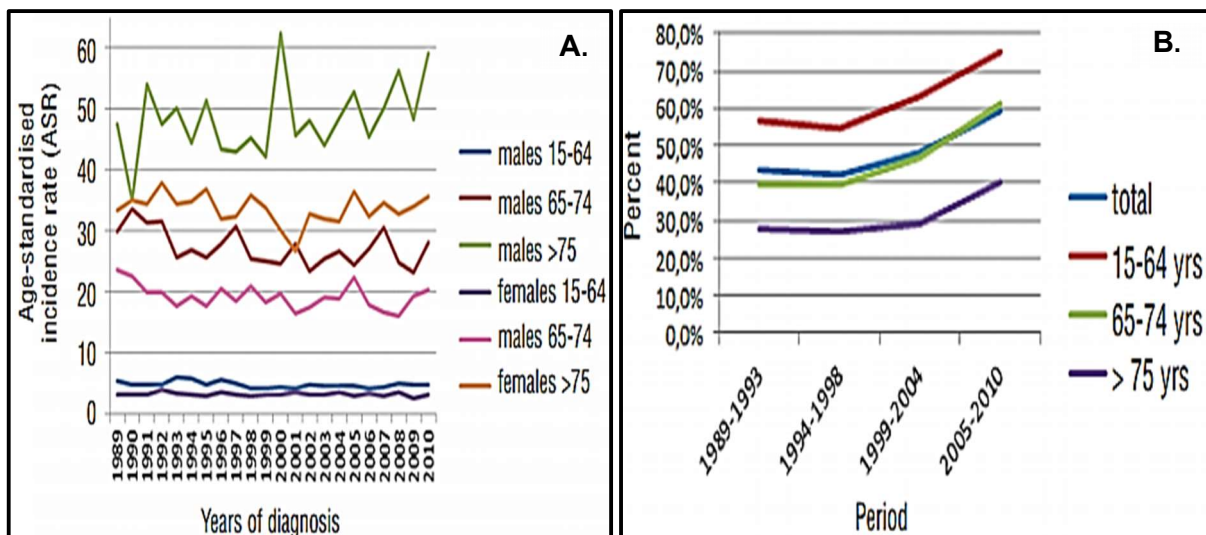


Figure 10. Répartition selon l'âge et le sexe des LBDGC entre 1989 et 2010 (14).

Figure 10.A montre l'incidence du LBDGC aux Pays-Bas normalisée selon l'âge et le sexe (3 tranches d'âge par sexe). Les tranches les plus touchées sont les plus de 75 ans (courbes verte (homme) et orange (femme)).

Figure 10.B montre l'amélioration de la survie relative à 5 ans dans les LBDGC selon les 3 tranches d'âge ; elle est légèrement inférieure à 60% tout âge confondu (courbe bleue).

Ces progrès tangibles font notamment suite à l'avènement du R-CHOP qui est une immunochimiothérapie à base de Rituximab (anticorps anti CD-20), de Cyclophosphamide, d'Hydroxy Doxorubicine, de Vincristine et de Prednisone. Il s'agit du traitement de référence actuel dans le LBDGC mais son efficacité reste partielle : de nombreux patients y sont réfractaires ou rechutent. Voilà pourquoi le LBDGC est encore aujourd'hui considérée comme une entité de mauvais pronostic. La recherche de facteurs prédictifs de la réponse au traitement apparaît donc capitale dans cette pathologie. Les facteurs pronostiques et les différentes options thérapeutiques actuelles seront développés ultérieurement.

C. *Etiologies*

Il existe de rares facteurs de risque des LBDGC. Les terrains les plus à risque sont les immunodéprimés, comme par exemple les patients atteints par le VIH, les transplantés ou les patients sous traitement immunosuppresseur au long cours. Les autres facteurs de risque connus sont une infection chronique à EBV (souvent à l'origine d'un sous-type particulier de LBDGC) ou un état pro-inflammatoire chronique (lymphœdème post mastectomie, antécédent de chirurgie avec pose de matériel étranger). Enfin, même si la majorité des LBDGC surviennent « de novo », il existe des LBDGC « transformés » sur une hémopathie préexistante, notamment à partir d'une LLC ou d'un lymphome folliculaire.

D. *Présentation clinique*

Les LBDGC peuvent se développer à partir d'un tissu ganglionnaire ou extra-ganglionnaire. Les origines ganglionnaires et spléniques sont les plus fréquentes alors

que les sites extra-ganglionnaires le plus souvent à l'origine d'un LBDGC sont le tube digestif (notamment estomac), les cavités naso-sinusiennes, les anneaux de Waldeyer et les testicules (**Figures 11.A et 11.B**) [15]. Certains LBDGC dérivant d'un organe particulier comme la peau et le système nerveux central, présentent des spécificités cliniques et biologiques à part entière ; ils constituent alors un des nombreux sous-types de LBDGC dans la dernière classification de l'OMS 2016.

Alors que l'origine ganglionnaire primitive est la plus courante, il n'est pas rare qu'au moment du diagnostic ou au cours de l'évolution de la maladie, une atteinte extra ganglionnaire survienne ou soit retrouvée (environ 70% des cas) [16]. Il en va de même pour la moelle osseuse, qui, lorsqu'elle est envahie (15% des cas) [16] reflète un LBDGC de plus mauvais pronostic.

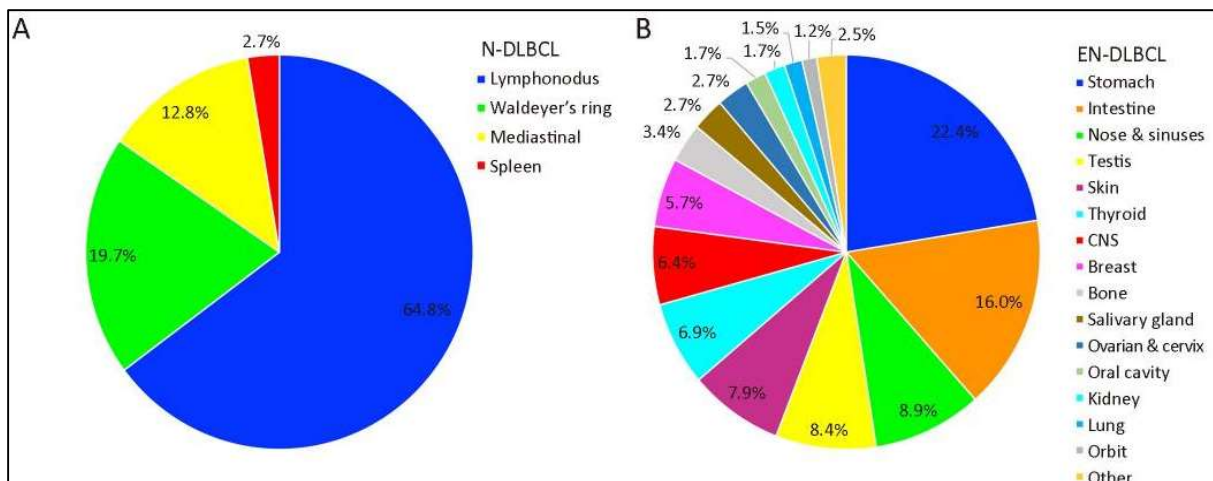


Figure 11. Diagrammes illustrant la répartition par fréquence de l'origine primitive du LBDGC (15). **Figure 11.A** montre la répartition des LBDGC dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires. L'origine ganglionnaire primitive est de loin la plus fréquente (65%). **Figure 11.B** montre la répartition des LBDGC dans les sites extra-ganglionnaires. L'origine digestive est la plus fréquente.

Tout comme sur les plans morphologiques et biologiques (qui seront abordés ultérieurement) les LBDGC sont des tumeurs très hétérogènes sur le plan clinique. Les signes cliniques sont aspécifiques et inconstants (présents dans un tiers des cas uniquement) [16], le tableau clinique étant principalement dominé par les « symptômes B » qui associent fièvre, sueurs nocturnes, asthénie et perte de poids. L'examen clinique doit être minutieux afin de rechercher des masses ganglionnaires superficielles sus et sous-diaphragmatiques ainsi qu'une splénomégalie. Typiquement, les adénopathies tumorales mesurent plus de 2 cm, sont fermes, indolores, mobiles et non inflammatoires. L'examen de toutes les aires ganglionnaires est essentiel car le nombre et la topographie des ganglions atteints modifient le stade (selon Ann Arbor) et le score IPI (International Prognostic Index).

Afin de mieux apprécier les adénopathies profondes, un bilan d'extension est systématiquement réalisé et comprend un scanner thoraco-abdomino-pelvien ainsi qu'une Tomographie à Emission de Positons (TEP-scanner). Ce bilan permet également de rechercher une atteinte extra-ganglionnaire. Enfin un bilan biologique sanguin standard complète l'évaluation initiale ; il permet notamment de quantifier les LDH (Lactate Déshydrogénase) circulants.

E. Diagnostic

Même si le tableau clinique et les données biologiques peuvent orienter vers une pathologie lymphomateuse, la confirmation diagnostique passe obligatoirement par un examen anatomopathologique à partir d'un prélèvement cytologique et/ou histologique du ganglion ou de l'organe atteint. Autant que faire se peut, une biopsie exérèse aussi large que possible est recommandée afin de disposer de matériel suffisant pour

pouvoir poser le diagnostic dans les meilleures conditions. Le matériel chirurgical biopsique récupéré doit être conditionné rapidement et peut alors être fragmenté pour assurer différentes analyses parmi lesquelles : un examen histologique, cytologique et immunohistochimique standard (réalisation d'appositions et fixation de matériel tissulaire en formol tamponné), une analyse en cytogénétique, biologie moléculaire et en cytométrie de flux (requiert un milieu de transport stérile) ainsi qu'une congélation dans des banques de tissus pour protocoles de recherche.

F. Aspects histopathologiques et morphologiques

Histologiquement, le LBDGC se définit par une prolifération tumorale d'architecture diffuse effaçant partiellement ou complètement le parenchyme ganglionnaire normal (**Figure 12.A**). Il présente une hétérogénéité morphologique importante en prenant différents aspects histopathologiques. Ainsi, la prolifération peut apparaître parfois pseudo-nodulaire au faible grossissement, s'accompagner de fibrose, de sclérose, de nécrose (**Figure 12.B**) ou infiltrer des structures tissulaires normales (**Figure 12.C**).

Parfois, cette tumeur peut s'associer à un aspect en « ciel étoilé » (starry-sky pattern) lorsque des macrophages à corps tingibles sont présents et se mêlent aux cellules tumorales (**Figure 12.D**). Ces macrophages doivent leur appellation à la présence de débris cellulaires et de particules phagocytés au sein de leur cytoplasme (corps tingibles de Fleming). Cet aspect accompagne les tumeurs avec un fort renouvellement cellulaire (index de prolifération et apoptose) [17].

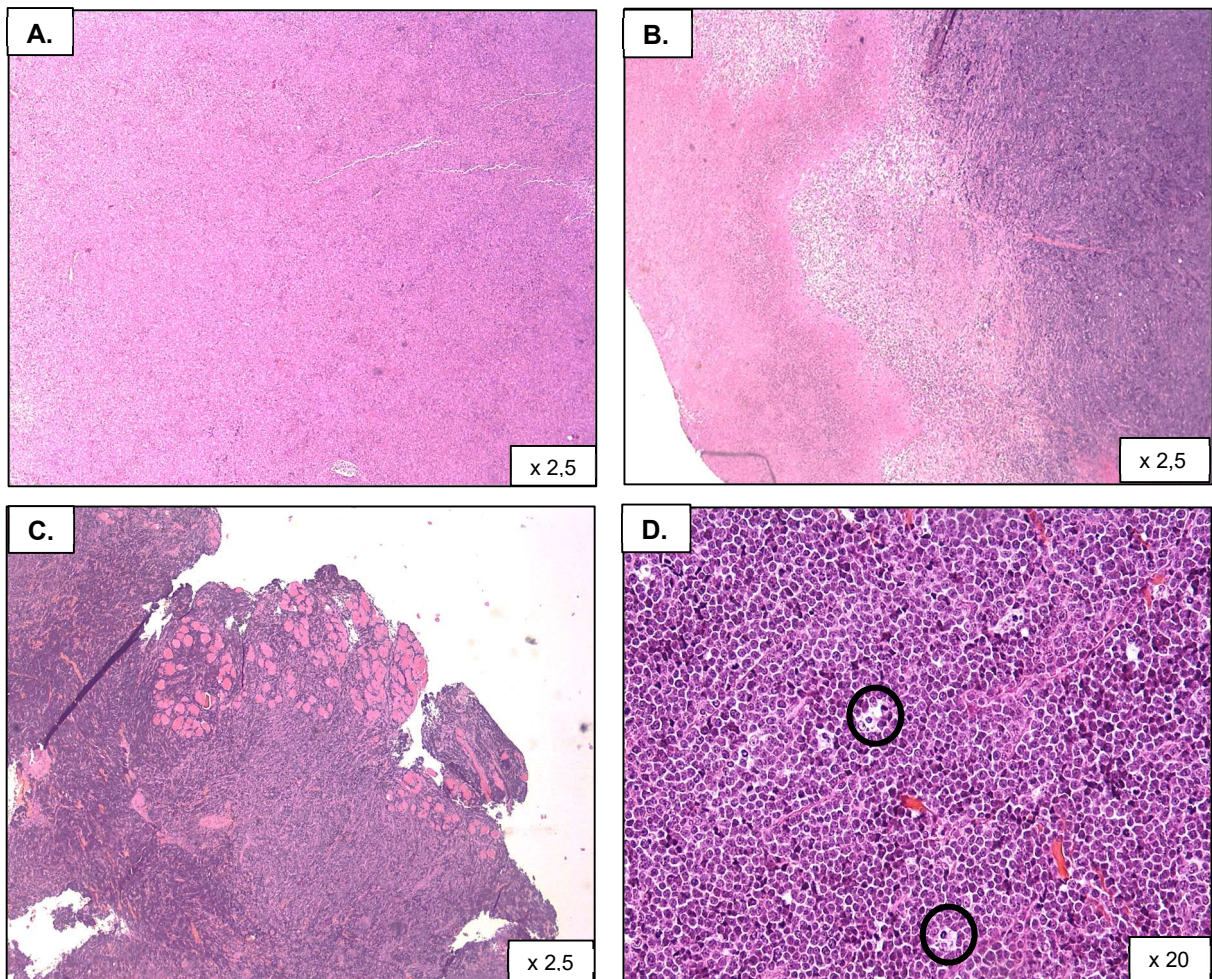


Figure 12. Aspects morphologiques de différents LBDGC, coloration HES.

Figure 12.A montre un LBDGC classique, constituée par une prolifération d'architecture diffuse effaçant complètement le parenchyme ganglionnaire normal.

Figure 12.B illustre un LBDGC accompagné d'une large plage de nécrose de coagulation.

Figure 12.C montre un LBDGC infiltrant et venant disséquer des fibres musculaires.

Figure 12.D illustre un aspect en « ciel étoilé » d'un LBDGC. Les « étoiles » correspondent aux macrophages à corps tingibles (cerclés) se mêlant aux cellules tumorales.

A plus fort grossissement, l'hétérogénéité du LBDGC se manifeste par un profil cytologique avec trois variants différents : centroblastique, immunoblastique ou anaplasique. Les cellules d'aspect centroblastique ont un noyau arrondi ou ovalaire, plus rarement multilobé ou anguleux, renfermant plusieurs (souvent entre 2 et 5) petits nucléoles périphériques situés sous la membrane nucléaire (marginés). Elles possèdent également un liseré de cytoplasme amphophile (**Figure 13.A**). Les cellules

d'apparence immunoblastique sont plus grandes, avec un noyau volumineux, souvent ovalaire, centré par un nucléole unique bien visible. Le cytoplasme est fin mais plus basophile que dans les cellules centroblastiques (**Figure 13.B**). Enfin le variant anaplasique est défini par la présence de cellules pléiomorphes, au noyau souvent multilobé et très volumineux et entouré par un cytoplasme plus volumineux que dans les deux autres types (**Figure 13.C**). Ce variant peut faire évoquer à tort une prolifération carcinomateuse devant l'importance des atypies cyto-nucléaires.

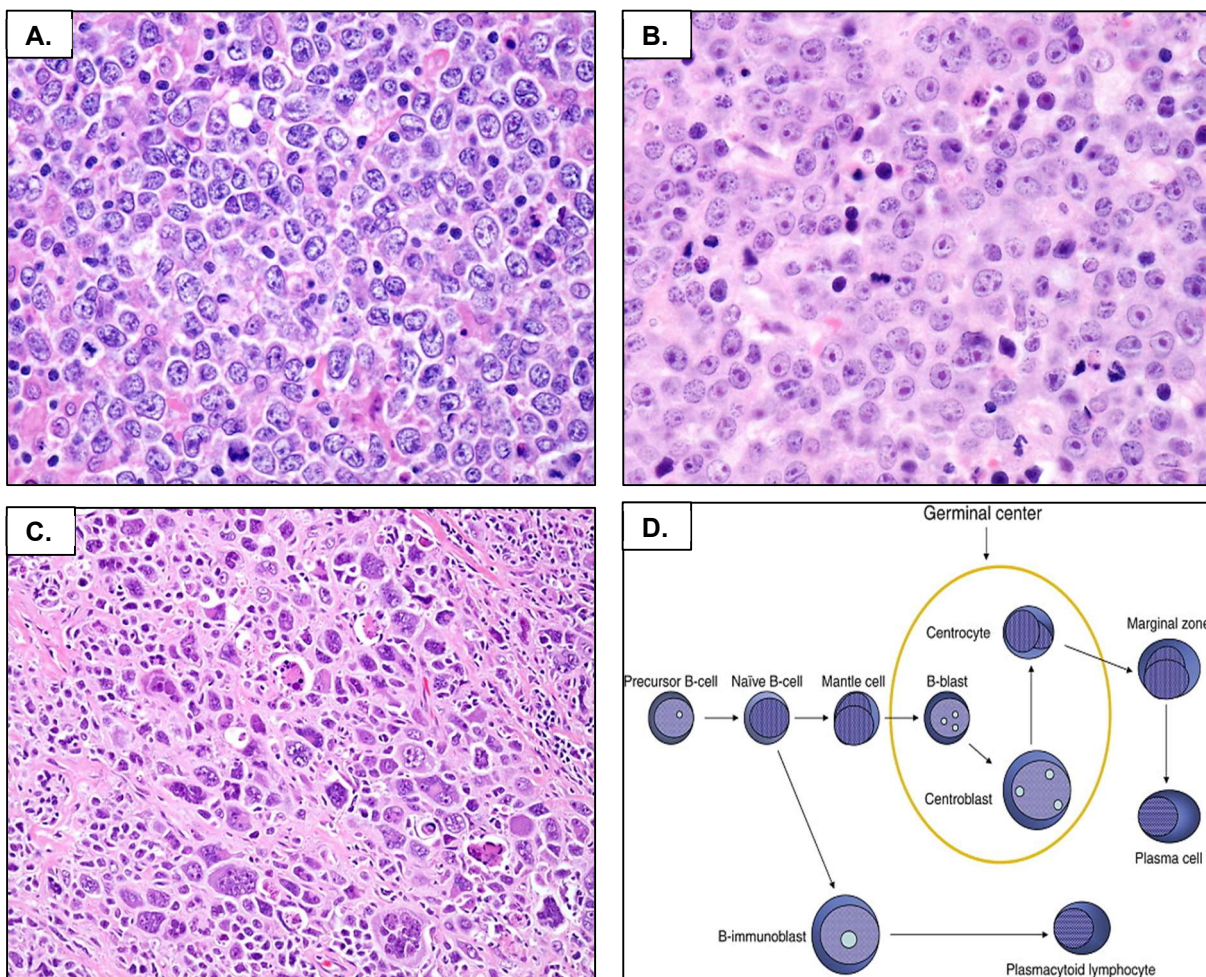


Figure 13. Aspects cytologiques des 3 variants de LBDGC, coloration HES (WebPathology).

Figure 13.A montre un LBDGC centroblastique, constituée par des cellules tumorales avec 2 à 5 nucléoles marginaux.

Figure 13.B représente un LBDGC immunoblastique, avec des cellules au noyau centré par un nucléole unique et volumineux.

Figure 13.C montre un LBDGC anaplasique constitué de cellules pléiomorphes.

Figure 13.D permet d'apprécier la différence entre centroblaste et immunoblaste (ScienceDirect).

En pratique, la majorité des LBDGC se présentent sous la forme d'une prolifération où des cellules d'aspect centroblastique se mêlent avec des cellules de type immunoblastique. La distinction entre ces deux variants est parfois difficile, elle se fera alors selon le type cellulaire prédominant. Cependant, cette classification cytologique a un intérêt modéré car il n'a pas été montré d'impact pronostique selon la variant de LBDGC.

D'un point de vue physiopathologique, la différence entre un centroblaste et un immunoblaste s'explique par la voie de maturation qu'emprunte le lymphocyte B naïf. En effet, la première de ces voies est de transiter par le CG du ganglion lymphatique : le lymphocyte B donnera alors naissance à un centroblaste puis un centrocyte avant de quitter le CG et rejoindre la zone marginale ganglionnaire. La seconde voie d'activation lymphocytaire B passe par la présentation antigénique. En cas d'exposition à un antigène, le lymphocyte B naïf se transforme en immunoblaste puis en cellule plasmocytoïde sécrétrice d'immunoglobulines, assurant la réponse immunitaire ; cette voie de maturation est indépendante du CG (**Figure 13.D**).

Enfin, il existe d'autres variants morphologiques beaucoup plus rares de LBDGC qui contribuent à l'hétérogénéité de cette pathologie : citons par exemple les variants plasmocytaires, à cellules fusiformes ou à stroma myxoïde.

Comme toute prolifération lymphomateuse, le LBDGC présente une population réactionnelle d'accompagnement plus ou moins abondante, souvent polymorphe, composée essentiellement de petits lymphocytes matures (lymphocytes T), de cellules plasmocytaires et histiocytaires.

G. Immunohistochimie

1. Confirmation diagnostique

L'immunohistochimie (IHC) est essentielle car elle confirme le diagnostic et permet de rechercher des biomarqueurs pronostiques et théranostiques. En IHC, il faut retrouver une positivité diffuse des cellules tumorales vis-à-vis des marqueurs pan-leucocytaires (CD45) et pan-B comme le CD20, le CD19, le CD79a, CD79b et le PAX-5 (**Figures 14.A et B**). Il est cependant important de noter que l'expression du CD20 par les cellules tumorales est perdue dans près de 60% des cas lors d'une rechute après un traitement initial avec du Rituximab [18]. De plus, les marqueurs pan-T (CD3) sont exprimés par les cellules d'accompagnement, principalement lymphocytaires T, mais sont négatifs sur les cellules tumorales (**Figure 14.C**).

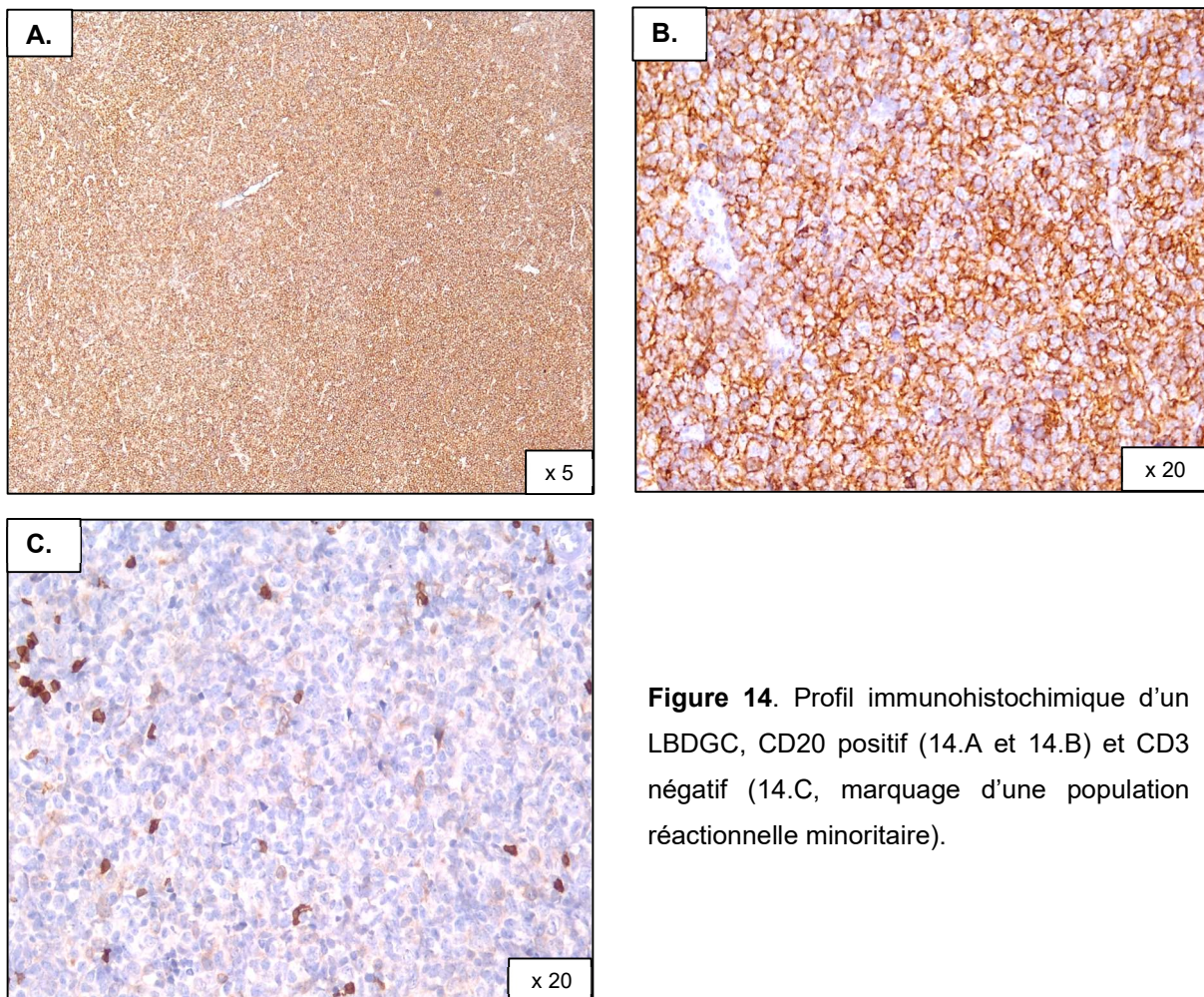


Figure 14. Profil immunohistochimique d'un LBDGC, CD20 positif (14.A et 14.B) et CD3 négatif (14.C, marquage d'une population réactionnelle minoritaire).

2. Biomarqueurs pronostiques

a) Statut GCB ou ABC

Une fois le diagnostic confirmé, l'IHC permet la recherche de marqueurs pronostiques, passent en premier lieu par la détermination de la COO. En utilisant l'algorithme de Hans [19], basé sur trois marqueurs (CD10, BCL6 et MUM-1), il est possible de classer le LBDGC en GCB (Germinal Center B-cell) ou nGCB / ABC (non-GCB / Activated B-cell) (**Figure 15.A**). Cet algorithme permet d'identifier les LBDGC de sous type GCB, de meilleur pronostic que le sous type nGCB (**Figure 15.B**), sans être parfaitement concordant avec le profil d'expression génique. En effet, seul l'étude moléculaire permet de déterminer avec précision la COO et donc de différencier les GCB des ABC.

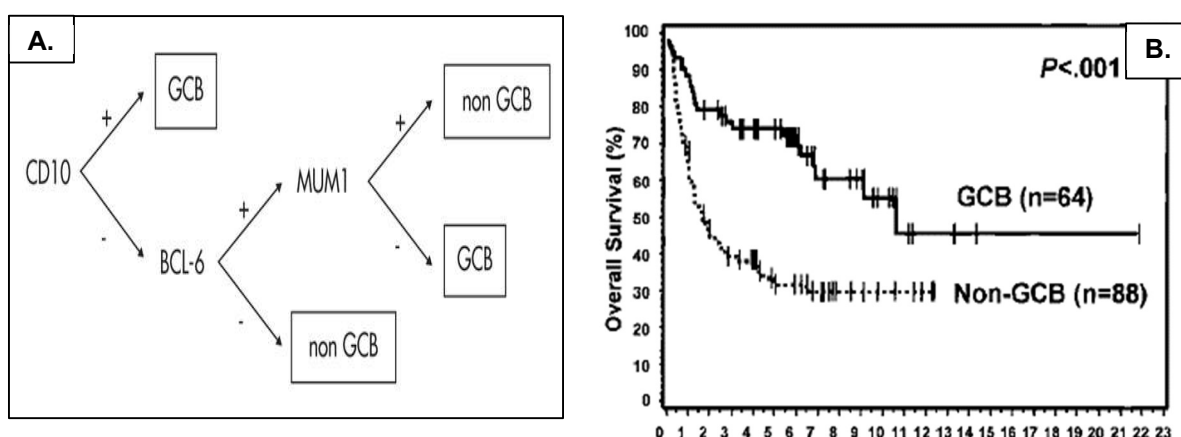


Figure 15.A Algorithme de Hans basé sur 3 marqueurs.

Figure 15.B Courbes de survie des sous types GCB et nGCB (18). Le sous-type GCB présente une meilleure survie que le nGCB.

En tant que marqueurs du CG, un LBDGC exprimant le CD10 et/ou le BCL6 est donc de meilleur pronostic [20(p6),21(p10)] alors qu'une surexpression de MUM-1, en lien avec un sous type nGCB, est de mauvais pronostic [19].

b) Statut « double expresseur »

Un autre marqueur pronostique fréquemment décrit est le statut « double expresseur » du lymphome (DEL), défini par une surexpression conjointe des niveaux protéiques de BCL2 et de c-MYC en IHC.

Pour rappel, au niveau génique, *c-MYC* (ou *MYC*) est un pro-oncogène situé dans la région 8q24 du chromosome 8, codant pour un facteur de transcription impliqué dans différentes fonctions cellulaires comme le cycle cellulaire ou la croissance [22]. Son activation oncogénique joue un rôle important dans la survenue de plusieurs LNH B, notamment les lymphomes de Burkitt et 10% des LBDGC [23,24]. Les altérations du gène *c-MYC* dans les LBDGC seront développées ultérieurement mais il est important de préciser que les réarrangements de *c-MYC* sont associés à un pronostic bien plus critique dans les LBDGC traités par R-CHOP [23,25]. En IHC, une augmentation du niveau d'expression de la protéine c-MYC ne témoigne pas toujours d'un réarrangement au niveau du gène *c-MYC* [24]. Ainsi, selon les séries et les cut-offs de positivité retenus, 30 à 50% des LBDGC surexpriment la protéine c-MYC [26] mais l'impact pronostique d'une surexpression de c-MYC en univarié reste débattu, même si elle semble être associée à un pronostic défavorable en cas de traitement par R-CHOP [24–27].

En ce qui concerne le gène *BCL2*, il est situé sur la région 18q21 du chromosome 18 et est reconnu comme étant un gène anti apoptotique ; son réarrangement et son activation oncogénique sont connus pour être à l'origine de nombreux lymphomes. Les mutations du gène *BCL2* sont détaillées ci-après. La protéine BCL2 est fréquemment surexprimée dans les LBDGC (de 47 à 58% selon les études et les cut-offs de positivité) [28] et était un facteur de mauvais pronostic avant l'avènement du Rituximab [29,30]. Dorénavant il a été prouvé que l'ajout du Rituximab à la chimiothérapie (R-

CHOP) annihile l'effet néfaste d'une surexpression de BCL2, notamment pour les LBDGC de sous type ABC [31,32].

Finalement, pris isolément, les niveaux d'expressions protéiques de MYC et BCL2 ont un impact péjoratif inconstant sur la survie, mais le statut « double expresseur » (20 à 35% des LBDGC) est plus volontiers reconnu comme étant de mauvais pronostic, comme si ces deux protéines se potentialisaient [33,34]. Les DEL sont retrouvés préférentiellement dans les LBDGC de sous type ABC.

c) *LBDGC de novo CD5 positif*

Le CD5 est une protéine normalement retrouvée sur les cellules lymphocytaires T et une partie des lymphocytes B naïfs [35] mais elle est également exprimée dans 5 à 10% des LBDGC [36]. Cependant, devant tout LBDGC *de novo* CD5+, il convient d'éliminer des diagnostics différentiels parfois trompeurs car de nombreuses proliférations lymphomateuses expriment le CD5. Le principal diagnostic différentiel est le lymphome du manteau dans sa forme blastoïde ou pléiomorphe ; une étude immunohistochimique complémentaire (Cycline D1 et SOX11 négatifs) permet d'éliminer cette hypothèse. Un syndrome de Richter à partir d'une LLC et une LLC dans son variant para immunoblastique doivent également être évoqués devant une prolifération lymphomateuse à grandes cellules exprimant le CD5.

Certains auteurs considèrent les LBDGC *de novo* CD5+ comme un spectre à part entière car cette entité est associée à certains critères agressifs clinico-biologiques comme un score IPI élevé, un envahissement médullaire ou extra-ganglionnaire, un taux de LDH élevé ou un sous-type ABC [37,38]. Il en va de même pour la survie car plusieurs études asiatiques [36,39,40], européennes [41] ou nord-américaines [37] ont

conclu à un pronostic péjoratif en cas de positivité du CD5 dans un LBDGC *de novo*, même en cas de traitement par R-CHOP.

d) *Les LBDGC avec surexpression de la p53*

La protéine p53 (appelée aussi TP53) codée par le gène *p53*, est connue comme suppresseur de tumeurs à l'état physiologique et est considérée comme un médiateur essentiel des voies de réponse cellulaire à différents stress. Ce facteur de transcription régule l'action de centaines de gènes impliqués dans des fonctions capitales comme le cycle cellulaire, l'apoptose, la senescence et la réparation de l'ADN [42]. A l'état physiologique, p53 est présente en très faible quantité dans les cellules car elle est dégradée grâce à la protéine MDM2 qui se fixe sur p53. En réponse à un stress extérieur, MDM2 est inhibée, le complexe MDM2-p53 ne peut plus se former et p53 se retrouve activée du fait d'une diminution de sa dégradation intra-cellulaire. De plus, des modifications post-traductionnelles (phosphorylation) vont impacter la structure de cette protéine et lui conférer son rôle de facteur de transcription [42]. Ainsi, p53 activée va permettre de répondre au stress (réparation de l'ADN, mort cellulaire) en régulant des voies de signalisation telles que la voie IGF-PI3K-mTOR [43]. Une fois le stress « éliminé », le complexe MDM2-p53 est de nouveau formé.

Les mutations du gène *p53* codent pour une protéine p53 mutée, dont la dégradation intra-cellulaire est plus lente. Cette protéine mutée ne présente pas la même activité transcriptionnelle que la protéine sauvage et ne peut pas activer l'arrêt du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN. Ces pertes de fonction expliquent en partie pourquoi les mutations de *p53* sont considérées comme pro-oncogènes. Mais certains variants de la protéine mutée présentent également des gains de fonction, ayant pour conséquence une répression de gènes suppresseur de tumeurs [44]. Enfin,

la version mutée de la protéine p53 a la capacité de s'associer à la forme sauvage de p53 (sous la forme de tétramères) et de venir inhiber son action. Il existe donc trois mécanismes différents permettant à la protéine p53 mutée de favoriser la prolifération tumorale.

En résumé, le gène *p53* est à l'état normal un gène suppresseur de tumeur souvent appelé « gardien du génome » mais en cas de mutation, il perd sa fonction physiologique et devient un pro-oncogène. Il n'est donc pas surprenant de retrouver des mutations de *p53* dans près de 50% des tumeurs [45].

Dans les LBDGC, on retrouve des mutations de *p53* dans 20% des cas [46] alors qu'une surexpression de la protéine en IHC est retrouvée dans 30 à 40% des cas, selon le seuil de positivité retenu (allant de 10% à 50%) [46,47]. Il a été confirmé un lien entre surexpression protéique et présence d'une mutation du gène *p53* [46] ; ceci découlant d'une demi-vie plus longue de la protéine p53 mutée, comme expliquée ci-dessus. L'IHC est considéré comme un outil intéressant de détection de mutations de *p53*, en l'absence d'analyse moléculaire disponible, en utilisant un seuil de positivité de 50% [46,47].

