



**HAL**  
open science

# Apport d'un classificateur moléculaire dans l'essai "Gained" du LYSA ciblant les lymphomes B diffus à grandes cellules

Amine Moslemi

► **To cite this version:**

Amine Moslemi. Apport d'un classificateur moléculaire dans l'essai "Gained" du LYSA ciblant les lymphomes B diffus à grandes cellules. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03516401

**HAL Id: dumas-03516401**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03516401v1>**

Submitted on 7 Jan 2022

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

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



UNIVERSITÉ DE PICARDIE JULES VERNE  
**UFR DE MÉDECINE D'AMIENS**

Année universitaire : 2020-2021

Thèse N°2021 - 139

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

**APPORT D'UN CLASSIFICATEUR MOLÉCULAIRE DANS L'ESSAI  
GAINED DU LYSA CIBLANT LES LYMPHOMES B DIFFUS À  
GRANDES CELLULES**

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2021

à la Faculté de Médecine d'Amiens

**par Amine MOSLEMI**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU**

**Monsieur le Professeur Denis CHATELAIN**

**Madame la Professeur Brigitte GUBLER**

**Monsieur le Docteur Philippe RUMINY**

**Directeur de thèse :**

**Monsieur le Professeur Thierry MOLINA**

---

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Henri SEVESTRE**

Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques à l'UFR de Médecine d'Amiens

Adjoint au chef de l'Oncopôle

*Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Vous m'avez fait confiance dès le début de mon internat, vous m'avez toujours conseillé, encouragé et soutenu. J'ai fait mes premiers pas en hématopathologie grâce à vous. Je vous remercie du fond du cœur.*

*Je vous témoigne ma profonde et respectueuse reconnaissance.*

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Thierry MOLINA**

Professeur d'Anatomie et de Cytologie pathologiques de l'Université de Paris

Chef du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques des Hôpitaux Universitaires Robert  
Debré et Necker - Enfants Malades, AP-HP

*Je vous remercie profondément de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer ce travail de thèse avec vous. Vous m'avez permis de réaliser un stage dans votre service et de profiter de vos enseignements. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre confiance.*

*Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma gratitude.*

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

(Hématologie, transfusion)

Chef du service d'hématologie clinique et de thérapie cellulaire

Chef du Pôle « Oncopôle »

*Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.*

A mon Maître,

**Monsieur le Professeur Denis CHATELAIN**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier

(Anatomie et cytologie pathologique)

Chef du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU d'Amiens Picardie

*Je tiens à te remercier profondément pour avoir accepté de juger ce travail, mais aussi pour tous tes enseignements durant mon internat. Tu as toujours été investi dans la formation des internes, mais également investi dans la vie et la bonne humeur du service (les crêpes de la chandeleur, le Beaujolais nouveau, le tournoi de ping-pong...). Le "diagnostic de l'humilité" est devenu mon mantra. Je te remercie du fond du cœur pour ta disponibilité, ton soutien et ta confiance.*

*Tu trouveras ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.*

A mon Maître,

**Madame le Professeur Brigitte GUBLER**

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Chef de Service "Laboratoire d'Immunologie"

Chef de Service "Laboratoire d'Oncobiologie moléculaire"

Pôle « Biologie et pharmacie »

*Merci infiniment d'avoir accepté de juger ce travail. Vous m'avez très agréablement accueilli pendant un semestre et m'avez permis de profiter de vos enseignements. Merci pour votre disponibilité et votre confiance.*

*Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance et mon profond respect.*

A mon Maître,

**Monsieur le Docteur Philippe RUMINY**

Unité INSERM 1245, Centre Henri Becquerel, Rouen

*Merci infiniment d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Vous avez toujours été disponible et m'avez conseillé pour la rédaction de ce travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de ma gratitude.*



# Remerciements

A ma famille, à mes parents qui m'ont toujours soutenu et encouragé à donner le meilleur de moi-même, à mes frères, sur qui je peux toujours compter, je suis fier de devenir l'un de vos confrères, je vous aime.

A mes êtres chers qui me suivent depuis de nombreuses années, Maxime, Thomas, Clément, Siiri, merci d'être présent pour moi, je n'imagine pas ma vie sans vous. A mes proches, Thibaut, Elodie, Chloé, Juan, Marie, Elisa, Stan, Marius, Annette, Quentin, Laura, Julie, Rémi, Eugénie, Simon, les Almy, les Doré, Corinne, Philippe, Elodie, Benoit, Juliette et Eliott.

A tout le service d'Anapath du CHU d'Amiens, qui lors de mon arrivée il y a 4 ans, m'a accueilli chaleureusement, je vous remercie.

A Christophe, avec qui il est toujours agréable de travailler et discuter, maître incontestable de la dermatopathologie, qui nous fait profiter régulièrement de ses enseignements, je te remercie.

A Carole, avec qui j'ai fait mes premiers pas en anapath, toujours à l'écoute et disponible, je vous remercie.

A Jean, avec qui j'ai fait mes débuts en extempo, toujours de bonne humeur, je vous remercie.

A tous les "anciens" internes, à Alexandra, merci pour ta bonne humeur infailible et ton soutien, c'est toujours un plaisir d'être en ta compagnie, toujours un plaisir de t'écouter jouer du sax. Merci pour le super semestre de gynécopath avec toi, et merci pour tous les ganglions que tu m'as confiés à I-Path :D.

A Nelly, qui garde un bronzage exceptionnel été comme hiver, avec qui l'on peut travailler comme faire du squash, aller se balader ou jouer à Seven Wonders, merci pour tout ce temps partagé ensemble. J'espère que j'aurai l'opportunité de profiter de ton savoir en neuropath, et qu'on partagera encore de nombreux loisirs.

A Estelle, avec qui je peux toujours me confier (et inversement), je ne compte plus les heures à discuter avec toi, jouer (avec tes parents aussi ^^), c'est toujours un bonheur, merci d'être là pour moi. Je n'oublierai jamais ton accueil chaleureux à Salon, au moment des assises :D.

A Jean-Re, qui traite tout le monde de chèvre mais qui n'en est pas moins une ^^, merci de nous prouver jour après jour que le monde n'appartient pas forcément à ceux qui se lèvent (ou arrivent) tôt :D, merci pour ta bonne humeur et ton implication dans les séances de lame.

A Mickael, exilé en Suisse, merci pour les séances ciné chez toi, merci pour les soirées à discuter, j'espère que tu as trouvé ton bonheur en dehors de l'anapath, et j'espère qu'on se reverra très bientôt !

A Guillaume, Lewis, Soufiane, j'espère que tout va bien pour vous, ce serait un plaisir de vous revoir.

A Amel, qu'est-ce qui t'as pris de faire un M2 ?! RIP les cultures cellulaires qui n'ont pas poussées... Tu nous manques. Merci pour ton soutien, j'espère qu'un jour tu réaliseras qu'Amiens, c'est carrément mieux que Paris :p.

A Clémence (la grande), tu es repartie beaucoup trop vite à Rouen, j'aurais souhaité passer plus de temps avec toi, j'espère que tu es heureuse depuis ton retour, tu nous manques.

A Ahmed, probablement le seul interne d'anapath sur la planète à aimer faire des gardes aux urgences, j'ai apprécié mon semestre avec toi à Saint-Quentin, toujours calme et de bon conseil.

A mes co-internes de promo, Pierre le futur PU-PH, à qui on fait facilement confiance, qui a appris à gérer les biopsies rénales en un temps record, et à Robin, le crossfiteur invétéré qui nous ramène du bon vin et de la bonne humeur du sud, je sais que je peux compter sur vous.

A Benjamin, merci pour tes précieux conseils de jardinage :D, pour les moments partagés en stage ou en dehors, les moments de musique, de discussion, c'est toujours un plaisir.

A Arnaud, qui ne part jamais avant 20h, bravo pour ton implication et ta ferveur dans le travail (il n'y a peut-être que Pierre qui rivalise ^^).

A Clémence (la petite), j'espère que je ne t'ai pas trop forcée à choisir l'anapath ^^'. En tout cas, on était ravis de t'accueillir. Tu es toujours de bonne humeur et volontaire, bientôt les JO en patinage artistique !

A Quentin, bon compagnon de fête, toujours partant pour une soirée !

A Guillaume, avec qui j'ai eu ma première expérience de "chef", j'espère que je ne t'ai pas raconté trop de bêtises :o

A Marion et Axel, avec qui je n'ai pas encore pu passer beaucoup de temps, mais je sais que ça viendra !

A l'équipe de choc de l'hôpital nord, Chloé (et Namie !), Elodie, Valentine, Louis-Victor, Richard, Mahé, Matthieu, Nathalie, Cathie, Marie-Pierre, Ahmed, Florine, Dominique, Christine, Elise, Sylvie, Riad, Dorothée, Sophie, Isabelle, Isabelle, Babeth, Catherine, Marie, Valérie, c'est un plaisir de travailler avec vous au quotidien.

A toute l'équipe du service d'anapath de Saint-Quentin qui m'a accueilli pendant 2 semestres, Laure, Daniela, Rana, Malika, Sabrina, Morgane, Benoît, Béatrice, Corinne, Nathalie, Mélanie, Sakina, je vous remercie.

A toute l'équipe du service d'anapath de Necker, Thierry, Julie, Pierre, Marion, Sylvie, Stéphanie, Jean-Paul, Monsieur Barbet, Viorel, Monique, merci pour tout. A mes co-internes d'inter-CHU, Sarah, Nicolas, Maya, Emmanuel, Mona, Guillaume, j'espère qu'on se recroisera. Aux techniciens et secrétaires, merci.

A toute l'équipe du service d'oncobiologie moléculaire du CHU d'Amiens, Brigitte, Julie, Camille, Léa, Jérôme, Anne, Florine, Laura, merci pour ce semestre agréable à vos côtés. Merci à mes co-internes d'oncobio, Marion et Kaies, avec qui l'entente a été immédiate ! Bon courage Marion pour ta thèse, on est dans le même bateau ! Kaies, je ne m'inquiète pas, elle est déjà quasiment bouclée ! Merci beaucoup pour ton aide statisticienne ! Merci à Amandine que j'ai rencontré par la suite, pour les séances de remise en forme, et de nous avoir remarquablement invités chez Marion ! Merci à Kevan également.

A toute l'équipe de I-Path, Thomas, Philippe, Céline, Claire, Monsieur Richard, Francis, merci de votre disponibilité, j'ai appris énormément à vos côtés, et merci de m'avoir fait confiance pour l'hémato. Merci à tous les techniciens et secrétaires, notamment ceux de macro (Solène, Pauline, Aude, Nathan, Thomas) avec qui j'ai passé de nombreuses heures à découper des vessies ^^.

Aux techniciens et ingénieurs du LYSA-Pathologie, Chantal, Maryse, Véronique, à Nicolas Nio, merci beaucoup pour votre aide. Merci au Pr Emmanuel Itti et au Dr Paul Blanc Durand pour avoir accepté de relire les TEP-scanner d'une partie des patients. Merci au Dr Fabienne Desmots-Loyer et au Pr Fest pour leur aide dans la classification NGS des patients du GAINED. Aux patients du GAINED, cliniciens, pathologistes, imageurs du LYSA et au LYSARC, merci.

# Table des matières

<b>I. Introduction</b> .....	<b>14</b>
1) Généralités.....	14
2) Les lymphomes B diffus à grandes cellules non spécifiés (DLBCL NOS) .....	15
3) Les lymphomes B primitifs du médiastin (PMBL).....	19
4) Développement de nouvelles techniques utilisant l'intelligence artificielle .....	20
5) Objectifs de l'étude .....	22
<b>II. Matériel et méthodes</b> .....	<b>23</b>
1) Population d'étude.....	23
2) Relecture LYSA-Pathologie.....	23
3) Nanostring .....	24
4) Classificateur moléculaire .....	24
5) NGS.....	29
6) FISH .....	29
7) Étude immunohistochimique complémentaire.....	29
8) Étude statistique .....	30
<b>III. Résultats</b> .....	<b>31</b>
1) Relecture LYSA-Pathologie.....	31
2) Résultats du classificateur moléculaire .....	32
3) Concordance et discordance diagnostique entre le classificateur moléculaire et la relecture LYSA-P .....	33
4) Réconciliation diagnostique à la lumière de l'ensemble des données moléculaires ...	35
5) Interprétation des données du NGS pour 10 cas de classification difficile .....	41
6) Population finale avec diagnostic de réconciliation .....	43

7) Concordance finale entre le classificateur moléculaire après réévaluation et le diagnostic de réconciliation.....	45
8) Concordance GCB/ABC entre classificateur moléculaire, algorithme de Hans et Nanostring .....	47
9) Réévaluation des données du TEP-scanner pour les cas de PMBL .....	50
10) Réévaluation des données morphologiques des PMBL .....	50
11) Corrélation immunohistochimie et RT-MLPA pour la signature PMBL.....	55
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>61</b>
<b>V. Conclusion.....</b>	<b>65</b>
<b>VI. Références bibliographiques .....</b>	<b>66</b>

# Liste des abréviations

DLBCL : Diffuse large B-cell lymphoma / Lymphome B diffus à grandes cellules.

NHL : Non-Hodgkin lymphoma / Lymphome non-Hodgkinien.

NOS : Not otherwise specified / Sans autre spécificité.

FISH : Fluorescence in situ hybridation / Hybridation fluorescente in situ.

NGS : Next generation sequencing / Séquençage nouvelle génération.

PMBL : Primary mediastinal large B-cell lymphoma / Lymphome B primitif du médiastin.

GEP : Gene expression profiling / Profil d'expression génique.

COO : Cell of origin / Cellule d'origine.

GCB : Germinal center B-cell / Lymphocyte B centro-germinatif.

ABC : Activated B-cell / Lymphocyte B activé.

RT-MLPA : Reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification / Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation après transcriptase inverse.

cHL : Classical Hodgkin lymphoma / Lymphome de Hodgkin classique

FFPE : Formalin-fixed paraffin-embedded / Fixé en formol et inclus en paraffine.

FL : Follicular lymphoma / Lymphome folliculaire.

MCL : Mantle cell lymphoma / Lymphome du manteau.

MZL : Marginal zone lymphoma / Lymphome de la zone marginale.

CLL/SLL : Chronic lymphocytic leukaemia / Small lymphocytic lymphoma / Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire.

THRLBCL : T-cell / histiocyte-rich large B-cell lymphoma / Lymphome B diffus à grandes cellules riche en lymphocytes T et / ou en histiocytes.

HGBL : High-grade B-cell lymphoma / Lymphome B de haut grade.

BL : Burkitt lymphoma / Lymphome de Burkitt.

NLPHL : Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma / Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire.

ALCL : Anaplastic large cell lymphoma / Lymphome à grandes cellules anaplasiques.

B-ALL/LBL : B-acute lymphoblastic leukaemia / lymphoma / Leucémie aiguë lymphoblastique B / Lymphome lymphoblastique B.

PCM : Plasma cell myeloma / Myélome.

B-NHL : B-cell non-Hodgkin lymphoma / Lymphome B non-Hodgkinien.

AITL : Angioimmunoblastic T-cell lymphoma / Lymphome T angio-immunoblastique.

HGBL DH/TH : High-grade B-cell lymphoma double hit / triple hit / Lymphome B de haut grade double hit / triple hit.

# I. Introduction

## 1) Généralités

Le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) est la néoplasie lymphoïde B la plus fréquente chez l'adulte, représentant 30 à 40% des lymphomes non Hodgkiniens (NHL). Les DLBCL forment un groupe d'entités hétérogènes par leur présentation clinique, leurs caractéristiques histologiques et biologiques, et leur pronostic (figure n°1). Certains sous-types représentent des entités bien distinctes, cependant, la grande majorité des cas sont classés selon l'OMS en DLBCL NOS (Not Otherwise Specified), représentant 80 à 85% des DLBCL. Il s'agit d'un diagnostic d'exclusion, nécessitant un panel de techniques exhaustif afin de ne pas omettre l'ensemble des sous-types spécifiques (par exemple les DLBCL EBV + NOS qui nécessiteraient pour les reconnaître de façon optimale une technique systématique d'hybridation in situ EBER, les lymphomes B de haut grade double/triple hit qui posent le problème de la FISH MYC systématique dans tous les DLBCL). Parmi les sous-types de DLBCL, le lymphome B primitif du médiastin (PMBL), dérivé des lymphocytes B thymiques, représente 2 à 3% des NHL. Le diagnostic de cette entité et sa distinction avec le DLBCL NOS est souvent difficile, car les deux sous-types histologiques possèdent des caractéristiques cliniques, histologiques et immunohistochimiques communes (1).

<b>Diffuse large B-cell lymphoma, NOS</b>
Morphological variants
Centroblastic
Immunoblastic
Anaplastic
Other rare variants
Molecular subtypes
Germinal centre B-cell subtype
Activated B-cell subtype
<b>Other lymphomas of large B cells</b>
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary diffuse large B-cell lymphoma of the CNS
Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type
EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, NOS
Diffuse large B-cell lymphoma associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Large B-cell lymphoma with <i>IRF4</i> rearrangement
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK-positive large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
<i>HHV8</i> -positive diffuse large B-cell lymphoma
Primary effusion lymphoma
<b>High-grade B-cell lymphoma</b>
High-grade B-cell lymphoma with <i>MYC</i> and <i>BCL2</i> and/or <i>BCL6</i> rearrangements
High-grade B-cell lymphoma, NOS
<b>B-cell lymphoma, unclassifiable</b>
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classic Hodgkin lymphoma

Figure n°1 : Classification des DLBCL selon l'OMS (1).

## 2) Les lymphomes B diffus à grandes cellules non spécifiés (DLBCL NOS)

### a. Epidémiologie et présentation clinique

Les DLBCL NOS représentent 25 à 35% des NHL. Ils sont plus fréquemment diagnostiqués chez les patients âgés avec un âge médian autour de 70 ans au diagnostic, mais ils sont parfois retrouvés chez les enfants et jeunes adultes. Ils sont légèrement plus fréquents chez l'homme.

Les patients présentent habituellement une masse tumorale de taille rapidement progressive de localisation ganglionnaire, mais 40% des cas présentent une localisation initiale extra-ganglionnaire. Le site extra-ganglionnaire le plus fréquent est le tractus digestif, mais tout autre localisation extra-ganglionnaire est possible. Un envahissement médullaire est retrouvé chez 10 à 25% des patients.

La symptomatologie est souvent représentée par des signes B (amaigrissement, asthénie, fièvre, sueurs nocturnes), associée à des manifestations cliniques propres au site anatomique envahi. Certains patients sont asymptomatiques (1).

### b. Histologie et immunophénotype

A l'examen microscopique, les DLBCL NOS sont caractérisés par une prolifération d'architecture diffuse, constituée d'éléments lymphoïdes B de taille moyenne à grande. Trois variants morphologiques sont décrits : centroblastique (le plus fréquent), immunoblastique et anaplasique. Il s'y associe des lymphocytes T réactionnels et histiocytes en nombre variable, et des bandes de fibroses peuvent être observées. En immunohistochimie, il n'existe pas de marqueur spécifique des DLBCL NOS. Ils expriment, comme la plupart des DLBCL, des marqueurs pan-B tels que CD20 et CD79a. CD30 est exprimé dans 10 à 20% des cas, plus particulièrement dans le variant anaplasique, et CD5 dans 5 à 10% des cas (1).

### c. Classification des DLBCL NOS selon la cellule d'origine

Depuis les années 2000, l'étude du profil d'expression génique (GEP) sur puce à ADN a permis de classer les DLBCL NOS selon la cellule d'origine (COO). Ainsi, les DLBCL NOS peuvent être classés en centro-germinatif (GCB), en cellule B activée (ABC) et de rares cas restent inclassés. Cette sous-classification a permis de mieux caractériser ces deux sous-types. Les patients atteints d'un DLBCL de type GCB présentent un pronostic plus favorable



sous R-CHOP (2–4). Les DLBCL GCB présentent parfois une translocation t(14;18)(q32;q21) et une délétion de *PTEN*, gène intervenant dans la voie de signalisation PI3K/AKT (5). Les DLBCL ABC sont caractérisés par une fréquence plus élevée de la translocation t(3;14)(q27;q32), de la délétion du locus *INK4A-ARF*, de l’amplification de *BCL2* et de l’activation de la voie classique de signalisation NF-KappaB (6–8).

Le profil d’expression génique n’étant pas réalisable pour chaque DLBCL en routine, des algorithmes utilisant des techniques immunohistochimiques ont été développés. L’algorithme de Hans, publié en 2004, est considéré comme algorithme de référence (figure n°2) (9). Il nécessite deux marqueurs de type GCB ; CD10 et BCL6, ainsi qu’un marqueur de type ABC ; MUM1.

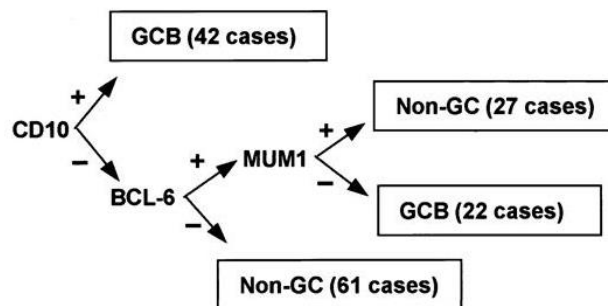


Figure n°2 : Algorithme de Hans (10).

Cependant, l’algorithme de Hans présente plusieurs inconvénients. Il ne permet pas de distinguer les DLBCL non classables, sa concordance comparativement aux techniques de GEP sur puce à ADN considérées comme gold standard est de 80% et sa corrélation avec le pronostic des patients diffère selon les études (10,11). Il présente également des problèmes de reproductibilité, notamment à la lecture des marqueurs BCL6 et MUM1 (12). Certains auteurs ont publié des algorithmes alternatifs incluant de nouveaux marqueurs tels que GCET1 et FOXP1, avec une concordance de 90% à 93% en comparaison des techniques de GEP, mais leur corrélation au pronostic des patients diffère également selon les études (13).

Afin de contourner les limites des algorithmes immunohistochimiques, des techniques d’étude du profil d’expression génique basées sur la quantification des ARN transcrits ont été développées. Deux techniques ont principalement été décrites, le Nanostring par l’équipe de *Scott et al*, avec une concordance vis-à-vis du gold standard de 95% (14,15) et la RT-MLPA (reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification) par l’équipe de

*Mareschal et al*, avec une concordance de 93% (16). Cette dernière technique présente les avantages d'une réalisation simple et d'un coût faible permettant une utilisation en routine.

#### d. Classification des DLBCL NOS selon le génotype

L'apport des techniques de NGS ont permis de décrire plus précisément les mutations survenant dans les DLBCL NOS. Les études mutationnelles confirment la prédominance des altérations de la voie de signalisation NF-KappaB dans les DLBCL NOS ABC. On observe fréquemment des mutations des gènes *MYD88*, *CD79B*, et *PRDM1*. Les DLBCL NOS GCB présentent fréquemment des altérations des voies de régulations épigénétiques. On observe fréquemment des mutations des gènes *CREBBP*, *EZH2*, *TNFRSF14*, *GNA13*, *MEF2B* et des translocations de *BCL2* (1,17,18) (figure n°3). Plus récemment, il a été décrit des altérations de certaines voies de signalisation ayant pour conséquence un échappement immunitaire dans les DLBCL NOS ABC et GCB, avec des mutations des gènes *MHC-I* et *HLA-I* (19)

De récentes études ont tenté de catégoriser les DLBCL NOS selon leur génotype. Dans l'étude de *Schmitz et al*, les DLBCL NOS sont catégorisés en quatre génotypes. Le premier et le troisième génotype sont caractérisés par des mutations de *MYD88*, *CD79B* (génotype MCD) et *NOTCH1* (génotype N1) et correspondent plus fréquemment aux DLBCL ABC. Le deuxième génotype (BN2), constitué de mutations de *NOTCH2* et de fusions de *BCL6*, correspond à la fois aux DLBCL GCB et ABC. Enfin, le quatrième génotype (EZB), caractérisé par des mutations de *EZH2* et des translocations de *BCL2*, est plus fréquemment retrouvé dans les DLBCL GCB. Ces quatre génotypes présentent des pronostics différents (20).

Dans l'étude de *Chapuy et al*, les DLBCL NOS sont classés en cinq clusters se rapprochant parfois aux génotypes décrits précédemment. Les clusters 1 et 5 correspondent plus fréquemment aux DLBCL ABC et sont caractérisés soit par des mutations ponctuels de *BCL6* et des mutations de *NOTCH2* (cluster 1), soit par des mutations de *MYD88* et *CD79B* associés à des gains du chromosome 18q et une amplification de *BCL2* et *MALT1* (cluster 5). Les clusters 3 et 4 regroupent les DLBCL GCB et sont caractérisés par des translocations de *BCL2* et des délétions de *PTEN* (cluster 3) ou des mutations de gènes intervenants dans les voies de signalisation BCR/PI3K, JAK/STAT et *BRAF* (cluster 4). Enfin, le cluster 2, indépendant de la cellule d'origine, présente des inactivations de *TP53*, des délétions de *CDKN2A* et une instabilité génomique. Ces cinq clusters sont également corrélés au pronostic des patients (21).

L'équipe de *Wright et al* a proposé un algorithme classant les DLBCL NOS selon 6 génotypes, basées sur les études de *Schmitz et al* et *Chapuy et al*. Le génotype MCD regroupe les mutations de *MYD88*, *CD79B*, délétions de *CDKN2A* et les amplifications de *BCL2*. Le génotype BN2 regroupe les mutations de *NOTCH2*, *SPEN*, *CCND3*, les translocations de *BCL6* et les délétions de *CCDN3*. Le génotype EZB est caractérisé par des mutations de *KMT2D*, *CREBBP*, *EP300*, *ARID1A*, *IRF8*, *MEF2B*, *EBF1*, *EZH2*, *CIITA*, *HLA-DMB*, *STAT6*, des mutations et délétions de *PTEN*, et des amplifications de *MIR17HG* et *REL*. Le génotype ST2 est caractérisé par des mutations de *SGK1*, *TET2*, *SOCS1*, *DUSP2*, *STAT3*, *P2RY8*, *GNA13* et *NFKBIA*. Le génotype A53 est caractérisé par des mutations et délétions de *TP53*, *53BP1*, *B2M*, des délétions du chromosome 6q, *P73*, *ING1*, et des amplifications du chromosome 3q, *NFKBIZ*, *CNPY3*, et *BCL2*. Enfin, le génotype N1 regroupe des mutations de *NOTCH1*, *ID3*, *BCOR* et *IKBKB*. Ces différents génotypes semblent présenter une réponse différente aux traitements d'immunochimiothérapies et aux thérapies ciblées (22).

Characteristic	Frequency		
	ABC DLBCL	GCB DLBCL	PMBL
<b>Rearrangements</b>			
<i>BCL2</i>	<5%	40%	0%
<i>BCL6</i>	25–30%	15%	0%
<i>MYC</i> , single hit	5–8%	5–8%	0%
<i>CD274/PDCD1LG2</i> (also called <i>PDL1/2</i> )	Rare	Rare	20%
<i>CIITA</i>	Rare	Rare	38%
<i>TBL1XR1</i>	0%	5%	0%
<b>Copy-number aberrations</b>			
1p36.32 deletion ( <i>TNFRSF14</i> )	10%	30%	Rare
2p16 gain/amplification ( <i>REL</i> )	Rare	30%	60–75%
3q27 gain/amplification	45%	15–20%	Rare
6q21 deletion ( <i>PRDM1</i> )	45%	25%	n/a
9p21 deletion ( <i>CDKN2A</i> )	40%	20%	Rare
9p24.1 gains/amplification ( <i>CD274/PDCD1LG2</i> )	Uncommon	Uncommon	60–75%
18q21.3 gain/amplification ( <i>BCL2</i> )	55%	15%	Rare
<b>Recurrent mutations<sup>a</sup></b>			
<i>EZH2</i>	Rare	20–25%	n/a
<i>GNA13</i>	Rare	25%	n/a
<i>KMT2D</i> (also called <i>MLL2</i> )	35%	40%	n/a
<i>TP53</i>	25%	20%	n/a
<i>MEF2B</i>	5%	15–20%	n/a
<i>SGK1</i>	5–10%	15–20%	n/a
<i>CREBBP</i>	10%	30%	n/a
<i>TNFRSF14</i>	Rare	30%	n/a
<i>SOCS1</i>	Uncommon	10–15%	40%
<i>PTPN1</i>	n/a	n/a	20%
<i>STAT6</i>	Rare	5%	35%
<i>CARD11</i>	10–15%	10–15%	n/a
<i>CD79B</i>	20–25%	Uncommon	n/a
<i>MYD88</i>	35%	Uncommon	n/a
<i>PRDM1</i>	15%	Rare	n/a
<i>B2M</i>	15–20%	20–25%	n/a
<i>CD58</i>	10%	10%	n/a
<b>Pathway perturbations</b>			
NF-kappaB activation	Yes	No	Yes
PI3K/AKT	No	Yes	No
JAK/STAT signalling	Rare	Yes	Yes
Immune escape	Yes	Yes	Yes

Figure n°3 : Caractéristiques génétiques et moléculaire des DLBCL GCB, ABC et PMBL (1).

### 3) Les lymphomes B primitifs du médiastin (PMBL)

#### a. Epidémiologie et présentation clinique

Les PMBL représentent 2 à 3% des NHL. Contrairement aux DLBCL NOS, ils prédominent chez les jeunes adultes avec un âge médian de 35 ans au diagnostic, et sont plus fréquents chez la femme avec un sex ratio de 2:1.

La présentation clinique typique se caractérise par une masse médiastinale antéro-supérieure de la loge thymique, souvent de grande taille (>10 cm chez 60 à 70% des patients) et envahissant fréquemment les structures anatomiques adjacentes. Une extension régionale aux ganglions supra-claviculaires et cervicaux ainsi qu'une dissémination extra-ganglionnaire est possible, habituellement sans envahissement médullaire.

La symptomatologie est liée à la masse médiastinale, avec souvent un syndrome cave supérieur. Des signes B peuvent être présents (1).

#### b. Histologie et immunophénotype

A l'instar des DLBCL NOS, les PMBL sont d'architecture diffuse, constitués d'éléments lymphoïdes B de taille moyenne à grande. Les cellules possèdent souvent un cytoplasme clair abondant, et dans certains cas un aspect pléomorphe et/ou multilobés, rappelant les cellules de Reed-Sternberg dans le lymphome de Hodgkin. On observe fréquemment une fibrose conférant un aspect pseudo-alvéolaire à la prolifération tumorale. En immunohistochimie, comme la plupart des DLBCL, les éléments lymphoïdes expriment des marqueurs pan-B, ainsi que CD30 dans 80% des cas et CD23, MAL et PDL1 dans 70% des cas (1).

#### c. Caractéristiques moléculaires des PMBL

Les PMBL sont moléculairement plus proches des lymphomes de Hodgkin classique (cHL) que des DLBCL NOS (23). Ils présentent des mutations de *SOCS1*, *STAT6*, *PTPN1*, intervenant dans la voie de signalisation JAK/STAT. Ils présentent également et des mutations de *TNFAIP3*, *NFKBIE*, *NFKB2*, *IKBKB* et une amplification de *REL*, intervenant dans la voie de signalisation NF-KappaB. Ils sont caractérisés par un échappement au système immunitaire, notamment dû à des translocations de *CIITA* dans 53% des cas, et des amplifications du chromosome 9p24 incluant *PDL1* et *PDL2* dans 75% des cas (1,24–28). On retrouve également des mutations fréquentes du gène *XPO1* (17) (figure n°3).

#### d. Distinction entre DLBCL NOS et PMBL

Les PMBL sont reconnus comme entité distinct des DLBCL NOS dans la classification OMS depuis 2008. Dans la plupart des cas, le diagnostic est possible grâce à une corrélation clinico-pathologique avec la présence d'une masse médiastinale. Cependant, il est parfois difficile de faire la distinction entre un PMBL et un DLBCL NOS avec envahissement secondaire du médiastin, les caractéristiques histologiques et immunophénotypiques n'étant parfois pas discriminants. Il a également été décrit des cas de DLBCL NOS avec des caractéristiques moléculaires proches des PMBL, sans lésion médiastinale détectable. Ces cas ne peuvent être distingués sans l'utilisation de techniques de GEP en routine (27,29). A cela s'ajoute d'autres entités dont la distinction est difficile avec les PMBL, notamment les médiastinal grey zone lymphoma, se présentant cliniquement souvent sous la forme d'une masse médiastinale et possédant des caractéristiques histologiques et immunohistochimiques à la fois des PMBL et des cHL (30). L'équipe de *Mottok et al* a proposé une technique de GEP afin de distinguer les DLBCL NOS des PMBL, basée sur la technique de Nanostring (31).

#### 4) Développement de nouvelles techniques de classification utilisant l'intelligence artificielle

L'essor de l'intelligence artificielle en médecine permet d'appréhender de nouvelles techniques de classification, dont l'utilisation en routine est envisageable. L'équipe de *Bobée et al* en 2020 (32), a proposé un classificateur moléculaire associant des techniques de RT-MLPA, de NGS et de machine learning. Ce classificateur moléculaire est développé à partir de l'étude de l'expression de 137 gènes, incluant notamment des gènes de cellules B et T, des gènes des immunoglobulines, des gènes de type GCB, ABC et PMBL, ainsi que certaines mutations somatiques (figure n°4). Ce profil génique étendu associé à un algorithme entraîné confère au classificateur moléculaire la capacité de classer les DLBCL NOS selon leur cellule d'origine, mais également de distinguer les PMBL, ainsi que les lymphomes B à petites cellules (lymphome folliculaire, lymphome à cellule du manteau, lymphome lymphocytaire / leucémie lymphoïde chronique, lymphome lymphoplasmocytaire, lymphome de la zone marginal splénique, ganglionnaire et extra-ganglionnaire) avec une concordance de 94% par rapport au gold standard. Ses résultats sont corrélés à la survie des patients (32). Les données incorporées dans le classificateur permettent également de reconnaître les principales entités de lymphomes T (33).