De nombreuses études ont montré un impact pronostique péjoratif d'une surexpression de p53 dans les LBDGC, traités par CHOP ou R-CHOP [46,48,49]. De plus, cette surexpression semble potentialiser l'effet néfaste de MYC et les LBDGC avec co-expression de MYC et p53 représentent un groupe au pronostic très incertain [47,50]. Ces données confirment aussi un lien fonctionnel encore mal compris entre ces deux protéines [51], probablement au sein d'un vaste réseau impliqué dans les lymphoproliférations B dans lequel certains acteurs pourraient être des cibles thérapeutiques intéressantes [51].

e) *Autres biomarqueurs immunohistochimiques d'intérêt*

D'autres protéines ont pu être citées ou utilisées comme facteurs prédictifs de la réponse au traitement.

Le CD30, protéine exprimée à la surface des cellules de Reed-Sternberg, est également surexprimée dans 15% des LBDGC [52] ; cette surexpression serait associée à un meilleur pronostic dans cette pathologie, notamment dans le sous type GCB.

Le CD23, protéine retrouvée dans les lymphocytes B naïfs et les cellules folliculaires dendritiques, est impliqué dans la synthèse des IgE mais est également surexprimée dans 5 à 10% des LBDGC [53]. Ainsi, l'équipe dirigée par *Linderöth* avait montré un impact pronostique défavorable en cas de LBDGC CD23 positif en IHC : néanmoins cette conclusion n'a pas été confirmée depuis.

L'index de prolifération Ki67 n'a pas d'impact pronostique robuste en analyse univariée. Certaines études ont montré une maladie plus agressive en cas d'index de prolifération augmenté [54] mais d'autres travaux ont infirmé ces résultats [55].

H. Génétique

1. Stratification des LBDGC selon la COO

Au début des années 2000, devant la grande variabilité de réponse au traitement des patients porteurs de LBDGC, les cliniciens et les scientifiques se sont intéressés à l'hétérogénéité moléculaire de ce lymphome. Ceci afin de mieux comprendre les raisons pour lesquelles une tumeur d'aspect morphologique et de phénotype immunohistochimique semblable pouvait parfois régresser sous immunochimiothérapie ou alors ne pas y être sensible. Des études transcriptomiques ont donc été réalisées par GEP (Gene Expression Profiling) grâce à des puces à ADN et ont permis de séparer les LBDGC en trois sous entités moléculaires [56,57] (**Figure 16.A**) : GCB, ABC et un sous type inclassable.

Comme précédemment décrit, cette stratification moléculaire permet d'isoler les LBDGC GCB qui sont des tumeurs de meilleur pronostic que les LBDGC ABC, y compris en cas de traitement par R-CHOP (**Figure 16.B**) [58].

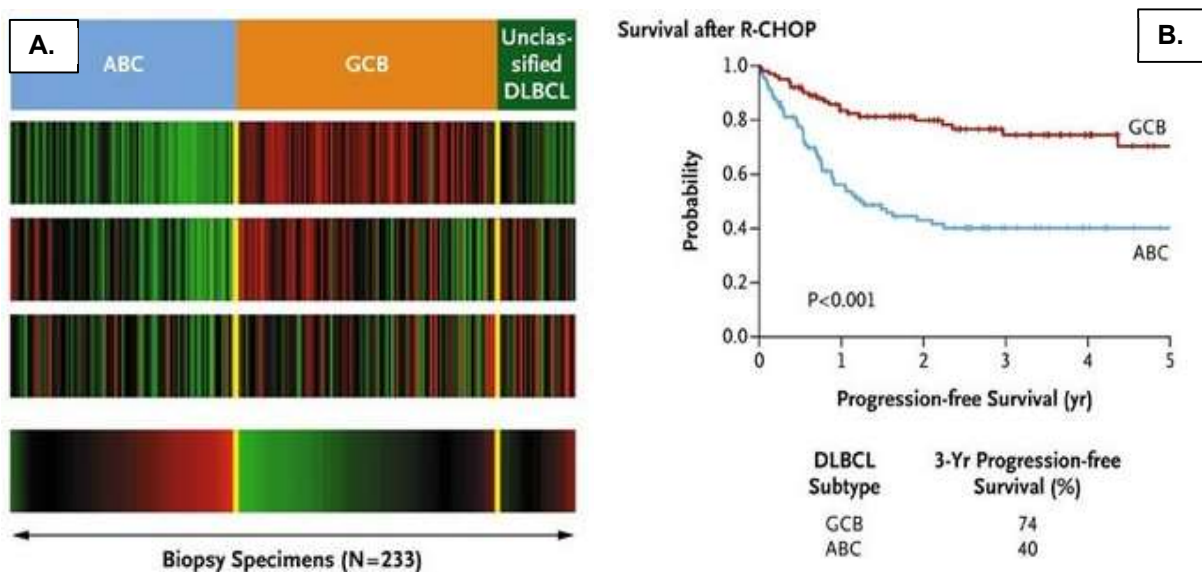


Figure 16.A Stratification moléculaire des LBDGC en 3 sous types : ABC, GCB et non classés.

Figure 16.B Courbes de survie en fonction du sous type GCB ou nGCB en fonction de la stratification moléculaire (57).

a) *Les LBDGC de sous type GCB*

Le sous-type GCB correspond aux lymphomes exprimant des gènes physiologiquement en lien avec le CG des follicules lymphoïdes. Ainsi, il apparaît logique que ce sous-groupe surexprime fréquemment *BCL-6*, gène répresseur de la différenciation plasmocytaire terminale. Parmi les autres gènes fréquemment surexprimés, il peut être cité *CD10*, *CD38*, *GCET2*, *SERPINA9* ou *EZH2*. Ce dernier est un gène indispensable à la formation des CG, notamment car il contrôle l'expression d'autres gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la maturation des lymphocytes B. De plus, *EZH2* code pour une méthyltransférase responsable de modifications épigénétiques importantes [57] : sa mutation est retrouvée dans 20% des LBDGC GCB [59].

Sur le plan cytogénétique, les LBDGC GCB sont souvent associés à des gains de la région 12q12, des translocations t(14;18) en rapport avec le gène *BCL2* et des délétions de la région 1p [60].

b) *Les LBDGC de sous type ABC*

Le sous type ABC correspond aux lymphomes dans lesquels sont retrouvés des réarrangements des gènes exprimés lors de l'activation des lymphocytes B in vitro. On retrouve donc au sein de ce groupe, des réarrangements impliquant le facteur de transcription *MUM1/IRF4* qui assure à l'état physiologique la maturation terminale du lymphocyte B dans le post CG.

De plus, il a été démontré que les LBDGC ABC résultent souvent d'une activation constitutive de la voie NF- κ B, elle-même secondaire à plusieurs mécanismes pathogéniques [57,59]. En effet, cette activation peut être due soit à des

mutations de gènes régulant cette voie de signalisation (tels *TRAF3*, *TRAF5* ou *A20*), soit à une activation de la voie de signalisation du récepteur des lymphocytes B (via des mutations de *CD79B*, *CARD11* ou *CD79A*) soit enfin à une mutation du gène *MYD88* (retrouvé dans 30% des LBDGC ABC) [59,61].

Les anomalies cytogénétiques en lien avec le sous type ABC sont des translocations (3 ;14), une trisomie 3, des gains de la région 3q ou 18q21 ou des délétions au niveau de la région 6q [60].

Les principales anomalies oncogénétiques retrouvées dans les groupes ABC et GCB sont répertoriées ci-dessous (**Figure 17**) [59].

c) *Les LBDGC inclassables*

Enfin, le troisième sous type regroupe tous les cas ne pouvant être classés en GCB ou ABC ; cela correspond environ à 10 à 15% des LBDGC. Les études moléculaires par ADN ou ARN ont mis en évidence que les LBDGC inclassables présentent un profil mutationnel proche de celui du sous type ABC [62]. Le principal problème de ce groupe vient du fait qu'il ne puisse pas être identifié par l'algorithme de Hans ; c'est la raison pour laquelle certains auteurs préfèrent dichotomiser, via l'algorithme de Hans, les LBDGC en GCB ou nGCB (regroupant à la fois les ABC et les LBDGC inclassables).

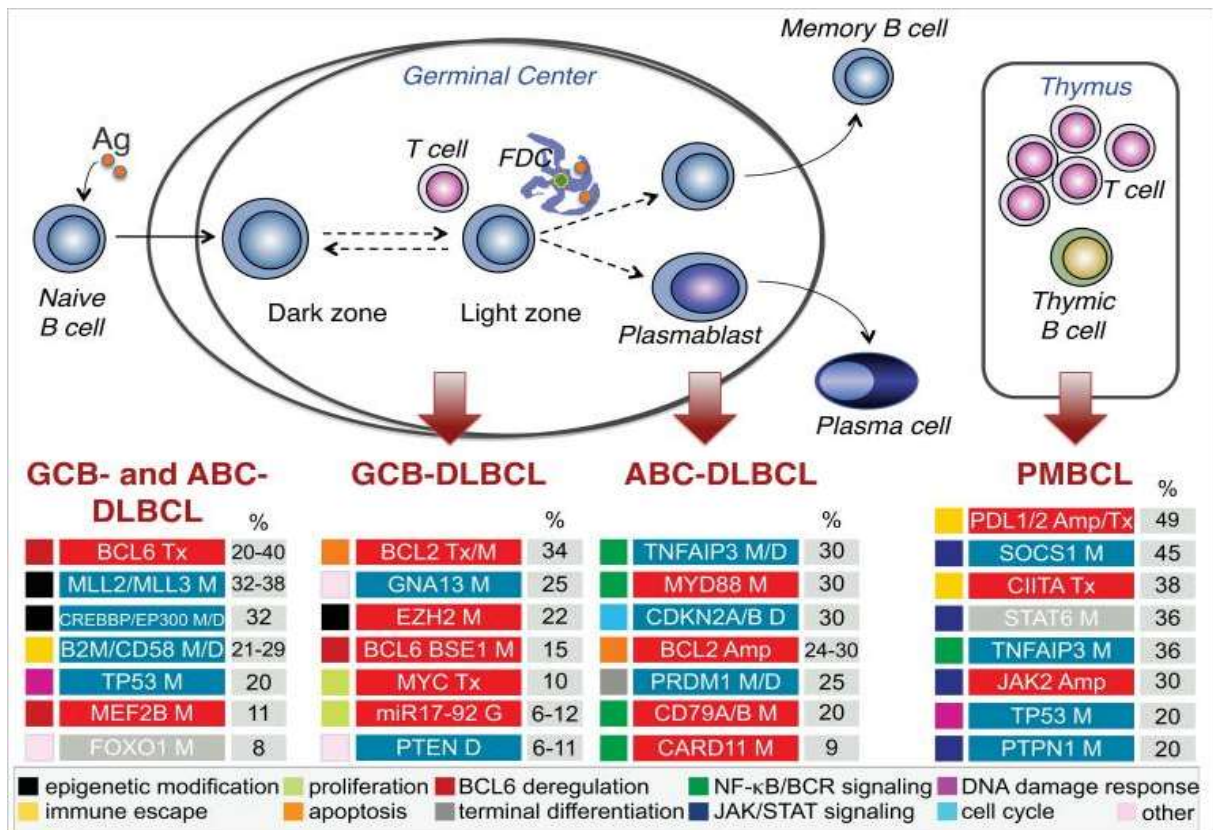


Figure 17. Principales anomalies cytogénétiques des LBDGC des sous types ABC et GCB. Le code couleur indique le mécanisme oncogénique (bleu = perte de fonction / rouge = gain de fonction) (58).

Abréviations : Ag, antigène ; Amp, amplification ; D, délétion ; FDC, cellules folliculaires dendritiques ; G, gain ; M, mutation ; PMBCL, Primary Mediastinal B-cell Lymphoma ; Tx, translocation.

d) Concordance entre la génétique et l'immunohistochimie

Malheureusement, aucun algorithme immunohistochimique ne permet de prédire avec une précision optimale le sous type moléculaire d'un LBDGC. Différentes méthodes immunohistochimiques ont été testées, mais c'est l'algorithme de Hans qui reste aujourd'hui la référence car, tout en étant suffisamment précis (86% de concordance par rapport à l'analyse moléculaire), il présente surtout l'avantage d'être applicable simplement en routine. En effet, d'autres approches immunohistochimiques, comme celle de Tally, existent mais sont pour la plupart plus difficile à utiliser au quotidien [63].

e) *Détermination de la COO en routine*

Malgré l'apport de l'IHC en routine diagnostique dans les LBDGC, la problématique principale reste l'accès à une analyse moléculaire permettant un résultat fiable et rapide, utilisable dans la pratique courante. En effet, les techniques par puces à ADN sont coûteuses, longues et peu reproductibles pour être utilisées en routine et requièrent un tissu frais ou congelé. Pour rappel, les LBDGC sont des lymphomes agressifs très hétérogènes, nécessitant une thérapeutique ciblée autant que faire se peut et devant être instaurée précocement. La question s'est posée de trouver une méthode simple permettant de connaître la COO sur tissu fixé, parallèlement à la confirmation diagnostique ; la réponse a été apportée par l'analyse de l'expression des transcrits de gènes via deux techniques actuellement disponibles, le NanoString ou le RT-MLPA (Reverse-Transcriptase Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Ces techniques ont le principal avantage de pouvoir être réalisées sur tissu fixé FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded).

La technique par Nanostring permet d'obtenir, en moins de 36 heures, un profil mutationnel à partir de sondes à ARN marquées par fluorescence s'hybridant de façon spécifique à un des gènes du panel utilisé [64].

La technique par RT-MLPA repose sur une hybridation puis une amplification par PCR multiplex permettant d'analyser l'expression des transcrits (ARN messagers) correspondant à des gènes de type ABC ou GCB ; elle permet également d'éliminer certains diagnostics différentiels des LBDGC [65].

2. *MYC*, *BCL2* et *BCL6* dans les LBDGC, NOS

a) Mutations du gène *MYC*

Pour rappel, le gène *MYC* code pour un facteur de transcription qui régule de multiples mécanismes cellulaires essentiels [22]. L'activation oncogénique de *MYC* joue un rôle important dans l'oncogenèse des LBDGC et sa mutation est retrouvée dans 10 à 15% des LBDGC [23,24]. Il est important de différencier l'atteinte au niveau du gène *MYC* de la surexpression de la protéine *MYC* que l'on recherche par IHC et dont les conséquences ont déjà été développées précédemment.

Le réarrangement de *MYC* se confirme en routine par technique de FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) à l'aide d'une sonde break-apart (**Figure 18.A**). Il peut être soit isolé, soit associé à un réarrangement des gènes *BCL2* et/ou *BCL6* ; on parlera alors de lymphome « double et triple hit » (DHL / THL). Dans ce cas, on sortira du LBDGC, NOS pour entrer dans le spectre des lymphomes B de haut grade (HGBL pour High Grade B-cell Lymphoma)

La présence d'un réarrangement de *MYC* dans les LBDGC est associée à une survie plus courte et à un risque de rechute neuro méningée plus important (**Figure 18.B**) [66]. Cependant cet impact pronostique doit être nuancé selon différents facteurs. Tout d'abord en fonction du gène partenaire avec lequel *MYC* se réarrange ; il peut être soit de type Immunoglobuline (Ig), notamment *IgH*, *IgK* ou *IgL*, soit de type non Ig (par exemple *BCL6* ou *PAX-5*). Si le gène partenaire est de type Ig, le pronostic est défavorable ; au contraire, si le réarrangement se fait avec un gène non Ig, il n'y aura pas d'impact sur le pronostic (**Figure 18.C**) [66].

Ensuite d'autres facteurs nuancent les conséquences du réarrangement de *MYC* parmi lesquels la COO, avec un impact pronostique avéré dans les LBDGC GCB,

ce qui n'est pas le cas pour les LBDGC ABC [66]. Enfin, le variant morphologique rentre aussi en considération avec une morphologie blastoïde de pronostic plus défavorable si elle est associée à une mutation du gène *MYC*.

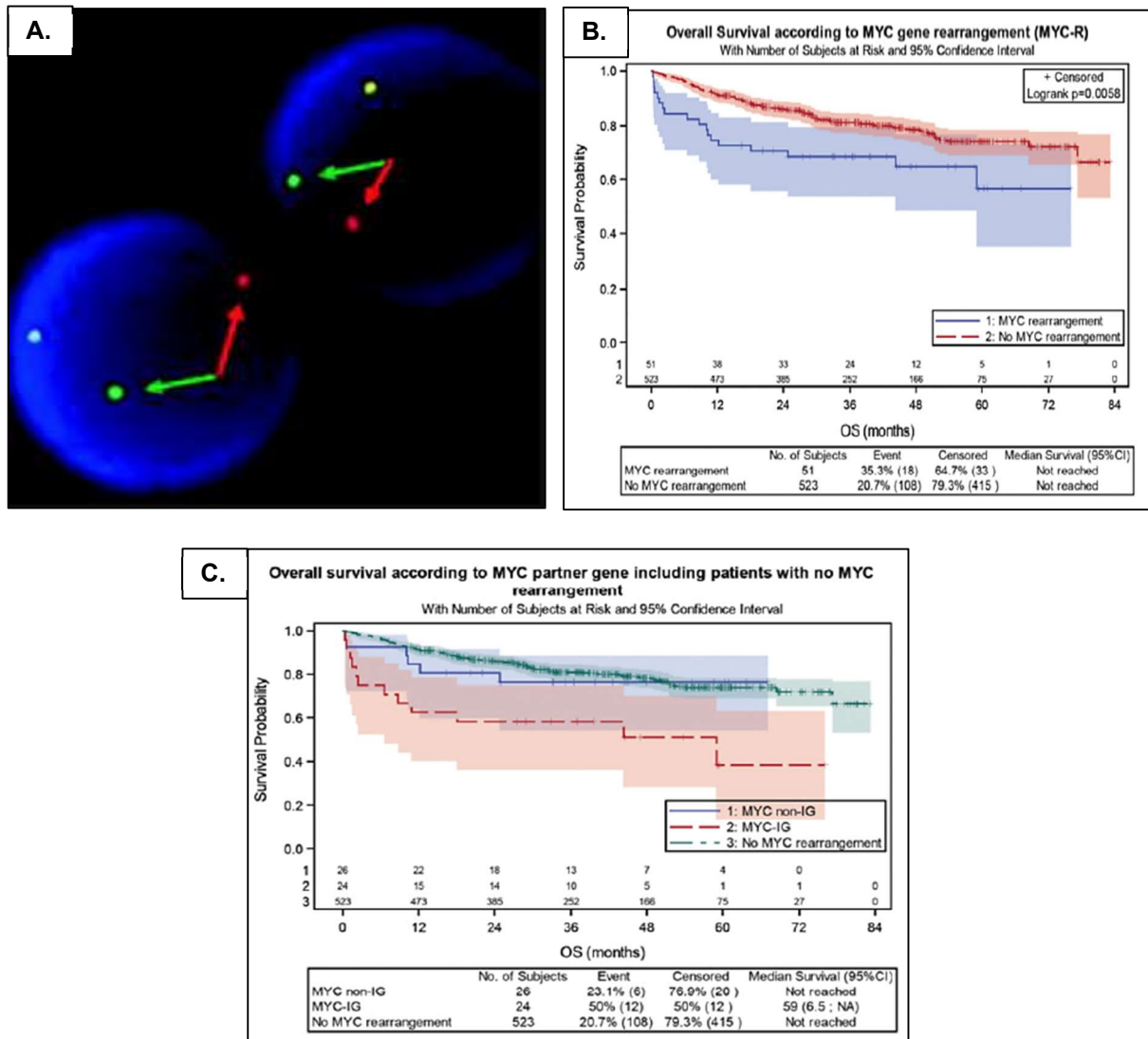


Figure 18. Réarrangements du gène *MYC* dans les LBDGC NOS

Figure 18.A Confirmation du réarrangement par FISH avec une sonde break-apart. La séparation de la sonde rouge et de la verte témoigne du réarrangement.

Figure 18.B Courbes de survie témoignant de l'impact pronostique défavorable d'un réarrangement de *MYC* dans une cohorte de LBDGC (65).

Figure 18.C L'impact de *MYC* sur la survie est avéré lorsque le réarrangement se fait avec un gène de type Ig (65).

b) Mutations du gène *BCL2*

Situé au niveau de la région 18q21 du chromosome 18, *BCL2* est reconnu comme un facteur anti apoptotique important. On le retrouve dans l'ensemble des tissus du corps humain, excepté le CG car il est inhibé par *BCL6* à l'état physiologique, ceci afin de maintenir un index apoptotique permanent, nécessaire au renouvellement des cellules B [59,67(p6)]. Cet axe de régulation est interrompu en cas de translocation t(14;18), cette dernière étant retrouvée dans environ 20% des LBDGC GCB et entraînant une expression ectopique incontrôlée de *BCL2* [57]. Ainsi, il est logique que les mutations de *BCL2* soient plus fréquemment retrouvées dans le sous type GCB [68].

Malgré son rôle incontestable dans la survenue des LBDGC, les réarrangements de *BCL2* ne sont pas reconnus de façon certaine comme facteur de mauvais pronostic [24]. En effet selon les auteurs et les séries, ces mutations ont un impact variable sur le pronostic et sont parfois liées à une survie défavorable uniquement pour le sous type GCB [31(p2)].

c) Mutations du gène *BCL6*

BCL6 est un répresseur transcriptionnel indispensable à la constitution du CG [67(p6)] et il y régule des fonctions essentielles comme le cycle cellulaire, l'apoptose (en lien avec *BCL2*), la réparation des altérations de l'ADN (en lien avec *p53*) et la maturation plasmocytaire terminale, comme déjà évoqué antérieurement [59].

Ce gène, témoin du passage d'un lymphocyte B au travers du CG, est altéré dans 30% des LBDGC, à la fois dans le sous type ABC et GCB. La conséquence des

anomalies de *BCL6* sur la survie des LBDGC sous R-CHOP est controversée, mais ces anomalies sont plutôt reconnues comme facteur de bon pronostic [69].

3. Autres altérations cytogénétiques des LBDGC, NOS

Le profil et la charge mutationnels des LBDGC est très variable, témoin d'une hétérogénéité importante de cette prolifération. Il sera cité ci-après les principales altérations moléculaires associées aux LBDGC, en dehors des gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6*, à partir de la classification réalisée par *Pasqualucci et al.* [59].

Mutations des gènes des Ig. La majorité des LBDGC, NOS présentent des mutations des gènes des chaînes légères et lourdes des *Ig* (*IgH*, *IgK*, *IgL*) et notamment des hypermutations du gène *IgHV* [9].

Altérations du BCR. Il est également fréquent également de retrouver des altérations au niveau du gène du récepteur des lymphocytes B (BCR) [9].

Mutations des gènes régulant la chromatine et les histones. Une altération d'au moins un des gènes impliqués dans ces mécanismes est retrouvée dans 85% des LBDGC ; le plus souvent, il s'agit d'altérations épigénétiques. Parmi les plus fréquemment touchés, on peut citer les gènes *KMT2D* (méthyltransférase), *CREBBP/EP300* (acétyltransférases), *ARID1A* ou *TET2*.

Echappement à la surveillance immunitaire. Une majorité des LBDGC parviennent à sortir du contrôle immun des lymphocytes T cytotoxiques grâce à des mécanismes génétiques et épigénétiques, entraînant notamment l'inactivation des facteurs du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Parmi ces mécanismes, on peut évoquer les inactivations bi-alléliques de *B2M* (*β-2 microglobuline*), connues pour

réprimer l'expression des molécules de CMH de type I à la surface des cellules tumorales [70] et ainsi empêcher l'action cytotoxique des lymphocytes T CD8+.

Mutations de FOXO1. Elles sont retrouvées dans 8 à 10% des LBDGC et sont associées à des rechutes précoces sous R-CHOP [71]. Physiologiquement, *FOXO1* est impliqué dans la différenciation lymphocytaire B au niveau du CG et agit comme facteur inhibiteur de *MYC*. Ce gène est régulé par la voie PI3K-AKT-mTOR et il a été démontré que l'efficacité antitumorale de la Rapamycin, inhibiteur de synthèse de *mTOR*, est dépendante de l'activation de *FOXO1* [72]. Ce gène est donc encore considéré comme suppresseur de tumeur en régulant le métabolisme cellulaire et l'apoptose [71], alors que les mutations de *FOXO1* sont considérées pro-oncogènes, permettant une activation de *MYC* [73].

Mutations de TNFRSF14. Ce gène (*Tumor Necrosis Factor Super Family Member*) suppresseur de tumeurs est muté dans 20% des LBDGC [74] mais aussi dans 20% des lymphomes folliculaires, dans lequel sa mutation est un facteur de mauvais pronostic [75]. On le connaît aussi sous le nom de *HVEM (Herpes Virus Entry Mediator)* et, à l'état physiologique, se lie avec son ligand *BTLA* pour assurer une réponse immune lymphocytaire T. En cas de mutation de *TNFRSF14*, il est observé une perte du complexe *BTLA-TNFRSF14* ayant pour conséquence la création d'un micro-environnement favorable à la prolifération tumorale [76]. De façon intéressante, ce circuit est une cible thérapeutique potentiellement efficace (CarT-cells, protéine HVEM soluble) car la restauration du complexe *BTLA-HVEM* permet une régression tumorale significative [76].

Mutations de p53. Pour rappel, ce gène code pour la protéine p53, essentielle dans l'arsenal cellulaire de la lutte contre l'oncogénèse. Les mutations de *p53* altèrent les fonctions de la protéine codée et sont donc répertoriées comme pro-oncogènes, y

compris dans les lymphoproliférations B [46]. Différents auteurs ont montré que les mutations de *TP53*, impliquées dans 20% des LBDGC [59], sont un facteur de mauvais pronostic sous R-CHOP [46,49]. Cependant, il a également été prouvé que les mutations de ce gène sont très hétérogènes et qu'elles n'altèrent pas toutes le pronostic [46]. Récemment, *Chapuy et al.* ont défini un sous-groupe moléculaire de LBDGC possédant une inactivation bi-allélique de *p53*, ce sous-groupe étant de mauvais pronostic [77]. En résumé, même s'il persiste de nombreuses zones d'ombres dans les conséquences des mutations de *p53* dans les LBDGC, il apparaît évident qu'elles confèrent un risque de rechutes augmenté sous R-CHOP.

4. La génétique, base des nouvelles classifications

Au fil des années et des études portant sur l'approche moléculaire dans les LBDGC, il a été confirmé une grande hétérogénéité des LBDGC également sur le plan mutationnel. De plus, devant la quantité de gènes impliqués et potentiellement mutés dans l'oncogénèse des LBDGC, il a été supposé qu'au sein d'un même type moléculaire (ABC, GCB et inclassables), il existait en réalité de nombreux sous types différents. Ainsi il a été montré dès 2008 que des voies d'activation oncogénique différentes peuvent être à l'origine des LBDGC.

Il a également été identifié de nombreux oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs gravitant autour de la pathogénèse des LBDGC [58] ; ainsi, il a été évoqué que les types de LBDGC peuvent être classés en fonction des acteurs oncogéniques impliqués [58]. Cette notion est également soutenue par une variabilité importante de réponse à la chimiothérapie, au sein d'un même type de LBDGC ; par exemple, si tous les LBDGC ABC présentaient un profil et une charge mutationnels quasi-identiques,

comment expliquer que certains patients répondent bien au traitement tandis que d'autres rechutent précocement ? Les premiers éléments de réponse à cette question datent de 2008, lorsqu'il a été montré par *Lenz et al.* que le profil mutationnel d'un LBDGC pouvait avoir une influence sur l'efficacité thérapeutique [78].

Pour répondre à cette problématique de manière plus précise, une étude récente de 2018 visant à examiner un panel de 372 gènes connus pour être liés aux lymphoproliférations B agressives a été menée sur une cohorte de 574 LBDGC [79]. A partir de ces données, les auteurs sont parvenus à identifier 4 sous-groupes moléculaires dans les LBDGC, nommés MCD (caractérisés par des mutations de *MYD88* et *CD79b*), BN2 (comprenant une fusion de *BCL6* et des mutations de *NOTCH2*), N1 (mutations de *NOTCH1*) et EZB (impliquant des mutations de *EZH2* et des translocations de *BCL2*). De façon encore plus intéressante, ils ont souligné le fait que les sous-groupes BN2 et EZB sont de meilleur pronostic et sont plus sensibles à la chimiothérapie que les deux sous-types restants [79] (**Figure 19**). De plus, identifier de nouveaux sous-types moléculaires permet de mettre en lumière de nouvelles voies oncogéniques impliquées et par conséquent de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles à étudier, comme celles récemment décrites par *Chapuy et al.* [77–79].

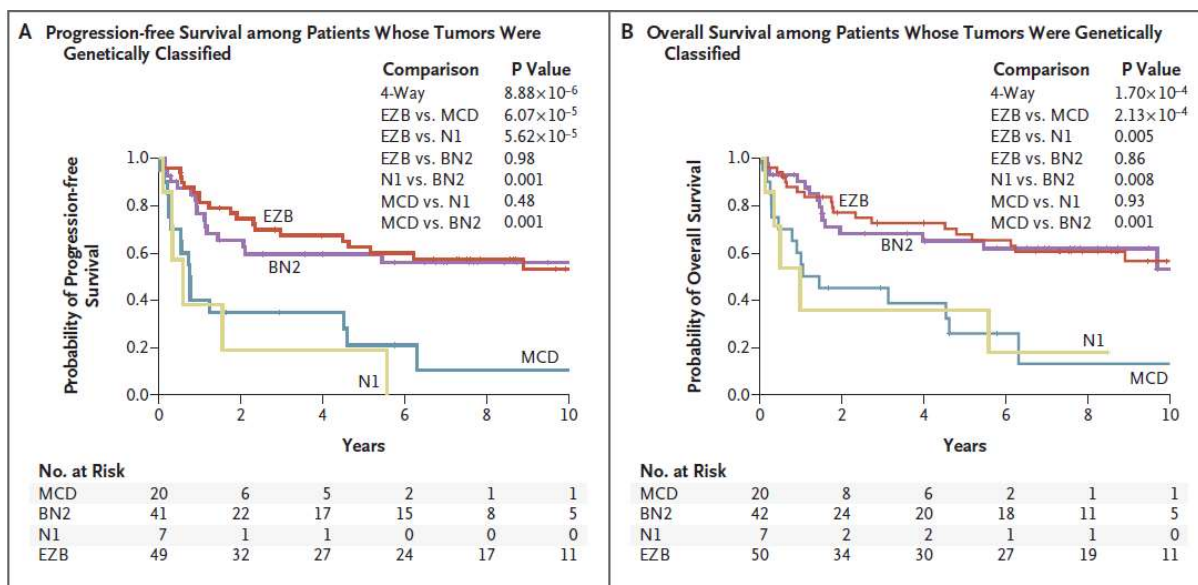


Figure 19. Courbes de survie selon les 4 sous-groupes moléculaires (78).

Figure 19.A Comparaison des courbes de PFS. Les sous-types EZB et BN2 présentent un risque de rechutes plus faible que les deux autres sous-types.

Figure 19.B Comparaison des courbes de l'OS. Les résultats obtenus sont concordants avec ceux de la PFS.

5. La génétique, base des nouvelles thérapeutiques

En résumé, l'approche moléculaire des LBDGC présente un double intérêt en permettant tout d'abord d'identifier des groupes de patients répondant moins bien aux thérapies actuelles mais également en soulignant des mécanismes oncogéniques distincts selon le type moléculaire de LBDGC. Ainsi, l'identification de ces nouvelles voies d'activation oncogéniques permet la recherche de nouveaux biomarqueurs prédictifs et de nouvelles thérapies ciblées.

Les progrès moléculaires récemment réalisés permettent d'adapter la prise en charge des patients atteints d'un LBDGC. L'approche thérapeutique se fait dorénavant à l'échelle du malade et non de la pathologie valorisant ainsi la médecine de précision. Ainsi, les stratégies thérapeutiques actuelles se basent sur l'identification de groupes

de patients partageant un profil mutationnel commun, l'enjeu étant de trouver des cibles thérapeutiques spécifiques à un groupe de patients.

Ainsi des essais cliniques ont permis d'étudier l'efficacité de certaines molécules comme par exemple le Lenalidomide, le Bortezomib (protéase inhibant la voie NF- κ B) ou encore l'Ibrutinib (inhibant la cascade d'activation de la voie du récepteur au lymphocyte B) [80–82]. Il en découle des options thérapeutiques, encore parfois d'actualité, qui seront développées ultérieurement.

Malheureusement certains gènes jouant un rôle clé dans la prolifération lymphomateuse, à l'image de *MYC*, sont difficiles à cibler directement d'un point de vue thérapeutique. Il peut alors être intéressant de passer par un intermédiaire en amont, qui va annihiler l'action de *MYC* ; c'est par exemple le cas de *BRD4*, qui code pour une protéine BET à bromodomaine régulant l'expression de *MYC* et qui a déjà été étudié comme cible thérapeutique potentielle [83].

I. Détermination du stade de la maladie au diagnostic

1. Bilan d'extension

Il repose sur un bilan clinique et biologique, une biopsie ostéo-médullaire et une imagerie (scanner et TEP scanner) et a pour but de préciser le stade de la maladie et de calculer le score IPI [84].

Le bilan clinique précise l'état général du patient selon l'échelle de score ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group, **Figure 20**) et doit comporter un examen minutieux de toutes les aires ganglionnaires à la recherche d'adénopathies cliniquement suspectes et/ou d'une hépatosplénomégalie ; ces items rentrent dans

l'évaluation du stade du LBDGC. Un bilan cardiologique est recommandé avant la mise en place de la chimiothérapie.

0	Activité normale
1	Capable de réaliser de petits travaux
2	Incapable de travailler, capable de s'occuper de lui-même, debout plus de 50% du temps
3	Confiné au lit ou dans un fauteuil plus de 50% du temps
4	Confiné au lit, incapable de s'occuper de lui-même

Figure 20. Evaluation de l'état général selon ECOG.

Le bilan biologique permet de connaître le taux sérique des LDH, item indispensable au score IPI, mais aussi de rechercher d'éventuelles comorbidités ou des contre-indications à la mise en place de certaines thérapies (insuffisance rénale, insuffisance cardiaque).

La biopsie ostéo-médullaire, souvent réalisée en parallèle de la biopsie chirurgicale diagnostique, permet de confirmer ou d'infirmer une extension médullaire de la prolifération lymphomateuse.

2. Place de l'imagerie

Le bilan radiologique comprend un scanner cervical et thoraco-abdomino-pelvien avec injection de produit de contraste iodé en l'absence de contre-indications. De plus, il est réalisé systématiquement en pré-thérapeutique, une tomographie à émission de positons (TEP) marquée au ¹⁸fluorodésoxyglucose (¹⁸FDG) [85]. Cet examen, plus sensible que le scanner, a pour objectif de préciser le stade de la maladie de manière plus précise qu'avec la simple palpation des aires ganglionnaires.

La TEP scanner précise également le volume métabolique tumoral total, défini par l'addition de toutes les masses hypermétaboliques retrouvées. Ce volume est un facteur pronostique [86] : plus il est élevé, plus la survie sans progression (PFS = Progression Free Survival) et la survie globale (OS) sont réduites. Ainsi, un volume métabolique tumoral total important isole un groupe de patients à haut risque de rechutes, semblant nécessiter une thérapie plus agressive [87].

La TEP scanner est aussi utile dans le suivi du patient, avec une indication à la réaliser après 2 ou 4 cycles de chimiothérapie afin de juger de la chimiosensibilité du LBDGC et d'en adapter le traitement si besoin [88]. Pour ce faire, il faut s'appuyer sur la différence de signal entre l'imagerie initiale et l'imagerie en cours de traitement et utiliser l'échelle de Deauville (**Figure 21**). A ce stade, la TEP scanner identifie alors précocement les patients non répondeurs dont la maladie continue d'évoluer ; ainsi, une tumeur peu chimiosensible sera de plus mauvais pronostic [89].

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

Figure 21. Echelle de Deauville en 5 points permettant une évaluation de la réponse métabolique au traitement du LBDGC (d'après LymphomaCare).