ABC markers	GCB markers	PMBL markers	Double Expressors	Other markers
<i>TAC1</i>	<i>CD10</i>	<i>IL411</i>	<i>BCL2</i> #1 (exon1-2)	EBER1
<i>FOXP1</i>	<i>LMO2</i>	<i>CD23</i>	<i>BCL2</i> #2 (exon2-3)	HTLV1
<i>LIMD1</i>	<i>ASB13</i>	<i>CD30</i>	<i>MYC</i> #1 (exon1-2)	<i>KI67</i>
<i>IRF4</i>	<i>NEK6</i>	<i>MAL</i>	<i>MYC</i> #2 (exon2-3)	<i>CD68</i>
<i>PIM2</i>	<i>MYBL1</i>	<i>CD95</i>		<i>CD163</i>
<i>CCDC50</i>	<i>MAML3</i>	<i>CD71</i>	T cell	<i>CCND1</i>
<i>CREB3L2</i>	<i>ITPKB</i>	<i>FGFR1</i>	<i>TCR</i> α	<i>CCND2</i>
<i>CYB5R2</i>	<i>SERPINA9</i>	<i>JAK2</i>	<i>TCR</i> β	<i>ZAP70</i>
<i>SH3BP5</i>	<i>S1PR2</i>	<i>TRAF1</i>	<i>TCR</i> γ	<i>ANXA1</i>
<i>RAB7L1</i>	<i>BCL6#1 (exon1-2)</i>	<i>STAT6</i>	<i>TCR</i> δ	<i>CRBN</i>
	<i>BCL6#2 (exon3-4)</i>	<i>PD-L1</i>	<i>CD3</i>	<i>STAT6</i>
		<i>PD-L2</i>	<i>CD5</i>	<i>APRIL</i>
			<i>CD4</i>	<i>BAFF</i>
<b>B cell</b>	<b>Ig genes</b>	<b>Gene fusions</b>	<i>CD8</i>	<i>BCMA</i>
<i>CD19</i>	Iα-Cα	<i>BCL6-C α</i>	<i>TBET</i>	<i>CCR4</i>
<i>MS4A1 (CD20)</i>	Iα-Cε	<i>BCL6-C ε</i>	<i>INF γ</i>	<i>CCR7</i>
<i>CD22</i>	Iα-Cγ	<i>BCL6-C γ</i>	<i>GRB</i>	<i>CD56</i>
<i>CD27</i>	Iα-Cμ	<i>BCL6-C μ</i>	<i>PRF</i>	<i>CD70</i>
<i>CD38</i>	Iε-Cα	<i>Iγ-BCL6</i>	<i>CD45RO</i>	<i>DUSP22</i>
<i>CD138</i>	Iε-Cε	<i>Iε-BCL6</i>	<i>CXCR5</i>	<i>MEF2B</i>
<i>CD86</i>	Iε-Cγ	<i>Iα-BCL6</i>	<i>CXCL13</i>	<i>PRDM1</i>
<i>CD80</i>	Iε-Cμ	<i>Iμ-BCL6</i>	<i>GATA3</i>	<i>XBP1</i>
<i>CTLA4</i>	Iγ-Cα	<i>JH-BCL6</i>	<i>CD28</i>	<i>CARD11</i>
<i>B2M</i>	Iγ-Cε		<i>ICOS</i>	<i>TCL1A</i>
	Iγ-Cγ		<i>FOXP3</i>	<i>BANK</i>
<b>CSR / SHM</b>	Iγ-Cμ	<b>Mutations</b>	<i>PD1</i>	
<i>AID#1 (exon2-3)</i>	<i>IGHD</i>	<i>XPO1 E571K</i>	<i>LAG3</i>	
<i>AID#2 (exon4-5)</i>	<i>IGHM</i>	<i>MYD88 L265P</i>	<i>ALK</i>	
<i>CD40</i>	Iμ-Cα	<i>BRAF V600E</i>		
<i>CD40L#1 (exon2-3)</i>	Iμ-Cε	<i>IDH2 R172K</i>		
<i>CD40L#2 (exon4-5)</i>	Iμ-Cγ	<i>RHOA G17V</i>		
	Iμ-Cμ	<i>MYD88 (exon3-4)</i>		
	<i>JH-Cα</i>	<i>XPOWT</i>		
	<i>JH-Cε</i>			
	<i>JH-Cγ</i>			
	<i>JH-Cμ</i>			

Figure n°4 : Tableau des 137 gènes ciblés par la technique de RT-MLPA (32).

## 5) Objectifs de l'étude

La population de notre étude correspond aux patients inclus dans le protocole Gained. Le protocole Gained est un essai clinique de phase 3 randomisé, évaluant l'efficacité thérapeutique de l'Obinutuzumab versus le Rituximab chez des patients présentant un DLBCL non traité, éligibles à la transplantation et avec un index aaIPI  $\geq 1$ . La supériorité de l'Obinutuzumab n'a pas été démontrée dans cette étude et la stratégie adaptée par TEP-scanner intérimaire est pertinente (34). Ce protocole a été promu en 2012 par le LYSA (Lymphoma Study Association), un réseau de recherche clinique et biologique sur le lymphome. Ce réseau, labellisé « Groupe coopérateur en Oncologie » par l'INCa, réunit plus de 500 professionnels spécialistes du lymphome, répartis actuellement sur 4 pays (France, Belgique, Portugal, Israël).

Les objectifs de notre étude étaient :

- d'étudier l'apport du classificateur moléculaire dans la classification optimisée des DLBCL des patients du protocole Gained, ses avantages et ses limites.
- d'étudier la performance du classificateur moléculaire dans la classification GCB/ABC des DLBCL, par rapport à l'algorithme de Hans et au Nanostring.

## II. Matériel et méthodes

### 1) Population d'étude

Notre population d'étude est issue du protocole Gained, qui a inclus au total 670 patients. Les critères d'inclusion dans cet essai clinique étaient : tout patient âgé de 18 à 60 ans présentant un DLBCL CD20+ nouvellement diagnostiqué et prouvé histologiquement (selon la classification OMS 2008), non traité, présentant un score aaIPI  $\geq 1$  et au moins une lésion hypermétabolique au TEP-scanner, éligible pour l'autogreffe et ayant une espérance de vie  $\geq 3$  mois. Les patients qui présentaient au moment du diagnostic de DLBCL un contingent à petites cellules étaient inclus également. Les patients présentant des comorbidités importantes non liées au DLBCL étaient exclus (insuffisance hépatique, rénale, cardiaque, diabète non contrôlé, autre pathologie hématologique). Les patients présentant au moment du diagnostic un envahissement du système nerveux central étaient exclus (34).

### 2) Relecture LYSA-Pathologie

Notre étude, rétrospective, a porté sur les prélèvements biopsiques ou pièces d'exérèses, fixés en formol et inclus en paraffine (FFPE), des patients inclus dans le protocole Gained. Au total, 646 prélèvements FFPE étaient disponibles.

Lors de l'inclusion dans le protocole Gained, ces 646 prélèvements ont fait l'objet d'une relecture par au moins deux hématopathologistes experts du LYSA-P (Christiane Copie-Bergman, Diane Damotte, Antoine Martin, Philippe Gaulard, Danielle Canioni, Josette Brière, Thierry Molina) afin de valider les critères histologiques d'inclusion dans le protocole. En cas de discordance entre les deux hématopathologistes experts, l'avis d'un troisième expert était recueilli. Cette relecture a été réalisée avec un panel immunohistochimique standardisé, sur lame entière, incluant les anticorps suivants : CD20 (clone L26), CD5 (clone 4C7), CD10 (clone 56C6), BCL6 (clone PG-B6p), MUM1 (clone MUM1p), MYC (clone Y69), BCL2 (clone 124), sur automate BenchmarkXT Roche selon le protocole établi au LYSA-P (11). A noter que cette étude immunohistochimique avait pour unique objectif de valider les critères d'inclusion, à savoir celui d'un lymphome B diffus à grandes cellules et de réaliser l'algorithme de Hans (il n'a pas été réalisé d'immunohistochimie complémentaire afin de préciser le sous-type d'un DLBCL, notamment pas d'évaluation du profil phénotypique de type PMBL).

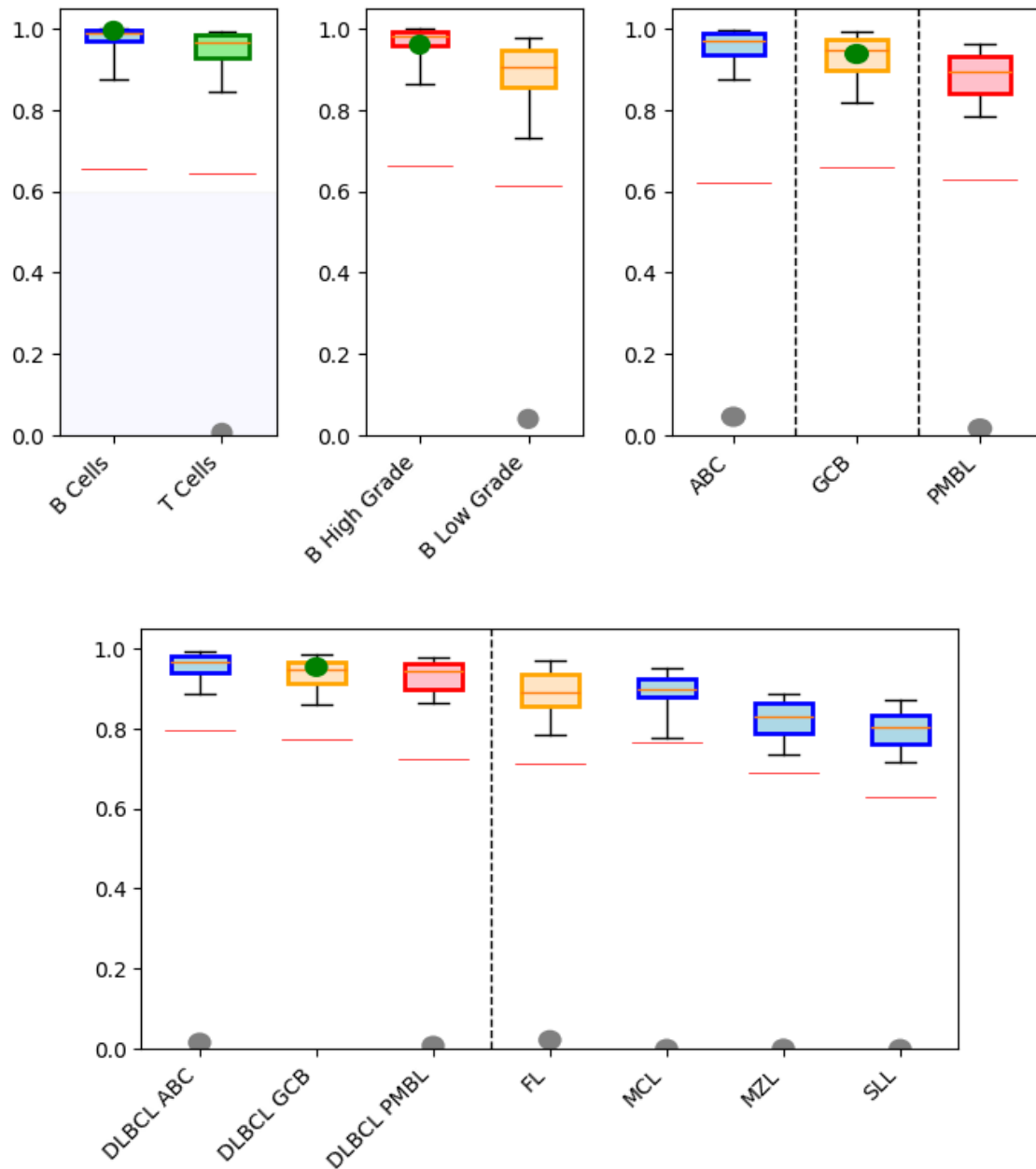


### 3) Nanostring

La technique de Nanostring utilisant la technologie nCounter Flex System, RUO LST (14) a été réalisée au LYSA-P. Il s'agit d'une technique de GEP basée sur l'expression de 20 gènes, réalisable sur tissu FFPE, afin de déterminer la cellule d'origine d'un DLBCL. Ainsi, après étude par Nanostring, les DLBCL sont classés GCB, ABC, ou inclassés.

### 4) Classificateur moléculaire

Le classificateur moléculaire a été réalisé à Rouen et interprété par Philippe Ruminy (32). Cette technologie, réalisable sur tissu FFPE, combine une technique de RT-MLPA ciblant 137 gènes, associée à un algorithme entraîné analysant l'expression de ces gènes, afin de proposer un diagnostic (figures n°5 à 11). La version de l'algorithme utilisée dans cette étude est celle d'avril 2019. Le classificateur moléculaire est capable de proposer les diagnostics suivants : DLBCL GCB, DLBCL ABC, PMBL, FL, MCL, MZL, CLL/SLL. Lorsque le classificateur moléculaire détectait un environnement prédominant de lymphocytes T ne permettant pas d'établir un des diagnostics précédemment énoncés, le prélèvement était classé « signature T ».



Best GEP matched classification :

**DLBCL GCB**

Figure n°5 : Exemple de résultat du classificateur moléculaire pour le cas n°13.0237.

Graphiques représentant la probabilité pour ce cas d'appartenir à un lymphome B ou T, lymphome B de haut grade ou bas grade, DLBCL GCB, ABC, PMBL, FL, MCL, MZL et SLL, par comparaison avec la série d'entraînement du classificateur moléculaire, en prenant en compte l'ensemble du niveau d'expression des gènes listés ci-dessous. La prédiction finale proposée par le classificateur moléculaire dans ce cas est « DLBCL GCB ».

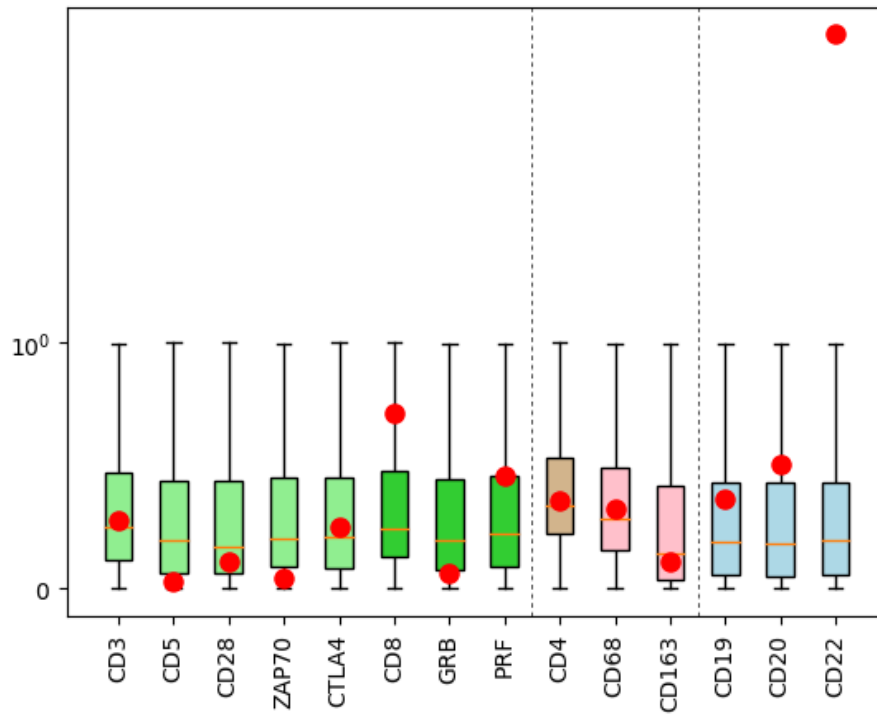


Figure n°6 : Profil d'expression génique de certains gènes B, T et histiocytaires. Dans ce cas, le profil d'expression du gène CD20 était supérieur au 3<sup>ème</sup> quartile par rapport à la cohorte d'entraînement du classificateur moléculaire.