Enfin, la TEP scanner peut se réaliser en fin de traitement dans le même but que précédemment ou en cas de suspicion clinique de rechute de la maladie (**Figure 22**) [90].



Figure 22. TEP-scanner d'un patient suivi pour un LBDGC, d'après *Kong et al.*

(A) TEP-scanner au diagnostic montre des fixations ganglionnaires au niveau sus et sous diaphragmatiques (axillaire, cervical, médiastinal, lombo-aortique) ainsi que des fixations extra ganglionnaires (surrénale droite, vertèbre lombaire).

(B) TEP-scanner après 2 cycles de chimiothérapie (PET-intermédiaire) positive selon l'échelle de Deauville (score 4) avec réponse métabolique incomplète devant la persistance d'une hyperfixation au niveau surrénalien droit et vertébral.

(C) TEP-scanner à 3 mois après la fin de la première ligne de chimiothérapie montre l'apparition de nouvelles lésions et la progression (augmentation d'intensité du signal) des lésions connues. Ces images sont en faveur d'un LBDGC en rechute précoce après traitement.

3. Stade Ann Arbor

Ce stade permet d'évaluer l'extension initiale de la maladie et se base sur le nombre et la topographie des sites ganglionnaires et/ou extra-ganglionnaires touchés [91]. Il permet de scinder schématiquement un LBDGC en stade « localisé » si le score est inférieur ou égal à 2 ou en stade « avancé » (si le score est supérieur à 2).

Le stade d'Ann Arbor fait partie intégrante du score IPI ; il est détaillé ci-dessous (Figure 23).

Stade	Description
Stade I	Atteinte d'un seul groupe ganglionnaire ou d'une seule structure lymphoïde (médiastin = 1 ; cervical gauche = 1 ; rate = 1 ; anneau de Waldeyer = 1)
Stade II	Atteinte de deux ou plusieurs groupes ganglionnaires d'un seul côté du diaphragme (le médiastin représente un seul territoire, les deux hiles sont considérés indépendamment du médiastin comme des « régions » ganglionnaires). Le nombre de territoires ganglionnaires est indiqué en indice (II _n)
Stade III	Atteinte ganglionnaire des deux côtés du diaphragme
III1	Atteinte sous-diaphragmatique limitée à la rate, aux ganglions du hile splénique, aux ganglions coeliaques ou du tronc porte
III2	Atteinte des ganglions latéro-aortiques, iliaques, mésentériques s'associant ou non à l'atteinte détaillée dans le stade III1
Stade IV	Atteinte extra-ganglionnaire distincte d'une localisation viscérale contiguë, ou atteinte du foie ou de la moelle osseuse
A	Absence de signes généraux
B	Présence de fièvre, sueurs, ou amaigrissement
X	Importante masse tumorale : <ul style="list-style-type: none"> • masse médiastinale de diamètre égal ou supérieur au tiers du diamètre transverse thoracique au niveau du disque intervertébral T5-T6 (sur un cliché thoracique de face) • masse ganglionnaire égale ou supérieure à 10 cm dans son diamètre maximum
E	Atteinte d'un seul viscère contigu ou à proximité d'un territoire ganglionnaire atteint

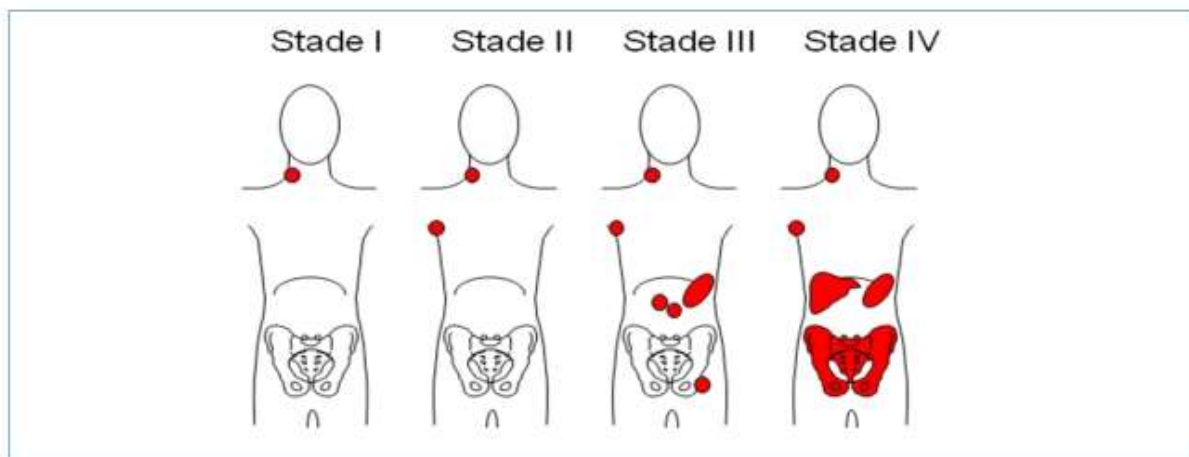


Figure 23. Stade Ann Arbor (d'après l'HAS).

4. Score IPI

Décrit pour la première fois en 1993 [92], le score IPI est le facteur pronostique clinico-biologique le plus robuste et le plus reproductible actuellement connu dans les LBDGC. Sa première version s'appuie sur cinq variables pré-thérapeutiques permettant de classer les patients en différents groupes de risque en termes de survie :

- Un âge au diagnostic supérieur ou inférieur à 60 ans
- Le nombre de localisations tumorales extra ganglionnaires
- Le stade Ann Arbor
- L'évaluation de l'état général du patient selon l'échelle ECOG
- Le taux des LDH sériques

Pour les patients de moins 60 ans au moment du diagnostic, il existe le score IPI adapté à l'âge (aalPI, age adapted IPI) ne prenant en compte que les trois derniers items précédemment listés (Ann Arbor, ECOG et LDH) (**Figure 24**).

FACTOR	RELATIVE RISK	P VALUE
All patients (n = 1385)		
Age (≤ 60 vs. > 60)	1.96	< 0.001
Serum LDH ($\leq 1 \times$ normal vs. $> 1 \times$ normal)	1.85	< 0.001
Performance status (0 or 1 vs. 2-4)	1.80	< 0.001
Stage (I or II vs. III or IV)	1.47	< 0.001
Extranodal involvement (≤ 1 site vs. > 1 site)*	1.48	< 0.001
Patients ≤ 60 years old (n = 885)		
Stage (I or II vs. III or IV)	2.17	< 0.001
Serum LDH ($\leq 1 \times$ normal vs. $> 1 \times$ normal)	1.95	< 0.001
Performance status (0 or 1 vs. 2-4)	1.81	< 0.001

*This was the only factor that did not retain independent prognostic significance in patients ≤ 60 years old (≤ 1 site vs. > 1 site; relative risk, 1.20; P = 0.134).

Figure 24. Score IPI de 1993 (91).

Le score IPI repose sur 5 items et donne un score allant de 0 à 5.

Le score aalPI est adapté aux patients de moins de 60 ans et ne prend en compte que 3 des 5

Ce score IPI permet, dès 1993, de classer les patients en 4 groupes de risque. Plus le score IPI est élevé, plus le pronostic est réservé, ainsi un score compris entre 0 et 1 correspond au groupe à faible risque de rechutes ou récidives (« Low »), un score 2 constitue le groupe à risque « bas intermédiaire » (« Low intermediate »), un score 3 signe un groupe à risque « intermédiaire haut » (« High intermediate ») et un score supérieur ou égal à 4 identifie les patients de haut risque (« High ») (**Figure 25**).

Table 4. Outcome According to Risk Group Defined by the International Index and the Age-Adjusted International Index.

RISK GROUP	NO. OF RISK FACTORS	DISTRIBUTION OF PATIENTS (%)	COMPLETE RESPONSE			SURVIVAL	
			RATE (%)	RELAPSE-FREE SURVIVAL		2-YR RATE (%)	5-YR RATE (%)
				2-yr rate (%)	5-yr rate (%)		
International index, all patients (n = 2031)*							
Low	0 or 1	35	87	79	70	84	73
Low intermediate	2	27	67	66	50	66	51
High intermediate	3	22	55	59	49	54	43
High	4 or 5	16	44	58	40	34	26
Age-adjusted index, patients ≤60 (n = 1274)†							
Low	0	22	92	88	86	90	83
Low intermediate	1	32	78	74	66	79	69
High intermediate	2	32	57	62	53	59	46
High	3	14	46	61	58	37	32
Age-adjusted index, patients >60 (n = 761)†							
Low	0	18	91	75	46	80	56
Low intermediate	1	31	71	64	45	68	44
High intermediate	2	35	56	60	41	48	37
High	3	16	36	47	37	31	21

*The total of patients includes the 1385 in the training sample and the 646 in the validation sample.
†The total of the patients in the two analyses with the age-adjusted index includes four more patients than the total in the analysis with the international index because all the data necessary for these four patients to be included in the age-adjusted analyses (which evaluated fewer variables) were available.

Figure 25. Données de survie des LNH B agressifs selon le score IPI ou aalPI. La survie à 5 ans varie de 73% pour le groupe à bas risque versus 26% pour le groupe à plus fort risque de rechutes (score = 4 ou 5)

Ces données relatives à la survie ont évolué depuis 20 ans, notamment suite à l'avènement du Rituximab en complément du CHOP dans la chimiothérapie de première ligne. Cependant, il est intéressant de noter que malgré les progrès thérapeutiques effectués, le score IPI reste un facteur pronostique très solide et une version révisée de l'IPI (r-IPI, revised-IPI) a été développée afin de l'affiner [93]. Depuis 2007, en reprenant les mêmes variables, le r-IPI stratifie les patients en 3 groupes de risque : très bon pronostic (score 0), bon pronostic (score 1 et 2) et mauvais pronostic (score 3, 4 ou 5). Ainsi, les patients du groupe « très bon pronostic » présentent une OS à 4 ans de 94% alors qu'elle chute à 55% pour les patients de « mauvais pronostic » [93] (**Figure 26**).

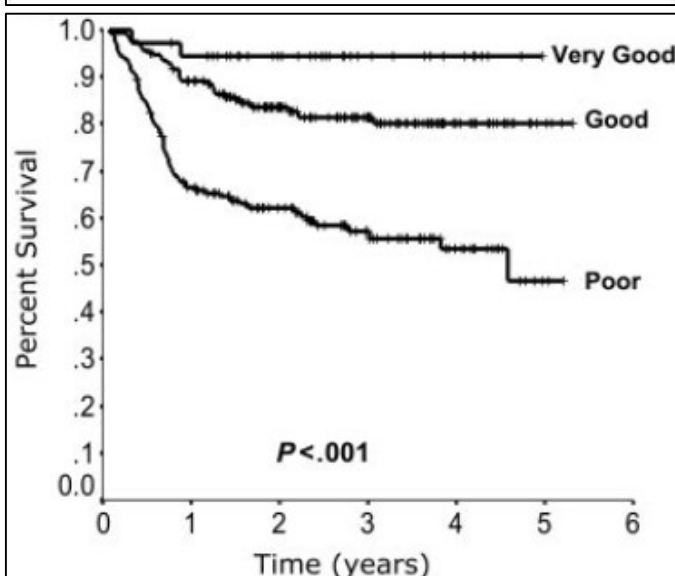
Table 2. Outcome according to International Prognostic Index (IPI) factors in 365 patients treated with R-CHOP in British Columbia

Risk group	No. of IPI factors	% Patients	4-year PFS, %	4-year OS, %
Standard IPI				
Low	0, 1	28	85	82
Low-intermediate	2	27	80	81
High-intermediate	3	21	57	49
High	4, 5	24	51	59
Revised IPI				
Very good	0	10	94	94
Good	1, 2	45	80	79
Poor	3, 4, 5	45	53	55

A.

Figure 26. Stratification plus précise du r-IPI en 3 groupes de risque par rapport au score IPI (92).

Figure 26.A. Données de survie à 4 ans (PFS et OS) selon le score IPI ou r-IPI.



B.

Figure 26.B. Comparaison des courbes de survie (sans progression) selon le score r-IPI. Trois groupes se différencient avec des patients présentant un très bon pronostic (score 0), ceux présentant un risque de rechutes limité (score 1 et 2) et les patients dont le pronostic est défavorable (score 3, 4 ou 5).

J. Traitement

1. Traitement de première ligne

a) Historique

Les LBDGC sont traités par CHOP depuis 1976, année durant laquelle une étude montrait la supériorité du CHOP en termes de survie par rapport au HOP, traitement de référence de l'époque [94]. Puis, dans les années 90, sont sortis différents travaux ayant pour objectif de chercher une alternative thérapeutique efficace au CHOP. Ces études n'ont jamais réussi à prouver une supériorité des chimiothérapies autres que le CHOP dans les LBDGC (**Figure 27**) [95].

Autour des années 2000, s'est posée la question de comparer le CHOP à l'allogreffe : une méta analyse des études menées concluait à l'absence de supériorité de l'allogreffe par rapport au CHOP en première ligne [96].

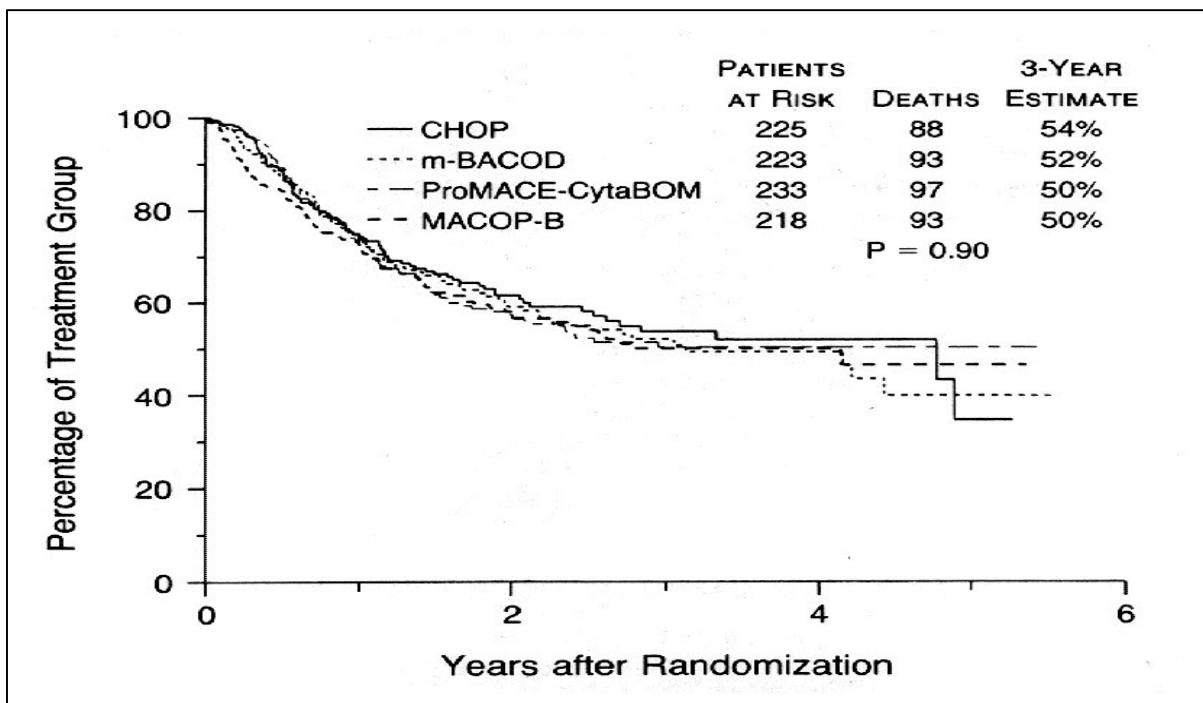


Figure 27. Historique des données de survie des LBDGC en fonction de la chimiothérapie utilisée dans le courant des années 1990 (94). Malgré l'utilisation du Méthotrexate à hautes doses dans les autres lignes de chimiothérapie, le CHOP n'apparaît pas moins efficace ; il est longtemps resté la référence thérapeutique des LBDGC en première ligne.

b) *R-CHOP, le traitement de référence actuel*

Les LBDGC sont considérés comme des lymphomes agressifs de mauvais pronostic mais dont le traitement peut être curatif. Avant 2002, sous CHOP, les données montraient que l'OS et la PFS à 5 ans étaient respectivement de l'ordre de 46% et 41% [97].

Depuis 2002, le paysage thérapeutique des LBDGC a changé avec l'avènement du Rituximab en complément du CHOP [98]. La première étude, menée par *Coiffier et al.* en 2002 sur une cohorte de patients de plus de 60 ans traités pour un LBDGC, a permis de montrer une amélioration significative de la PFS et de l'OS dans le bras R-CHOP versus le bras de traitement exclusivement par CHOP [98]. Ainsi, la PFS et l'OS sont améliorés d'environ 15 à 20% grâce au Rituximab, sans que le R-CHOP n'induisse plus de toxicité médicamenteuse comparé au CHOP seul ; ces données sont corroborées par différentes études successives [99,100] (**Figure 28**).

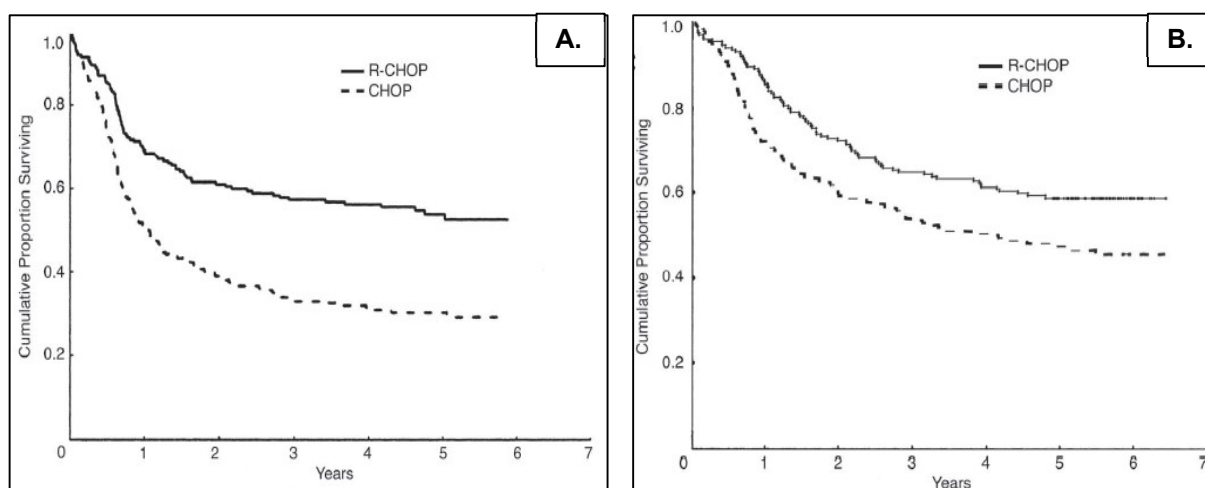


Figure 28. Comparaison des données de survie des patients de plus de 60 ans traités pour un LBDGC par R-CHOP ou par CHOP seul (97).

Figure 28.A Comparaison de la PFS sur 5 ans, montrant une amélioration significative du pronostic pour les patients traités par R-CHOP (PFS à 5 ans = 54% versus 30% pour CHOP seul).

Figure 28.B Comparaison de l'OS sur 5 ans arrivant aux mêmes conclusions avec un risque de décès diminué de 15% en cas de traitement par R-CHOP.

Des études plus récentes ont confirmé que la supériorité de l'efficacité du R-CHOP se retrouve aussi pour les patients de moins de 60 ans [101], avec un gain pronostique similaire, autour de 15 à 20% sur la PFS et l'OS.

Ainsi actuellement, les patients porteurs d'un LBDGC « localisé » et sensible au R-CHOP en première ligne (absence de rechute à 24 mois) ont une survie comparable à la population générale (Figure 29.A) [102]. Cependant, même si l'ajout de Rituximab au CHOP a permis une amélioration nette de la survie des LBDGC, cette immunochimiothérapie de première ligne perd en efficacité dès lors qu'une des cinq variables du score IPI est retrouvée « positive » (score supérieur à 0, Figure 29.B) [103].

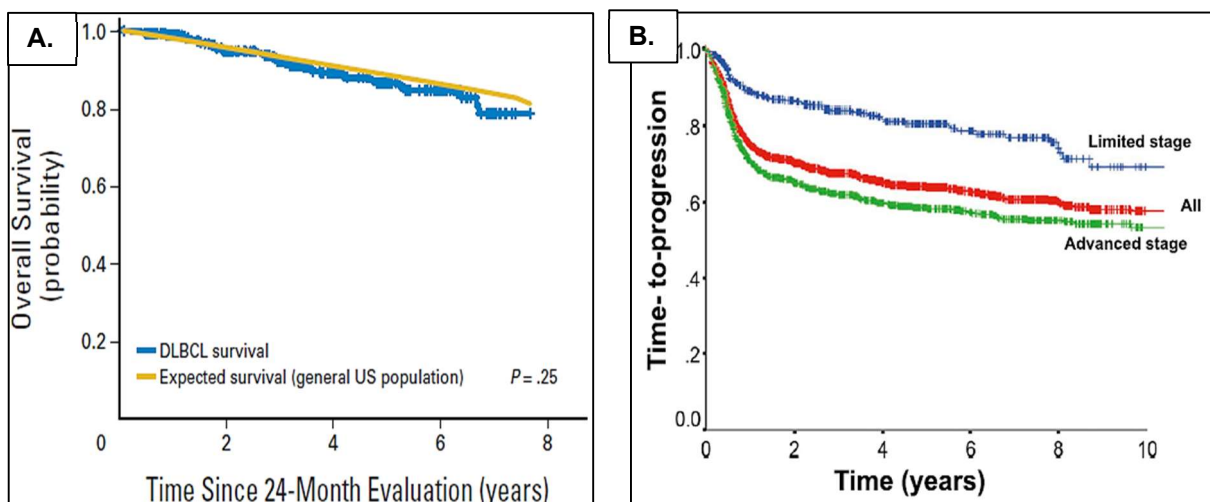


Figure 29. Le R-CHOP est efficace, surtout dans les LBDGC « localisés ».

Figure 29.A Comparaison des courbes de survie entre une cohorte américaine de LBDGC traités par R-CHOP sans progression de la maladie à 24 mois (courbe bleue) et la survie de la population générale américaine (courbe jaune) (101).

Figure 29.B Survie des patients traités par R-CHOP pour un LBDGC selon le stade de la maladie. En cas de stade avancé ou d'inefficacité du R-CHOP, les courbes de survie s'infléchissent vite dans les 6 premiers mois (102).

De plus, on estime encore à un tiers le nombre de patients réfractaires ou rechutant dans les deux ans après initiation du traitement [101]. Dans ce cas là, le pronostic est très sombre avec une médiane de survie de 7,1 mois et une probabilité de survie à un an de l'ordre de 30% [104].

En résumé, l'ajout du Rituximab au CHOP a permis une amélioration significative de la survie des patients suivis pour LBDGC, mais il est très important de ne pas « rater la première marche ». En effet, en cas d'échec de ce traitement de première ligne, soit environ pour un tiers des patients, le LBDGC est une tumeur de très mauvais pronostic.

c) Alternatives au R-CHOP 21

Au cours de la dernière décennie, plusieurs équipes ont tenté de trouver des alternatives thérapeutiques plus efficaces (sans augmentation de la toxicité médicamenteuse) au R-CHOP en première ligne, ce dernier étant administré tous les 21 jours (R-CHOP 21), classiquement sur 6 ou 8 cycles (**Figure 30**).

Ainsi comme pour le CHOP, l'ajout d'une autogreffe au R-CHOP n'a pas démontré sa supériorité dans les différentes études menées [105].

Il en est de même pour les protocoles d'intensification du R-CHOP (notamment R-CHOP 14 délivré tous les 14 jours versus R-CHOP 21) ou pour les autres chimiothérapies étudiées dont le bénéfice est minime par rapport la toxicité surajoutée (**Figure 30**). La seule alternative efficace au R-CHOP est le R-ACVBP (Rituximab, Adriamycine, Cyclophosphamide, Vindésine, Bléomycine, Prednisone), administré tous les 14 jours et devant être réservé uniquement aux patients de moins de 60 ans dont le score IPI est égal à 1 [106]. En effet, comme cette polychimiothérapie est plus

intense que le R-CHOP, elle n'est pas utilisée partout car certains centres considèrent que le bénéfice thérapeutique est minime par rapport à la toxicité induite.

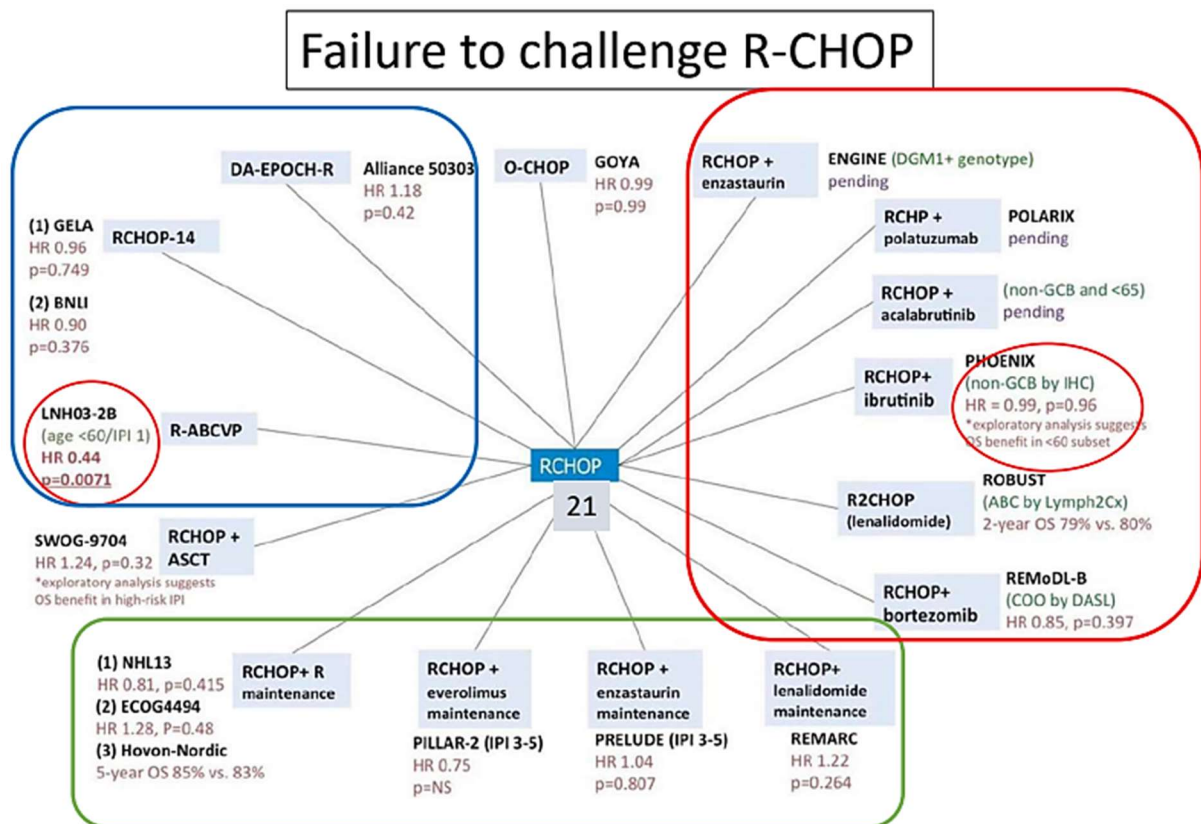


Figure 30. Revue des essais cliniques visant à trouver une alternative au R-CHOP 21, d'après le Dr T. Lamy, CHU de Rennes.

Le carré bleu regroupe toutes les études évaluant d'autres polychimiothérapies, le carré rouge concerne les essais cliniques des traitements combinatoires (R-CHOP associé à une autre thérapie) et enfin le rectangle vert rassemble les traitements avec maintenance (R-CHOP puis autre molécule au décours).

Pareillement, la place de la radiothérapie en complément du R-CHOP est très limitée et ne s'intègre pas à la prise en charge de base d'un LBDGC.

Pour les patients de plus de 80 ans, il n'est pas possible de donner du R-CHOP sauf cas exceptionnels ; une des alternatives consiste à administrer du R-miniCHOP (même molécules à doses réduites).

En conclusion, le R-CHOP reste le traitement de référence en première ligne dans la majorité des cas ; cependant, certaines alternatives existent mais leurs indications restent limitées à certaines situations (selon le score IPI et l'âge). Dans tous les cas, tout traitement devra être discuté en réunion de concertation pluridisciplinaire, après un bilan pré thérapeutique complet et bien mené.

2. Traitement de rattrapage

Pour rappel, environ 30% des patients sont dits non répondeurs ou réfractaires au R-CHOP. Ces patients représentent un groupe de LBDGC à « très haut risque », en raison d'un pronostic très mauvais.

L'un des problèmes majeurs pour ces patients est qu'il existe très peu de facteurs pouvant prédire la réponse à la chimiothérapie. La découverte de tels facteurs permettrait d'adapter la thérapeutique en amont, ceci étant d'autant plus important que le traitement du LBDGC se doit d'être curatif dès la première ligne (ne pas « rater la première marche »), et ce peu importe l'âge du patient.

En seconde ligne après échec du R-CHOP, plusieurs options existent et d'autres molécules devraient bientôt venir renforcer l'arsenal thérapeutique. Tout d'abord, il peut être proposé un traitement de consolidation en cas de réponse partielle au traitement par R-CHOP : il s'agit d'une autogreffe de cellules souches conditionnée par une chimiothérapie à hautes doses de type BEAM (Carmustine (BICNU), Etoposide, Cytosine-Arabinosine et Melphalan) [107,108].

Si le patient est éligible à un traitement intensif, il peut être discuté un traitement par R-DHAP (Rituximab, Dexaméthasone, Aracytine à fortes doses et Cisplatine) ou plus rarement par R-ICE (Rituximab, Ifosphamide, Carboplatine, Etoposide)

[109,110]. Si le patient n'est pas éligible à un traitement intensif (mauvais état général ou âge avancé), une chimiothérapie par R-GEMOX (Rituximab, Gemcitabine, Oxaliplatine) peut être initiée.

En troisième ligne, devant le pronostic très péjoratif des patients, il doit être discuté une inclusion dans un essai clinique (nouvelles cibles thérapeutiques étudiées) ou l'administration de traitement novateur tel les CAR-T cells. Ce dernier, dont son efficacité est prometteuse [111,112], a maintenant une autorisation de mise sur le marché en troisième ligne des LBDGC réfractaires ; cette immunothérapie repose sur le prélèvement des lymphocytes T du patient que l'on va génétiquement modifier, avant de les ré-injecter, afin que le système immunitaire puisse reconnaître et lutter contre la prolifération tumorale. Il faut garder à l'esprit que de nombreuses autres molécules sont en cours d'évaluation et que le traitement de rattrapage dans les LBDGC est susceptible d'être modifié dans les prochaines années [113].

En résumé, le traitement d'un LBDGC doit faire l'objet d'une discussion entre spécialistes et tenir compte des paramètres de la pathologie lymphomateuse (score IPI, atteinte neuro-méningée, critères histo-pronostiques) et du patient (âge, état général, éligibilité au traitement intensif et à la greffe). L'arbre thérapeutique de base est schématisé ci-dessous (**Figure 31**). Il est également important de garder à l'esprit qu'un groupe de patients, dits à « haut risque », ne répondront pas ou peu à l'immunochimiothérapie de première ligne. Pour ces patients, la découverte de facteurs de sensibilité au traitement, déterminés en amont de l'administration du R-CHOP, serait une avancée majeure permettant une adaptation thérapeutique.

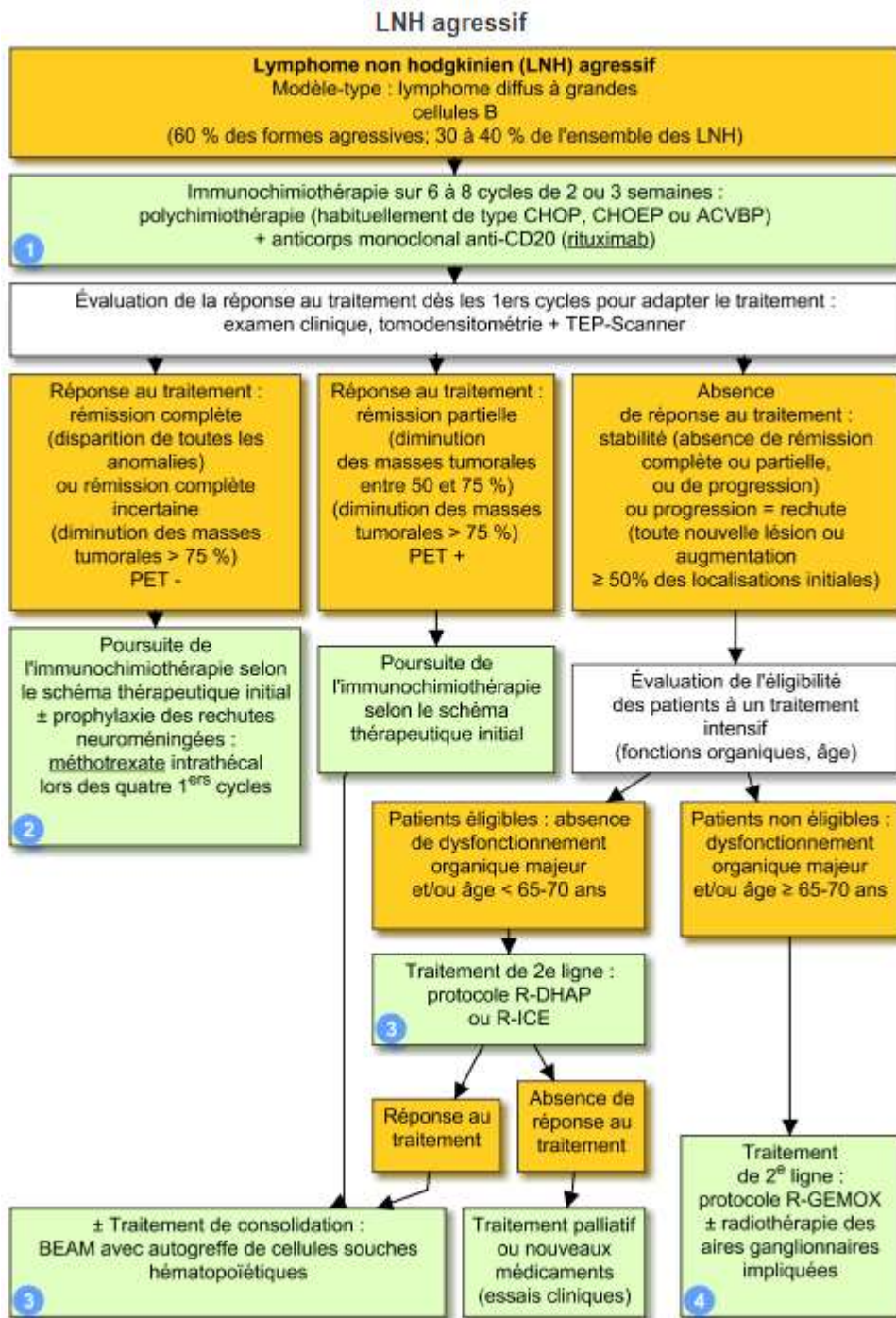


Figure 31. Arbre thérapeutique des lymphomes B agressifs (LBDGC y compris), d'après le Vidal.

K. Tableau récapitulatif des principaux facteurs pronostiques

Un tableau récapitulatif résumant les principaux facteurs pronostiques déjà cités est fourni ci-dessous (**Tableau 2**).