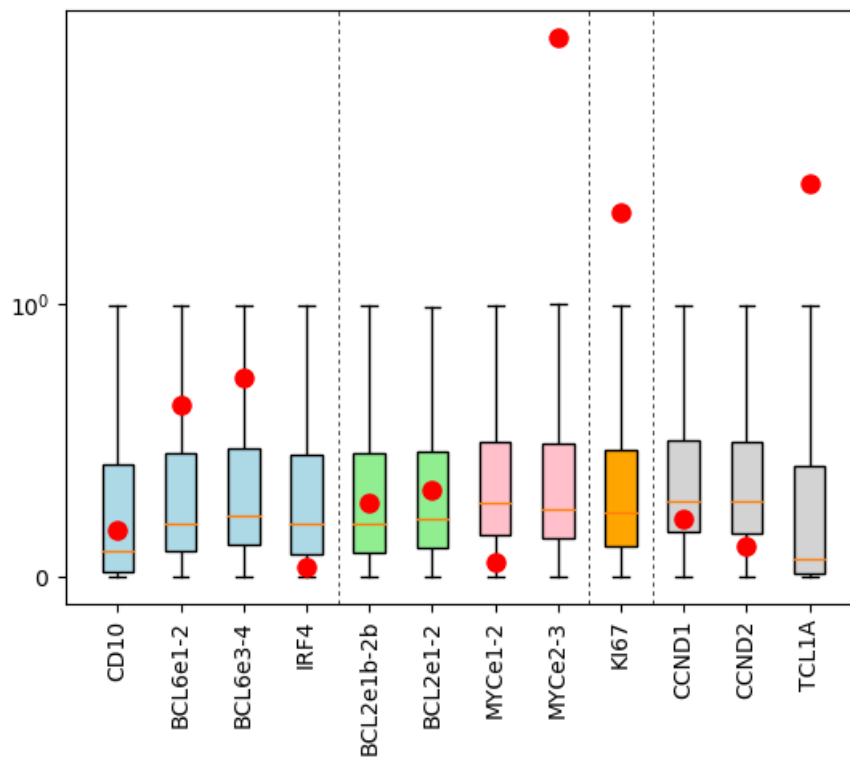


Figure n°7 : Profil d'expression génique des gènes impliqués dans l'algorithme de Hans, de certains gènes exprimés dans les lymphomes de haut grade, du gène de la Cycline D1.

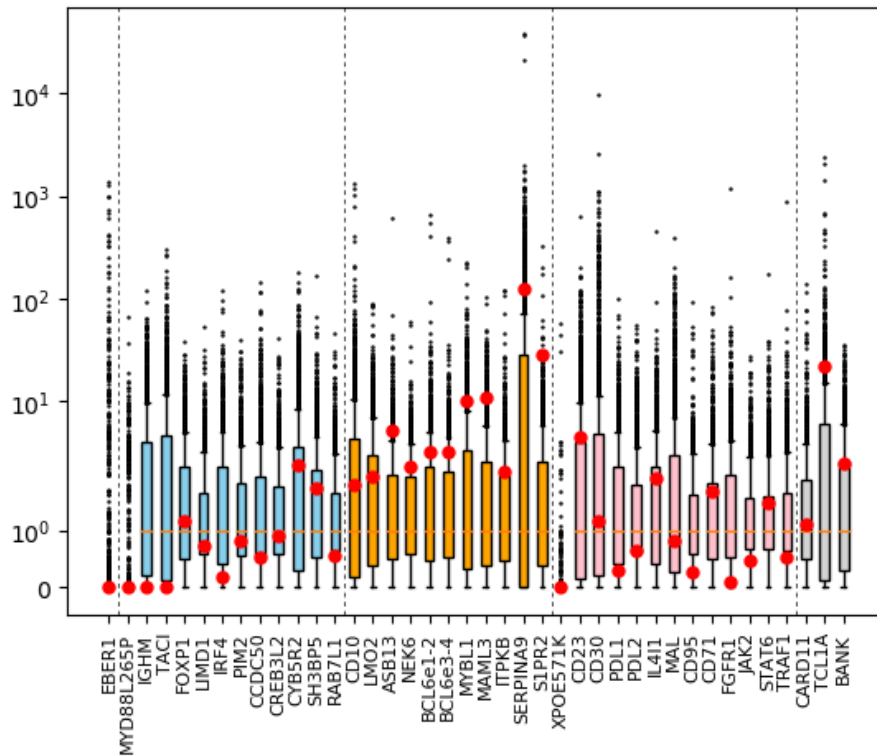


Figure n°8 : Profil d'expression génique niveau de certains gènes ABC (bleu), GCB (jaune) et PMBL (rose). Dans ce cas, on observe un profil d'expression élevé de nombreux gènes GCB.

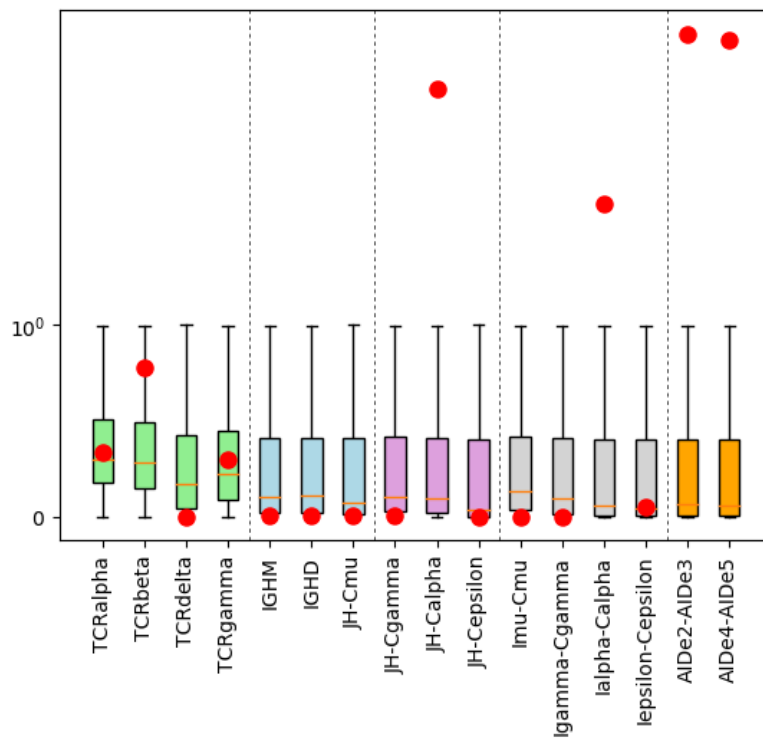


Figure n°9 : Profil d'expression génique de certains gènes du TCR et des immunoglobulines.

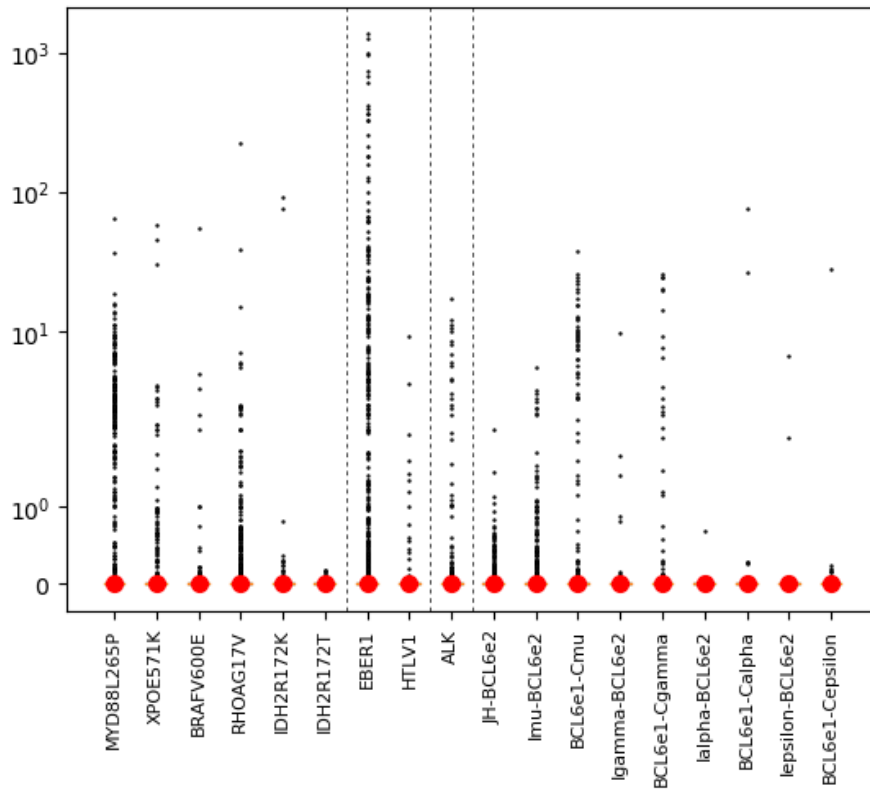


Figure n°10 : Graphique représentant la présence ou non de certaines mutations, ainsi que certaines translocations impliquant le gène BCL6.

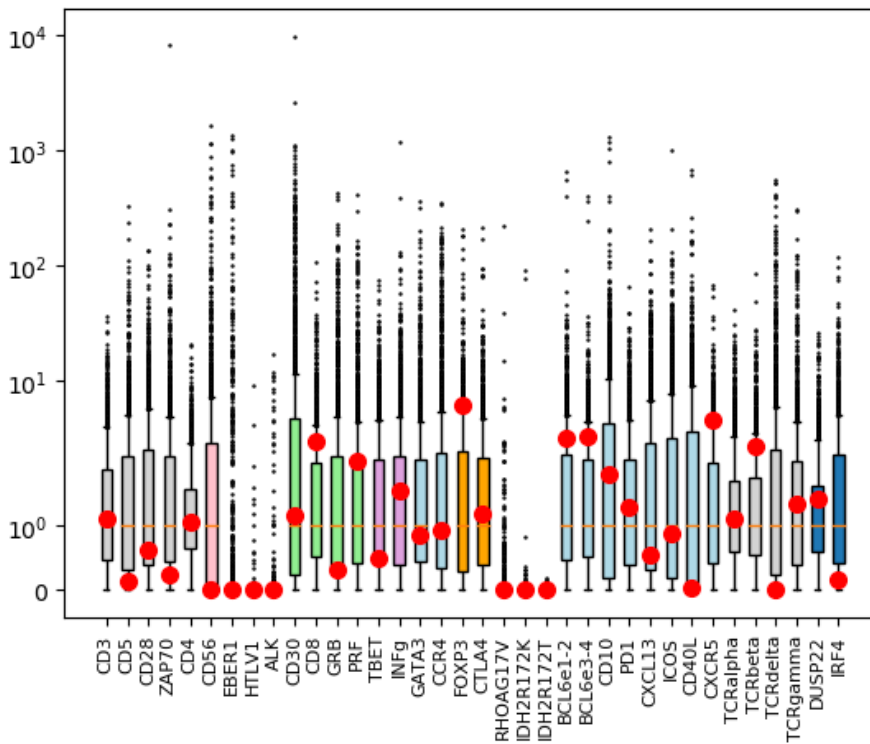


Figure n°11 : Profil d'expression d'autres gènes, principalement lymphocyte T, fréquemment exprimés par certaines entités de lymphome T, du virus EBV.

## 5) NGS

Certains cas de classification difficile après comparaison des données de la relecture LYSA-P et du classificateur moléculaire nécessitaient une technique de NGS complémentaire. Afin de réaliser cette technique, les échantillons d'ADN des patients ont été extraits sur l'automate Siemens (LYSA-P). Pour 394 échantillons, la quantité d'ADN d'au moins 15 ng avec une taille de fragmentation supérieure à 200 ng a été atteinte permettant la préparation des bibliothèques suivies du séquençage par Integragen (Evry, France) sur la plateforme Illumina HiSeq4000 (PE\*75 reads). Une capture-NGS (Twist, Bioscience) à partir d'un panel de 69 gènes élargi à des coordonnées additionnelles de régions non codantes permettant d'approcher les stratégies de classification récemment proposées a été utilisée (20,35,36). L'analyse bio-informatique a été réalisée sur la base Sirius (Integragen) pour le filtrage et l'annotation des variants. A partir du tableau Excel de tous les variants générés, un filtrage des mutations somatiques et une annotation a été effectuée à partir d'un pipeline bioinformatique créé au laboratoire d'hématologie du CHU Rennes. D'autres bases de données, Ensembl's VEP (Variant Effect Predictor, release 92), SIFT (sift5.2.2), PolyPhen (2.2.2) et la présence du variant dans la base COSMIC (V85) ont permis de finaliser l'annotation des variants. Pour la visualisation des résultats, les packages R Maftools ou Ballon plot permettant de générer la matrice des altérations génétiques associées aux patients analysés ont été utilisés.

## 6) FISH

Certains cas ont fait l'objet d'une étude par FISH avec les sondes MYC (8q24, Vysis 01N63), BCL6 (3q27, Dako Y5408), et BCL2 (18q21, Dako Y5407). Le résultat était interprété comme positif si la translocation était objectivée dans au moins 10% des cellules tumorales.

## 7) Étude immunohistochimique complémentaire

Une étude immunohistochimique complémentaire a été réalisée, sur lame entière, afin d'étudier la corrélation entre le niveau d'expression des gènes par RT-MLPA et l'expression immunohistochimique. Les anticorps utilisés étaient les suivants : CD30 (clone Ber-H2), CD23 (clone NCL-CD23-1B12), MAL (clone E1), PDL1 (clone E1L3N).

## 8) Étude statistique

Une étude statistique a été réalisée afin de calculer la corrélation GCB/ABC entre le Nanostring et le classificateur moléculaire, et entre le Nanostring et l'algorithme de Hans (test polychorique pour corrélation des variables qualitatives). Les résultats sont exprimés sous forme de coefficient de corrélation (-1 : corrélation négative, 0 : pas de corrélation, 1 : corrélation positive) avec un seuil de significativité de 5%. Un test bilatéral (test z pour deux proportions) a été réalisé afin de comparer la concordance classificateur moléculaire / Nanostring et la concordance algorithme de Hans / Nanostring (intervalle de confiance à 95%,  $\alpha = 0,05$ ). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2020.5, Addinsoft, Paris France).

### III. Résultats

#### 1) Relecture LYSA-Pathologie

Parmi les 646 patients relus du protocole Gained, 620 patients ont pu faire l'objet d'une classification histologique, dont le but était de vérifier les critères d'inclusions.

Parmi ces 620 patients, 580 patients étaient compatibles avec les critères d'inclusion (93,5%) (tableau n°1), 40 patients ne correspondaient pas aux critères d'inclusion (6,5%) (tableau n°2) (34).

La catégorie « DLBCL » intégrait les diagnostics suivants : DLBCL NOS, DLBCL NOS variant anaplasique, DLBCL inclassable, DLBCL inclassable pour raison technique, lymphome B agressif inclassable. La catégorie « DLBCL + lymphome B à petites cellules » intégrait les diagnostics suivants : DLBCL + FL, FL avec transformation possible en DLBCL, MZL, lymphome B à petites cellules non classable.

<b>Nombre de patients</b>	<b>Diagnostic</b>
<b>376 (60,6%)</b>	DLBCL
<b>119 (19,2%)</b>	PMBL
<b>53 (8,5%)</b>	DLBCL + lymphome B à petites cellules
<b>18 (2,9%)</b>	THRLBCL
<b>9 (1,5%)</b>	HGBL
<b>3 (0,5%)</b>	DLBCL EBV +
<b>2 (0,3%)</b>	DLBCL intravasculaire

Tableau n°1 : Détails des patients correspondant aux critères d'inclusion après relecture LYSA-P.



<b>Nombre de patients</b>	<b>Diagnostic</b>
<b>7 (1,1%)</b>	FL grade 1-2
<b>6 (1,0%)</b>	FL grade 3A
<b>7 (1,1%)</b>	FL grade 3B
<b>2 (0,3%)</b>	FL grade indéterminé
<b>6 (1,0%)</b>	B-NHL inclassable pour raison technique
<b>4 (0,6%)</b>	NLPHL
<b>2 (0,3%)</b>	BL
<b>2 (0,3%)</b>	MCL variant pléomorphe
<b>1 (0,2%)</b>	Lymphome B à petites cellules inclassable
<b>1 (0,2%)</b>	ALCL ALK +
<b>1 (0,2%)</b>	AITL
<b>1 (0,2%)</b>	B-ALL/LBL

Tableau n°2 : Détails des patients ne correspondant pas aux critères d'inclusion après relecture LYSA-P.

## 2) Résultats du classificateur moléculaire

Parmi les patients du protocole Gained, le classificateur moléculaire n'a pas pu être réalisé pour 141 cas en raison d'un matériel insuffisant, et présentait un résultat ininterprétable pour 34 cas.

Les 471 patients restants présentaient les résultats suivants : 430 patients étaient classés en DLBCL GCB, ABC ou PMBL, correspondant aux critères d'inclusion (91,3%) (tableau n°3), 38 patients ne pouvaient être classés dans un premier temps, et 3 étaient classés dans des sous-types ne correspondant pas aux critères d'inclusion (8,7%) (tableau n°4).