Facteurs immunohistochimiques
• Profil nGCB selon Hans
• LBDGC double expresseur Myc et Bcl2 +
• LBDGC CD5+ de novo
• Surexpression de p53
• LBDGC Myc+ ou BCL2+ (*)
• LBDGC CD30-
• LBDGC CD23+ (*)
• Index de prolifération Ki67 élevé (> 80%) (*)
Facteurs moléculaires
• Statut ABC selon COO
• Sous types moléculaires identifiés par Chapuy et Schmitz (75,78)
• Réarrangement <i>MYC</i> , notamment <i>MYC-Ig</i> (<i>MYC-IgH</i>)
• Mutations <i>BCL2</i> (*)
• Absence de mutation ou de réarrangement de <i>BCL6</i>
• Mutations de <i>FOXO1</i>
• Mutations <i>p53</i>
Facteurs cliniques
• Score IPI ou r-IPI élevé
• Patients réfractaires ou non-répondeurs au R-CHOP
Facteurs métaboliques (imagerie)
• Volume métabolique tumoral total initial important
• Réponse incomplète au traitement (TEP intermédiaire / échelle Deauville)

Tableau 2. Principaux facteurs de mauvais pronostic dans les LBDGC NOS.

Les facteurs pronostiques encore débattus sont suivis d'un astérisque (*) alors que ceux servant de référence sont indiqués en gras.

IV. Les autres sous-types de LNH B agressifs

Afin d'expliquer notre démarche diagnostique dans la constitution de la cohorte de ce travail, il est important de lister les principaux diagnostics différentiels des LBDGC, NOS, notamment les LNH agressifs à cellules B matures et les lymphomes anciennement classés dans le groupe des LBDGC (OMS 2008). Pour rester didactique, seuls les éléments différenciant les LBDGC, NOS des entités citées ci-après seront développées.

Il ne sera pas abordé non plus le cas des LBDGC transformés à partir d'une autre prolifération lymphomateuse (par exemple un syndrome de Richter à partir d'une LLC) ; en effet, comme précisé ultérieurement, l'existence d'une lymphoprolifération antérieure au diagnostic de LBDGC, NOS était un des critères d'exclusion de la cohorte.

A. Les lymphomes B de haut grade (HGBL)

Ils correspondent à des lymphomes B agressifs, de très mauvais pronostic, ne pouvant rentrer ni dans le spectre des LBDGC, NOS ni dans celui des lymphomes de Burkitt. Ils se divisent en deux catégories : les HGBL double ou triple hit (DHL/THL) et les HGBL, NOS [1].

1. HGBL DHL/THL

Cette entité est définie par un réarrangement du gène *MYC* associé à un réarrangement de *BCL2* et/ou *BCL6*.

C'est une forme peu fréquente, marquée par des critères cliniques défavorables tels qu'une atteinte extra-ganglionnaire et un score IPI élevé [114].

Morphologiquement, la moitié des HGBL DHL / THL prend l'aspect d'un LBDGC, NOS avec, de façon peu spécifique, la présence d'un « ciel étoilé » et de nombreuses figures de mitoses. L'autre forme morphologique commune est le HGBL avec une morphologie intermédiaire entre un lymphome de Burkitt et un LBDGC, NOS [34] (aspect antérieurement appelé « zone grise entre un Burkitt et un LBDGC » dans l'OMS 2008). Très rarement, l'aspect peut être celui d'un lymphome de type blastoïde, caractérisé par une prolifération diffuse de cellules de taille moyenne, très monotones, à la chromatine mottée (**Figure 32**). Dans tous les cas, l'étude immunohistochimique rapporte un index de prolifération très élevé et oriente vers un sous-type préférentiellement GCB.

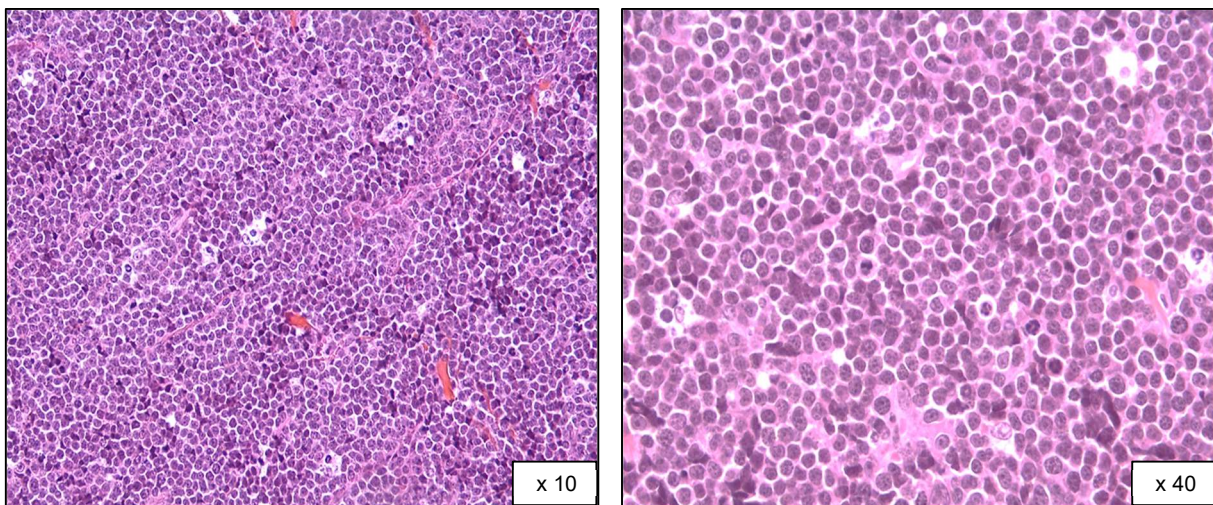


Figure 32. HGBL dans sa forme blastoïde, à l'HES à faible (à gauche, à noter un aspect en « ciel étoilé ») et à fort grossissement (à droite). Les cellules tumorales sont monomorphes, contrairement à un LBDGC, NOS.

Au niveau génétique, l'analyse par FISH est l'élément clé du diagnostic en mettant en évidence un réarrangement du gène *MYC* (qui peut être avec un partenaire

de type *Ig* ou non *Ig*) auquel se surajoute un réarrangement de *BCL2* et/ou *BCL6*. La charge mutationnelle de ces lymphomes est importante avec un caryotype complexe [34].

Les diagnostics différentiels dépendent de l'aspect morphologique du HGBL ; ainsi, devant une prolifération blastoïde, il conviendra d'éliminer un lymphome lymphoblastique ou un lymphome du manteau dans sa forme blastoïde. Mais les principaux diagnostics différentiels restent le LBDGC, NOS et le lymphome de Burkitt.

D'un point de vue pratique, il est important d'individualiser ces proliférations car leur pronostic est très mauvais (survie inférieure à 6 mois) [34,115], avec une chimiorésistance même après des thérapies intensives. Les patients porteurs d'un HGBL DHL ou THL doivent suivre un traitement adapté, plus agressif que pour un LBDGC, NOS.

2. HGBL, NOS

Les HGBL, NOS sont des LNH B partageant des caractéristiques morphologiques entre un lymphome de Burkitt et un LBDGC, NOS. Cette nouvelle entité (OMS 2016 [1]) remplace le précédent spectre des lymphomes B inclassables, intermédiaires entre un Burkitt et un LBDGC (OMS 2008). Contrairement au HGBL DHL ou THL, il ne doit pas être retrouvé de double ou triple réarrangement des gènes *MYC*, *BCL2* et/ou *BCL6*.

Le diagnostic repose donc uniquement sur l'aspect histologique qui doit être soit blastoïde ou soit intermédiaire entre un Burkitt et un LBDGC.

Cliniquement, cette entité est de très mauvais pronostic, mais le manque de recul ne permet pas encore de faire émerger les grandes différences entre un HGBL,NOS et un HGBL DHL ou THL [114,116].

Un arbre diagnostique tiré de l’OMS 2016 permet de résumer l’approche à adopter devant une suspicion histologique ou clinique de HGBL (**Figure 33**).

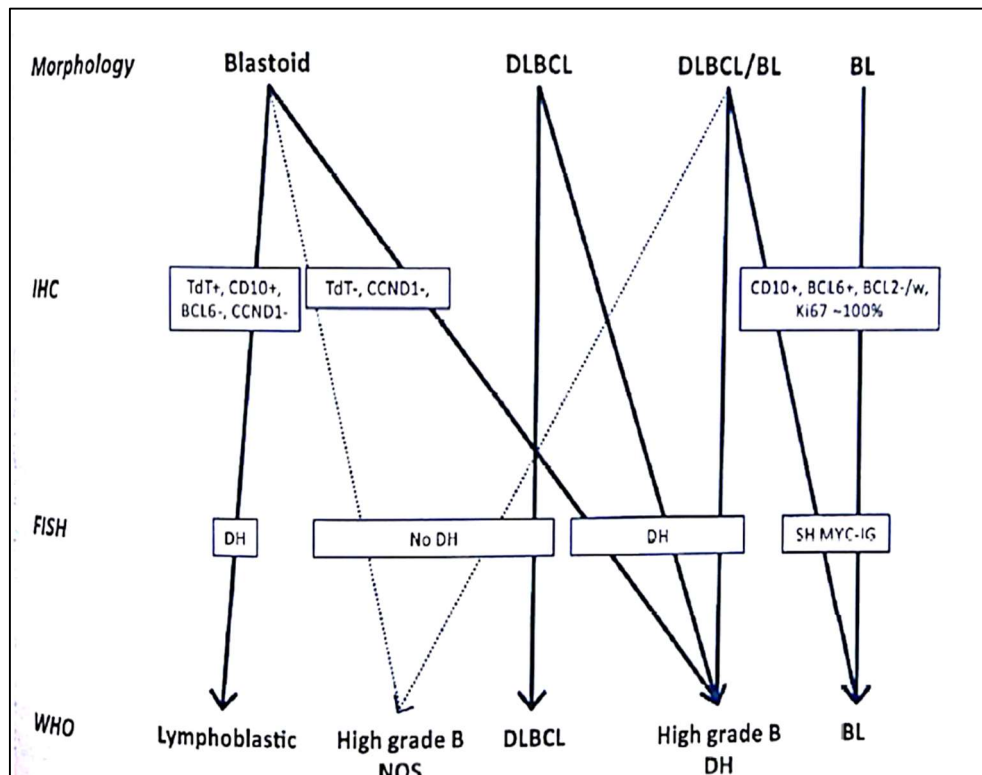


Figure 33. Arbre diagnostique selon l’OMS 2016 permettant de conclure au diagnostic de HGBL, NOS ou DHL/THL.

B. LBDGC EBV positif, NOS

Depuis 2016, ils constituent une entité à part entière [1] et correspondent aux ex-LBDGC du sujet âgé ; il existe deux pics d’incidence, l’un vers 30 ans et l’autre vers 80 ans. Ils surviennent chez un patient non immunodéprimé et sans histoire antérieure de lymphome.

La présentation clinique révèle souvent une atteinte ganglionnaire et extra-ganglionnaire. Histologiquement, la prolifération est polymorphe, pouvant prendre l'aspect d'un LH ou d'un LBDGC, avec des remaniements nécrotiques fréquents. Les cellules tumorales montrent une positivité des marqueurs pan-B mais aussi du CD30.

La recherche d'une latence de l'EBV passe par l'IHC (anticorps anti-LMP1 et EBNA1) et l'hybridation in situ avec la sonde EBER, qui doit être positive sur plus de 80% des cellules tumorales (**Figure 34**).

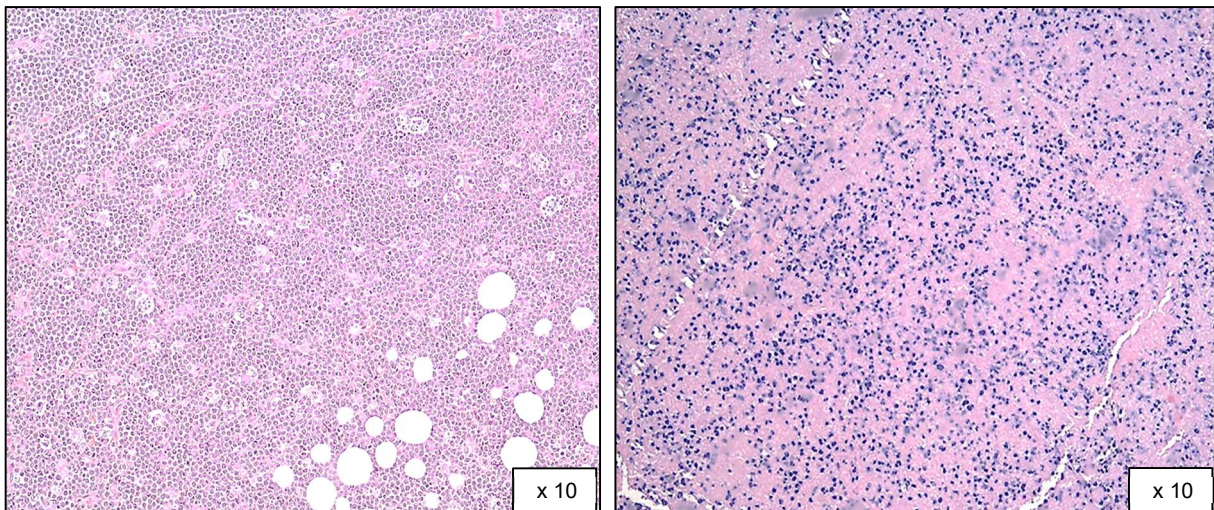


Figure 34. Aspect classique d'un LBDGC EBV positif NOS à l'HES (à gauche, noter un aspect en « ciel étoilé ») et une mise en évidence de l'EBV via une positivité diffuse des cellules tumorales avec la sonde EBER en hybridation in situ (à droite).

Les principaux diagnostics différentiels sont les autres LNH associés à l'EBV, la mononucléose infectieuse mais également le spectre des lymphoproliférations post-transplantation (PTLD) dans un contexte d'immunodépression.

Du fait de son association fréquente à d'autres facteurs de mauvais pronostic (âge > 80 ans, score IPI élevé), cette forme de LBDGC est peu chimiosensible sous R-CHOP et la survie globale est inférieure aux LBDGC, NOS [117].

C. LBDGC avec réarrangement de *IRF4*

Ce lymphome, souvent de stade localisé au moment du diagnostic, intéresse les enfants et les jeunes adultes [118(p4)], notamment dans les ganglions cervicaux et les anneaux de Waldeyer [1]. La prolifération tumorale est d'architecture diffuse, nodulaire ou mixte en histologique. L'analyse immunohistochimique montre une forte expression des cellules tumorales vis-à-vis de l'*IRF4* / *MUM1* ainsi que pour *BCL6*.

Cette entité est majoritairement de sous type GCB, avec des réarrangements du gène *IRF4* parfois associés à des réarrangements de *BCL6* mais sans anomalie de *BCL2*. Même si cette variante doit être considérée comme plus agressive qu'un lymphome folliculaire de l'enfant, le pronostic reste très bon [1].

D. LBDGC de topographie particulière (extra-ganglionnaires)

1. LBDGC cérébral primitif

Ce type de lymphome se développe à partir du tissu cérébral ou lepto-méningé. C'est une forme rare, survenant habituellement autour de la 5^{ème} décennie, souvent dans un contexte d'immunosuppression (infection à VIH).

Histologiquement, seul des remaniements hémorragiques ou nécrotiques plus abondants différencient cette forme cérébrale primitive. L'hybridation in situ retrouve une positivité fréquente pour l'EBV chez les patients immunodéprimés, alors qu'elle est négative chez les immunocompétents.

L'autre particularité de ce lymphome est une activation de la voie NF-κB secondaire à des mutations de *MYD88*, *CD79B* ou *PIM1* [119]. Ces lymphomes sont logiquement plus souvent de sous-type ABC.

Enfin, cette forme est de pronostic plus défavorable qu'un LBDGC, NOS avec une survie globale limitée à quelques mois sous R-CHOP [120].

2. LBDGC « leg-type » (cutané primitif)

Depuis 2016, le LBDGC exclusivement cutané est reconnu comme une entité à part entière [1] ; comme son nom l'indique, il se manifeste volontiers par des lésions cutanées des jambes (autres localisations cutanées beaucoup plus rares). Il survient chez la personne âgée, après la 7^{ème} décennie, mais reste une forme très minoritaire de lymphome cutané [121].

Histologiquement, il est important de noter que cette prolifération tumorale ne montre pas d'épidermotropisme mais peut envahir les tissus sous cutanés. Il faut également retenir que ces tumeurs sont de sous-type ABC, à la fois sur le plan immunohistochimique et génétique [121]. Le principal problème diagnostique est avec le LBDGC, NOS avec atteinte cutanée secondaire. Seul un bilan complémentaire clinique et radiologique minutieux permettra de trancher entre ces deux entités.

Ce lymphome est plus agressif que les autres formes de lymphomes cutanés, mais son pronostic reste meilleur que le LBDGC,NOS sous R-CHOP [122].

3. Les lymphomes B primitifs du médiastin (PMBL)

Par définition, cette entité a pour origine les cellules B du thymus. Ce lymphome est rare et touche préférentiellement la femme avec un âge médian de 37 ans. La clinique est dominée par le syndrome de masse médiastinale, ayant pour conséquence des signes respiratoires (dyspnée, toux, douleurs thoraciques,

obstruction de la veine cave supérieure) [97]. Le stade de la maladie est souvent localisé au diagnostic.

Morphologiquement, aucun critère n'est pathognomonique pour retenir le diagnostic de PMBL, l'architecture est plutôt diffuse et les cellules tumorales sont de taille moyenne à grande, polymorphes, d'aspect très variable. Deux signes sont plus en faveur d'un PMBL que d'un LBDGC, NOS à savoir la présence de cellules tumorales claires et l'importance de la sclérose [1].

En IHC, les marquages du CD23 et du CD30 (faible et partiel) sont en accord avec un PMBL.

Sur le plan génétique, leur profil mutationnel se rapproche de celui des LH [123], avec trois voies oncogéniques impliquées (NF- κ B, JAK-STAT et un échappement immunitaire via *CIITA*).

4. LBDGC intravasculaire

Il s'agit d'une forme encore plus rare, de diagnostic difficile car la présentation clinique et le tableau sont très aspécifiques, en dehors de points d'appel cutanés et neurologiques [124].

Histologiquement, ce lymphome se caractérise par une infiltration des parois des vaisseaux par des cellules tumorales lymphomateuses de grande taille, mieux soulignées par l'étude immunohistochimique. C'est un lymphome majoritairement de sous-type ABC, répondant moins bien au R-CHOP qu'un LBDGC, NOS [124].

E. Lymphome B à grandes cellules riche en cellules T /histiocytes

Cette entité est souvent de stade avancé au moment du diagnostic et touche préférentiellement le sujet âgé [1]. La prolifération tumorale, d'architecture diffuse, se compose d'une riche population de cellules T et d'histiocytes réactionnels, au sein de laquelle on observe moins de 10% de grandes cellules B tumorales, parfois Sternbergoïde [125].

Ainsi, ce lymphome aura plus volontiers comme diagnostic différentiels un LH, voire un lymphome T plutôt qu'un LBDGC, NOS. Le pronostic de cette tumeur est similaire à celui d'un LBDGC, NOS.

V. CYCLON : découverte de son rôle dans les LBDGC

Notre intérêt s'est porté sur cette protéine car l'équipe dirigée par *Mary Callanan* a montré qu'elle avait un rôle dans la résistance au Rituximab *in vitro*.

Le gène *CYCLON* (Cytokine-induced protein with Coiled-coil dOmain) a été découvert en 2007 à partir d'une lignée cellulaire hématopoïétique de souris [126]. Son expression est induite par des cytokines et notamment par IL-3. Ce gène code pour une protéine nucléaire éponyme, dont l'expression est quasi-uniquement retrouvée au niveau testiculaire à l'état physiologique (cellules germinales des tubes séminifères) [126]. Cette protéine est aussi connue sous le nom de CCDC86 (Coiled-Coil Domain Containing 86) ; plus récemment, il a été montré qu'elle joue un rôle crucial dans la régulation du micro-environnement tumoral, notamment dans la régulation à l'échappement immunitaire. En effet, *CYCLON* semble contrôler la voie d'apoptose induite par Fas [127], ainsi, une délétion au niveau du gène *CYCLON* entraîne une répression de l'activité cytotoxique des lymphocytes T.

A partir de données génomiques et transcriptomiques publiques [128], *Emadali et al.* a identifié une surexpression importante de la protéine *CYCLON* dans les LNH agressifs (**Figure 35.A**) [129]. Cette surexpression n'ayant jamais été décrite auparavant, elle est d'autant plus intéressante que *CYCLON* est peu ou pas exprimée dans les LNH dits « indolents » (lymphome folliculaire, lymphome du manteau) ou dans les cellules B normales. En s'appuyant sur de nouvelles données publiques de LBDGC [78], il a été démontré que les LBDGC ayant un haut niveau d'expression de *CYCLON* sont de pronostic plus défavorable que ceux avec un faible niveau d'expression de *CYCLON* (**Figure 35.B**) [129].

Après avoir confirmé que CYCLON est impliqué dans l'agressivité tumorale des LBDGC, cette même étude a mis en lumière que cette protéine est également un facteur de résistance au Rituximab *in vitro* (**Figure 35.C et D**). En effet, l'impact pronostique péjoratif d'une surexpression de CYCLON n'est retrouvé qu'en cas de traitement par R-CHOP (**Figure 35.C et D**). Les modèles murins ont confirmé ces données, en mettant en évidence une régression tumorale sous Rituximab pour les tumeurs ne surexprimant pas CYCLON. A l'inverse, les tumeurs avec surexpression de CYCLON présentaient une stabilisation voire une augmentation du volume tumoral sous Rituximab [129].

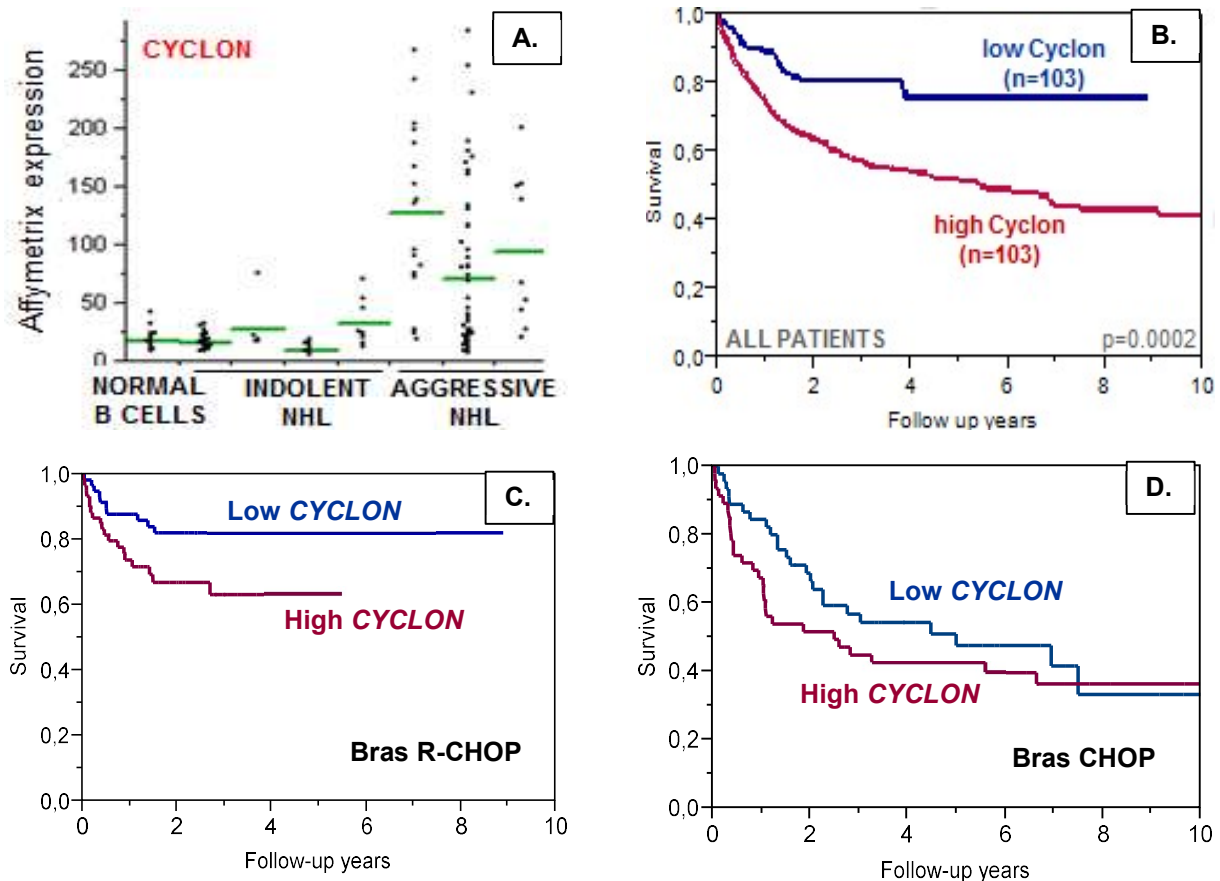


Figure 35. Découverte de CYCLON comme facteur de résistance au Rituximab *in vitro*.

Figure 35.A montre une surexpression aberrante de CYCLON dans les LNH agressifs.

Figure 35.B montre qu'une surexpression de CYCLON dans les LBDGC (courbe rouge) a un impact pronostique défavorable par rapport aux LBDGC avec bas niveau d'expression de CYCLON (courbe bleue).

Figures 35.C confirme CYCLON comme facteur de résistance au Rituximab

Figure 35.D témoigne de l'absence d'impact de CYCLON en cas de traitement par CHOP.

VI. Buts du travail

Pour rappel, 30% des patients atteints de LBDGC ne répondent pas ou peu au R-CHOP en première ligne et représentent un groupe à « très haut risque » en termes de survie. Ce groupe de patients est associé à un pronostic très réservé, malgré les progrès thérapeutiques de ces dernières années et les espoirs de molécules émergentes ciblées.

D'un point de vue fonctionnel, il n'est pas encore bien compris pourquoi certains patients répondent au R-CHOP tandis que d'autres y sont peu ou pas sensibles. En effet, aucun indice histologique ou immunohistochimique fiable ne permet d'isoler de façon certaine les patients chimiorésistants. L'approche génomique offre de nouvelles perspectives dans la classification et la prise en charge thérapeutique future des LBDGC. Toutefois, elle reste complémentaire à l'analyse immunohistochimique qui est plus facilement accessible et moins coûteuse.

Cliniquement, identifier ces patients au cours du suivi de la maladie sous R-CHOP n'est pas une option intéressante. En effet, il a été montré que la « première marche » est capitale dans le devenir du patient et, qu'en cas de rechute lymphomateuse sous R-CHOP, le pronostic est très incertain. Ainsi, une identification précoce de ces patients réfractaires, avant même l'administration du traitement, reste encore aujourd'hui le principal objectif en pratique clinique.

Idéalement, il faudrait, à partir de marqueurs cliniques ou biologiques fiables, isoler un groupe de patients comme étant « probablement réfractaires ou résistants au R-CHOP » afin d'adapter leur prise en charge thérapeutique. Ainsi, ces patients pourraient bénéficier de traitements de première ligne plus agressifs ou plus ciblés que le R-CHOP.

A partir des données actuelles et des problématiques existantes dans les LBDGC, le but de notre travail est d'identifier des facteurs prédictifs de la réponse au R-CHOP dans cette maladie.

Afin de répondre à notre objectif, nous constituerons une cohorte homogène de LBDGC, NOS traités par R-CHOP en première ligne, en respectant des critères d'inclusion précis puis en réalisant des Tissus MicroArrays (TMA). Nous évaluerons ensuite différents facteurs prédictifs connus dans les LBDGC avant de les corrélés entre autres, aux données de survie.

Enfin, en prenant appui sur les données préliminaires *in vitro* dont nous disposons et qui suggèrent que CYCLON est impliqué dans la résistance au Rituximab, nous chercherons à confirmer *in vivo* ces résultats. Nous prendrons soin également de nous intéresser aux protéines interagissant autour de CYCLON afin d'évaluer l'impact pronostique de ce réseau protéique dans les LBDGC.

VII. Evaluation de différents facteurs pronostiques connus dans les LBDGC

L'objectif de cette étude est de s'intéresser à l'impact pronostique de différents facteurs morphologiques et immunohistochimiques déjà connus dans les LBDGC : l'aspect morphologique en « ciel étoilé », l'expression de MYC, BCL2, p53, CD5, CD23, MUM1, EBV, le statut double expresseur et l'index de prolifération.

Il a également été réalisé une étude moléculaire par FISH afin de rechercher les réarrangements des gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6* et d'isoler les HGBL DHL / THL. Ces données ont été complétées par une analyse complémentaire par NGS sur un panel de 50 gènes impliqués dans la lymphogénèse des LBDGC.

L'ensemble de ces résultats ont été corrélés avec les données de survie des patients composant la cohorte de LBDGC, NOS traités par R-CHOP en première ligne.

**c-MYC AND p53 EXPRESSION HIGHLIGHT STARRY-SKY PATTERN AS A
PROTECTIVE CO-FACTOR IN R-CHOP TREATED DIFFUSE LARGE B-CELL
LYMPHOMA**

Antonin Bouroumeau^{1,3}, Lucile Bussot², Thierry Bonnefoix^{3,4}, Cyril Fournier⁵, Mary B. Callanan⁵, Anne McLeer¹, Edwige Col¹, Laurence David-Boudet¹, Christine Lefebvre⁶, Tatiana Raskovalova⁶, Marie-Christine Jacob⁶, Claire Vettier⁶, Simon Chevalier⁶, Rémy Gressin², Anouk Emadali^{3,4}, Hervé Sartelet¹

1. Department of Pathology, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France
2. Department of Clinical Hematology, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France
3. Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209 / CNRS UMR 5309 / Grenoble-Alpes University, Grenoble, France
4. Pole Recherche, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France
5. Unit for Innovation in Genetics and Epigenetics in Oncology and Dijon University Hospital, University of Bourgogne, INSERM 1231, Dijon, France
6. Hematology, Oncogenetics and Immunology Unit, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France

Running title: c-MYC, p53 and “starry-sky” in DLBCL treated by R-CHOP

Corresponding author:

Dr H Sartelet

Address: Department of Pathology, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble Alpes, Avenue Maquis du Grésivaudan, Grenoble, France

Phone: (33)0476767575

E-mail: hsartelet@chu-grenoble.fr

Word count: 3716 words

The authors declare they have no conflict of interest.

Article ayant fait l'objet d'une soumission dans Journal of Pathology.

ABSTRACT

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) is a clinically heterogeneous entity, in which first-line treatment currently consists in an immuno-chemotherapy regimen (R-CHOP). However, about 30% of patients will not primarily respond or relapse. Overexpression of c-MYC or p53 is frequently found in DLBCL, but its association with prognosis remains controversial, as for other biomarkers previously linked with DLBCL aggressivity (CD5, CD23 or BCL2). The aim of this study is to explore the expression of these biomarkers and their correlation with outcomes, clinical or pathological features in a DLBCL cohort. Immunohistochemical (c-MYC, p53, BCL2, CD5, CD23), morphological (“starry-sky” pattern), NGS and FISH analyses were performed on Tissue Microarray blocks for a retrospective cohort of 97 patients with R-CHOP treated *de novo* DLBCL. In univariate analysis, p53 overexpression (p53^{high}) was associated with unfavorable outcomes (p=0.03) and with c-MYC overexpression (p=0.02) whereas c-MYC overexpression was linked with a “starry-sky” pattern (p=0.003) but was only tended to an inferior prognosis (p=0.1). In multivariate assessment, presence of a “starry-sky” morphology was correlated with better survival in p53^{high} DLBCL (p=0.02) and/or c-MYC-positive DLBCL (p=0.002). Furthermore, NGS data revealed that these three variables were associated with several gene mutations involved in cell survival regulation (*PIMI1*, *TNFRSF14*, *FOXO1*, *B2M*). Altogether, these results show that “starry-sky” pattern is a protective factor in high-risk DLBCL subgroups and highlight cell death as a built-in failsafe mechanism to control tumor growth.

Keywords: DLBCL, R-CHOP, p53, Prognostic, Starry-sky, c-MYC, Protective, Factor

Introduction

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) is a clinically heterogeneous entity, accounting for around 30 percent of all lymphomas [1] and are the most common hematological malignancy in Western countries [2,3]. DLBCL is also among the most aggressive lymphoid neoplasms, with a 5-years Overall Survival (OS) around 50 percent [4]. Currently, a significant proportion of patients will still not primarily respond or relapse with the today standard of care, R-CHOP (Rituximab, a humanized monoclonal CD20 antibody plus Cyclophosphamide, Doxorubicin Hydrochloride, Vincristine Sulfate and Prednisone). Although outcomes in DLBCL have improved with this immuno-chemotherapy [5,6], around 10 to 15 percent of patients exhibit primary refractory disease and an additional 20 to 25 percent relapse, usually within the first 2 years [5]. These refractory or relapse highlight the limits of R-CHOP and the need for new predictive biomarkers that would guide individualized risk-adapted therapy [7]. Currently, the only robust prognostic factor is the International Prognostic Index (IPI) score [8], revised in the era of R-CHOP [9] (r-IPI), which segregates patients into different outcome groups.

Advances in molecular genetics have confirmed DLBCL biological heterogeneity [10,11] through the identification of several alterations leading to oncogenes activation and modulation of tumor suppressors activity [12,13]. Patterns of gene expression reminiscent of germinal center B cell (GCB group) and activated B cell (ABC group) allowed to define the “cell of origin” DLBCL classification, the GCB subtype being associated with better prognosis [10]. New entities have also been described such as High-Grade B-cell Lymphoma (HGBL), encompassing HGBL Double-Hit (DHL) / Triple-Hit Lymphomas (THL) and HGBL, NOS. HGBL DHL or THL are defined by *c-MYC* and *BCL2* and/or *BCL6* rearrangements whereas HGBL, NOS present a blastoid morphology or an intermediate aspect between DLBCL, NOS and Burkitt Lymphomas and lacking DHL or THL [14,15].

More recently, different molecular DLBCL subgroups associated with outcomes have been uncovered based on mutational profile [16,17]. However, although these investigations shed light on DLBCL biological heterogeneity and revealed new potential therapeutic targets, they fail to precisely discriminate high-risk DLBL patients.

ImmunoHistoChemistry (IHC) is routinely used to classify DLBCL as GCB or non-GCB using the Hans' algorithm [18] and evaluate expression of several biomarkers associated with DLBCL aggressivity, including *c-MYC*, *BCL2*, *p53*, *CD5* or *CD23*. Of note, *MYC*, *BCL2* and *BCL6* overexpression may occur independently of *c-MYC*, *BCL-2* or *BCL-6* gene rearrangement [19].

Several IHC biomarkers are used to get an idea of DLBCL aggressivity, including *c-MYC*, *BCL2*, *p53*, *CD5* or *CD23*. *c-MYC* is a proto-oncogene encoding a transcription factor controlling different cellular processes such as cell cycle and cell growth [20]. Its oncogenic activation has been described in Burkitt Lymphomas and in 10% of DLBCLs [19,21]. It has been proven that *c-MYC* rearrangement has an adverse effect on survival in R-CHOP treated DLBCL, especially if the partner gene is an Immunoglobulin (Ig) [22]. Although *c-MYC* protein expression is found in 30 to 50% in DLBCL (according to standard cut-off values) [23], its survival significance is still controversial even if it seems to correlate with poorer outcomes in the Rituximab era [19,23–25]. *BCL2* is an anti-apoptotic gene coding for *BCL2* protein which is frequently overexpressed in approximately 50% of DLBCL [26] and has been a well-recognized prognostic factor in the pre-Rituximab era [27,28]. Nowadays, the addition of Rituximab can mitigate the adverse effects of *BCL2* expression, especially in the ABC subtype [29,30]. Furthermore, Double Expressor Lymphoma (DEL), defined by co-expression of *c-MYC* and *BCL2*, are also associated with a poor prognostic effect but with a stronger negative impact than *BCL2* or *MYC* overexpression taken individually [14,31]. The *p53* (or *TP53*) protein is encoded by *p53* gene, a well-known tumor suppressor mediating

several crucial cell functions such as cell-cycle arrest, apoptosis or DNA reparation [32]. Thus, *p53* mutations (gain or loss-of-function) are found in many cancers, including in 20% of DLBCL [13] and are conferring inferior survival [33,34]. Protein overexpression is more common (30 to 40% of DLBCL are *p53*-positive, depending on positivity threshold) and is also predictive of poorer prognosis in R-CHOP treated DLBCL [33,35]. Moreover, some studies highlighted that *p53* overexpression enhanced *c-MYC* adverse effect in DLBCL, identifying a high-risk of relapses subgroup of patients co-expressed *c-MYC* and *p53* [34,36]. Others IHC biomarkers can also be used, like CD5 and CD23, positive in 5 to 10% of DLBCL [37,38] but their significance still remain controversial. On the one hand, CD23 is expressed on naïve B cells and follicular dendritic cells and its overexpression has been associated with unfavorable outcomes in DLBCL [38,39]. On the other hand, CD5 is expressed on normal T-cells but as it is also positive in others lymphoid malignancies (Chronic Lymphocytic Leukemia, Mantle Cell Lymphoma), further analyses are needed (Cyclin D1 and SOX11) to exclude these differential diagnoses. *De novo* CD5-positive DLBCL seems to be associated with adverse clinical and biological features [40] and with poorer OS and Progression Free Survival (PFS) after chemotherapy, as compared to CD5-negative DLBCL. [37,41].

Finally, some DLBCL showed a morphological “Starry-Sky” Pattern (SSP), defined by tingible body macrophages (“stars”) compounded with tumoral cells (“sky”), which is a reflection of a high mitotic rate and a high degree of apoptosis [42]. This morphology is usually found in Burkitt lymphoma and is defined by tingible-bodied macrophages (appearing as “stars” because containing cellular debris within their cytoplasm) intermingle with a “sky” of tumor cells. Macrophage proliferation in SSP has been described as promoted by lymphoma cell apoptosis [43].

The aim of the present study is to explore, in a retrospective cohort of R-CHOP treated DLBCL, the correlation between SSP and expression of several biomarkers (c-MYC, p53, BCL2, CD5, CD23) with outcomes, clinical and pathological features.

Materials and Methods

Patients selection

Ninety-seven patients were collected based on a monocentric retrospective study in Grenoble, France (Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes and Institut Daniel Hollard, department of Hematology) from January 2011 to December 2018. Based on different lists from all DLBCLs pathological diagnostics, each case was reviewed to ensure compliance with the following inclusion criteria. DLBCL tumors had to be *de novo*, all patients with an history of other lymphoma and all relapses were excluded. Primitive cerebral DLBCLs, DLBCL leg type and Primary Mediastinal B-cell Lymphoma were eliminated because of their particular pathological and biological presentations. Treatment had to be R-CHOP in first line (at least 3 cycles realized). Tissues had to be Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (AFA fixation was excluded to avoid IHC bias) and enough residual material had to be available to make a Tissue Micro Array (TMA) (needle biopsies were not included). All patients had to sign a consent form. Finally, biological and clinical data were collected for each patient and included especially gender, age, IPI score, Ann Arbor stage, serum Lactate Dehydrogenase level, a precise therapeutic and survival scheme with a long-term follow-up. DLBCLs were classified according to the WHO classification with the GCB or non-GCB status. Then, it was also checked if DLBCL had a morphological SSP.

TMA construction

Five TMAs blocks were built as previously described [44]. TMAs were composed by four 6µm cores of each patient and non-tumoral samples were also added as internal positive control (normal appendix and testis). A detailed Excel[®] file was used for each TMA, specifying the tumor identity of each spot.

Morphological analysis

Spots were reviewed by a morphological analysis (HES staining) to exclude those with an unrepresentative aspect (fibrotic or necrotic changes) and to ensure that any case showed a morphology compatible with a HGBL, NOS.

Immunohistochemistry

IHC analysis was performed on 4- μ m sections from TMA blocks. The fully automated (baking, deparaffinization, cell conditioning and staining, IHC, counter stain and titration) *Benchmark Ultra ROCHE Diagnostic System (Ventana)* was used for all antibodies tested. Nine antibodies were performed for each TMA: c-MYC, BCL2, p53, CD5, CD23, MUM-1 Cyclin D1, SOX11, Ki67 and the routinely procedure was followed (Supplementary Table 1). c-MYC was used with a *Ventana Amplification Kit (ROCHE VENTANA - ref 760-080)* to increase the staining intensity. Cutoffs for positivity of c-MYC was more than 40% of tumor cells showing immunoreactivity whereas thresholds for BCL2, p53 CD5 and CD23 were more than 50%, in accordance with previously established cutoffs [31,33,37,38]. For Ki-67, results were rendered semi quantitatively on a scale from 1 to 4+, according to the percentage positivity of cells (1+ [1-25%], 2+ [26-50%] and 3+ [51-75%] and 4+ [76-100%]) [18]. IHC staining was blindly scored by two different pathologists (AB and HS) and discordant cases have been the subject of a joint proofreading.

MUM1, Cyclin D1 and SOX11 antibodies were used to exclude DLBCL with *IRF4* rearrangement and differential diagnoses for all *de novo* CD5-positive DLBCL.

EBER in situ hybridization

To search DLBCL EBV positive, NOS, EBER in situ hybridization (ISH) was performed on deparaffinized 4- μ m sections from TMA blocks and using a *Ventana* fully automated tissue stainer with *INFORM iView Blue ISH* detection kit. A fluorescein-conjugated EBER oligonucleotide probe was used and the slides were then counterstained with *Red Counterstain II*. The reading was made by two different pathologists (AB and HS) and 80% of EBER-positive tumoral cells was the cut-off applied to consider a DLBCL EBV-positive [1].

FISH

FISH was performed using 4 μ m TMA sections. All samples were tested by *MYC*, *BCL2* and *BCL6* break-apart FISH using respectively the ZytoLight® SPEC *MYC* Dual Color Break Apart Probe, the ZytoLight® SPEC *BCL2* Dual Color Break Apart Probe and the ZytoLight® SPEC *BCL6* Dual Color Break Apart Probe. Furthermore, a Vysis LSI *IGH/MYC/CEP 8* Tri-Color Dual Fusion Probe Kit was used to determine if *IGH* was the partner gene of *MYC* rearrangement. At least 100 tumor nuclei were analyzed for each sample. Nuclei were counterstained with DAPI/Vectashield® (Vektor Laboratories, Burlingame, CA, USA) and were analyzed with a Leica CytoVision GSL10 FISH fluorescence capture system® (Leica, Nanterre, France) under a 63x oil immersion objective. Signals were enumerated with the CytoVision imaging system® (Leica). A cut-off value of 10% of the cells showing rearrangement was selected to confirm mutation for a specimen.

Targeted NGS sequencing

Four 6 μ m FFPE core biopsies were used per case at the same time as we built TMAs. DNA was extracted by QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Qiagen). DNA quality was assessed by tapestation protocol and quantified for NGS by Qubit. Targeted sequencing was

performed by a capture approach covering 51 genes that present mutations in DLBCL, Follicular Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia. Libraries were prepared by standard procedures using 50 ng of DNA and KAPA HyperPlus kit (Roche). Libraries were purified, quantified and barcoded before being submitted to Illumina sequencing by NextSeq 500/550 Mid Output Kit V2 (300 cycles) kit on a Nextseq 550 Illumina sequencer. Somatic mutation calling was performed using an in-house and commercial sequence alignment, variant caller and annotation pipeline. Somatic mutations that affected protein coding regions (non-synonymous), and at exon splice site junctions were retained for analysis.

Statistics

OS and PFS were assessed by Kaplan-Meier analyses and Cox regression. The starting point for time-to-event analysis was the date of the pathological diagnosis. Observational intervals of patients without any event at the time of the last follow up or at 7.5 years after diagnosis were censored. The proportional-hazards assumption was checked on the basis of Schoenfeld residuals after cox model fitting. The concordance probability, which is defined as the probability that predictions and outcomes are concordant were provided by Harrell's C and Gönen and Heller's concordance coefficients.

All statistical analyses were performed using Stata 16.1 (Stata Corporation, College Station, Texas) and R statistical software 3.5.0 (StataCorp LLC, College Station, Texas). All statistical tests were two-sided, and the level of significance was set at $p < .05$.

Results

Cohort clinical characteristics

A total of 97 patients were included and the main clinical characteristics are presented in Table 1. Briefly, in this cohort, the repartition of gender was equal with a low predominance of male (55.6%) and a median age of 68 years old. The average time of long-term follow-up was over 4 years (51 months). About half of the patients presented an advanced stage DLBCL (stage Ann Arbor IV in 46.4% and a 3 to 5 IPI-score in 48.5%).

Cohort pathological features

The main pathological characteristics are summarized in Table 2. After morphological assessment, all DLBCL showed a typical morphology without finding HGBL, NOS. SSP was seen in 29.9% of cases (Figure 1A). Using Hans' algorithm, it was observed more non-GCB DLBCL than GCB subtype (62.9% vs 37.1%). In IHC, p53 was positive (so called p53^{high}) in 38.7% of DLBCL (Figure 1B), c-MYC was expressed in one-third of cases (32/97, Figure 1C) while BCL2 was overexpressed in 59 patients (60.8%, Figure 1D). Thus, patients with DEL accounted for nearly one-quarter of this cohort (22.7%). CD5 expression was observed in 9 cases (9.3%, Figure 1E) and 10 patients were CD23 positive (10.3%, Figure 1F). Of note, all CD5-positive DLBCL were negative for Cyclin D1 and SOX11 and no MUM1 overexpression compatible with an *IRF4* rearrangement was observed. Using Ki67 staining, more than half cases showed a 4+ proliferation index (52.6%). Only one patient presented a positive EBER HIS.

FISH analyses revealed 8 patients with *MYC* rearrangement (Figures 2A and 2B), including 4 cases of *MYC-IgH* rearrangement (Figures 2C and 2D) but only 3 HGBL DHL or

THL. It should be noted that the 8 patients with *MYC* rearrangement were *MYC*-positive in IHC.

Cohort validation

As expected, this cohort shows the poorer outcome associated to non-GCB subtype compared to GCB DLBCL (Supplementary Figure 1A, p-value = 0.01). Prognostic impact of IPI-score was also confirmed with better outcome for patients with IPI = 0 compared to patients with IPI = 1-2 or IPI = 3 to 5 (Supplementary Figure 1B, p-value = 0.0009).

Impact of c-MYC-positive DLBCL on clinical features and outcomes

c-MYC overexpression was significantly correlated with IPI score higher than 2 (OR = 2.9, p-value = 0.02), with SSP (HR = 4.0 p-value = 0.003) and with 4+ proliferation index (HR = 5.35, p-value = 0.001). Taken individually, c-MYC overexpression (Figure 3A, p-value = 0.10) and SSP (Supplementary Figure 2A, p-value = 0.34) were not significantly linked with survival in univariate analysis. However, c-MYC positive DLBCL without SSP defined a subgroup of patients with poorer survival compared to those showing SSP (for OS, Figure 3B, p-value = 0.002 and for PFS, Supplementary Figure 2B, p-value = 0.001).

Impact of p53^{high} DLBCL on clinical features and outcomes

In univariate survival analysis, p53^{high} DLBCL presented poorer outcomes (Figure 3C, p-value = 0.03). This p53 prognostic impact was even stronger when DLBCL do not present SSP (Figure 3D, p-value = 0.02). Moreover, in the present study, p53 overexpression was linked with c-MYC overexpression (HR = 5.10, p-value = 0.02) but not with SSP. SSP DLBCL morphology is also able to segregate two prognosis group within p53^{high} and c-MYC-positive DLBCL (Supplementary Figure 2E, p-value = 0.001).

Impact of other biomarkers on clinical features and outcomes

None of other biomarkers examined showed a correlation with outcomes (DEL, BCL2-positive DLBCL, CD23-positive DLBCL and CD5-positive DLBCL) in univariate analysis. But, as c-MYC and p53, DEL showing SSP was associated with better outcomes (Supplementary Figure 2C, p-value = 0.002) and the same applies for DLBCL with a 4+ proliferation index (Supplementary Figure 2D, p-value = 0.03). Of note, both of DEL (HR = 4.09, p-value = 0.006) and 4+ proliferation index DLBCL (HR = 3.32, p-value = 0.013) were correlated with SSP.

Correlation with NGS data

NGS lymphopanel sequencing was performed in 48 DLBCL and then correlated with p53 and c-MYC expression in IHC and DLBCL morphology (Figure 4). The most frequently mutated gene was *TP53* (16/38, 42.1%) and mutations profiles were broadly in line with GCB versus ABC patterns. c-MYC overexpression seems enriched for *B2M* and *FOXO1* mutations (6 of 18 cases in c-MYC-positive DLBCL compared to 1 of 30 cases in c-MYC negative DLBCL, HR = 8.2, p-value = 0.004).

SSP DLBCL was not significantly associated to any specific mutational profile. Nevertheless, some degree of correlation was observed between DLBCL without SSP and *TNFRSF14* mutations without reaching significance threshold (9 of 32 cases, HR = 3.09, p-value = 0.07). *TNFRSF14* mutations was significantly linked with p53^{high} DLBCL without SSP (5 of 14 cases, HR = 3.70, p-value = 0.05).

Finally, in p53^{high} subgroup, 5 of 8 cases with SSP DLBCL showed *PIMI* mutations, compared to 1 of 14 DLBCL without this pattern (HR = 7.8, p-value = 0.005).

Discussion

The aim of the study was to assess impact of different biomarkers on survival in R-CHOP treated DLBCL. To achieve this evaluation, we established a retrospective cohort representative of *de novo* DLBCL in term of baseline characteristics, including poorer outcomes for patients with a high IPI score and a non-GCB subtype, both known as robust prognostic factors in DLBCL [7,18].

c-MYC protein overexpression was found in one-third cases, in agreement with previous data [23,24]. In univariate analysis, this overexpression showed only a weak trend with survival but some studies have drawn similar conclusions [31,45]. c-MYC expression prognostic impact still remains controversial in DLBCL. This could be explained by the absence of consensus in IHC cutoff positivity or sometimes by a lack of treatment homogeneity in the cohort resulting in a substantial percentage of patients not only treated by R-CHOP. Furthermore, as described before, c-MYC-positive DLBCL showed in this study a strong interaction with high IPI-score [24,25] and high proliferation index [19,31].

On the one hand, c-MYC overexpression was significantly associated with the presence of SSP, as once described [46]. Moreover, a multivariate analysis confirms that these two factors could stratify DLBCL patients into prognostically relevant subgroups. These data strongly suggest that the adverse effect of c-MYC expression on survival could be outbalance by SSP, which is correlated with a high apoptotic rate in the tumoral proliferation [43], indicating that a high-degree of apoptosis is a protective factor in c-MYC-driven DLBCL.

This is consistent with the observation that overexpression of c-MYC could induce apoptosis but in the presence of other cooperative actors such as p53 [47], which is thought to be a built-in failsafe cell mechanism [48,49]. This biological activity, provoking cellular suicide to counteract oncogenic proliferation [48] represent a crucial checkpoint in MYC-

induced tumors [50]. This would be consistent with our data showing that DLBCL with a high apoptotic rate outbalance c-MYC overexpression in term of survival impact.

Regarding p53 expression, in accordance with previous works [34], p53^{high} DLBCL subgroup was associated with c-MYC overexpression and with unfavorable outcomes. Moreover, p53 expression prognostic impact was even stronger in combination with SSP. As for c-MYC, p53^{high} DLBCL without SSP had worse outcomes. The same applies for both c-MYC-positive and p53^{high} cases confirming apoptosis as a protective factor in p53 and c-MYC-driven lymphomas. This could be explained by the well-known role of p53 in cell survival [51] and by the p53 expression upregulation by c-MYC [48].

In this cohort, NGS data revealed that p53, c-MYC and SSP were linked with a specific mutational profile including several cell survival gene, such as *FOXO1*, *B2M*, *TNFRSF14* and *PIM1*.

c-MYC positive DLBCL presented a significant enrichment for *FOXO1* and *B2M* mutations. FOXO transcription factors and *FOXO* genes are known to interact with c-MYC pathway apoptosis by participating to c-MYC and p53 regulation loop [52,53]. Mutations in *FOXO* genes, which are therefore considered as tumor suppressors, are also associated with decreased OS in c-MYC-driven DLBCL [53,54]. On the other hand, *B2M* mutations completely blocked *B2M*-mediated apoptosis program [55], representing an other independent pathway by which MYC-driven DLBCL could escape apoptosis.

Then, we found that p53^{high} DLBCL without SSP have more *TNFRSF14* mutations which are known to be associated with unfavorable prognosis in follicular lymphomas [56]. In physiological conditions, this gene has a key role in cell survival and homeostasis of T and B cells but it also regulates the tumor microenvironment [55,57]. It is considered as a tumor-suppressor gene, inducing apoptosis and immune response against tumor cells [57].

Conversely, *TNFRSF14* mutations seem to create a tumor-supportive microenvironment and promote tumorigenesis [58]. Furthermore, it was shown loss of *TNFRSF14* can be restored using antibodies or peptides, highlighting this gene as an interesting therapeutic target [58]. *TNFRSF14* mutation frequency in p53^{high} DLBCL without SSP suggests that this gene is a major player in anti-tumor immune response and apoptosis in p53-driven DLBCL.

Lastly, *PIMI* mutations were significantly linked with p53^{high} DLBCL with SSP. This gene has a well characterized role in cell survival and is seen as a proto-oncogene acting synergically with proteins involved in cell death, especially p53 [59,60]. In fact, *PIMI* oncogenic effects are effective only if tumor cells can bypass p53-dependant apoptosis in inhibiting p53 expression. Thus, we make the assumption that, by maintaining p53 overexpression inducing high cell death level (SSP as a consequence), cells are protecting themselves from *PIMI* oncogenic mutation.

DEL counted for 22.7% of this cohort, a ratio in agreement with other studies [14,31]. Here, DEL was associated with SSP, which has not been yet described. DEL without SSP presented poorer outcomes than DEL with this morphology strengthening the association between activation of apoptotic pathways and improved survival. 60.8% of DLBCL cases were BCL2-positive [29,31] but they were not associated with poorer outcomes, consistently with a large number of studies on R-CHOP treated DLBCL [29,30]. These data strongly suggest that the adverse effect of BCL2 overexpression on DLBCL outcome could be mitigated by the addition of Rituximab as previously reported [29,30]. Finally, we found expected proportion of *de novo* CD5-positive (9 cases) and CD23-positive DLBCL (10 cases) [37,38] but they were not associated with outcomes but these results should be taken with precaution because of small number of positive cases.

In conclusion, on a representative cohort of DLBCL uniformly treated by R-CHOP in first line, only p53 overexpression is associated with poorer outcomes in univariate analysis. However, c-MYC and p53 overexpression are associated with survival when combined with SSP, which is a morphological pattern found in lymphomas with a high rate apoptosis [43]. Thus, persistence of a high rate apoptosis has a protective impact when c-MYC and/or p53 are overexpressed. This pro-apoptotic environment, controlled by several key genes including *c-MYC*, *p53*, *FOXO1*, *B2M*, *TNFRSF14* and *PIMI* would therefore be repressing tumor progression. Altogether, these results highlight an apoptosis-mediated network involving in DLBCL which impacts outcomes, plays a tumor-suppressive role and contains potential therapeutic targets. Nevertheless, all these preliminary observations need to be confirmed on larger scales.

ABBREVIATIONS

ABC: Activated B-Cell

DEL: Double Expressor Lymphoma

DHL / THL: Double Hit Lymphoma / Triple Hit Lymphoma

DLBCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma

GCB: Germinal Center B-cell

HGBL: High Grade B-cell Lymphoma

IHC: Immunohistochemistry

IPI: International Prognostic Index

OS: Overall Survival

PFS: Progression-Free Survival

R-CHOP: Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin Hydrochloride, Vincristine Sulfate,
Prednisone

SSP: “Starry-Sky” Pattern

TMA: Tissue MicroArray

Author contributions statement

AB, HS, AE and TB conceived and carried out experiments and statistics. LB and RG collected clinical data. AML achieved FISH analysis. EC and LDB did IHC and HIS assessments. MC and CF realized NGS data. The other authors helped built cohort. All authors were involved in writing the paper and had final approval of the submitted and published versions.

REFERENCES

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; **127**; 2375-2390.
- 2 Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, et al. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes: 2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2016; **66**; 443-459.
- 3 Laurent C, Baron M, Amara N, et al. Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. *JCO* 2017; **35**; 2008-2017.
- 4 Smith A, Crouch S, Lax S, et al. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004–2014: sub-type analyses from the UK’s Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2015; **112**; 1575-1584.
- 5 Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d’Etudes des Lymphomes de l’Adulte. *Blood* 2010; **116**; 2040-2045.
- 6 Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *The Lancet Oncology* 2011; **12**; 1013-1022.
- 7 Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 2015; **125**; 22-32.
- 8 A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin’s Lymphoma | NEJM. New England Journal of Medicine.
- 9 Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007; **109**; 1857-1861.
- 10 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000; **403**; 503.
- 11 Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2002; **346**; 1937-1947.
- 12 Lenz G, Wright GW, Emre NCT, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**; 13520-13525.
- 13 Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2018; **131**; 2307-2319.

- 14 Rosenthal A, Younes A. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev* 2017; **31**; 37-42.
- 15 Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011; **117**; 2319-2331.
- 16 Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nature Medicine* 2018; **24**; 679-690.
- 17 Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2018; **378**; 1396-1407.
- 18 Hans CP. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; **103**; 275-282.
- 19 Horn H, Ziepert M, Becher C, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013; **121**; 2253-2263.
- 20 Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)* 2017; **8**.
- 21 Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009; **114**; 3533-3537.
- 22 Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 2015; **126**; 2466-2474.
- 23 Karube K, Campo E. MYC Alterations in Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Seminars in Hematology* 2015; **52**; 97-106.
- 24 Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzmann T, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 2013; **98**; 1554-1562.
- 25 Zhou M, Wang J, Ouyang J, et al. MYC protein expression is associated with poor prognosis in diffuse large B cell lymphoma patients treated with RCHOP chemotherapy. *Tumor Biol.* 2014; **35**; 6757-6762.
- 26 Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann Oncol* 2014; **25**; 2124-2133.
- 27 Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. ; 9.

- 28 Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non- Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). ; 9.
- 29 Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, et al. BCL2 Predicts Survival in Germinal Center B-cell–like Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with CHOP-like Therapy and Rituximab. *Clin Cancer Res* 2011; **17**; 7785-7795.
- 30 Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 2003; **101**; 4279-4284.
- 31 Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent Expression of MYC and BCL2 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol* 2012; **30**; 3452-3459.
- 32 Zilfou JT, Lowe SW. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; **1**.
- 33 Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2012; **120**; 3986-3996.
- 34 Wang XJ, Jeffrey Medeiros L, Bueso-Ramos CE, et al. P53 expression correlates with poorer survival and augments the negative prognostic effect of MYC rearrangement, expression or concurrent MYC/BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Modern Pathology* 2017; **30**; 194-203.
- 35 Young KH, Leroy K, Møller MB, et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* 2008; **112**; 3088-3098.
- 36 Xie Y, Bulbul MA, Ji L, et al. p53 Expression Is a Strong Marker of Inferior Survival in De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma and May Have Enhanced Negative Effect With MYC CoexpressionA Single Institutional Clinicopathologic Study. *Am J Clin Pathol* 2014; **141**; 593-604.
- 37 Zhao P, Li L, Zhou S, et al. CD5 expression correlates with inferior survival and enhances the negative effect of p53 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematological Oncology* 2019; **37**; 360-367.
- 38 Linderoth J, Jerkeman M, Cavallin-Ståhl E, et al. Immunohistochemical Expression of CD23 and CD40 May Identify Prognostically Favorable Subgroups of Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Nordic Lymphoma Group Study. ; 8.
- 39 Linderoth J, Ehinger M, Jerkeman M, et al. CD40 expression identifies a prognostically favourable subgroup of diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 2007; **48**; 1774-1779.
- 40 Jain P, Fayad LE, Rosenwald A, et al. Recent advances in de novo CD5 + diffuse large B cell lymphoma. *Am. J. Hematol.* 2013; **88**; 798-802.

- 41 Xu-Monette ZY, Tu M, Jabbar KJ, et al. Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget* 2015; **6**; 5615-5633.
- 42 Chuang S-S, Ye H, Du M-Q, et al. Histopathology and Immunohistochemistry in Distinguishing Burkitt Lymphoma From Diffuse Large B-Cell Lymphoma With Very High Proliferation Index and With or Without a Starry-Sky Pattern: A Comparative Study With EBER and FISH. *Am J Clin Pathol* 2007; **128**; 558-564.
- 43 Ford CA, Petrova S, Pound JD, et al. Oncogenic Properties of Apoptotic Tumor Cells in Aggressive B Cell Lymphoma. *Curr Biol* 2015; **25**; 577-588.
- 44 AU - Kampf C, AU - Olsson I, AU - Ryberg U, et al. Production of Tissue Microarrays, Immunohistochemistry Staining and Digitalization Within the Human Protein Atlas. *JoVE* 2012; e3620.
- 45 Green TM, Young KH, Visco C, et al. Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *JCO* 2012; **30**; 3460-3467.
- 46 Oliveira CC, Maciel-Guerra H, Kucko L, et al. Double-hit lymphomas: clinical, morphological, immunohistochemical and cytogenetic study in a series of Brazilian patients with high-grade non-Hodgkin lymphoma. *Diagn Pathol* 2017; **12**.
- 47 Hoffman B, Liebermann DA. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 2008; **27**; 6462-6472.
- 48 Klapproth K, Wirth T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *British Journal of Haematology* 2010; **149**; 484-497.
- 49 Meyer N, Penn LZ. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer* 2008; **8**; 976-990.
- 50 Nilsson JA, Cleveland JL. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 2003; **22**; 9007-9021.
- 51 Sakamuro D, Eviner J, Elliott K, et al. c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* 1995; **11**; 2411-2418.
- 52 Fu Z, Tindall D. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* 2008; **27**; 2312.
- 53 Trinh DL, Scott DW, Morin RD, et al. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013; **121**; 3666-3674.
- 54 Bouchard C, Lee S, Paulus-Hock V, et al. FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev* 2007; **21**; 2775-2787.
- 55 Mori M, Terui Y, Ikeda M, et al. Beta(2)-microglobulin identified as an apoptosis-inducing factor and its characterization. *Blood* 1999; **94**; 2744-2753.

- 56 Cheung K-JJ, Johnson NA, Affleck JG, et al. Acquired TNFRSF14 Mutations in Follicular Lymphoma Are Associated with Worse Prognosis. *Cancer Res* 2010; **70**; 9166-9174.
- 57 Zhu Y-D, Lu M-Y. Increased expression of TNFRSF14 indicates good prognosis and inhibits bladder cancer proliferation by promoting apoptosis. *Mol Med Rep* 2018; **18**; 3403-3410.
- 58 Boice M, Salloum D, Mourcin F, et al. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* 2016; **167**; 405-418.e13.
- 59 Magnuson NS, Wang Z, Ding G, et al. Why target PIM1 for cancer diagnosis and treatment? *Future Oncol* 2010; **6**; 1461-1478.
- 60 Zemskova M, Lilly MB, Lin Y-W, et al. p53-Dependent Induction of Prostate Cancer Cell Senescence by the PIM1 Protein Kinase. *Mol Cancer Res* 2010; **8**; 1126-1141.

Parameters	Cohort [range] (proportion)
Median age (years old)	68 [31; 97]
Median age at time of diagnosis (years old)	65 [29; 94]
<ul style="list-style-type: none"> • > 60 years 	69.0% (67/97)
Gender	
<ul style="list-style-type: none"> • Male 	55.6% (54/97)
<ul style="list-style-type: none"> • Female 	44.4% (43/97)
Median time of treatment (days)	123 [13; 214]
Median time of follow up (days)	1561 [43; 2784]
Median time of follow up (months)	51 [1.5; 91.5]
Number of patients with relapse	39.2% (38/97)
Ann Arbor staging classification (time of diagnosis)	
<ul style="list-style-type: none"> • I (Single lymph node (LN) involves) 	11.3% (11/97)
<ul style="list-style-type: none"> • II (2 or more LN ipsilateral to the diaphragm) 	20.6% (20/97)
<ul style="list-style-type: none"> • III (LN on both sides of the diaphragm) 	21.6% (21/97)
<ul style="list-style-type: none"> • IV (Involvement extralymphatic organs or tissues) 	46.4% (45/97)
IPI score (time of diagnosis)	
<ul style="list-style-type: none"> • 0 	7.2% (7/97)
<ul style="list-style-type: none"> • 1-2 	44.3% (43/97)
<ul style="list-style-type: none"> • 3 to 5 	48.5% (47/97)
LDH > upper limit of normal	75.0% (73/97)

Table 1. Cohort description – clinical characteristics

Parameters	Cohort (proportion)
DLBCL subtype (Hans' algorithm)	
• GCB	37.1% (36/97)
• Non-GCB	62.9% (61/97)
“Starry sky” aspect pattern	29.9% (29/97)
CD5	
• Positive	9.3% (9/97)
• Negative	90.7% (88/97)
CD23	
• Positive	10.3% (10/97)
• Negative	89.7% (87/97)
c-MYC	
• Positive	33.0% (32/97)
• Negative	67.0% (65/97)
BCL2	
• Positive	60.8% (59/97)
• Negative	39.2% (38/97)
DEL (c-MYC+ and BCL2+)	22.7% (22/97)
p53	
• p53 ^{high} (≥ 50%)	38.7% (36/93)
• p53 ^{low} (< 50%)	61.3% (57/93)
Presence of <i>MYC</i> rearrangement (by FISH)	8.9% (8/89)
Presence of a <i>MYC-IgH</i> rearrangement (by FISH)	4.5% (4/89)
DHL / THL (by FISH)	3.4% (3/89)

Table 2. Cohort description – pathological characteristics

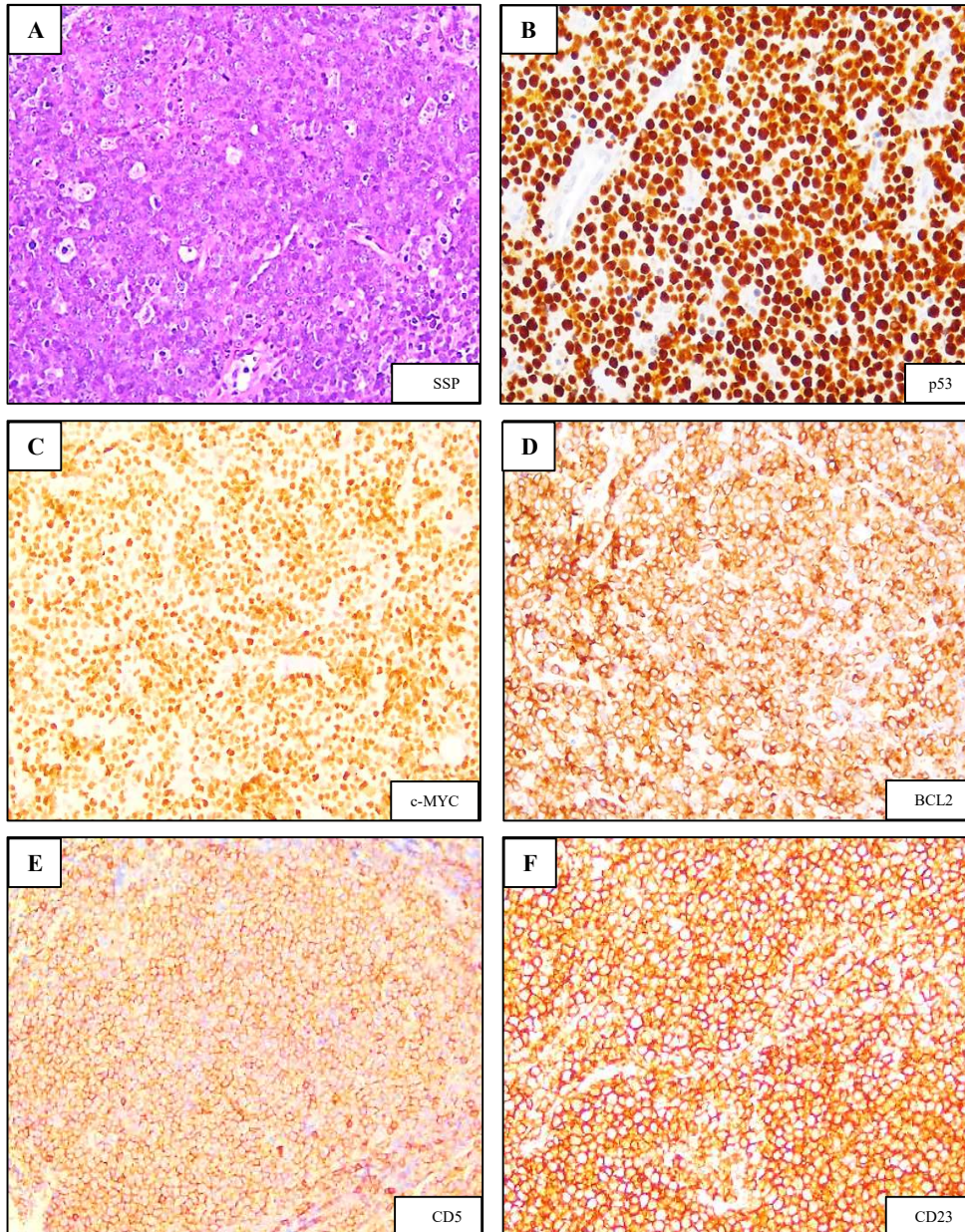


Figure 1. SSP and immunohistochemical biomarkers in R-CHOP treated DLBCL at x200 magnification.

SSP is characterized by the presence of tingible body macrophages compounded with tumoral cells (A). In IHC, positivity was defined by a strong nuclear staining for p53 (B) and c-MYC (C) or a diffuse cytoplasmic / membranous staining for BCL2 (D), CD5 (E) and CD23 (F).

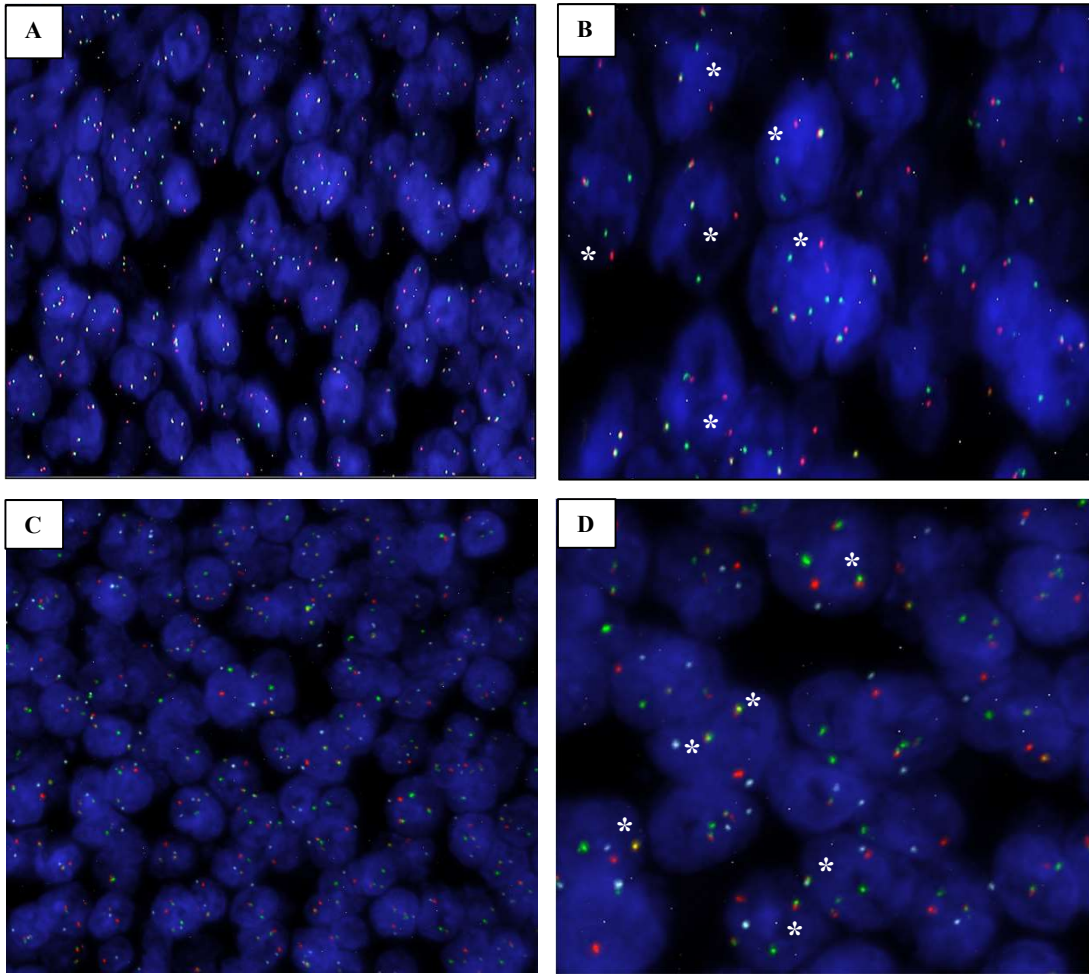


Figure 2. Illustration of a DLBCL with *MYC-IgH* rearrangement in FISH.