A noter que pour l'un des patients, le classificateur moléculaire initial n'arrivait pas à trancher entre DLBCL ABC et PMBL.

Nombre de patients	Résultat Classificateur Moléculaire
205 (43,5%)	DLBCL GCB
122 (25,9%)	DLBCL ABC
102 (21,7%)	PMBL
1 (0,2%)	DLBCL ABC/PMBL

Tableau n°3 : Détail des résultats du classificateur moléculaire correspondant aux critères d'inclusion.

Nombre de patients	Résultat Classificateur Moléculaire
38 (8,1%)	Signature T
2 (0,4%)	FL
1 (0,2%)	MCL

Tableau n°4 : Détail des résultats du classificateur moléculaire correspondant aux non classés par une signature T trop abondante, ou ne correspondant pas aux critères d'inclusion.

### 3) Concordance et discordance diagnostique entre le classificateur moléculaire et la relecture LYSA-P

Parmi les 471 patients ayant eu une relecture LYSA-P et un résultat par le classificateur moléculaire, la concordance diagnostique globale était de 69,4% (327 cas concordants parmi 471). En ne prenant en compte que les diagnostics pouvant être reconnus par le classificateur moléculaire, la concordance était de 83,6% (327 cas concordants parmi 391).

La concordance des patients correspondants aux critères d'inclusion entre la relecture LYSA-P et le classificateur moléculaire était de 87,7% (413 cas concordants parmi les 471).

Parmi les critères d'inclusion, la concordance diagnostique entre la relecture LYSA-P et le classificateur moléculaire était de 73,6% (327 cas concordants parmi 444). Les 327 cas concordants correspondaient à 252 DLBCL et 75 PMBL.

La discordance diagnostique parmi les critères d'inclusion était donc de 26,4%, (117 cas discordants parmi 444). A noter que l'on observait 45 DLBCL + lymphome B à petites cellules inévitablement discordants car que le classificateur moléculaire a été conçu pour ne proposer qu'un seul diagnostic. On observait également 15 THRLBCL, 6 HGBL, 3 DLBCL EBV + et 1 DLBCL intravasculaire inévitablement discordants, le classificateur moléculaire ne sachant pas en première intention reconnaître ces entités (tableau n°5).

Parmi les 27 diagnostics ne correspondant pas aux critères d'inclusion, l'ensemble des cas était discordant. On observait notamment 15 diagnostics de FL, représentant de véritables discordances car cette entité était intégrée dans le classificateur moléculaire (tableau n°6).

<b>Relecture LYSA-P</b>	<b>Classificateur Moléculaire</b>
<b>45 DLBCL + lymphome B à petites cellules</b>	34 DLBCL GCB 8 DLBCL ABC 1 MCL 1 FL 1 Signature T
<b>35 DLBCL</b>	26 PMBL 1 FL 8 Signature T
<b>15 THRLBCL</b>	15 Signature T
<b>12 PMBL</b>	6 DLBCL GCB 1 DLBCL ABC 1 DLBCL ABC/PMBL 4 Signature T
<b>6 HGBL</b>	4 DLBCL GCB 1 DLBCL ABC 1 Signature T
<b>3 DLBCL EBV +</b>	3 Signature T
<b>1 DLBCL intravasculaire</b>	1 Signature T

Tableau n°5 : Détail des discordances entre la relecture LYSA-P et le classificateur moléculaire parmi les critères d'inclusion (police bleue : diagnostic concordant avec les critères d'inclusion, police rouge : diagnostic discordant avec les critères d'inclusion).

<b>Relecture LYSA-P</b>	<b>Classificateur Moléculaire</b>
<b>3 FL grade 1-2</b>	3 DLBCL GCB
<b>5 FL grade 3A</b>	5 DLBCL GCB
<b>6 FL grade 3B</b>	5 DLBCL GCB
	1 Signature T EBV + et RHOA muté
<b>1 FL de grade indéterminé</b>	1 DLBCL GCB
<b>4 NLPHL</b>	3 Signature T
	1 PMBL
<b>3 B-NHL inclassable pour raison technique</b>	3 DLBCL GCB
<b>2 MCL variant pléomorphe</b>	2 DLBCL ABC
<b>1 AITL</b>	1 Signature T EBV + et IDH2 muté
<b>1 BL</b>	1 DLBCL GCB
<b>1 B-ALL/LBL</b>	1 DLBCL ABC

Tableau n°6 : Détail des discordances entre la relecture LYSA-P et le classificateur moléculaire parmi les diagnostics ne correspondant pas aux critères d'inclusion (police bleue : diagnostic concordant avec les critères d'inclusion, police rouge : diagnostic discordant avec les critères d'inclusion).

#### 4) Réconciliation diagnostique à la lumière de l'ensemble des données moléculaires

Des discordances étaient ainsi observées entre la relecture LYSA-P et le classificateur moléculaire. Une réévaluation histologique centralisée à Henri Mondor par Josette Brière et Thierry Molina a été réalisée, associée, si nécessaire, à une étude immunohistochimique complémentaire. Une réévaluation des données moléculaires du classificateur a également été réalisée par Philippe Ruminy à Rouen. Les résultats de ces réévaluations ont été confrontés afin de proposer un diagnostic de réconciliation définitif. Enfin, les données des FISH MYC, BCL2 et BCL6 ont été intégrées lorsqu'elles étaient disponibles.

Suite à cette réconciliation diagnostique et à la lumière du classificateur moléculaire (tableau n°7) :

- 15 DLBCL ont été reclassés définitivement en PMBL (exemple du cas n°13.0645).
- 1 PMBL a été reclassé définitivement en DLBCL ABC (cas n°13.0572).
- 1 lymphome de la zone marginale transformé CD5 - (cycline D1 non évaluée lors de la relecture LYSA-P) a été reclassé définitivement en MCL (cas n°13.1246). La cycline D1, évaluée à posteriori, était positive.

Dans certains cas, la réévaluation du profil moléculaire a permis de mettre en évidence certaines caractéristiques intéressantes :

- 1 FL grade 3B a été reclassé (cas n°13.1452). Le classificateur moléculaire avait initialement classé ce cas en signature T, associé à une expression d'EBV et une mutation de RHOA évoquant une oncogénèse TFH. La réévaluation histologique et immunohistochimique, à la lumière du classificateur moléculaire, a permis de confirmer le diagnostic difficile de lymphome T de phénotype TFH CD10+, CD5+, PD1+, d'architecture folliculaire et périfolliculaire et d'évoquer le diagnostic de lymphome folliculaire T selon la classification OMS (figures n°12 à 16).
- 1 DLBCL était classé signature T par le classificateur moléculaire. La réévaluation moléculaire confirmait la présence d'un environnement riche en lymphocytes T, mais retrouvait également une expression d'EBV. Le diagnostic de réconciliation retenu était celui de DLBCL EBV +, avec une sonde EBER positive réalisée à posteriori (cas n°14.0763).
- 3 DLBCL EBV + étaient classés signature T par le classificateur moléculaire. La réévaluation confirmait un environnement riche en lymphocytes T, mais retrouvait également une expression d'EBV (exemple du cas n°13.1151).
- 4 PMBL étaient classés DLBCL GCB par le classificateur moléculaire. La réévaluation moléculaire a permis de mettre en évidence un profil compatible avec un PMBL (exemple du cas n°13.0847).
- 1 PMBL était classé DLBCL ABC ou PMBL par le classificateur moléculaire. La réévaluation moléculaire a permis de mettre en évidence un profil correspondant plus probablement à un PMBL (cas n°13.1283).
- 3 PMBL étaient classés signature T par le classificateur moléculaire. La réévaluation moléculaire mettait en évidence un profil compatible avec un PMBL associé à un environnement riche en lymphocytes T (exemple du cas n°14.0038).

- 1 AITL était classé signature T par le classificateur moléculaire. La réévaluation moléculaire mettait effectivement en évidence une mutation du gène IDH2, associée à une expression d'EBV (cas n°15.0232).
- 1 DLBCL était classé PMBL par le classificateur moléculaire. La réévaluation moléculaire était toujours en faveur d'un PMBL, mais on observait une expression d'EBV associée. Le diagnostic de réconciliation retenu était celui de DLBCL EBV + (cas n°15.0955).
- 1 MCL variant pléomorphe était classé DLBCL ABC par le classificateur moléculaire. La réévaluation moléculaire mettait en évidence un profil compatible avec un DLBCL ABC ou un MCL, avec une forte expression du gène CCND1 (cas n°16.0949).
- 1 HGBL de morphologie intermédiaire entre DLBCL et BL, en attente d'étude par FISH, était classé DLBCL GCB par le classificateur moléculaire. La réévaluation moléculaire était toujours en faveur d'un DLBCL GCB, avec cependant une forte expression des gènes MYC et BCL2. L'étude par FISH mettait en évidence la présence d'un réarrangement des gènes MYC, BCL2 et BCL6. Le diagnostic de réconciliation retenu était celui de HGBL triple hit (cas n°13.0668).

Certains cas restaient discordants malgré la réévaluation des données histologiques et moléculaires. Ce cas de figure était notamment observé pour certains DLBCL (exemple du cas n°13.0367) et FL (exemple du cas n°13.0373).

<i>Numéro de référence</i>	<i>Relecture LYSA-P</i>	<i>Classificateur moléculaire initial</i>	<i>Réévaluation moléculaire</i>	<i>Réarrangement MYC/BCL2/BCL6</i>	<i>Diagnostic de réconciliation</i>
13.0367	DLBCL	PMBL	Inclassable, plasmocytose réactionnelle, mutation de MYD88	NE	DLBCL
13.0372	DLBCL + lymphome B à petites cellules	DLBCL GCB	DLBCL mais GCB ou ABC pas net	Absence de réarrangement	FL grade 3B
13.0373	FL grade 3B	DLBCL GCB	DLBCL ABC, environnement riche en LT et plasmocytes, MZL en transformation ?	NE	FL grade 3B
13.0572	PMBL	DLBCL ABC	DLBCL ABC avec présence d'une translocation t(3;14)	Réarrangement de BCL6	DLBCL
13.0645	DLBCL	PMBL	PMBL	Absence de réarrangement	PMBL
13.0652	DLBCL intravasculaire	Signature T	Toujours signature T avec environnement riche en plasmocytes	NE	DLBCL
13.0668	HGBL	DLBCL GCB	DLBCL GCB avec expression élevée de MYC et BCL2	Triple hit	HGBL DH/TH
13.0847	PMBL	DLBCL GCB	PMBL avec mutation XPO1	NE	PMBL
13.0970	HGBL	DLBCL GCB	DLBCL GCB avec expression de MYC élevée	NE	HGBL NOS
13.0991	NLPHL	PMBL	PMBL mais présence d'une translocation t(3;14)	NE	NLPHL
13.1075	DLBCL	DLBCL GCB	DLBCL GCB avec expression de MYC et BCL2 élevée	NE	DLBCL
13.1151	DLBCL EBV +	Signature T	Signature T + EBV	NE	DLBCL EBV +
13.1197	MCL variant pléomorphe	DLBCL ABC	DLBCL ABC avec expression élevée de CCND1	NE	MCL variant pléomorphe
13.1246	DLBCL + lymphome B à petites cellules	MCL	MCL	Absence de réarrangement	MCL
13.1283	PMBL	DLBCL ABC/PMBL	Probable PMBL	NE	PMBL
13.1339	DLBCL	FL	Erreur de bloc	NE	DLBCL
13.1452	FL grade 3B	Signature T	Signature T avec mutation de RHOA et expression d'EBV	NE	Lymphome T folliculaire TFH
13.1463	PMBL	DLBCL GCB	DLBCL GCB ou PMBL	Absence de réarrangement	PMBL
14.0038	PMBL	Signature T	PMBL avec environnement riche en LT	NE	PMBL
14.0208	FL grade 3A	DLBCL GCB	DLBCL GCB avec expression élevée de BCL2	NE	FL grade 3A
14.0763	DLBCL	Signature T	Signature T + EBV	NE	DLBCL EBV +
14.1190	HGBL	DLBCL ABC	DLBCL ABC avec expression élevée de MYC et BCL2	Réarrangement de BCL6	HGBL NOS
15.0232	AITL	Signature T	Signature T avec mutation de IDH2 et expression d'EBV	NE	AITL
15.0590	DLBCL	DLBCL ABC	DLBCL ABC avec translocation t(3;14) et expression élevée de MYC et BCL2, triple hit ?	NE	HGBL
15.0838	PMBL	Signature T	Signature T, peut-être XPO1 muté faible	NE	PMBL
15.0953	DLBCL	PMBL	PMBL mais translocation t(3;14), CD23 et CD30 négatifs	Réarrangement de BCL6	DLBCL
15.0955	DLBCL	PMBL	PMBL mais avec expression d'EBV	NE	DLBCL EBV +
16.0949	MCL variant pléomorphe	DLBCL ABC	DLBCL ABC ou MCL, expression élevée de CCND1	NE	MCL variant pléomorphe

**Tableau n°7 : Détail de certaines réconciliations diagnostiques (NE : non évaluée ou non évaluable).**

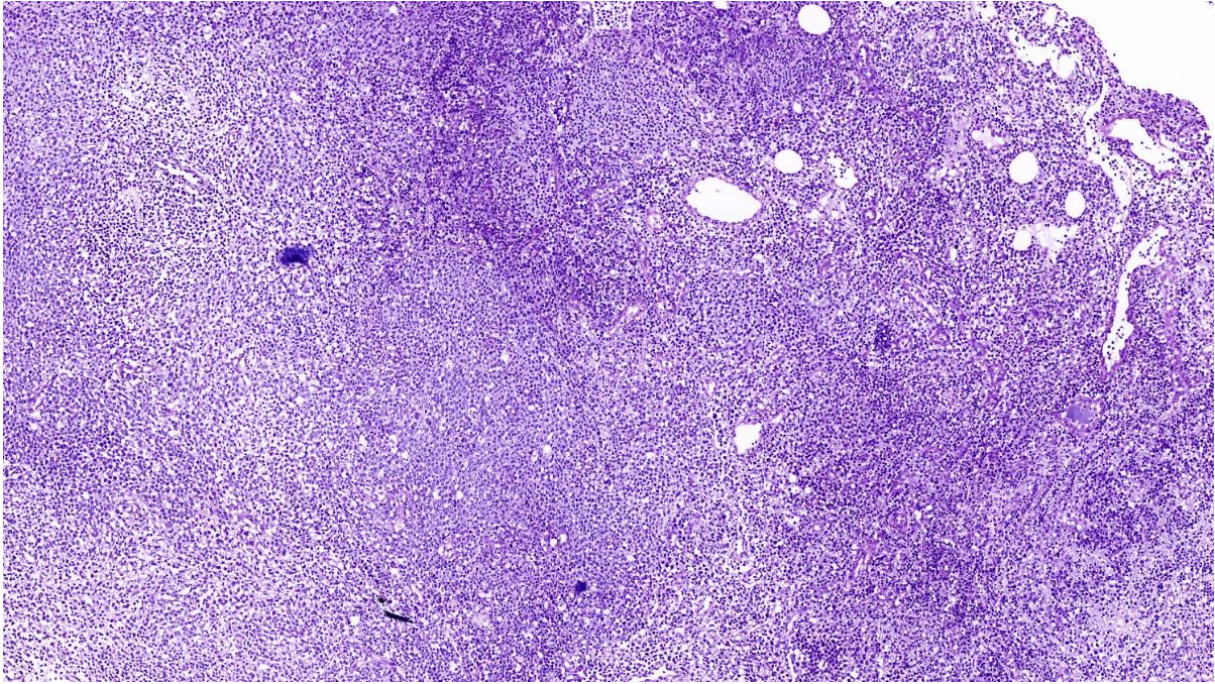


Figure n°12 : Exemple du cas n°13.1452 : lymphome folliculaire de grade 3B reclassé en lymphome T folliculaire TFH, architecture vaguement nodulaire à faible grossissement (Giemsa, objectif x4).

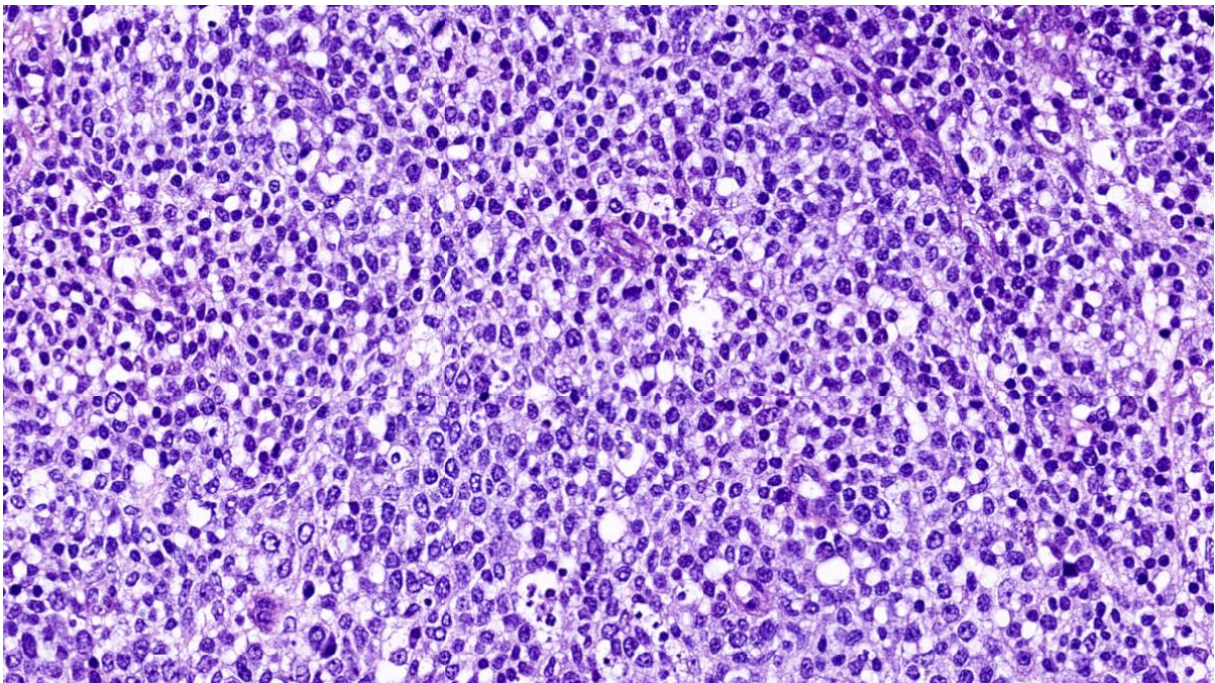


Figure n°13 : Au sein de ces nodules, on observe de nombreuses cellules lymphoïdes de grande taille ou de taille moyenne avec rétrospectivement des centres germinatifs résiduels et une population de taille moyenne à la partie externe des follicules (Giemsa, objectif x20).



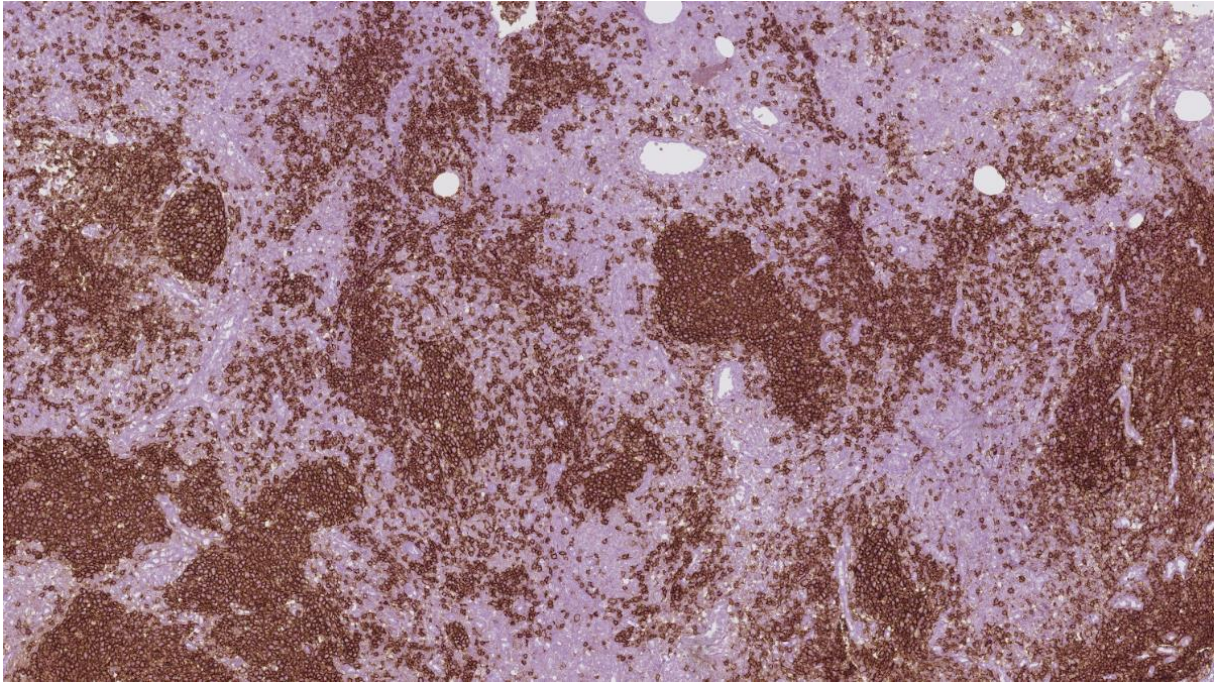


Figure n°14 : Anticorps anti-CD20 : nombreux follicules lymphoïdes B sans expansion des espaces interfolliculaires (IHC anti-CD20, objectif x4).

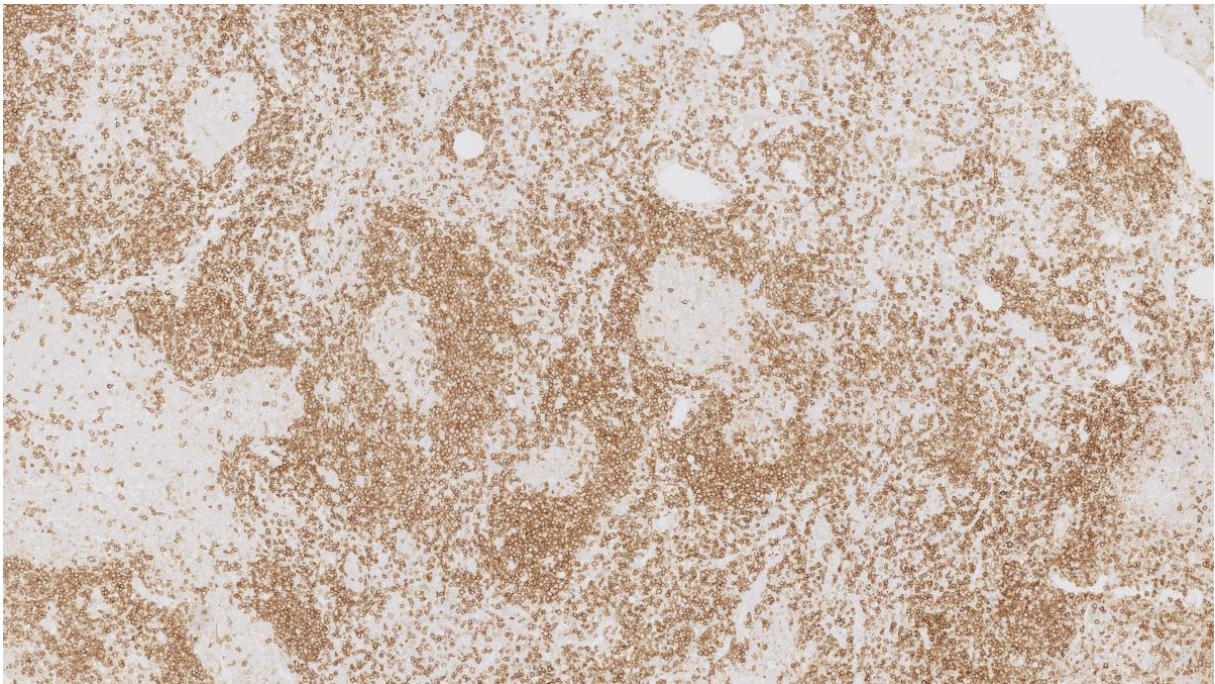


Figure n°15 : Anticorps anti-CD5 : positif dans les territoires folliculaires et notamment la partie externe, juxta ou périfolliculaires (IHC anti-CD5, objectif x4).

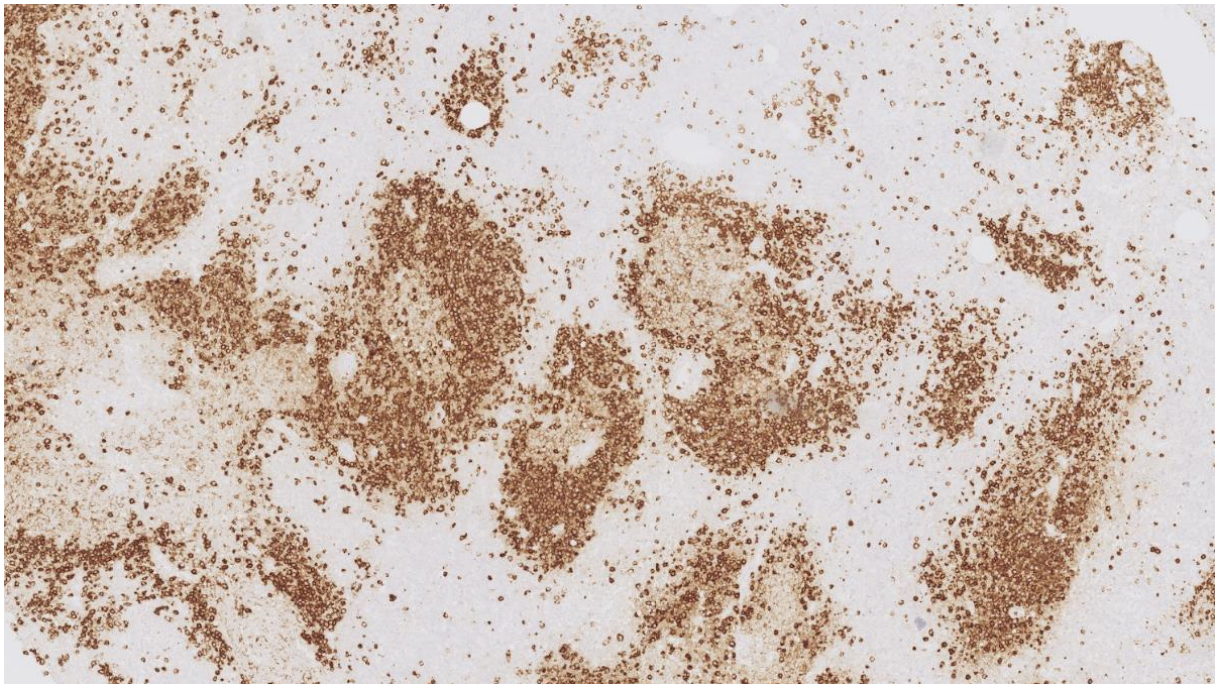


Figure n°16 : Anticorps anti-CD10 : positif dans les territoires folliculaires avec une intensité prédominante sur la partie externe T périfolliculaire (phénotype TFH) (IHC anti-CD10, objectif x4).

## 5) Interprétation des données du NGS pour 10 cas de classification difficile

La réconciliation diagnostique n'a pas permis de conclure pour 10 cas de classification difficile entre DLBCL et PMBL. Les données du NGS ont été interprétées, et les résultats ont été intégrés aux restes des données moléculaires afin de proposer un diagnostic définitif (tableau n°8).

Suite à l'interprétation des résultats du NGS et à l'intégration de l'ensemble des données :

- 8 DLBCL ont été reclassés définitivement en PMBL, avec un résultat de classificateur moléculaire concordant.
- 1 PMBL a été conservé définitivement en PMBL, le classificateur moléculaire mettant en évidence un profil de DLBCL inclassable.
- 1 PMBL a été conservé définitivement en PMBL, le classificateur moléculaire initialement discordant dû à une erreur de sélection de bloc, puis concordant après étude moléculaire sur le bon bloc.

Numéro de référence	Relecture LYSA-P	Classificateur moléculaire initial	Réévaluation moléculaire	Réarrangement MYC/BCL2/BC6	NGS	Diagnostic de réconciliation
13.0251	PMBL	DLBCL GCB	Inclassable, plasmocytose réactionnelle	NE	SOCS1, TNFAIP3	PMBL
13.1467	DLBCL	PMBL	PMBL	NE	NOTCH1	PMBL
14.1253	DLBCL	PMBL	PMBL	Absence de réarrangement	B2M, ARID5B, NFKBIA	PMBL
15.0058	DLBCL	PMBL	PMBL	NE	STAT6, B2M, CIITA, FOXO1, CD58, PAX5, PIK3CA, PIM1, SGK1, XPO1	PMBL
15.0093	DLBCL	PMBL	PMBL	NE	STAT6, SOCS1, TNFAIP3, CIITA, FOXO1, GNA13	PMBL
15.0156	DLBCL	Signature T	Signature T, expression élevée de CD30 et PDL1, expression moyenne de MAL	Absence de réarrangement	HLA-B, NOTCH2	PMBL
15.0364	DLBCL	PMBL	PMBL	Absence de réarrangement	SOCS1, REL	PMBL
15.0774	DLBCL	PMBL	PMBL	Absence de réarrangement	STAT6, CREBBP, TNFRSF14, BTG1, NF1	PMBL
15.0836	PMBL	DLBCL ABC	Inclassable, plasmocytose réactionnelle	NE	CREBBP, CARD11, HLA-DMB, RHOA	PMBL
15.0954	DLBCL	PMBL	PMBL	Absence de réarrangement	STAT6, B2M, TNFAIP3, ARID5B, GNA13, IRF4	PMBL

Tableau n°8 : Détail des réconciliations diagnostiques avec interprétation des données du NGS (NE : non évaluée ou non évaluable).

Exemple du cas n°13.0251 :

La relecture LYSA-P était en faveur d'un PMBL et le classificateur moléculaire initial en faveur d'un DLBCL GCB.

A la relecture histologique, on observait une morphologie en faveur d'un PMBL avec la présence de cellules au cytoplasme abondant et clair et de cellules de type Reed-Sternberg. Cependant, on observait également en périphérie du prélèvement la présence d'un ganglion non lymphomateux, d'aspect réactionnel.

A la réévaluation moléculaire, le profil n'était pas caractéristique entre un DLBCL GCB ou ABC, n'était pas en faveur d'un PMBL, et il s'y associait une plasmocytose réactionnelle abondante.

Les résultats du NGS mettaient en évidence une mutation des gènes SOCS1 et TNFAIP3, plaidant en faveur d'un PMBL.

Le diagnostic de réconciliation finalement retenu était donc celui de PMBL.

#### Exemple du cas n°15.0836 :

La relecture LYSA-P était en faveur d'un PMBL et le classificateur moléculaire initial en faveur d'un DLBCL ABC.

A la relecture histologique, la morphologie était en faveur d'un PMBL avec la présence d'une fibrose de type alvéolaire, de cellules au cytoplasme abondant et clair, et de cellules de type Reed-Sternberg.

La réévaluation moléculaire n'était pas caractéristique entre un DLBCL GCB ou ABC, n'était pas en faveur d'un PMBL et retrouvait un environnement plasmocytaire réactionnel abondant.

Les résultats du NGS retrouvaient la présence de mutation des gènes CREBBP, CARD11, HLA-DMB et RHOA, plaidant globalement pour un DLBCL GCB.

A posteriori, on observait une erreur de sélection du bloc envoyé pour étude moléculaire. Ce bloc concernait un ganglion réactionnel, sans prolifération lymphomateuse. Le classificateur moléculaire, réalisé sur le bon bloc, était en faveur d'un PMBL.

Le diagnostic de réconciliation retenu était celui de PMBL.

## 6) Population finale avec diagnostic de réconciliation

Parmi les 471 patients du protocole Gained ayant eu une étude moléculaire ainsi qu'un diagnostic de réconciliation, 1 cas présentait une erreur de bloc. L'étude moléculaire n'a pas pu être réalisée sur le bon bloc à posteriori.

Parmi les 470 patients restants, 441 patients étaient compatibles avec les critères d'inclusion (93,8%) (tableau n°9), et 29 patients ne correspondaient pas aux critères d'inclusion (6,2%) (tableau n°10).

<b>Nombre de patients</b>	<b>Diagnostic de réconciliation</b>
<b>252 (53,6%)</b>	DLBCL
<b>109 (23,1%)</b>	PMBL
<b>40 (8,5%)</b>	DLBCL + lymphome B à petites cellules
<b>16 (3,4%)</b>	THRLBCL
<b>13 (2,8%)</b>	HGBL DH/TH
<b>6 (1,3%)</b>	HGBL NOS
<b>5 (1,1%)</b>	DLBCL EBV +

Tableau n°9 : Détail des patients correspondant aux critères d'inclusion après réconciliation diagnostique.

<b>Nombre de patients</b>	<b>Diagnostic de réconciliation</b>
<b>3 (0,6%)</b>	FL grade 1-2
<b>5 (1,1%)</b>	FL grade 3A
<b>6 (1,3%)</b>	FL grade 3B
<b>1 (0,2%)</b>	FL de grade indéterminé
<b>4 (1,0%)</b>	NLPHL
<b>3 (0,6%)</b>	B-NHL inclassable pour raison technique
<b>2 (0,4%)</b>	AITL
<b>2 (0,4%)</b>	MCL variant pléomorphe
<b>1 (0,2%)</b>	MCL
<b>1 (0,2%)</b>	BL
<b>1 (0,2%)</b>	B-ALL/LBL

Tableau n°10 : Détail des patients ne correspondant pas aux critères d'inclusion après réconciliation diagnostique.