This case presented a *MYC* rearrangement, defined by split between red and green signals (2.A), better visualized at high magnification (2.B, white asterisk). Here, the partner gene of *MYC* rearrangement was *IgH* (2.C), as illustrated in bottom panels with double-color fusion signals (2.D, white asterisk).

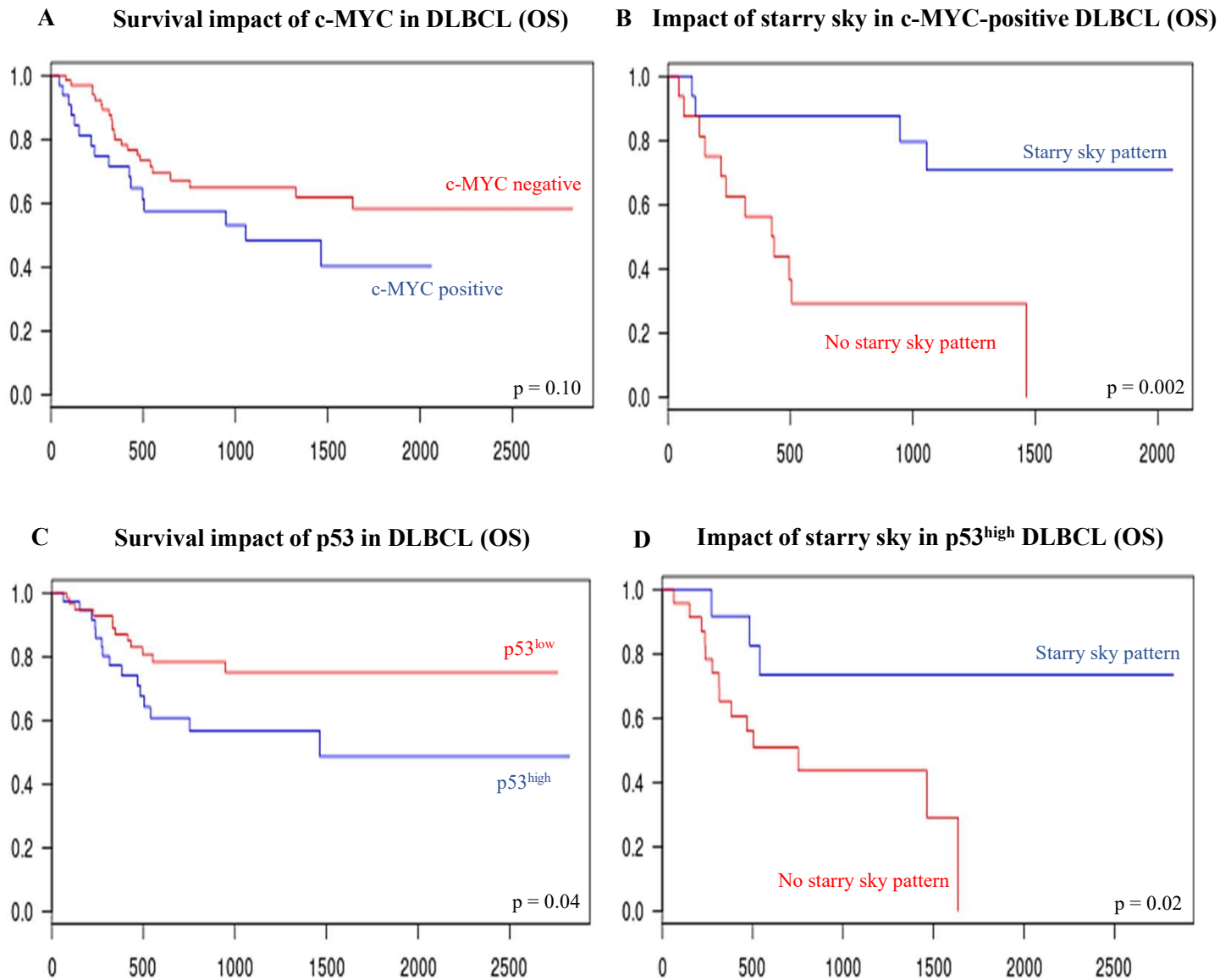


Figure 3. Survival impact of c-MYC and p53, depending on starry-sky pattern.

Kaplan-Meier analysis of OS for DLBCL c-MYC-positive (blue curve) or c-MYC-negative (red curve) (3.A).

Kaplan-Meier analysis of OS for DLBCL p53^{high} (blue curve) or p53^{low} (red curve) (3.C).

Kaplan-Meier analysis of OS for DLBCL c-MYC-positive (3.B) or p53^{high} DLBCL (3.D), depending on starry-sky pattern.

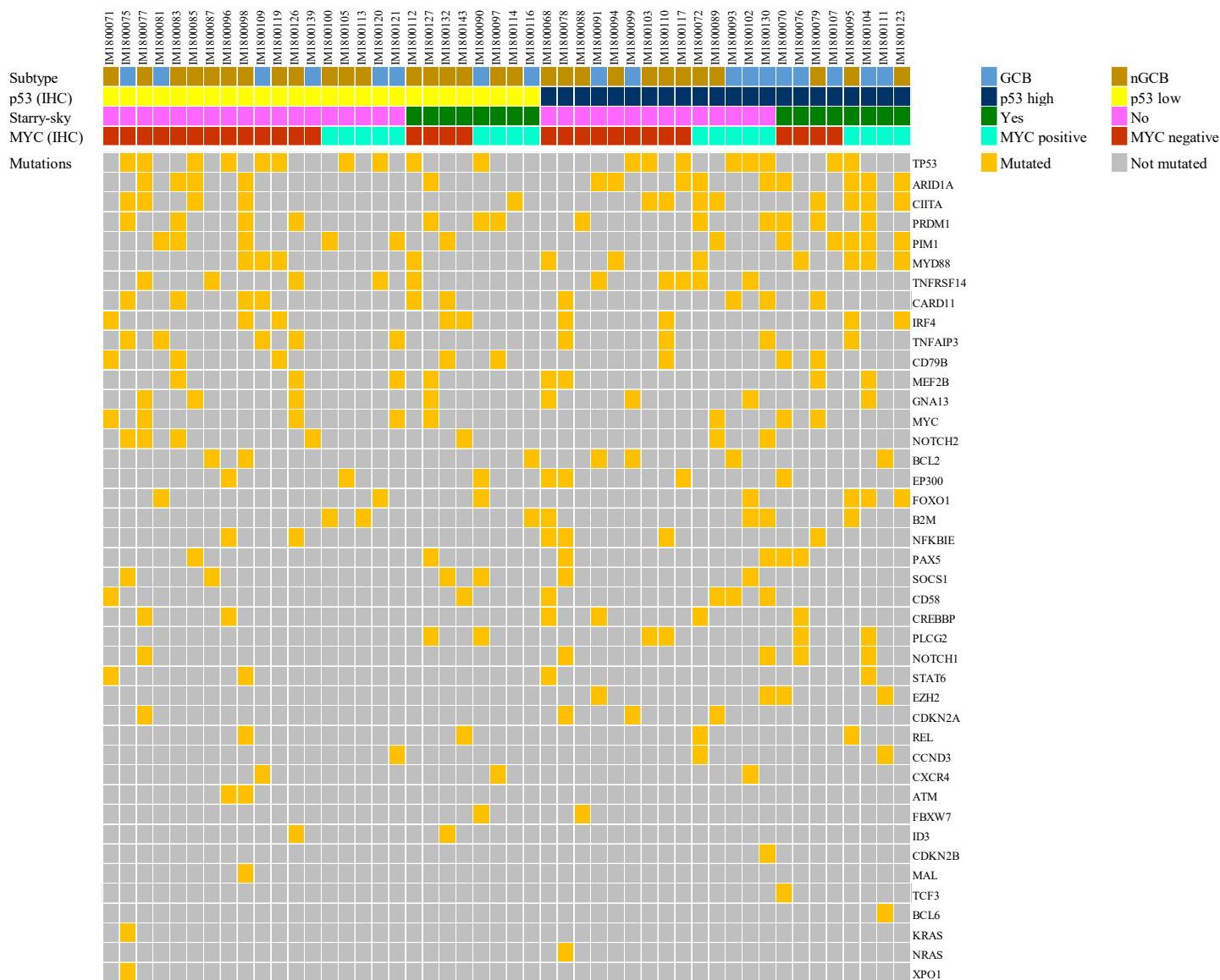


Figure 4. NGS heatmap on 48 DLBCL using a panel of 51 gene lymphoma panel.

Antibody (clone)	Type	Dilution	Retrieval solution	Source (reference)
CD5 (4C7)	Mouse monoclonal	1:75	Ventana CC1	Novocastra (NCL-L-CD5-4C7)
CD23 (SP23)	Rabbit monoclonal	1:200	Ventana CC1	ThermoScientific (RM-9123-S)
c-MYC (Y69)	Rabbit monoclonal	Prediluted	Ventana CC1	Roche (06504612001)
p53 (DO-7)	Mouse monoclonal	1:100	Ventana CC1	Dako (M7001)
MUM-1 (MUM1p)	Mouse monoclonal	1:50	Ventana CC1	Dako (M7259)
BCL2 (124)	Mouse monoclonal	1:20	Ventana CC1	Dako (M0887)
Cyclin D1 (SPA)	Rabbit monoclonal	1:100	Ventana CC1	Neomarkers (RM-9104-S)
SOX11 (MRQ-58)	Mouse monoclonal	Prediluted	Ventana CC1	Cell Marque (760-4868)
Ki67 (MIB1)	Mouse monoclonal	1:50	Ventana CC1	Roche (05278384001)

Table S1. List of antibodies

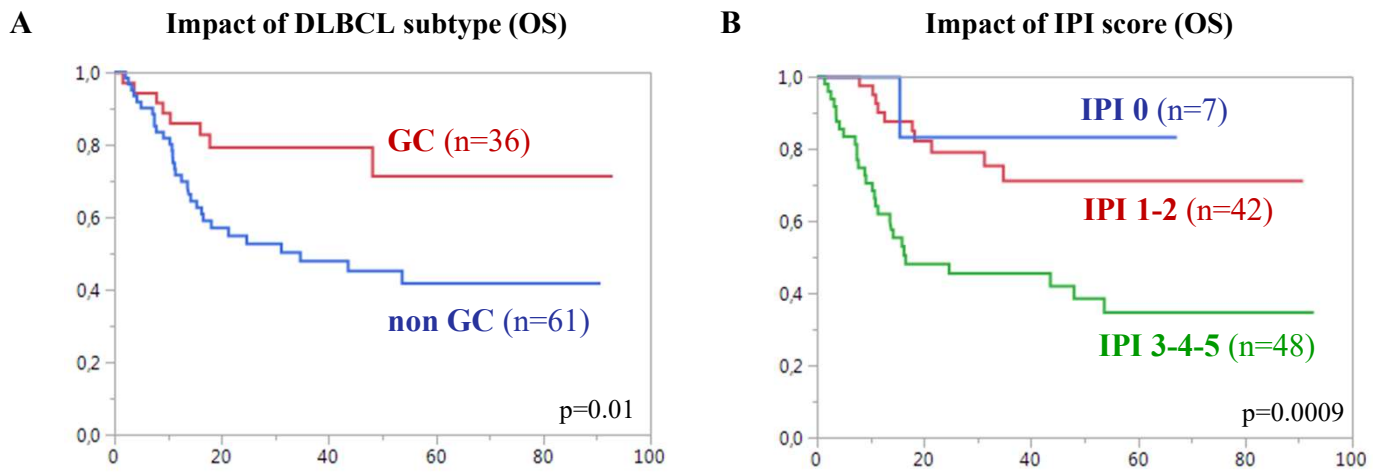
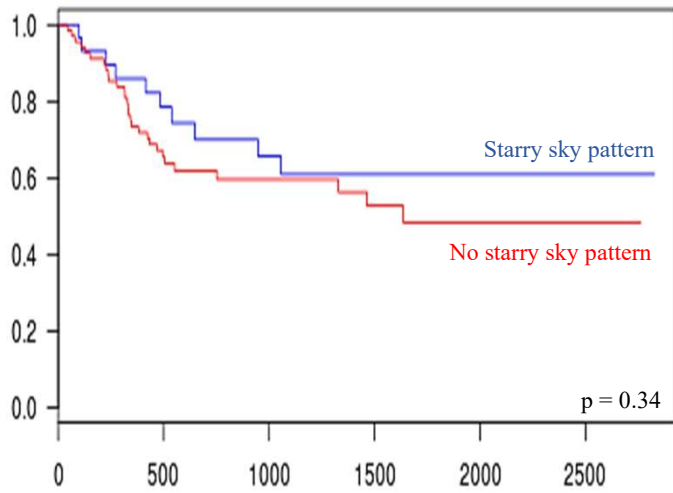


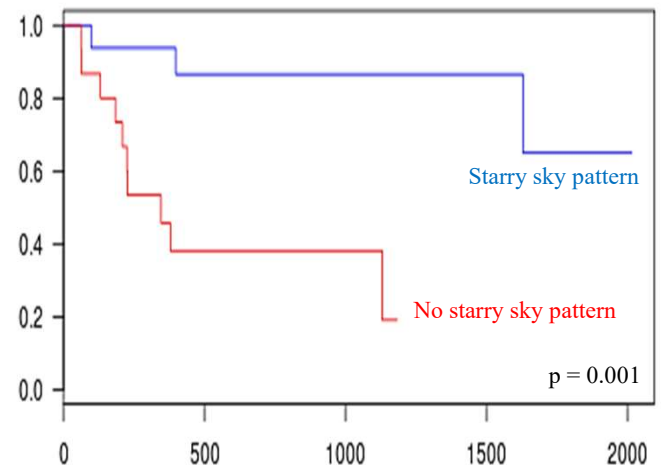
Figure S1. Cohort validation.

Kaplan-Meier analysis of OS associated to GC/non GC subtype (A, left panel) and r-IPI class (B, right panel)

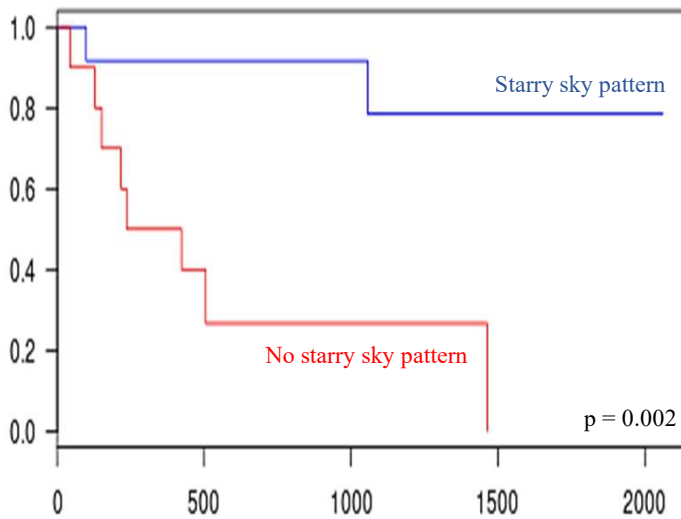
A Impact of starry sky (OS)



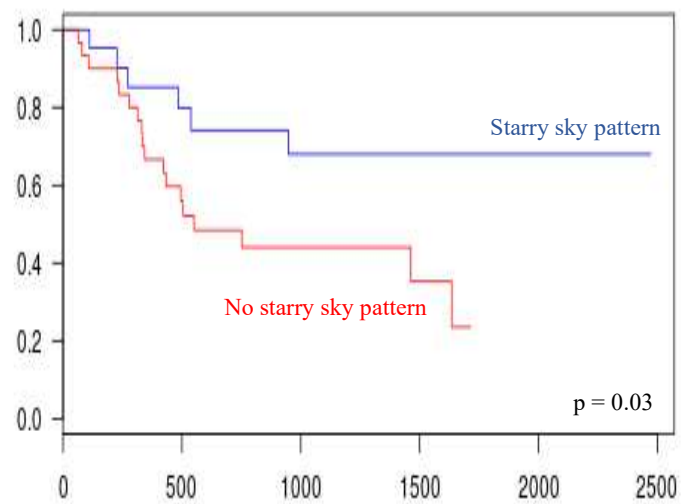
B Impact of starry sky in c-MYC + DLBCL (PFS)



C Impact of starry sky in DEL (OS)



D Impact of starry sky in Ki 4+ DLBCL (OS)



E Impact of starry sky in MYC-positive and p53^{high} DLBCL (OS)

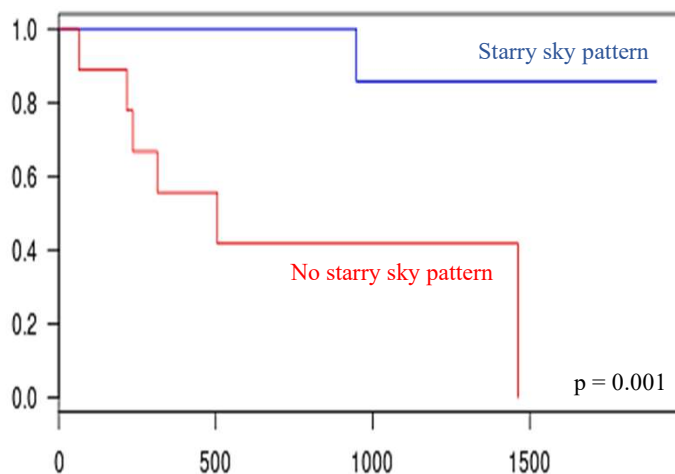


Figure S2. Starry-sky pattern had no prognostic impact itself (S2.A) but predicted outcomes when associated with others prognostic factors (S2.B to S2.E)

VIII. Recherche de nouveaux facteurs prédictifs dans les LBDGC : CYCLON impliqué dans un réseau de protéines en lien avec la résistance au Rituximab ?

Dans un second temps, en partant de la cohorte déjà constituée, nous avons cherché à savoir si l'expression protéique de CYCLON est un facteur de résistance au Rituximab dans les LBDGC. Pour rappel, des données préliminaires sur des lignées cellulaires concluaient à une surexpression de CYCLON dans les LBDGC comme un facteur de résistance au Rituximab.

Des analyses transcriptomiques ont été initiées en parallèle en ayant pour but d'identifier les principales protéines interagissant avec CYCLON. A partir de ces résultats, nous avons évalué l'impact pronostique de ce réseau de protéines sur une cohorte de LBDGC.

CYCLON and NPM1 staining patterns predict relapse/refractory disease in R-CHOP treated DLBCL

Antonin Bouroumeau^{1,3}, Lucile Bussot², Sieme Hamaidia^{3,4}, Patricia Betton³, Samuel Duley³, Cyril Fournier⁵, Mary B. Callanan⁵, Annie Adrait⁶, Yohann Couté⁶, Anne McLeer¹, Edwige Col¹, Laurence David-Boudet¹, Christine Lefebvre^{3,7}, Tatiana Raskovalova⁷, Marie-Christine Jacob⁷, Claire Vettier⁷, Simon Chevalier⁷, Sylvain Carras^{2,3,7}, Thierry Bonnefoix^{3,4}, Rémy Gressin^{2,3}, Hervé Sartelet^{1*}, Anouk Emadali^{3,4*}

1. Department of Cytology and Pathology, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France
2. Department of Clinical Hematology, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France
3. Institute for Advanced Biosciences, INSERM U1209 / CNRS UMR 5309 / Grenoble-Alpes University, Grenoble, France
4. Pole Recherche, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France
5. Unit for Innovation in Genetics and Epigenetics in Oncology and Dijon University Hospital, University of Bourgogne, INSERM 1231, Dijon, France
6. Etude de la Dynamique du Protéome (EDyP), Laboratoire de Biologie à Grande Echelle INSERM U1038 / CEA / Grenoble-Alpes University, Grenoble, France
7. Hematology, Oncogenetics and Immunology Unit, Grenoble-Alpes University Hospital, Grenoble, France

*Equal contribution

Keywords: CYCLON, NPM1, DLBCL, R-CHOP, prognosis, R-IP1

Corresponding author:

Anouk Emadali, PhD
Institute for Advanced Biosciences
Site Santé La Tronche
30043 Grenoble Cedex 9
Phone : +33(0)4 76 54 94 68
E-mail : anouk.emadali@univ-grenoble-alpes.fr

Article en cours de soumission dans Blood sous la forme d'un Brief Report

Abstract

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) is a clinically heterogeneous hematological cancer. Standard first line anti-CD20 immunochemotherapy cure about 60% of fit patients. Despite extensive clinical, biological and molecular investigations, there is still no specific procedure to accurately discriminate refractory/relapse (R/R) DLBCL cases. In this setting, CYCLON, a novel nuclear germline factor overexpressed in aggressive B-Cell Lymphoma, has been related to anti CD20 resistance *in vitro*. We established a retrospective cohort of 97 *de novo* DLBCL to validate the prognosis impact of CYCLON and NPM1, an associated oncoprotein. Univariate survival analysis did not reveal any association between CYCLON or NPM1 staining intensity or percentage of positive cells with prognosis. But, remarkably, atypical localizations of both factors were strongly associated with progression free survival (CYCLON, $p > 0.0001$ and NPM1, $p = 0.0007$). Multivariate survival cox regression analyses adjusted for CYCLON, NPM1 and revised Index Prognosis (R-IPI) variables showed that mirror/extranucleolar CYCLON and mixed cytoplasmic/nuclear NPM1 localizations were statistically significant and independent prognostic factors that add to the R-IPI score for risk stratification by identifying DLBCL with especially worse prognosis. CYCLON and NPM1 expression evaluation could be easily implemented in the clinical practice and provide more precise high-risk assessment and risk discrimination for DLBCL patient.

Introduction

Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL), the most common hematological malignancy in Western countries ¹, is characterized by a high degree of clinical and biological heterogeneity ². Current first line therapy consists in an immuno-chemotherapy regimen referred as R-CHOP (Rituximab, an anti-CD20 antibody, combined with Cyclophosphamide, Doxorubicin Hydrochloride, Vincristine Sulfate and Prednisone). Although R-CHOP drastically improved DLBCL outcome ³, around 10-15% of patients exhibit primary refractory disease and an additional 20-25% relapse usually within the first 2 years ³. The revised version of the International Prognostic Index (R-IPI), that combines 5 clinical and biological readouts, represents the only robust prognosis factor for DLBCL ⁴, but fail to accurately discriminate these refractory/relapse (R/R) DLBCL cases.

The clinical heterogeneity of DLBCL can be explained by genomic alterations and phenotypic features that include: i) gene translocations involving c-MYC and BCL2/BCL6 and defining the refractory subtype “double/triple hit” (DH/TH) DLBCL ⁵, ii) gene expression signature defining “activated B-cells” (ABC) or “germinal center B-cells” (GCB) DLBCL subtypes, associated with DLBCL prognosis ⁶ but not correlated with R-CHOP response, and iii) recently identified recurrent mutational events defining

genetic subtypes that could have therapeutic implications ^{7,8}. But, despite this extensive molecular characterization, no clear predictive signature of R/R DLBCL has been yet identified to guide individualized risk-adapted therapy ⁹.

In this context, we have previously shown that CYCLON, a novel cytokine-inducible nuclear phosphoprotein ¹⁰, also known to maintain normal T-cell immune homeostasis after cell activation ¹¹, was acting an autonomous tumor growth driver and anti-CD20 treatment resistance factor in DLBCL ¹². Here, we describe how CYCLON and associated protein NPM1 represent novel prognosis markers for R-CHOP treated DLBCL patients.

Methods

Details about patient cohort, tissue micro-array, immunohistochemistry and other experimental procedures, as well as bioinformatics and statistical analysis are given in supplemental data.

Results and discussion

Cohort characteristics. A total of 97 patients were included, a description of the cohort main characteristics is presented in Table 1. Briefly, about half of the patients presented an advanced stage of the disease (stage Ann Arbor IV in 46.4% and a 3 to 5 R-IPI score in 48.5%). Using Hans' algorithm, ABC subtype was over-represented compared to GCB (62.9% vs 37.1%). Reporting all outcomes at the 7.5-year survival probabilities, the OS was, for the entire cohort, 64.4% and the PFS was 51.1%. As expected, ABC subgroup was associated to worse prognosis compared to GCB subgroup for both PFS (log-rank $p=0.0049$) and OS (log-rank $p=0.0109$) (Figure S3A). Similarly, the R-IPI clearly predicted OS (log-rank $p=0.0008$) and PFS (log-rank $p=0.0009$) (Figure S3B). Overall, the characteristics of this cohort are in full accordance with the literature.

CYCLON is associated with a nucleolar protein network involving the protein NPM1. In order to get further insights into CYCLON oncogenic network, we used a DLBCL cell line, B593, genetically engineered to express a GFP-tagged form of the protein (Figure S1A). We then performed GFP-CYCLON immunoprecipitation (Figure S1B-C), followed by mass spectrometry identification of associated proteins (Figure S1D). This revealed a protein-protein interaction network (Figure S2A) including mainly nucleolar proteins involved in gene expression regulation through RNA processing (Figure S2B-C). Consistently with our previous results, several of these proteins are involved in cell cycle progression and proliferation at least in part through MYC signaling (Figure S2A). Among CYCLON interactors, the protein NPM1 could represent a relevant candidate to be evaluated as a

prognosis biomarker, together with CYCLON due to its function connecting chromatin remodeling, nucleolar function and cell division. *NPM1* mutations leading to its delocalization in the cytoplasm have also been described in Acute Myeloid Leukemia (AML) ¹³. *NPM1*-mutated AML have been recognized as a distinct entity ¹⁴ and are associated with favorable outcomes ^{13,15}.

CYCLON and NPM1 present distinct immunohistochemical (IHC) staining patterns in DLBCL. CYCLON IHC staining unexpectedly revealed four different aspects, defined by specific staining pattern in at least 80% of positive tumor cells (Figure 1A): negative, diffuse (weakly to strong homogeneous nuclear positivity), foci (strong nucleolar positivity, confirmed by an AgNOR method, Figure S4A and B) or mirror (strong nuclear positivity excluding the nucleolus, Figure S4C and D). In our cohort, CYCLON was negative in 8 cases (8/97, 8.2%), diffuse in 59 cases (59/97, 60.9%) and showed a foci aspect in 12 cases (12/97, 12.4%), while the mirror pattern was observed in 18 DLBCL patients (18/97, 18.6%) (Table 1 and Figure 1A).

NPM1 was also associated with four distinct staining patterns: negative, nuclear, cytoplasmic and mixed nuclear/cytoplasmic. *NPM1* staining was negative for 23 cases (23/94, 24.5%). Exclusive nuclear positivity was found in 47 patients (47/94, 50%), exclusive cytoplasmic positivity was found in 10 cases (10/94, 10.6%) whereas 14 cases (14/94, 14.9%) had mixed nuclear/cytoplasmic staining (Table 1 and Figure 1C).

CYCLON and NPM1 atypical subcellular localizations are strongly associated with poor outcome in R-CHOP treated DLBCL. Kaplan-Meier survival analyses were performed for PFS (Figure 1B-1D) and OS (Figure S5A-D) for the different CYCLON and *NPM1* staining patterns. CYCLON “mirror” cases demonstrated a remarkably bad-risk profile with inferior PFS and OS compared to patients classified into negative, diffuse or foci categories. Overall log-rank test is highly significant for PFS ($p=0.0015$, Figure 1B) and for OS ($p=0.0441$, Figure S5A) despite the relatively low statistical power reached in this monocentric cohort.

Strikingly, cases with *NPM1* mixed nuclear/cytoplasmic pattern also exhibit extremely adverse outcomes compared to patients classified into negative, exclusive nuclear or exclusive cytoplasmic staining categories. As for CYCLON, this difference is again very significant for PFS ($p=0.0017$, Figure 1D) and for OS ($p=0.0403$, Figure S5D). Taken together, these data revealed two novel and extremely potent prognosis factors in R-CHOP-treated DLBCL.

Building groups dichotomizing CYCLON and NPM1 staining patterns. A log rank test for linear trend across CYCLON and *NPM1* staining subtypes gave highly significant p -values for OS and PFS for the

two biomarkers, thus defining CYCLON mirror and NPM1 mixed nuclear/cytoplasmic staining as the worst prognosis groups (see supplemental data).

Multivariate survival cox models with variables CYCLONmirror^(+/-), NPM1mixed^(+/-) and R-IPI. We next investigated whether CYCLON and NPM1 can act as applicable prognostic biomarkers in the sense that they do add to the R-IPI score. To this end, we built multivariate cox models for PFS and OS with the grouping variables CYCLON *mirror^(+/-)*, NPM1 *mixed^(+/-)* and R-IPI, a grouping variable subdividing the patients into very low and low risk R-IPI category (*ripi^(0,1)*; 49 cases) and high-risk R-IPI category (*ripi⁽²⁾*; 48 cases). As shown in Figure 1E and Figure S5, multivariate survival analysis for PFS and OS indicated that CYCLON *mirror⁽⁺⁾*, NPM1 *mixed⁽⁺⁾* and *ripi⁽²⁾* categories were statistically significant and independent prognostic factors with strong negative impact on PFS and OS. Of note, the hazard ratios were comparable for all three variables in PFS and OS models as estimated by a standard wald test (not shown). The stability of the established models was investigated by bootstrap resampling, providing 95% confidence intervals for Hazard Ratios that never include the value 1 for any of the model variables in both PFS and OS models, and assessing the robustness of the models (Figure 1E, PFS and Figure S5G, OS). Finally, the proportional hazard assumption was checked using Schoenfeld residual test and could not be rejected (PFS model: p=0.59; OS model: p=0.74); the discrimination ability of both models was satisfactory when assessed by the Harrell's C statistic with concordance index of 0.73 for the PFS model and 0.76 for the OS model. This formally demonstrates that these atypical CYCLON and NPM1 localizations can, independently of R-IPI predict relapse/refractory disease in DLBCL patients.

Mutational profiles associated with CYCLON and NPM1 staining pattern. In view of the prognostic value of staining patterns for CYCLON and NPM1 in DLBCL tumor B cells, we next asked whether this might correlate to specific gene mutation profiles. For this, we performed targeted NGS sequencing in 48 of our DLBCL cases by using a 51 gene lymphoma resequencing panel¹⁶, of which 43 that were positive for CYCLON staining (Figure 2). All 48 cases showed at least one mutation in one gene of the panel (range 1 to 12). The most frequently mutated gene in the series was *TP53*. Mutation profiles were broadly as predicted for DLBCL subtypes (GCB and ABC, respectively). Quite strikingly, DLBCL cases that showed heterogenous staining for CYCLON (either as nuclear foci or perinucleolar) were enriched for *PIM1* mutations (5 of 12 cases) compared to DLBCL cases with diffuse CYCLON staining (5 of 31 showing *PIM1* mutations). We also noted a high frequency of *ARID1A* mutations in DLBCL cases with focal staining patterns for CYCLON (seen in 6 of 8 of these cases) compared to DLBCL cases with heterogenous staining for CYCLON (5 of 31 cases with diffuse nuclear staining for CYCLON

showed *ARID1A* mutation). Taken together these findings are suggestive of a link between altered PIM kinase and SWI/SNF chromatin signalling and the occurrence of aberrant CYCLON staining in DLBCL. We also noted clustering of FOXO1 mutations (c-terminal) in DLBCL with heterogenous versus diffuse CYCLON staining (n-terminal mutations) (3 of 12 versus 3 of 31 cases, respectively). Co-mutation of PIM1, FOXO1 and ARID1A were seen in 2 of 8 cases with focal CYCLON staining (none with nucleolar) compared to 1 of 31 with diffuse staining, indicative of additional gene regulatory malfunction events in driving abnormal assembly of CYCLON foci in DLBCL tumor B cell nuclei. No specific mutation was associated to NPM1 mixed localization in this panel.

In summary, this study revealed specific IHC staining patterns for both CYCLON and its binding partner NPM1 which outpass all predictors of poor outcome in R-CHOP treated DLBCL. These prognosis markers were shown to be independent of R-IP1 and not associated to any known recurrent mutational profile in lymphoma. CYCLON and NPM1 IHC investigations could therefore represent a simple and very potent way to discriminate DLBCL refractory/relapse cases at diagnosis and adjust first-line treatment towards more intensive regimen. Further investigations will be required to validate this finding a larger cohort and decipher the biological mechanism associated with these atypical subcellular localizations.

Supplemental Methods

Patient selection

Patients were collected based on a unicentric retrospective study in Grenoble, France (Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes and Institut Daniel Hollard, Department of Hematology) from January 2011 to December 2018. Based on different lists from all DLBCLs pathological diagnostics, each case was reviewed to ensure compliance with the following inclusion criteria. DLBCL tumors had to be *de novo*, all patients with an history of other lymphoma and all relapses were excluded. Primitive cerebral DLBCLs, DLBCL leg type and Primary Mediastinal B-cell Lymphoma were eliminated because of their particular pathological and biological presentations. IHC analysis of Cyclin D1 and SOX11 were performed for all *de novo* CD5-positive DLBCL to exclude mantle cell lymphoma and Richter's transformation. Treatment had to be R-CHOP in first line (at least 3 cycles realized). Tissues had to be Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) (AFA fixation was excluded to avoid IHC bias) and enough residual material had to be available to make a Tissue Micro Array (TMA) (needle biopsies were not included). This study was conducted in accordance to Institutional Ethics Board regulation after obtaining patient consent. Finally, biological and clinical data were collected for each patient and included especially gender, age, IPI score, Ann Arbor stage, serum Lactate Dehydrogenase level, a precise therapeutic and survival scheme with a long-term follow-up. DLBCLs were classified according to the WHO classification with the GCB or non-GCB status.

Tissue Micro-array

Five manual TMAs blocks were built using FFPE tissue for each patient, in which we previously checked the presence of tumoral cells with Hematoxylin and Eosin (H&E) staining. TMA was composed by four 6µm cores (from Alphamatrix[®]) of each sample and non-tumoral samples were also added as internal positive control (testis and appendix). A detailed Excel[®] file was used for each TMA, specifying the tumor identity of each spot.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed on 4-µm sections from the five TMA blocks. The fully automated (baking, deparaffinization, cell conditioning and staining, IHC, counter stain and titration) *Benchmark Ultra ROCHE Diagnostic System (Ventana, n°4802)* was used for CYCLON and NPM1.

The following protocol was used for CYCLON, rabbit polyclonal antibody, from ATLAS Antibodies (*ref: HPA 041117*), with a Ventana Cell Conditioning 2 retrieval solution (citrate pH6) for 44 min and incubated for 60 minutes at 37°C, at a 1:50 dilution (final concentration of [6µg/ml]). The Ventana UltraView Universal DAB Detection Kit was used followed by Ventana Hematoxylin (8 minutes) and

Bluing Reagent (4minutes) staining as a nuclear counterstain. A Ventana amplifier was necessary to increase the intensity of the staining. NPM1, mouse monoclonal antibody, clone [7H10B9], from NeoBiotech (*ref: NB-22-7956*), was used with a Ventana Cell Conditioning 1 retrieval solution (Tris/Borate/EDTA pH8) for 64 minutes and incubated for 60 minutes at room temperature, at a 1:400 dilution. The Ventana Ultraview Universal DAB Detection Kit was used followed by Ventana Hematoxylin (16 minutes) staining as a nuclear counterstain. The tissue-array sections were treated in one set of immunostaining for each marker.