## 7) Concordance finale entre le classificateur moléculaire après réévaluation et le diagnostic de réconciliation

Parmi les 470 patients du protocole Gained ayant eu une étude moléculaire avec réévaluation ainsi qu'un diagnostic de réconciliation, la concordance diagnostique globale était de 75,1% (353 diagnostics concordants parmi 470). En ne prenant en compte que les diagnostics pouvant être reconnus par le classificateur moléculaire, la concordance était de 92,1% (349 cas concordants parmi 379).

La concordance des patients correspondant aux critères d'inclusion entre le diagnostic de réconciliation et le classificateur moléculaire était de 88,5% (416 cas concordants parmi les 470).

Parmi les critères d'inclusion, la concordance diagnostique entre le diagnostic de réconciliation et le classificateur moléculaire était de 79,4% (350 cas concordants parmi 441). Les 350 cas concordants correspondaient à 244 DLBCL et 106 PMBL.

La discordance diagnostique parmi les critères d'inclusion entre le diagnostic de réconciliation et le classificateur moléculaire était donc de 20,6% (91 cas discordants parmi 441) (tableau n°11) si l'on ne prend pas en compte la signature T comme un potentiel marqueur des THRLBCL ou permettant de repérer les DLBCL EBV +.

Parmi les 29 diagnostics ne correspondant pas aux critères d'inclusion, on observait 3 concordances diagnostiques entre le diagnostic de réconciliation et le classificateur moléculaire réévalué, concernant 1 MCL, 1 lymphome T folliculaire TFH et 1 AITL. Les 26 autres diagnostics restaient discordants (tableau n°12). bien que 3 cas de lymphomes B non classables histologiquement même après relecture aient pu être classés par le classificateur.

Le classificateur moléculaire avec réévaluation a permis d'identifier au total 23 PMBL, 1 DLBCL ABC, 1 MCL, 1 lymphome T folliculaire TFH et 1 DLBCL EBV +, correspondant à 5,7% des diagnostics parmi les critères d'inclusions (25 cas parmi 441), 5,7% des diagnostics globalement (27 cas parmi 470), 6,6% en ne prenant en compte que les diagnostics pouvant être reconnus par le classificateur moléculaire (25 cas parmi 379).

<b>Diagnostic de réconciliation</b>	<b>Classificateur moléculaire réévalué</b>
<b>40 DLBCL + lymphome B à petites cellules</b>	30 DLBCL GCB 8 DLBCL ABC 1 FL 1 Signature T
<b>16 THRLBCL</b>	16 Signature T
<b>13 HGBL DH/TH</b>	11 DLBCL GCB 2 DLBCL ABC
<b>8 DLBCL</b>	6 Signature T 1 PMBL 1 DLBCL inclassé avec plasmocytose réactionnelle
<b>6 HGBL NOS</b>	3 DLBCL GCB 2 DLBCL ABC 1 Signature T + EBV
<b>3 PMBL</b>	1 Signature T 1 DLBCL GCB/PMBL 1 DLBCL inclassé avec plasmocytose réactionnelle
<b>5 DLBCL EBV +</b>	4 Signature T + EBV 1 PMBL + EBV

Tableau n°11 : Détail des discordances entre le diagnostic de réconciliation et le classificateur moléculaire réévalué parmi les critères d'inclusion (police bleue : diagnostic concordant avec les critères d'inclusion, police rouge : diagnostic discordant avec les critères d'inclusion).

<b>Diagnostic de réconciliation</b>	<b>Classificateur moléculaire réévalué</b>
<b>3 FL grade 1-2</b>	3 DLBCL GCB
<b>5 FL grade 3A</b>	5 DLBCL GCB
<b>6 FL grade 3B</b>	4 DLBCL GCB 1 DLBCL ABC 1 DLBCL ABC/MZL
<b>1 FL de grade indéterminé</b>	1 DLBCL GCB
<b>4 NLPHL</b>	3 Signature T 1 PMBL
<b>3 B-NHL inclassable pour raison technique</b>	DLBCL GCB
<b>2 MCL variant pléomorphe</b>	1 DLBCL ABC 1 DLBCL ABC/MCL
<b>1 BL</b>	1 DLBCL GCB
<b>1 B-ALL/LBL</b>	1 DLBCL ABC

Tableau n°12 : Détail des discordances entre le diagnostic de réconciliation et le classificateur moléculaire réévalué parmi les diagnostics ne correspondant pas aux critères d'inclusion (police bleue : diagnostic concordant avec les critères d'inclusion, police rouge : diagnostic discordant avec les critères d'inclusion).

## 8) Concordance GCB/ABC entre classificateur moléculaire, algorithme de Hans et Nanostring

Après réconciliation diagnostique, nous observons 292 cas de DLBCL dont 40 cas de DLBCL + lymphome B à petites cellules.

Parmi ces 292 cas, 289 cas ont eu un résultat de Nanostring GCB, ABC ou inclassé, 282 cas ont eu un résultat de classificateur moléculaire DLBCL GCB ou DLBCL ABC, et 272 cas ont eu un résultat d'algorithme de Hans GCB ou ABC.

Les résultats de Nanostring mettaient en évidence 173 DLBCL GCB (59,9%), 77 DLBCL ABC (26,6%), et 39 DLBCL inclassés (13,5%).



Les résultats du classificateur moléculaire mettaient en évidence 166 DLBCL GCB (58,9%) et 116 DLBCL ABC (41,1%). Parmi les 224 cas ayant eu un résultat de classificateur moléculaire et un résultat de Nanostring (catégorie « inclassé » exclue), 218 cas étaient concordants, correspondant à 97,3% de concordance ( $p = 0,614$  montrant une absence de différence significative entre les résultats du Nanostring et du classificateur moléculaire, coefficient de corrélation entre 0,818 et 1) (figure n°17). Les 6 cas non corrélés correspondaient à 6 DLBCL classés ABC par le classificateur moléculaire.

Variable	Modalités	Comptages	Effectifs	%
<b>Classifieur</b>	ABC	76	76	33,929
	GCB	148	148	66,071
<b>Nanostring</b>	ABC	70	70	31,250
	GCB	154	154	68,750

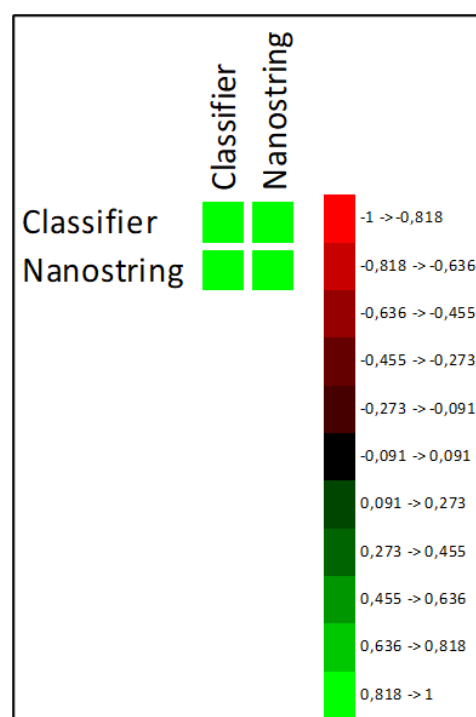


Figure n°17 : Résultats de corrélation GCB/ABC entre le classificateur moléculaire et le Nanostring ( $p = 0,614$ , coefficient de corrélation entre 0,818 et 1).

Les résultats de l'algorithme de Hans mettaient en évidence 164 DLBCL GCB (60,3%) et 108 DLBCL ABC (39,7%). Parmi les 232 cas ayant eu un résultat d'algorithme de Hans et un résultat de Nanostring (catégorie « inclassé » exclue), 196 cas étaient concordants, correspondant à 84,5% de concordance ( $p = 0,485$  montrant une absence de différence significative entre les résultats du Nanostring et de l'algorithme de Hans, coefficient de corrélation entre 0,818 et 1) (figure n°18). Les 36 cas non concordants correspondaient à 14 DLBCL classés GCB et 22 cas classés ABC par l'algorithme de Hans.

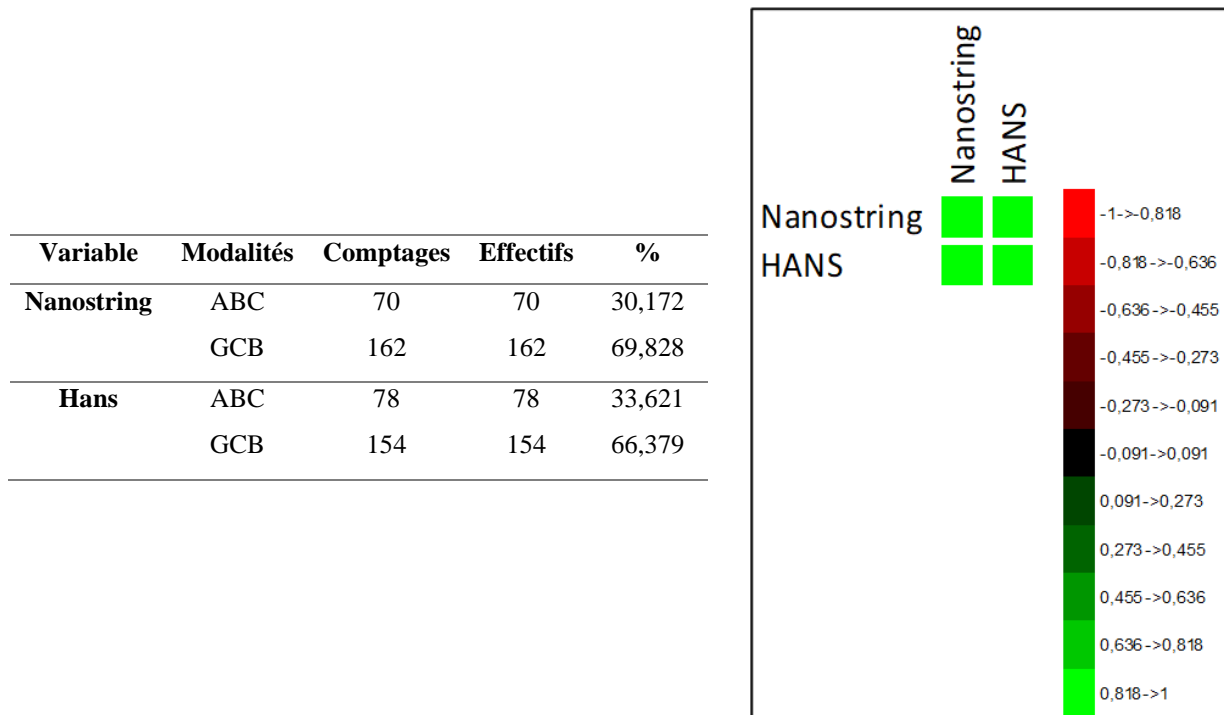


Figure n°18 : Résultats de corrélation GCB/ABC entre l'algorithme de Hans et le Nanostring ( $p = 0,485$ , coefficient de corrélation entre 0,818 et 1).

Les résultats du test bilatéral (test z pour deux proportions) mettaient en évidence une **différence significative** entre la concordance classificateur moléculaire / Nanostring (97,3%) et la concordance algorithme de Hans / Nanostring (84,5%) : 12,8% de différence,  $p < 0.0001$ , intervalle de confiance à 95% autour de la différence des proportions : ] 0,073 ; 0,184 [.

## 9) Réévaluation des données du TEP-scanner pour les cas de PMBL

L'ensemble des cas considérés comme PMBL après réconciliation ont fait l'objet d'une réévaluation de la présentation clinique, avec notamment une relecture du TEP-scanner au moment du diagnostic, par deux relecteurs différents (Pr Itti et Dr Blanc Durand). Les données suivantes ont été relevées : présence d'une masse médiastinale uniquement, présence d'une masse médiastinale associée à des adénopathies satellites (sus-claviculaires, mammaires internes, phréniques), présence d'une atteinte extra-médiastinale.

Parmi les 109 cas considérés comme PMBL après réconciliation diagnostique, les données du TEP-scanner n'ont pas pu être récupérées pour 1 cas.

Parmi les 108 cas restants :

- 37 cas (34,3%) se présentaient avec une masse médiastinale unique (stade I)
- 56 cas (51,8%) se présentaient avec une masse médiastinale associée à des adénopathies satellites (stade II)
- 12 cas (11,1%) se présentaient avec une masse médiastinale associée à une ou plusieurs atteintes extra-médiastinales (stade III et IV)
- 3 cas (2,8%) se présentaient sous forme d'atteinte extra-médiastinale uniquement (2 cas de masse inguinale unique, 1 cas de coulée ganglionnaire lombo-aortique, iliaque et inguinale) (tableau n°14).

## 10) Réévaluation des données morphologiques des PMBL

A l'issue de la réconciliation diagnostique, 109 cas considérés finalement comme PMBL ont fait l'objet d'une relecture histologique. Les caractéristiques suivantes ont été relevées : architecture, présence ou absence d'un microenvironnement diffus, présence ou absence d'une fibrose alvéolaire (figure n°19), présence ou absence de cellules de taille moyenne et grande au cytoplasme abondant et clair (figure n°20), présence ou absence de cellules de type Reed-Sternberg (figure n°21).

Parmi ces 109 cas de PMBL, 2 cas n'ont pas pu être relus en raison d'un renvoi des lames au laboratoire d'origine et 3 cas présentaient une coloration HES difficile d'interprétation.

Parmi les 104 cas restants : l'ensemble des cas présentait une architecture diffuse (pas d'aspect de type scléro-nodulaire), aucun cas ne présentait un microenvironnement diffus, 65 cas présentaient une fibrose de type alvéolaire (62,5%), 71 cas présentaient des cellules de taille moyenne et grande au cytoplasme abondant clarifié ou pâle (68,3%) et 82 cas présentaient des cellules de type Reed-Sternberg (78,8%).

Les PMBL présentaient dans 17 cas un seul critère histologique (16,3%), dans 33 cas deux critères histologiques (31,7%), et dans 45 cas les trois critères histologiques (43,3%).

On observait 9 cas de PMBL ne présentant aucun de ces critères histologiques (8,4%), dont les caractéristiques cliniques et moléculaires sont résumées dans le tableau n°13. Parmi ces 9 cas de PMBL, on observait 1 cas faisant partie des 3 cas identifiés par le TEP-scanner sans lésion médiastinale (cas n°15.0364, figures n°22 et 23, tableau n°14).

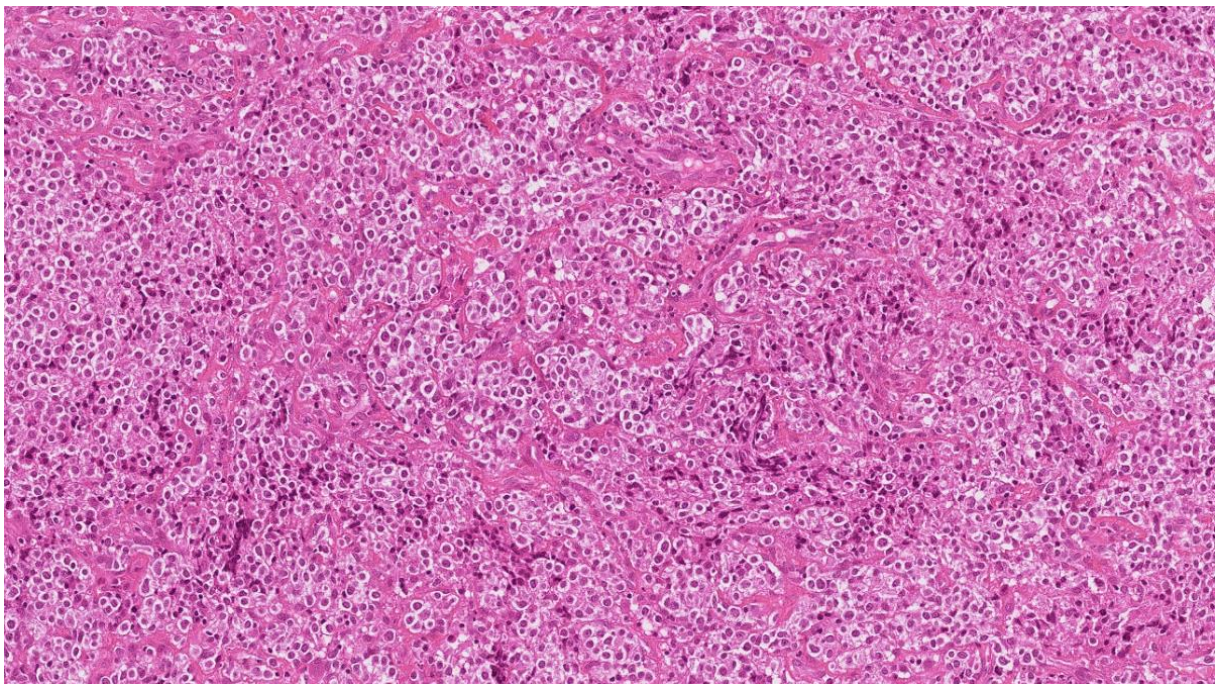


Figure n°19 : Aspect de fibrose alvéolaire (HES objectif x10).