IHC staining was rendered semi-quantitatively using a scale from 1 to 4+ according to the percentage positivity of cells (1+ [1-25%], 2+ [26-50%] and 3+ [51-75%] and 4+ [76-100%] and a scale from 1+ to 3+ according the staining intensity (1+ weak, 2+ medium, 3+ strong). Two investigators blinded for clinical data independently evaluated immunostaining under a light microscope at a magnification of 400X. Interobserver agreement was calculated by the kappa coefficient. The observed agreement between the two pathologists was Kappa=0.71, 95%-CI 0.68-0.74, $p<0.0001$. Discordant cases were discussed by the two investigators and a consensus was reached for the discordant values.

AgNOR

We used a previously described AgNOR staining protocol¹⁷. Histological sections of 3 μ m thick are cut from TMA blocks on the eve of the staining and then are deparaffinized with automated *Benchmark*. Two solutions are needed: a 2% gelatin solution (solution A) dissolved in ultrapure water, to which formic acid is then added to make a final 1% solutions and a 50% silver nitrate solution (solution B) in ultrapure water. The staining solution is obtained instantly by rapidly mixing one part of solution A with two parts of solution B. Slides were pretreated with citrate buffer for 20 minutes at 120°C before final solution was poured on each one for 13 min at room temperature and in dark to avoid direct sunlight during silver-staining. After staining, the solution is poured off and the slides are washed then dehydrated and mounted.

Cell lines

B593 DLBCL cell line was derived in house¹⁸. Cells were cultured in RPMI medium supplemented with 2 mM GlutaMAX®, 1 mM sodium pyruvate, 25 mM HEPES, non-essential amino acids, 100 mg/mL Penicillin/Streptomycin solution and 20% fetal calf serum. Cells were grown at 37 °C, 5% CO₂. Unless otherwise specified, cell culture reagents were purchased from Thermo Fisher. Cells were kept at a density between 0.3 and 1,5 million cells/ml (passage every 2-3 days). Cell viability was estimated with ethidium bromide and acridine orange staining. B593 GFP-CYCLON was produced by transduction of B593 with a lentiviral vector designed to express CYCLON with an N-terminus GFP-tag. B593 GFP-CYCLON 3L was derived from the polyclonal cell population obtained above by

monoclonal cell sorting and pooling of the 3 clones showing the lower GFP expression (3L) in order to generate a cell line showing expression level of CYCLON-GFP close from the endogenous level of the protein.

Nuclei isolation

Nuclei were isolated by hypotonic cell lysis (100 million cells) using 2 mL of nucleic buffer-NB (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA pH8, 15 mM Tris pH8, 0.3 M sucrose, 1 mM DTT, 1X Complete protease inhibitor cocktail, 1X PIC3 phosphatase inhibitor cocktail, 1 µg/mL TSA, 0.2% NP40). After a 10 min incubation on ice, detergent was diluted with 8 mL of NB without NP40 before centrifugation (2000 rpm, 10 min, 4 °C). Nuclei were then washed in HDG150 buffer (20 mM HEPES pH7,4, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 10% Glycerol, 1X Complete protease inhibitor cocktail and H₂O mQ). Nuclei integrity was verified by Trypan Blue staining under an inverted light microscope (Eclipse TS2 FL Statif Inverse Fluo, Nikon).

Solubilization of nucleic-acid bound complexes using micrococcal nuclease (MNase)

Nuclei were quickly sonicated using a Vibracell ultrasonic processor (20% amplitude for 5 seconds with 2 second pulse, 2 second pause) before DNA quantification using NanoDrop. DNA digestion performed by addition of 1U MNase and 1 mM CaCl₂ per 10 µg chromatin before incubation at 37 °C for 15 minutes with agitation every 2 min (until most of the chromatin was digested as mononucleosomes, visualized by migration on a 2 % agarose gel electrophoresis). Digestion was then stopped by addition of 10 mM EDTA. Digested chromatin was incubated at 4 °C for 1 hour (or overnight) in HDGN300 buffer (20 mM HEPES pH7,4, 300 mM KCl, 1 mM DTT, 10% Glycerol, 1X Complete, 0.05% NP40) to increase protein complexes solubilization. Isolation of insoluble (pellet) and soluble (supernatant) fractions was obtained by centrifugation (10000g, 10 min, 4 °C).

Immunoprecipitation of GFP-tagged CYCLON

Magnetic nanobeads tagged with GFP-Trap[®] were prepared according to the manufacturers protocol GFP-Trap[®] MA for Immunoprecipitation of GFP-Fusion Proteins from mammalian cell extract (Chromotek). Soluble protein fraction was incubated with 30 µL of bead solution under rotation at 4 °C for 1 hour. The supernatant (flow through = unbound fractions) was kept for further analysis. Bound fraction was washed 3 times in HDGN300 before elution of bound proteins with 100 µL of Laemmli buffer.

Immunoblotting

Proteins were loaded and separated on 4-12 % Bis-Tris gel in MES buffer and transferred onto a PVDF membrane in Tris Glycine 10 % ethanol for one hour at 100V. Membranes were then treated with a blocking solution (PBS 0.1 % Tween 20, 5% skimmed milk) before incubation with primary antibody (1/5000 α -GFP (Genentech), 1/1000 α -CYCLON (Bethyl laboratory) in PBS, 0.1% Tween 20, 5% skimmed milk), washing with PBS and secondary antibody incubation (1/5000 anti-rabbit HRP (BioRad)). Revelation was performed through incubation in ECL SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher) and images captured using Vilber imaging system.

Silver staining

Protein samples were loaded and separated on a 4-12 % NuPAGE™ Bis-Tris gel in MES buffer (Thermo Fisher). Silver staining of gel was performed according to the protocol for SilverQuest silver staining kit provided by the manufacturer (Thermo Fisher).

Mass spectrometry analysis

3 independent replicates of CYCLON and control-IP fractions were stacked in the top of a 4-12% NuPAGE gel, and stained with Coomassie blue R-250 before in-gel digestion using modified trypsin (Promega, sequencing grade) as previously described. Resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to tandem MS (UltiMate 3000 and Q Exactive Plus, Thermo Scientific, Illkirch, France). Peptides were sampled on a 300 μ m x 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 μ m x 250 mm C18column (ReproSil-Pur 120 C18-AQ 1.9 μ m) using a 240-min gradient. MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific). Peptides and proteins were identified using Mascot (version 2.6) through concomitant searches against Uniprot (Homo sapiens taxonomy, August 2018 version), classical contaminants database (homemade) and the corresponding reversed databases. The Proline software (<http://proline.profiroteomics.fr>) was used to filter the results: conservation of rank 1 peptides, false discovery rate (FDR) of peptide identification <1% as calculated on peptide scores by employing the reverse database strategy, minimum peptide score of 25, and minimum of 1 specific peptide per identified protein group. Proline was then used to perform a compilation, grouping and MS1-based label-free quantification of the protein groups from the different samples. Statistical analysis was performed using ProStaR. Proteins identified in the reverse and contaminant databases, proteins identified with only 1 peptide, proteins identified in less than 2 replicates of one condition and proteins exhibiting less than 3 quantification values in one condition were discarded. After log₂ transformation, abundance values were normalized using Loess method (span = 0.8) before missing value imputation (slsa method for

POV and DetQuantile with quantile and factor set to 1 for MEC). Statistical testing was conducted using limma. Differentially expressed proteins were sorted out using a log₂ (fold change) cut-off >1 and a p-value leading to a FDR < 5% according to the Pounds estimator.

Targeted NGS sequencing

Four FFPE core biopsies were used per case, at the same time as we built TMAs. DNA was extracted by QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit (Qiagen). DNA quality was assessed by tapestation protocol and quantified for NGS by Qubit. Targeted sequencing was performed by a capture approach covering 51 genes that present mutations in DLBCL, Follicular Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia. Libraries were prepared by standard procedures using 50 ng of DNA and KAPA HyperPlus kit (Roche). Libraries were purified, quantified and barcoded before being submitted to Illumina sequencing by NextSeq 500/550 Mid Output Kit V2 (300 cycles) kit on a Nextseq 550 Illumina sequencer. Somatic mutation calling was performed using an in-house and commercial sequence alignment, variant caller and annotation pipeline. Somatic mutations that affected protein coding regions (non-synonymous), and at exon splice site junctions were retained for analysis.

Bioinformatics analysis

Protein-protein interaction network was analyzed using Cytoscape v3.8 software. Gene ontology analyses were performed using Funrich 3.1 and DAVID interfaces.

Statistics

Overall survival (OS) and progression free survival (PFS) were assessed by Kaplan-Meier analyses and Cox regression. The starting point for time-to-event analysis was the date of the pathological diagnosis. Relapse rate was defined as time to relapse for those achieving complete remission, with censoring at date of last contact. Overall survival (OS) was defined as time to death, with censoring at date of last contact. Patients without any event at the time of the last follow up or at 7.5 years after diagnosis were censored. The proportional-hazards assumption of the Cox models was checked on the basis of Schoenfeld residuals after cox model fitting. The fit of the Cox models was assessed using Harrell's concordance index which is defined as the probability that predictions and outcomes are concordant. All statistical analyses were performed using Stata 16.1 (Stata Corporation, College Station, Texas).

Building groups dichotomizing CYCLON and NPM1 staining patterns

A log rank test for linear trend across CYCLON staining subtypes ordered as negative, diffuse, foci and mirror gave highly significant p-values for OS and PFS ($p=0.0005$ and $p=0.0004$, respectively). Similarly, there was strong evidence of a trend across NPM1 staining subtypes ordered as negative, exclusive nuclear, exclusive cytoplasmic and mixed nuclear/cytoplasmic for OS and PFS ($p=0.0004$ and $p=0.0031$, respectively). CYCLON mirror and NPM1 mixed nuclear/cytoplasmic staining were then respectively considered as the worst prognosis groups. Therefore, we focused on grouping staining subtypes rather than the full spectrum of individual staining presentations. Two grouping variables were generated, dichotomizing the patients into two categories. The first grouping variable CYCLON *mirror*^(+/-) was defined by the patients with CYCLON mirror staining (category *mirror*⁽⁺⁾; 18 cases) and the patients with non-mirror staining (foci, diffuse, negative ; category *mirror*⁽⁻⁾; 79 cases) ; the second grouping variable *NPM1 mixed*^(+/-) dichotomized the patients into mixed nuclear/cytoplasmic staining (category *NPM1 mixed*⁽⁺⁾; 14 cases) and non-mixed staining (nuclear, cytoplasmic, negative ; category *NPM1 mixed*⁽⁻⁾; 80 cases). The corresponding Kaplan–Meier survival curves (PFS and OS) are depicted in Figure S5B-C for CYCLON and Figure S5E-F for NPM1. As expected, the outcome of patients from the category CYCLON *mirror*⁽⁻⁾ was largely superior to that of patients in the category CYCLON *mirror*⁽⁺⁾ (PFS rate, 60.3%, 95%-CI 42.4%-74.2% versus 15.7% ; OS rate, 73.4%, 95%-CI 59.7%-83.1% versus 31.1%). The log rank test comparing the two categories *mirror*⁽⁺⁾ and *mirror*⁽⁻⁾ reached high significance level for both PFS and OS ($p<0.0001$ and $p=0.0046$, respectively). Similarly, the outcome of patients from the category *NPM1 mixed*⁽⁻⁾ was approximately twice higher to that of patients in the category *NPM1 mixed*⁽⁺⁾ (PFS rate, 58.1%, 95%-CI 41.9%-71.3% versus 24.7% ; OS rate, 70.4%, 95%-CI 57.2%-80.2% versus 31.1%). Again, the log rank test comparing the two categories *NPM1 mixed*⁽⁺⁾ and *NPM1 mixed*⁽⁻⁾ was highly significant for both PFS and OS ($P=0.0007$ and $P=0.0042$, respectively).

Authorship Contributions

AB, AE, HS, SH and TB conceived and carried out experiments and statistics. LB and RG collected clinical data. AML achieved FISH analysis. EC and LDB did IHC and HIS assessments. MC and CF realized NGS data. The other authors helped built cohort. All authors were involved in writing the paper and had final approval of the submitted and published versions.

Disclosure of Conflicts of Interest

The authors declare they have no conflict of interest.

References

1. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, et al. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes: 2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2016;66(6):443–459.
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375–2390.
3. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010;116(12):2040–2045.
4. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007;109(5):1857–1861.
5. Sarkozy C, Traverse-Glehen A, Coiffier B. Double-hit and double-protein-expression lymphomas: aggressive and refractory lymphomas. *Lancet Oncol*. 2015;16(15):e555–e567.
6. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(25):1937–1947.
7. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(15):1396–1407.
8. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*. 2020;37(4):551-568.e14.
9. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015;125(1):22–32.
10. Hoshino A, Fujii H. Redundant promoter elements mediate IL-3-induced expression of a novel cytokine-inducible gene, cyclon. *FEBS Lett*. 2007;581(5):975–980.
11. Saint Fleur S, Hoshino A, Kondo K, Egawa T, Fujii H. Regulation of Fas-mediated immune homeostasis by an activation-induced protein, Cyclon. *Blood*. 2009;114(7):1355–1365.
12. Emadali A, Rousseaux S, Bruder-Costa J, et al. Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. *EMBO Mol Med*. 2013;5(8):1180–1195.
13. Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106(12):3747–3754.
14. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–2405.
15. Xu L-H, Fang J-P, Liu Y-C, Jones AI, Chai L. Nucleophosmin mutations confer an independent favorable prognostic impact in 869 pediatric patients with acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 2020;10(1):1.
16. Dubois S, Vially P-J, Mareschal S, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(12):2919–2928.
17. Trerè D. AgNOR staining and quantification. *Micron*. 2000;31(2):127–131.
18. Callanan MB, Baccon PL, Mossuz P, et al. The IgG Fc Receptor, FCγRIIB, Is a Target for Dereglulation by Chromosomal Translocation in Malignant Lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(1):309–314.

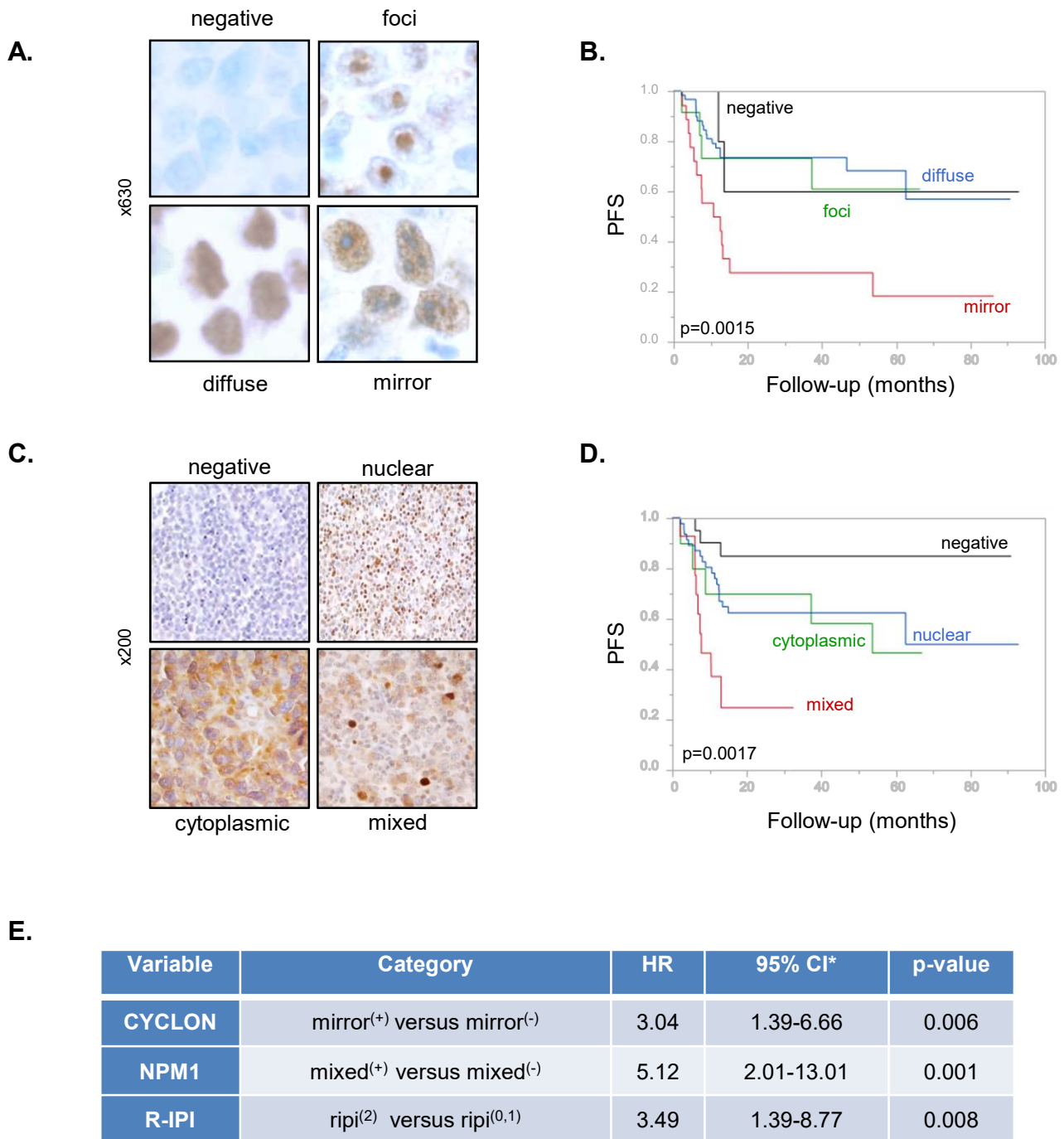


Figure 1: CYCLON and NPM1 subcellular localization define prognosis subgroups in DLBCL patients
A,C. IHC analysis of CYCLON (A) and NPM1 (C) revealing distinct expression patterns in DLBCL patients.
B,D. Kaplan-Meier survival analysis of progression-free survival (PFS) associated to CYCLON (B) and NPM1 (D) patterns. p values are derived from a log-rank test. **E.** Multivariate bootstrap cox regression analysis of the significance of independent prognostic variables CYCLON, NPM1 and R-IPI for PFS. HR, Hazard Ratio; R-IPI, Revised International Prognostic Index, * 95% confidence intervals (CI) based on bootstrap resampling (1,000 replicates).

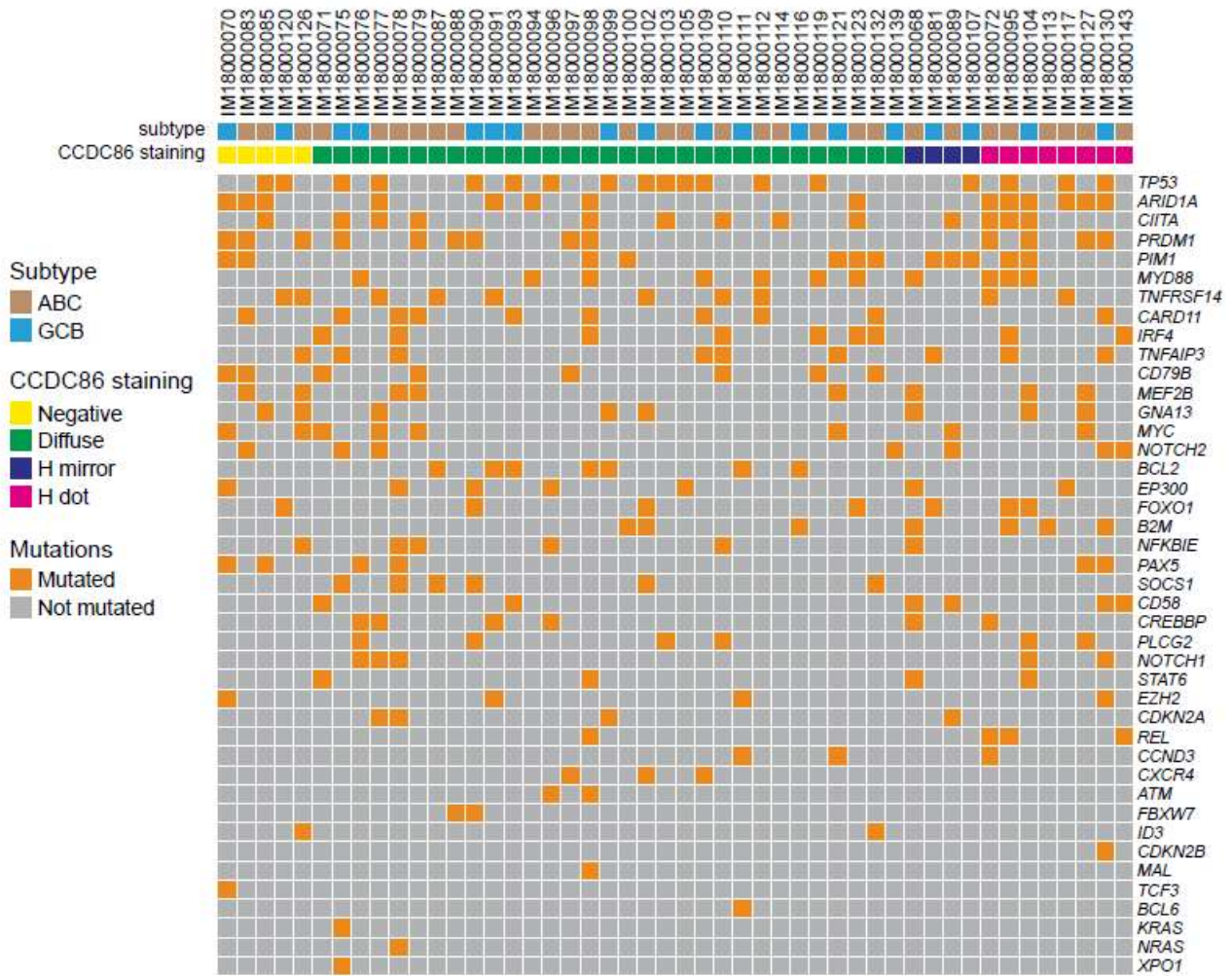


Figure 2: Mutation profiles for 48 DLBCL cases

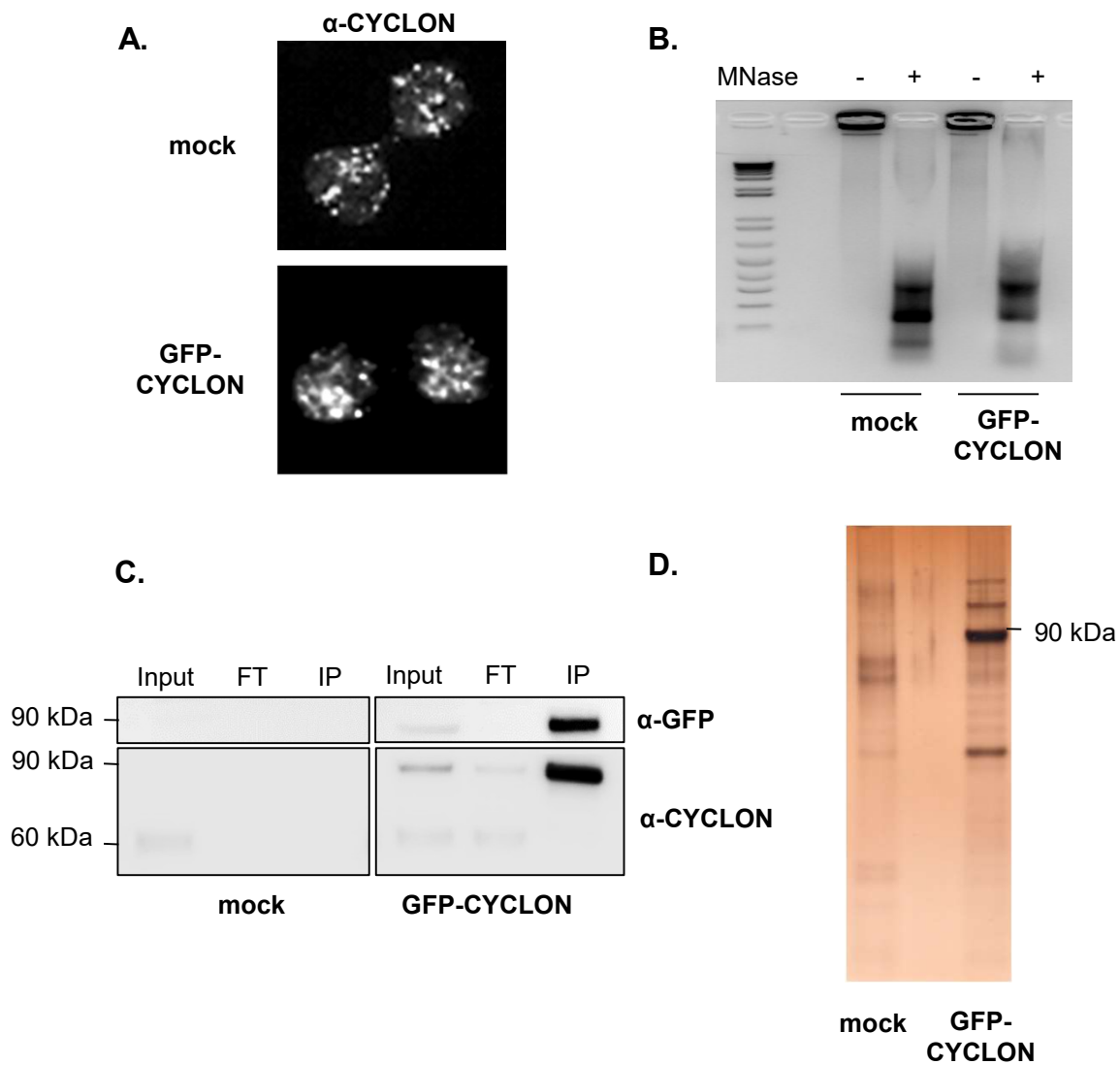
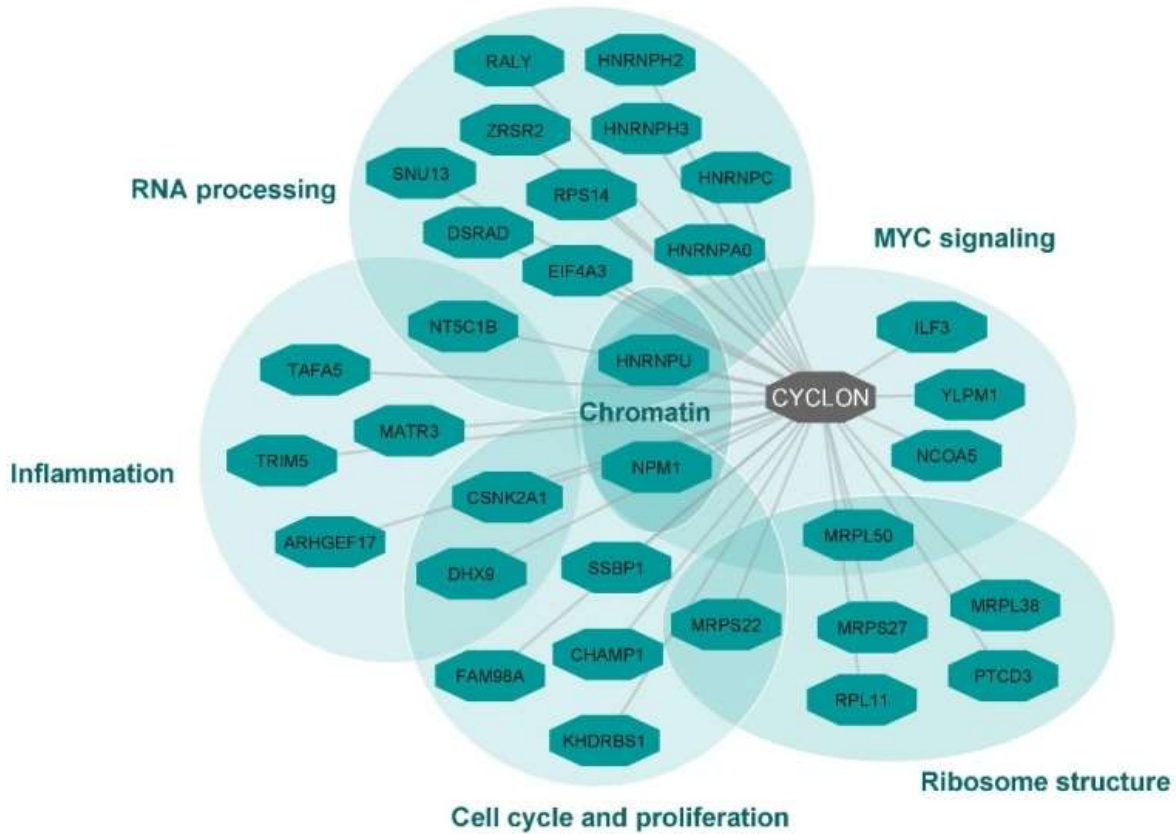


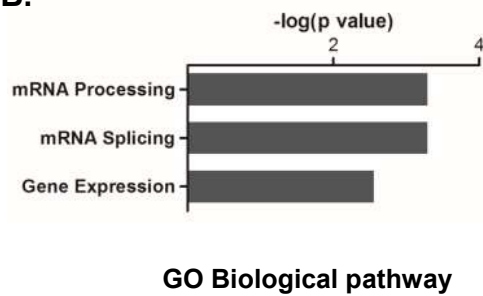
Figure S1: Experimental approach for identification of CYCLON protein-protein interaction network in B593 DLBCL cell line.

A. Immunofluorescence analysis of B593 mock and GFP-CYCLON cells showing the same punctated nuclear pattern for CYCLON. **B.** Agarose gel electrophoresis showing nucleic acids profiles before (-) and after (+) MNase digestion used to solubilized CYCLON associated complex. **C.** Western blot analysis of CYCLON and CYCLON-GFP in input, flow-through (FT, eq 1 volume) and GFP-Trap immunoprecipitated (IP, eq. 10 volumes) fractions as indicated. **D.** Silver staining of the GFP-Trap immunoprecipitated fraction in B593 mock and GFP cell lines.

A.



B.



C.

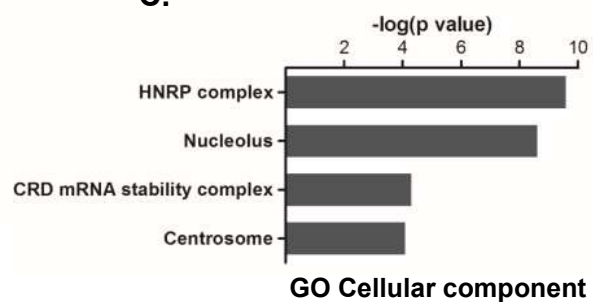


Figure S2: CYCLON protein network exert oncogenic effects through nucleolar gene expression regulation and cell-cycle dependent functions.

A. CYCLON protein-protein interaction network and associated functions in B593 DLBCL cell line. **B-C.** Gene ontology (GO) enrichment analysis of CYCLON interacting proteins for Biological Pathway (B) and Cellular Component classifiers (C).

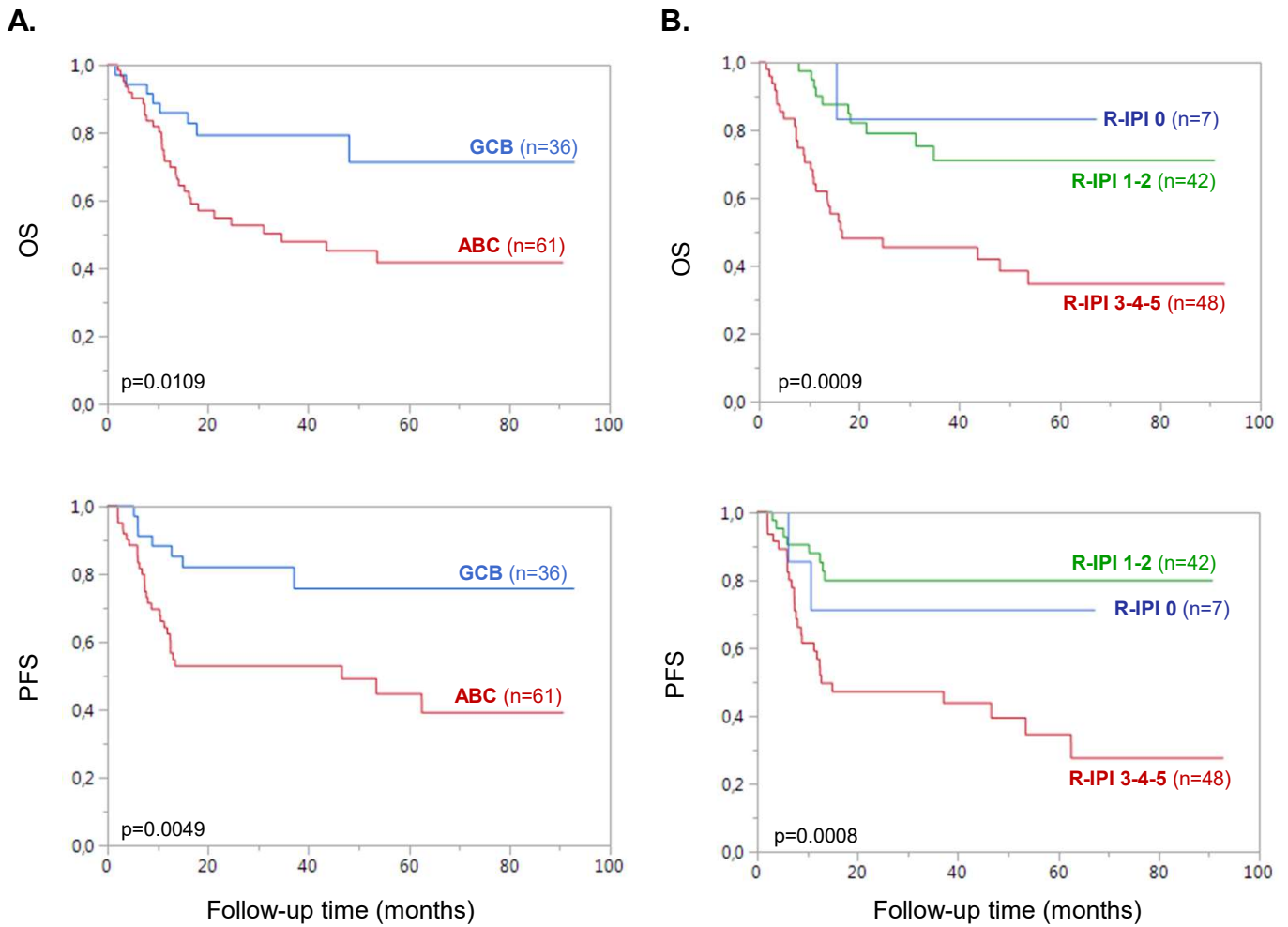


Figure S3: Cohort validation Kaplan-Meier analysis of overall survival (OS, upper panel) and progression-free survival (PFS, down) associated to ABC/GCB subtype (A) and R-IPI class (B)

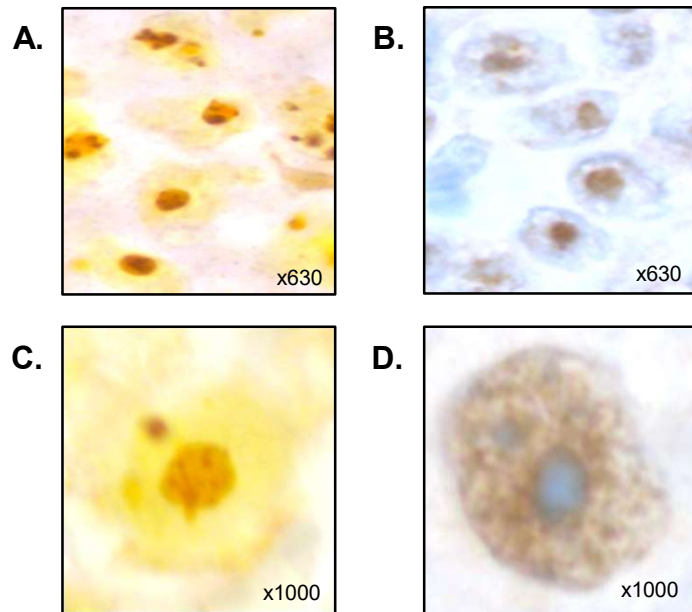
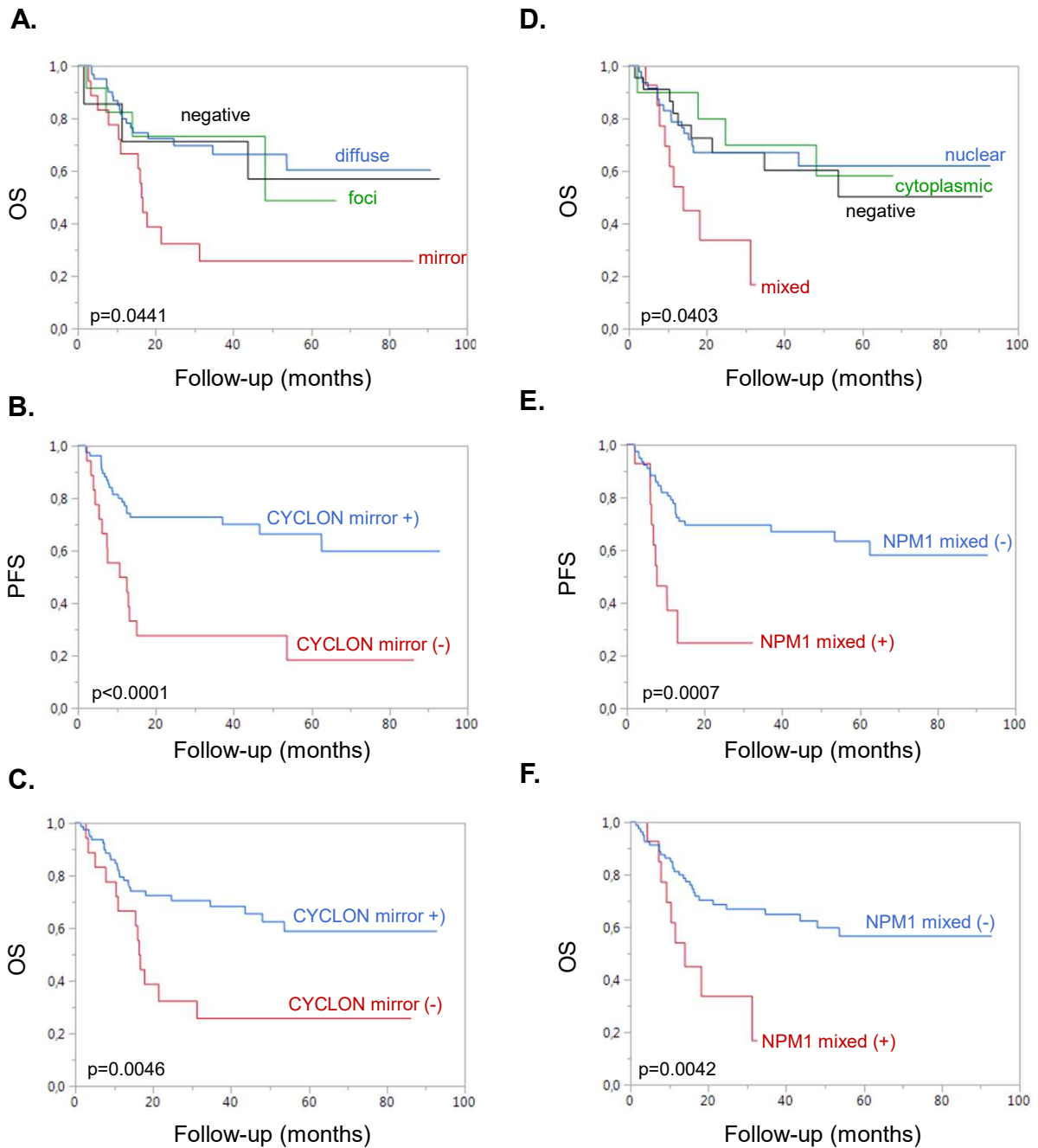


Figure S4: CYCLON and AgNOR staining on serial sections. AgNOR staining (A) confirms that foci seen in CYCLON IHC (B) are nucleoli. The same applies for CYCLON mirror positivity (D) which exclude nucleoli (C).



G.

Variable	Category	OS		
		HR	95%CI*	p-value
CYCLON	mirror ⁽⁺⁾ versus mirror ⁽⁻⁾	3.02	1.28-7.16	0.012
NPM1	mixed ⁽⁺⁾ versus mixed ⁽⁻⁾	5.77	2.43-13.69	<0.0001
R-IPi	ripi ⁽²⁾ versus ripi ^(0,1)	4.97	1.91-12.91	0.001

Figure S5: Univariate and multivariate survival analyses of CYCLON and NPM1 staining patterns. **A-F.** Kaplan-Meier analysis of overall survival (OS, A-D, C-F) and progression-free survival (PFS, B-E) associated to CYCLON (A-C) and NPM1 (D-F) subgroups. **G.** Multivariate bootstrap cox regression analysis of the significance of independent prognostic variables CYCLON, NPM1 and R-IPi for PFS. HR, Hazard Ratio; R-IPi, Revised International Prognostic Index, * 95% confidence intervals (CI) based on bootstrap resampling (1,000 replicates).

Parameters	Cohort (range) [proportion]
Median age (years old)	68 (31; 97)
Median age at time of diagnosis (years old)	65 (29; 94)
<ul style="list-style-type: none"> > 60 years 	69.0% [67/97]
Gender	
<ul style="list-style-type: none"> Male 	55.6% [54/97]
<ul style="list-style-type: none"> Female 	44.4% [43/97]
Median time of treatment (days)	123 (13; 214)
Median time of follow up (days)	1561 (43; 2784)
Median time of follow up (months)	51 (1.5; 91.5)
Number of patients with relapse	39.2% [38/97]
Ann Arbor staging classification (time of diagnosis)	
<ul style="list-style-type: none"> I (Single lymph node (LN) involves) 	11.3% [11/97]
<ul style="list-style-type: none"> II (2 or more LN ipsilateral to the diaphragm) 	20.6% [20/97]
<ul style="list-style-type: none"> III (LN on both sides of the diaphragm) 	21.6% [21/97]
<ul style="list-style-type: none"> IV (Involvement extralymphatic organs or tissues) 	46.4% [45/97]
R-IPI score (IPI score, time of diagnosis)	
<ul style="list-style-type: none"> Very good (0) 	7.2% [7/97]
<ul style="list-style-type: none"> Good (1-2) 	44.3% [43/97]
<ul style="list-style-type: none"> Poor (3-5) 	48.5% [47/97]
LDH > upper limit of normal	75.0% [73/97]
DLBCL subtype (Hans' algorithm)	
<ul style="list-style-type: none"> GCB 	37.1% [36/97]
<ul style="list-style-type: none"> ABC 	62.9% [61/97]
Cyclon (IHC)	
<ul style="list-style-type: none"> Negative 	8.2% [8/97]
<ul style="list-style-type: none"> Diffuse 	60.9% [59/97]
<ul style="list-style-type: none"> Foci 	16.5% [16/97]
<ul style="list-style-type: none"> Mirror 	14.4% [14/97]
NPM1 (IHC)	
<ul style="list-style-type: none"> Cytoplasmic 	25.8% [25/97]
<ul style="list-style-type: none"> Nuclear 	74.2% [72/97]

Table 1. Cohort characteristics

IX. Conclusions

Afin de déterminer de nouveaux facteurs prédictifs de la réponse au R-CHOP dans les LBDGC, nous avons constitué une cohorte de 97 LBDGC *de novo*, tous traités par R-CHOP en première ligne. A partir des tumeurs des patients inclus dans cette cohorte, il a été construit 5 blocs de TMA.

Notre première étude a permis en premier lieu de confirmer l'impact pronostique défavorable de p53 en univarié dans les LBDGC. De plus, les analyses multivariées ont mis en lumière le rôle protecteur d'un aspect morphologique en « ciel étoilé » dans les LBDGC surexprimant c-MYC et/ou p53. Pour rappel, le « ciel étoilé » est défini par la présence de macrophages à corps tingibles mêlés aux cellules tumorales et il est associé aux tumeurs présentant un fort renouvellement cellulaire et un important taux d'apoptose. Par conséquent ce dernier semble permettre de contrer les effets néfastes d'une surexpression de p53 ou de c-MYC dans les LBDGC. Nous avons émis l'hypothèse, à partir de l'ensemble des données récoltées, qu'un fort taux d'apoptose au sein du micro-environnement tumoral est un mécanisme de défense cellulaire pour endiguer la prolifération tumorale. Les données NGS renforcent cette idée en montrant que ces trois variables (c-MYC, p53 et le « ciel étoilé ») ont un profil mutationnel spécifique incluant *FOXO1*, *B2M*, *TNFRSF14* et *PIM1*. Ces gènes sont tous impliqués, par différents mécanismes, dans le renouvellement cellulaire. Nous avons donc mis en évidence un réseau qui a un impact pronostique en régulant l'apoptose dans les LBDGC, ce réseau étant composé d'acteurs pouvant être des cibles thérapeutiques potentielles.

Notre deuxième approche s'est portée sur l'expression de CYCLON au sein de cette même cohorte de LBDGC. La co-immunoprécipitation, visant à étudier les interactions protéines-protéines autour de CYCLON, a permis d'isoler NPM1 comme

facteur en lien avec CYCLON. Nous avons donc cherché si ces deux protéines étaient associées à la résistance au R-CHOP *in vivo*. En univarié, les données IHC ont montré que le pourcentage de cellules tumorales positives ou l'intensité de marquage de CYCLON et NPM1 n'étaient pas en lien avec la survie. Mais il a été noté que CYCLON présentait parfois une localisation extra-nucléolaire (CYCLONmirror) tandis que NPM1 était parfois retrouvée dans le cytoplasme et le noyau (NPM1mixte). Nous avons mis en évidence que NPM1mixte et CYCLONmirror sont associés très significativement à un mauvais pronostic. De plus, des analyses multivariées ont montré que ces deux facteurs pronostiques sont indépendants, aussi robustes que le score r-IPI et qu'ils peuvent même s'ajouter à ce dernier afin de prédire un groupe de LBDGC à très haut risque de rechutes. Par conséquent, il nous semble intéressant de rechercher l'expression de ces deux protéines pour tous les LBDGC avant la mise en place du R-CHOP afin d'identifier les patients nécessitant un traitement plus agressif d'emblée (CYCLONmirror / NPM1mixte / r-IPI élevé).

L'ensemble de ces données doivent être confirmées sur des cohortes plus larges.

X. Perspectives

Dans le futur, six axes de travail se dessinent :

1) La fabrication des blocs de TMA permet de disposer d'un outil nous permettant d'avoir rapidement accès à une cohorte homogène dont le recueil des données cliniques, biologiques et moléculaires a déjà été réalisé et répertorié de façon précise. Ainsi, ces blocs de TMA pourront être utilisés afin d'étudier de nouveaux biomarqueurs potentiellement intéressants dans cette pathologie.

2) Le recueil des données NGS pour la totalité des patients inclus dans l'étude nous permettrait d'affiner les profils mutationnels évoqués.

3) Afin de mieux préciser le rôle protecteur de l'apoptose dans les LBDGC, il faudrait quantifier de manière plus précise le taux d'apoptose des LBDGC, via une étude IHC visant différentes Caspases, avant de corrélérer ces données IHC avec la survie et avec les autres biomarqueurs étudiés.

4) A propos de CYCLON et NPM1, une étude par immunofluorescence permettrait de mieux appréhender les interactions entre ces deux protéines mais également avec le reste des structures nucléaires ou nucléolaires. En effet, la principale zone d'ombre qui persiste dans cette étude est de comprendre la mécanistique de CYCLON avec le nucléole. Il est peu commun de mettre en évidence un marquage nucléolaire ou extra nucléolaire en IHC et CYCLON est, à notre connaissance, la première protéine pour laquelle cette positivité est retrouvée. D'un point de vue fonctionnel, il nous est encore difficile d'expliquer pourquoi et comment CYCLON navigue entre le noyau et les structures nucléolaires. Notre première hypothèse serait que CYCLON, à l'état physiologique, est en lien avec le nucléole mais, en situation pathologique ayant pour

conséquence une augmentation de son expression, CYCLON quitterait le nucléole pour rejoindre le secteur extra-nucléolaire.

5) La capacité de CYCLON de se déplacer au sein du noyau est aussi confirmée par ses localisations très atypiques selon les différentes phases d'une mitose ; le lien entre mitose et CYCLON reste encore incompris et difficile à étudier mais il nous semble être une piste importante dans la compréhension de la fonction de cette protéine.

6) Enfin, une lecture quantitative de l'expression de CYCLON et NPM1 par intelligence artificielle permettrait d'affiner nos résultats et de confirmer l'impact pronostique de ces deux facteurs.

Liste des abréviations (abréviations anglaises)

ABC : Activated B-Cell

CG : Centre Germinatif (GC)

COO : Cell Of Origin

DEL : Lymphome Double Expresseur

DHL / THL : Lymphomes Double Hit / Triple Hit

FFPE : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

GCB : Germinal Center B-cell / nGCB : non GCB

HGBL : High Grade B-cell Lymphoma / Lymphome B de Haut Grade

IHC : Immunohistochimie

LBDGC, NOS : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (DLBCL)

LDH : Lactate Déshydrogénase

LH : Lymphome de Hodgkin (HL)

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique (CLL)

LNH : Lymphome Non-Hodgkiniens (NHL)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé (WHO)

OS : Overall Survival

PCG : post-CG

PFS : Progression-Free Survival

R-CHOP : Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxy Doxorubicine, Vincristine et Prednisone

TMA : Tissue Micro Array

Bibliographie

- 1 Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016; **127**; 2375-2390.
- 2 Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; **469**; 314-322.
- 3 Morton LM, Turner JJ, Cerhan JR, et al. Proposed classification of lymphoid neoplasms for epidemiologic research from the Pathology Working Group of the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood* 2007; **110**; 695-708.
- 4 Data explorer | ECIS
- 5 Facts and Statistics | Leukemia and Lymphoma Society.
- 6 Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2013.
- 7 Salati M, Cesaretti M, Macchia M, et al. Epidemiological overview of Hodgkin lymphoma across the Mediterranean basin. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2014; **6**; e2014048.
- 8 Laurent C, Baron M, Amara N, et al. Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. *J. Clin. Oncol.* 2017; **35**; 2008-2017.
- 9 Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2005; **5**; 251-262.
- 10 Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, et al. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes: 2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes. *CA. Cancer J. Clin.* 2016; **66**; 443-459.
- 11 Smith A, Howell D, Patmore R, et al. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br. J. Cancer* 2011; **105**; 1684-1692.
- 12 Smith A, Crouch S, Lax S, et al. Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004–2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. *Br. J. Cancer* 2015; **112**; 1575-1584.
- 13 Sant M, Minicozzi P, Mounier M, et al. Survival for haematological malignancies in Europe between 1997 and 2008 by region and age: results of EURO CARE-5, a population-based study. *Lancet Oncol.* 2014; **15**; 931-942.
- 14 Issa DE, van de Schans SAM, Chamuleau MED, et al. Trends in incidence, treatment and survival of aggressive B-cell lymphoma in the Netherlands 1989-2010. *Haematologica* 2015; **100**; 525-533.

- 15 Shi Y, Han Y, Yang J, et al. Clinical features and outcomes of diffuse large B-cell lymphoma based on nodal or extranodal primary sites of origin: Analysis of 1,085 WHO classified cases in a single institution in China. *Chin. J. Cancer Res.* 2019; **31**; 152-161.
- 16 Armitage JO, Weisenburger DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J. Clin. Oncol.* 1998; **16**; 2780-2795.
- 17 Chuang S-S, Ye H, Du M-Q, et al. Histopathology and Immunohistochemistry in Distinguishing Burkitt Lymphoma From Diffuse Large B-Cell Lymphoma With Very High Proliferation Index and With or Without a Starry-Sky Pattern: A Comparative Study With EBER and FISH. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; **128**; 558-564.
- 18 Kennedy GA, Tey S-K, Cobcroft R, et al. Incidence and nature of CD20-negative relapses following rituximab therapy in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: a retrospective review. *Br. J. Haematol.* 2002; **119**; 412-416.
- 19 Hans CP. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004; **103**; 275-282.
- 20 Winter JN, Weller EA, Horning SJ, et al. Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* 2006; **107**; 4207-4213.
- 21 Ohshima K, Kawasaki C, Muta H, et al. CD10 and Bcl10 expression in diffuse large B-cell lymphoma: CD10 is a marker of improved prognosis. *Histopathology* 2001; **39**; 156-162.
- 22 Nguyen L, Papenhausen P, Shao H. The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes* 2017; **8**.
- 23 Savage KJ, Johnson NA, Ben-Neriah S, et al. MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* 2009; **114**; 3533-3537.
- 24 Horn H, Ziepert M, Becher C, et al. MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013; **121**; 2253-2263.
- 25 Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzman T, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* 2013; **98**; 1554-1562.
- 26 Karube K, Campo E. MYC Alterations in Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Semin. Hematol.* 2015; **52**; 97-106.
- 27 Zhou M, Wang J, Ouyang J, et al. MYC protein expression is associated with poor prognosis in diffuse large B cell lymphoma patients treated with RCHOP chemotherapy. *Tumor Biol.* 2014; **35**; 6757-6762.

- 28 Vaidya R, Witzig TE. Prognostic factors for diffuse large B-cell lymphoma in the R(X)CHOP era. *Ann. Oncol.* 2014; **25**; 2124-2133.
- 29 Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, et al. Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. ; 9.
- 30 Hermine O, Haioun C, Lepage E, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non- Hodgkin's lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). ; 9.
- 31 Iqbal J, Meyer PN, Smith LM, et al. BCL2 Predicts Survival in Germinal Center B-cell-like Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with CHOP-like Therapy and Rituximab. *Clin. Cancer Res.* 2011; **17**; 7785-7795.
- 32 Mounier N, Briere J, Gisselbrecht C, et al. Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Blood* 2003; **101**; 4279-4284.
- 33 Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, et al. Concurrent Expression of MYC and BCL2 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J. Clin. Oncol.* 2012; **30**; 3452-3459.
- 34 Rosenthal A, Younes A. High grade B-cell lymphoma with rearrangements of MYC and BCL2 and/or BCL6: Double hit and triple hit lymphomas and double expressing lymphoma. *Blood Rev.* 2017; **31**; 37-42.
- 35 Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell populations. *Immunol. Today* 1999; **20**; 312-316.
- 36 Zhao P, Li L, Zhou S, et al. CD5 expression correlates with inferior survival and enhances the negative effect of p53 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* 2019; **37**; 360-367.
- 37 Xu-Monette ZY, Tu M, Jabbar KJ, et al. Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget* 2015; **6**; 5615-5633.
- 38 Jain P, Fayad LE, Rosenwald A, et al. Recent advances in de novo CD5 + diffuse large B cell lymphoma. *Am. J. Hematol.* 2013; **88**; 798-802.
- 39 Lu T-X, Wu S, Zhou X-Y, et al. CD5+MYC+ predicts worse prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Exp. Mol. Pathol.* 2020; **112**; 104326.
- 40 Zhang F, Li L, Zhang L, et al. Prognostic analysis of CD5 expression in double-hit diffuse large B-cell lymphoma and effectiveness comparison in patients treated with dose-adjusted EPOCH plus rituximab/R-CHOP regimens. *Blood Lymphat. Cancer Targets Ther.* 2019; **Volume 9**; 33-43.

- 41 Thakral B, Medeiros LJ, Desai P, et al. Prognostic impact of CD5 expression in diffuse large B-cell lymphoma in patients treated with rituximab-EPOCH. *Eur. J. Haematol.* 2017; **98**; 415-421.
- 42 Zilfou JT, Lowe SW. Tumor Suppressive Functions of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2009; **1**.
- 43 Lacroix M, Linares LK, Cam LL. Rôle du suppresseur de tumeurs p53 dans le contrôle du métabolisme. *médecine/sciences* 2013; **29**; 1125-1130.
- 44 Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* 2018; **25**; 104-113.
- 45 C B, T S. p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res.* 1998; **26**; 200-204.
- 46 Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2012; **120**; 3986-3996.
- 47 Wang XJ, Jeffrey Medeiros L, Bueso-Ramos CE, et al. P53 expression correlates with poorer survival and augments the negative prognostic effect of MYC rearrangement, expression or concurrent MYC/BCL2 expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod. Pathol.* 2017; **30**; 194-203.
- 48 Kramer MH, Hermans J, Parker J, et al. Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J. Clin. Oncol.* 1996; **14**; 2131-2138.
- 49 Young KH, Leroy K, Møller MB, et al. Structural profiles of TP53 gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* 2008; **112**; 3088-3098.
- 50 Xie Y, Bulbul MA, Ji L, et al. p53 Expression Is a Strong Marker of Inferior Survival in De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma and May Have Enhanced Negative Effect With MYC CoexpressionA Single Institutional Clinicopathologic Study. *Am. J. Clin. Pathol.* 2014; **141**; 593-604.
- 51 Yu L, Yu T-T, Young KH. Cross-talk between Myc and p53 in B-cell lymphomas. *Chronic Dis. Transl. Med.* 2019; **5**; 139-154.
- 52 Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* 2013; **121**; 2715-2724.
- 53 Linderoth J, Jerkeman M, Cavallin-Ståhl E, et al. Immunohistochemical Expression of CD23 and CD40 May Identify Prognostically Favorable Subgroups of Diffuse Large B-cell Lymphoma: A Nordic Lymphoma Group Study. ; 8.

- 54 Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood* 1994; **83**; 1460-1466.
- 55 Hall PA, Richards MA, Gregory WM, et al. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Pathol.* 1988; **154**; 223-235.
- 56 Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. 2000; **403**; 9.
- 57 Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2002; **346**; 1937-1947.
- 58 Lenz G, Wright GW, Emre NCT, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; **105**; 13520-13525.
- 59 Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2018; **131**; 2307-2319.
- 60 Bea S, Zettl A, Wright G, et al. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood* 2005; **106**; 3183-3190.
- 61 Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011; **470**; 115-119.
- 62 Iqbal J, Shen Y, Huang X, et al. Global microRNA expression profiling uncovers molecular markers for classification and prognosis in aggressive B-cell lymphoma. *Blood* 2015; **125**; 1137-1145.
- 63 Meyer PN, Fu K, Greiner TC, et al. Immunohistochemical Methods for Predicting Cell of Origin and Survival in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab. *J. Clin. Oncol.* 2010; **29**; 200-207.
- 64 Scott DW, Wright GW, Williams PM, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood* 2014; **123**; 1214-1217.
- 65 Bobée V, Ruminy P, Marchand V, et al. Determination of Molecular Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Classifier: A CALYM Study. *J. Mol. Diagn. JMD* 2017; **19**; 892-904.
- 66 Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* 2015; **126**; 2466-2474.
- 67 Ci W, Polo JM, Cerchiatti L, et al. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* 2009; **113**; 5536-5548.

- 68 Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K, et al. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2009; **27**; 5573-5579.
- 69 Iqbal J, Greiner T, Patel K, et al. Distinctive patterns of BCL6 molecular alterations and their functional consequences in different subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund UK* 2007; **21**; 2332-2343.
- 70 Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, et al. Combined Genetic Inactivation of Beta2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Cancer Cell* 2011; **20**; 728-740.
- 71 Trinh DL, Scott DW, Morin RD, et al. Analysis of FOXO1 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2013; **121**; 3666-3674.
- 72 Abdelnour-Berchtold E, Cerantola Y, Roulin D, et al. Rapamycin-mediated FOXO1 inactivation reduces the anticancer efficacy of rapamycin. *Anticancer Res.* 2010; **30**; 799-804.
- 73 Wilhelm K, Happel K, Eelen G, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature* 2016; **529**; 216-220.
- 74 Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 2011; **476**; 298-303.
- 75 Cheung K-JJ, Johnson NA, Affleck JG, et al. Acquired TNFRSF14 Mutations in Follicular Lymphoma Are Associated with Worse Prognosis. *Cancer Res.* 2010; **70**; 9166-9174.
- 76 Boice M, Salloum D, Mourcin F, et al. Loss of the HVEM Tumor Suppressor in Lymphoma and Restoration by Modified CAR-T Cells. *Cell* 2016; **167**; 405-418.e13.
- 77 Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* 2018; **24**; 679-690.
- 78 Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal Gene Signatures in Large-B-Cell Lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2008; **359**; 2313-2323.
- 79 Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2018; **378**; 1396-1407.
- 80 Vitolo U, Chiappella A, Franceschetti S, et al. Lenalidomide plus R-CHOP21 in elderly patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: results of the REAL07 open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2014; **15**; 730-737.
- 81 Dunleavy K, Pittaluga S, Czuczman MS, et al. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2009; **113**; 6069-6076.

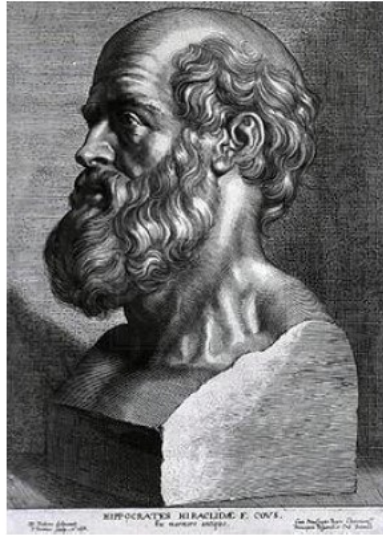
- 82 Wilson WH, Young RM, Schmitz R, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Med.* 2015; **21**; 922-926.
- 83 Younes A, Ansell S, Fowler N, et al. The landscape of new drugs in lymphoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017; **14**; 335-346.
- 84 Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2015; **26**; v116-v125.
- 85 Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, et al. Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2007; **25**; 579-586.
- 86 Vercellino L, Cottreau A-S, Casasnovas O, et al. High total metabolic tumor volume at baseline predicts survival independent of response to therapy. *Blood* 2020; **135**; 1396-1405.
- 87 Al Tabaa Y, Tout M, Casasnovas O, et al. Le volume métabolique initial influence l'exposition au rituximab et la survie dans les lymphomes B diffus à grandes cellules. *Médecine Nucl.* 2017; **41**; 144.
- 88 Casasnovas R-O, Ysebaert L, Thieblemont C, et al. FDG-PET-driven consolidation strategy in diffuse large B-cell lymphoma: final results of a randomized phase 2 study. *Blood* 2017; **130**; 1315-1326.
- 89 Casasnovas R-O, Meignan M, Berriolo-Riedinger A, et al. SUVmax reduction improves early prognosis value of interim positron emission tomography scans in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2011; **118**; 37-43.
- 90 Kong Y, Qu L, Li Y, et al. Predictive Significance of a New Prognostic Score for Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the Interim-Positron Emission Tomography Findings. *Medicine (Baltimore)* 2016; **95**.
- 91 Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1989; **7**; 1630-1636.
- 92 A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma | NEJM. *New England Journal of Medicine.*
- 93 Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* 2007; **109**; 1857-1861.
- 94 McKelvey EM, Gottlieb JA, Wilson HE, et al. Hydroxyldaunomycin (Adriamycin) combination chemotherapy in malignant lymphoma. *Cancer* 1976; **38**; 1484-1493.
- 95 Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, et al. Comparison of a Standard Regimen (CHOP) with Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1993; **328**; 1002-1006.

- 96 Greb A, Bohlius J, Trelle S, et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell support in first-line treatment of aggressive non-Hodgkin lymphoma - results of a comprehensive meta-analysis. *Cancer Treat. Rev.* 2007; **33**; 338-346.
- 97 A Clinical Evaluation of the International Lymphoma Study Group Classification of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* 1997; **89**; 3909-3918.
- 98 Coiffier B, Lepage E, Brière J, et al. CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2002; **346**; 235-242.
- 99 Feugier P, Van Hoof A, Sebban C, et al. Long-Term Results of the R-CHOP Study in the Treatment of Elderly Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J. Clin. Oncol.* 2005; **23**; 4117-4126.
- 100 Sehn LH, Donaldson J, Chhanabhai M, et al. Introduction of Combined CHOP Plus Rituximab Therapy Dramatically Improved Outcome of Diffuse Large B-Cell Lymphoma in British Columbia. *J. Clin. Oncol.* 2005; **23**; 5027-5033.
- 101 Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2010; **116**; 2040-2045.
- 102 Maurer MJ, Ghesquières H, Jais J-P, et al. Event-free survival at 24 months is a robust end point for disease-related outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2014; **32**; 1066-1073.
- 103 Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood* 2015; **125**; 22-32.
- 104 Crump M, Neelapu SS, Farooq U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood* 2017; **130**; 1800-1808.
- 105 Epperla N, Hamadani M, Reljic T, et al. Upfront autologous hematopoietic stem cell transplantation consolidation for patients with aggressive B-cell lymphomas in first remission in the rituximab era: A systematic review and meta-analysis. *Cancer* 2019; **125**; 4417-4425.
- 106 Récher C, Coiffier B, Haioun 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. *Lancet Lond. Engl.* 2011; **378**; 1858-1867.
- 107 Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, et al. Autologous Bone Marrow Transplantation as Compared with Salvage Chemotherapy in Relapses of Chemotherapy-Sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1995; **333**; 1540-1545.

- 108 Gisselbrecht C, Van Den Neste E. How I manage patients with relapsed/refractory diffuse large B cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2018; **182**; 633-643.
- 109 Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2010; **28**; 4184-4190.
- 110 Thieblemont C, Briere J, Mounier N, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2011; **29**; 4079-4087.
- 111 Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2019; **380**; 45-56.
- 112 Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Kte-C19 (anti-CD19 CAR T Cells) Induces Complete Remissions in Patients with Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL): Results from the Pivotal Phase 2 Zuma-1. *Blood* 2016; **128**; LBA-6-LBA-6.
- 113 Sehn LH, Herrera AF, Flowers CR, et al. Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2020; **38**; 155-165.
- 114 Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011; **117**; 2319-2331.
- 115 Snuderl M, Kolman OK, Chen Y-B, et al. B-cell lymphomas with concurrent IGH-BCL2 and MYC rearrangements are aggressive neoplasms with clinical and pathologic features distinct from Burkitt lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; **34**; 327-340.
- 116 Sesques P, Johnson NA. Approach to the diagnosis and treatment of high-grade B-cell lymphomas with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Blood* 2017; **129**; 280-288.
- 117 Sato A, Nakamura N, Kojima M, et al. Clinical outcome of Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in the rituximab era. *Cancer Sci.* 2014; **105**; 1170-1175.
- 118 Salaverria I, Philipp C, Oschlies I, et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood* 2011; **118**; 139-147.
- 119 Montesinos-Rongen M, Schäfer E, Siebert R, et al. Genes regulating the B cell receptor pathway are recurrently mutated in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 2012; **124**; 905-906.
- 120 McAllister LD, Doolittle ND, Guastadisegni PE, et al. Cognitive outcomes and long-term follow-up results after enhanced chemotherapy delivery for primary central nervous system lymphoma. *Neurosurgery* 2000; **46**; 51-60; discussion 60-61.

- 121 Senff NJ, Hoefnagel JJ, Jansen PM, et al. Reclassification of 300 primary cutaneous B-Cell lymphomas according to the new WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas: comparison with previous classifications and identification of prognostic markers. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2007; **25**; 1581-1587.
- 122 Grange F, Joly P, Barbe C, et al. Improvement of survival in patients with primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type, in France. *JAMA Dermatol.* 2014; **150**; 535-541.
- 123 Savage KJ, Monti S, Kutok JL, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; **102**; 3871-3879.
- 124 Brunet V, Marouan S, Routy J-P, et al. Retrospective study of intravascular large B-cell lymphoma cases diagnosed in Quebec. *Medicine (Baltimore)* 2017; **96**.
- 125 Abramson JS. T-cell/histiocyte-rich B-cell lymphoma: biology, diagnosis, and management. *The Oncologist* 2006; **11**; 384-392.
- 126 Hoshino A, Fujii H. Redundant promoter elements mediate IL-3-induced expression of a novel cytokine-inducible gene, cyclon. *FEBS Lett.* 2007; **581**; 975-980.
- 127 Saint Fleur S, Hoshino A, Kondo K, et al. Regulation of Fas-mediated immune homeostasis by an activation-induced protein, Cyclon. *Blood* 2009; **114**; 1355-1365.
- 128 Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G, et al. Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat. Genet.* 2005; **37**; 382-390.
- 129 Emadali A, Rousseaux S, Bruder-Costa J, et al. Identification of a novel BET bromodomain inhibitor-sensitive, gene regulatory circuit that controls Rituximab response and tumour growth in aggressive lymphoid cancers. *EMBO Mol. Med.* 2013; **5**; 1180-1195.

Serment d'Hippocrate



SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

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

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

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

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

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

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

THÈSE SOUTENUE PAR : Antonin BOUROUMEAU

TITRE :

EVALUATION DE DIFFERENTS FACTEURS PRONOSTIQUES DANS LES LYMPHOMES B DIFFUS A GRANDES CELLULES TRAITES PAR R-CHOP

CONCLUSION :

Afin de déterminer de nouveaux facteurs prédictifs de la réponse au R-CHOP dans les LBDGC, nous avons constitué une cohorte de 97 LBDGC *de novo*, tous traités par R-CHOP en première ligne. A partir des tumeurs des patients inclus dans cette cohorte, il a été construit 5 blocs de TMA.

Notre première étude a permis en premier lieu de confirmer l'impact pronostique défavorable de p53 en univarié dans les LBDGC. De plus, les analyses multivariées ont mis en lumière le rôle protecteur d'un aspect morphologique en « ciel étoilé » dans les LBDGC surexprimant c-MYC et/ou p53. Pour rappel, le « ciel étoilé » est défini par la présence de macrophages à corps tingibles mêlés aux cellules tumorales et il est associé aux tumeurs présentant un fort renouvellement cellulaire et un important taux d'apoptose. Par conséquent ce dernier semble permettre de contrer les effets néfastes d'une surexpression de p53 ou de c-MYC dans les LBDGC. Nous avons émis l'hypothèse, à partir de l'ensemble des données récoltées, qu'un fort taux d'apoptose au sein du micro-environnement tumoral est un mécanisme de défense cellulaire pour endiguer la prolifération tumorale. Les données NGS renforcent cette idée en montrant que ces trois variables (c-MYC, p53 et le « ciel étoilé ») ont un profil mutationnel spécifique incluant *FOXO1*, *B2M*, *TNFRSF14* et *PIM1*. Ces gènes sont tous impliqués, par différents mécanismes, dans le renouvellement cellulaire. Nous avons donc mis en évidence un réseau qui a un impact pronostique en régulant l'apoptose dans les LBDGC, ce réseau étant composé d'acteurs pouvant être des cibles thérapeutiques potentielles.

Notre deuxième approche s'est portée sur l'expression de CYCLON au sein de cette même cohorte de LBDGC. La co-immunoprécipitation, visant à étudier les interactions protéines-protéines autour de CYCLON, a permis d'isoler NPM1 comme facteur en lien avec CYCLON. Nous avons donc cherché si ces deux protéines étaient associées à la résistance au R-CHOP *in vivo*. En univarié, les données IHC ont montré que le pourcentage de cellules tumorales positives ou l'intensité de marquage de CYCLON et NPM1 n'étaient pas en lien avec la survie. Mais il a été noté que CYCLON

présentait parfois une localisation extra-nucléolaire (CYCLONmirror) tandis que NPM1 était parfois retrouvée dans le cytoplasme et le noyau (NPM1mixte). Nous avons mis en évidence que NPM1mixte et CYCLONmirror sont associés très significativement à un mauvais pronostic. De plus, des analyses multivariées ont montré que ces deux facteurs pronostiques sont indépendants, aussi robustes que le score r-IPI et qu'ils peuvent même s'ajouter à ce dernier afin de prédire un groupe de LBDGC à très haut risque de rechutes. Par conséquent, il nous semble intéressant de rechercher l'expression de ces deux protéines pour tous les LBDGC avant la mise en place du R-CHOP afin d'identifier les patients nécessitant un traitement plus agressif d'emblée (CYCLONmirror / NPM1mixte / r-IPI élevé).

L'ensemble de ces données doivent être confirmées sur des cohortes plus larges.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 24/09/20


LE DOYEN



Pr. Patrice MORAND

Pour le Président
et par délégation
Le Doyen de Médecine
Pr. Patrice MORAND

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE



Pr. A. TRAVERSE-
GLEHEN

Pr. Alexandra TRAVERSE-GLEHEN