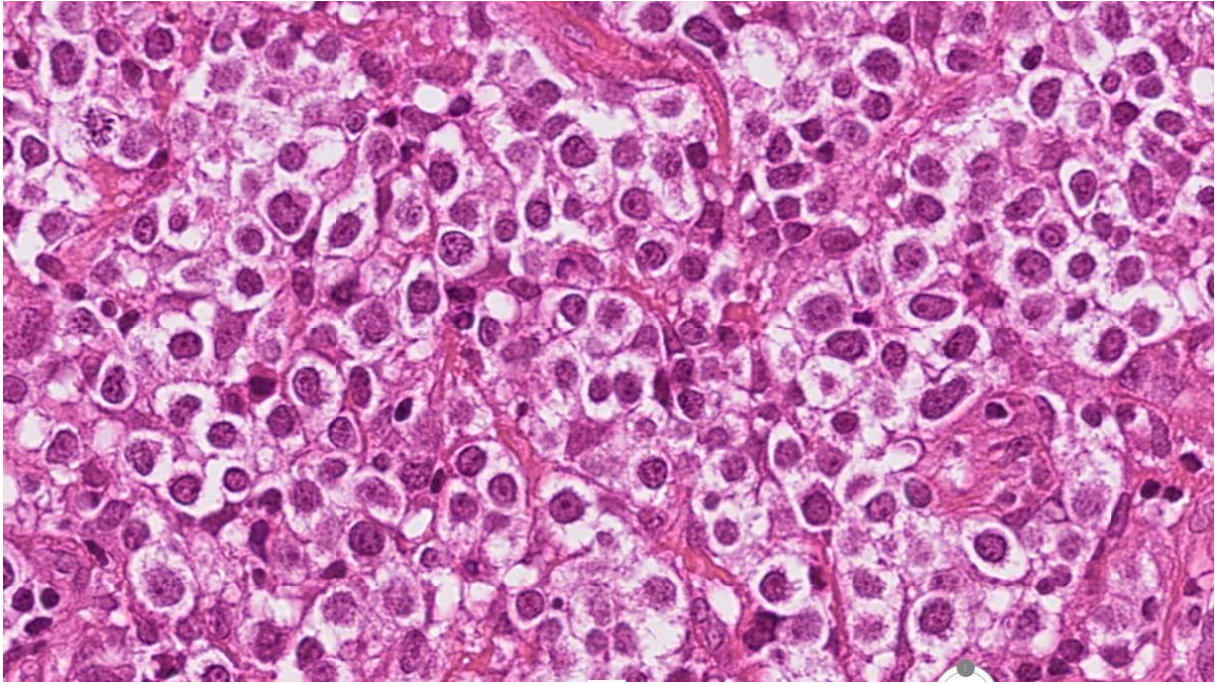


Figure n°20 : Cellules de taille moyenne et grande au cytoplasme abondant et clair (HES objectif x40).

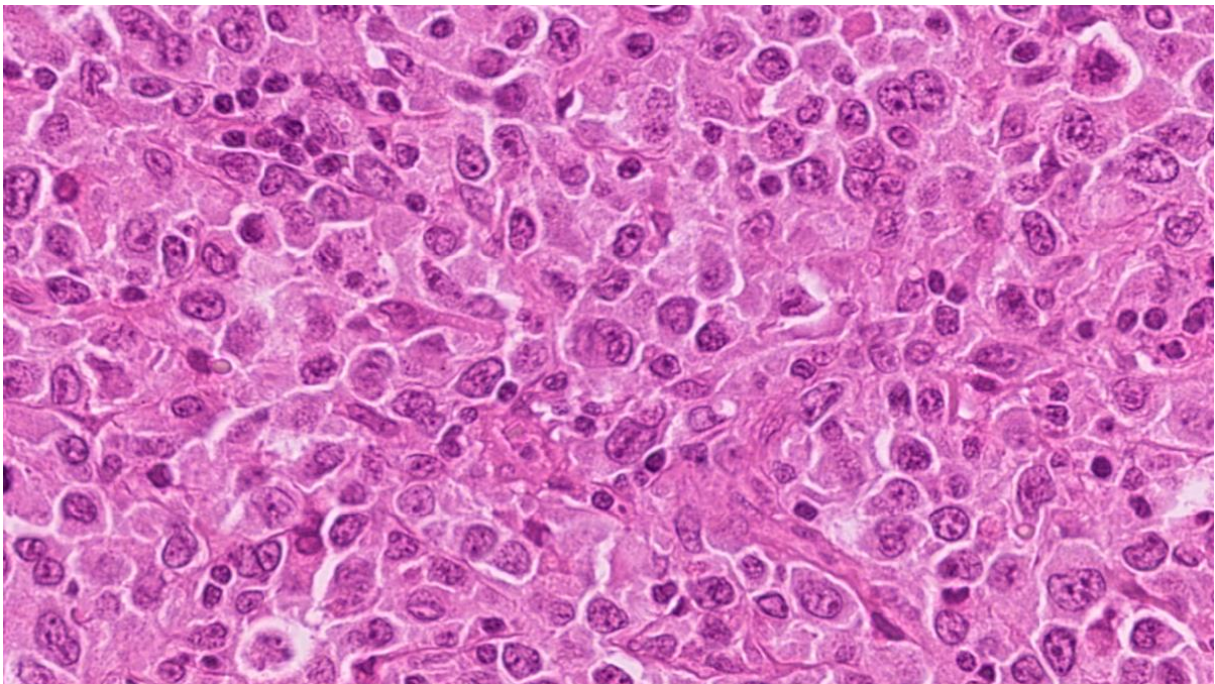


Figure n°21 : Cellules de type Reed-Sternberg (HES objectif x40).

Référence Gela-P	Classificateur moléculaire réévalué	NGS	Diagnostic initial	Diagnostic de réconciliation	TEP-scanner
13.0967	PMBL	NE	PMBL	PMBL	Masse médiastinale unique
13.1123	PMBL	NE	PMBL	PMBL	Masse médiastinale + ganglions satellites
13.1458	PMBL	NE	<u>DLBCL</u>	PMBL	Masse médiastinale unique
13.1465	PMBL	NE	PMBL	PMBL	Masse médiastinale + ganglions satellites
13.1467	PMBL	NOTCH1	<u>DLBCL</u>	PMBL	Masse médiastinale + ganglions satellites
15.0115	PMBL	NE	PMBL	PMBL	Masse médiastinale + ganglions satellites
15.0215	PMBL	NE	PMBL	PMBL	Masse médiastinale + ganglions satellites
15.0260	PMBL	NE	PMBL	PMBL	Masse médiastinale unique
15.0364	PMBL	<u>SOCS1</u> , <u>REL</u>	<u>DLBCL</u>	PMBL	<u>Masse inguinale unique</u>

Tableau n°13 : Caractéristiques cliniques et moléculaires des 9 PMBL ne présentant pas de critères histologiques de PMBL (NE : non évalué)

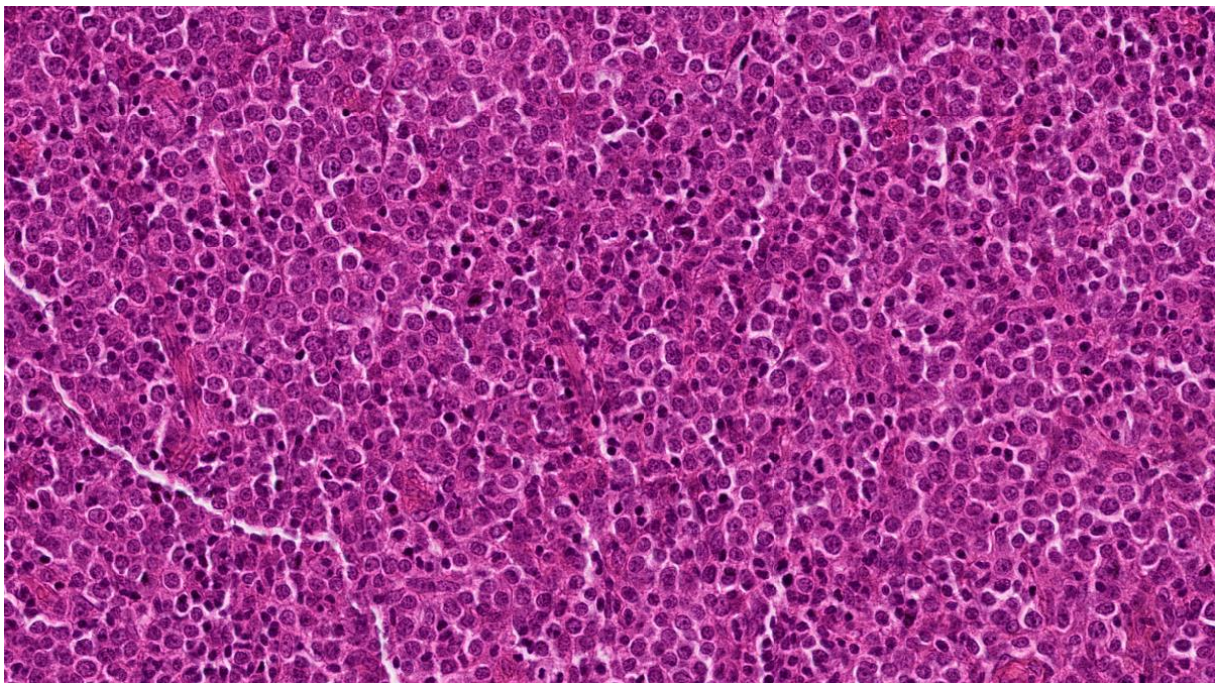
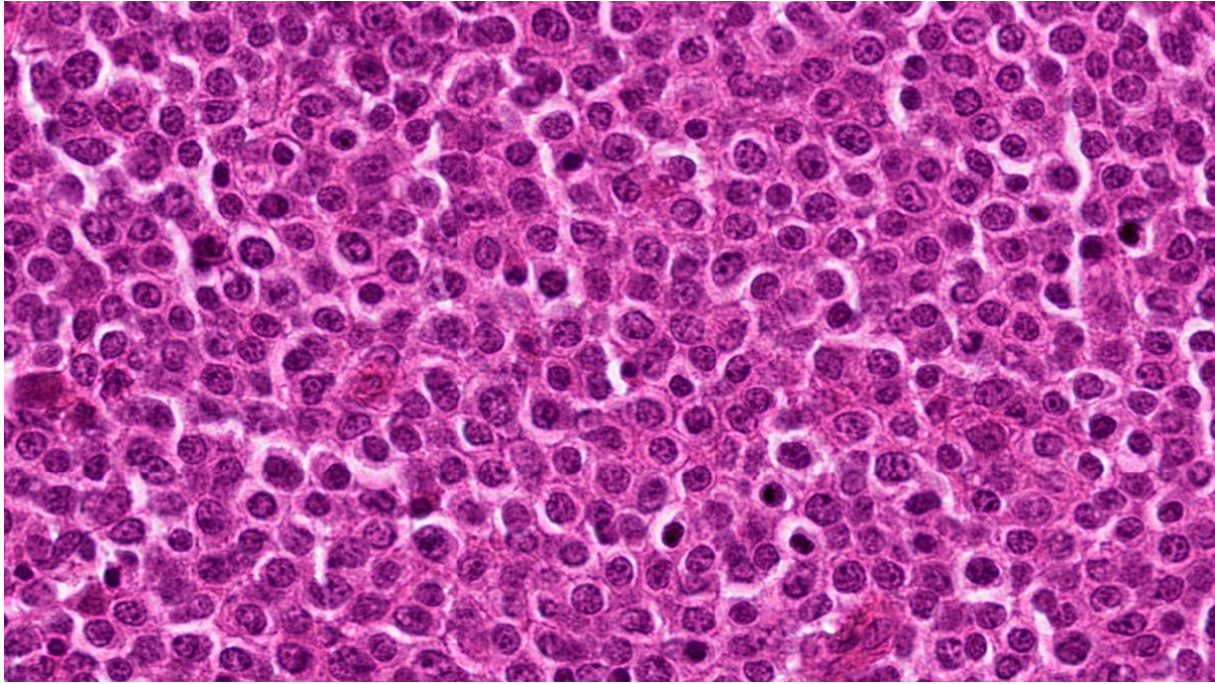


Figure n°22 : Exemple du cas n°15.0364 : PMBL de présentation extra-médiastinale, avec une architecture diffuse sans fibrose de type alvéolaire (HES objectif x20).



**Figure n°23** : Exemple du cas n°15.0364 : Cytologie monomorphe sans cytoplasme abondant et clarifié, et sans cellule de type Reed-Sternberg (HES, objectif x40).

Référence Gela-P	Classificateur moléculaire réévalué	NGS	Diagnostic initial	Diagnostic de réconciliation	TEP-scanner	Histologie
15.0250	PMBL	NE	DLBCL	PMBL	Masse inguinale unique	Présence de cellules au cytoplasme abondant et clarifié
15.0364	PMBL	SOCS1, REL	DLBCL	PMBL/DLBCL avec signature PMBL	Masse inguinale unique	Aspect monomorphe
15.0774	PMBL	STAT6, CREBBP, TNFRSF14, BTG1, NF1	DLBCL	PMBL	Coulée ganglionnaire lombo-aortique, iliaque et inguinale	Présence de rares cellules de type Reed-Sternberg

**Tableau n°14** : Caractéristiques cliniques, pathologiques et biologiques des 3 PMBL de présentation extra-médiastinale.

## 11) Corrélation immunohistochimie et RT-MLPA pour la signature PMBL

Une étude immunohistochimique complémentaire a été réalisée avec les anticorps anti-MAL, anti-PDL1, anti-CD30 et anti-CD23, sur 10 cas sélectionnés, ayant une forte ou faible expression de ces marqueurs en RT-MLPA. Une interprétation des résultats immunohistochimiques, sans connaissance des résultats de RT-MLPA a tout d'abord été réalisée, puis une relecture a été effectuée en connaissance des résultats de RT-MLPA. Les résultats immunohistochimiques ont été exprimés en pourcentage des cellules tumorales marquées sur le territoire de la lame le plus positif à fort grossissement (x400). Les marquages membranaires et en « dot » ont été pris en compte. Les résultats de RT-MLPA ont été relevés de manière semi-quantitative, exprimés en quartile par rapport à la cohorte d'entraînement du classificateur (inférieur au 1<sup>er</sup> quartile : < Q25, entre le 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> quartile : Q25-Q50, entre le 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> quartile : Q50-Q75, supérieur au 3<sup>ème</sup> quartile : > Q75).

Les résultats mettaient en évidence globalement une bonne corrélation entre l'expression immunohistochimique et le profil d'expression en RT-MLPA. Lorsque le profil d'expression en RT-MLPA était inférieur au 1<sup>er</sup> quartile, on observait dans la plupart des cas 0% de cellule tumorale marquée en immunohistochimie. Lorsque le profil d'expression en RT-MLPA était supérieur ou égal au 3<sup>ème</sup> quartile, on observait fréquemment 80 à 100% de cellules tumorales marquées en immunohistochimie. Cependant, on observait parmi 10 cas sur 40 une mauvaise corrélation, notamment avec l'anticorps anti-CD30 (5 cas parmi les 10 présentant une mauvaise corrélation) (tableaux n°15 à 18) (figures n°24 à 26).



Référence Gela-P	MAL RT-MLPA	MAL IHC	Commentaire
13.0236	< Q25	0%	
13.0841	< Q25	0%	
14.0210	< Q25	0%	Présence de cellules épithéliales positives
15.0618	< Q25	0%	Présence de macrophages positifs
13.0229	Q25-Q50	0%	
13.0966	Q25-Q50	0%	
13.1458	Q75	80%	
13.0455	> Q75	100%	(Figure n°24)
13.1235	> Q75	90%	
14.0206	> Q75	100%	

Tableau n°15 : Résultats de corrélation de MAL en IHC et RT-MLPA.

Référence Gela-P	CD30 RT-MLPA	CD30 IHC	Commentaire
14.0210	< Q25	10%	
13.0236	< Q25	0%	
13.0841	< Q25	0%	Pas de témoin interne
13.0966	< Q25	0%	
15.0618	< Q25	0%	Pas de témoin interne
13.0229	> Q75	50%	
13.0455	> Q75	0%	Pas de témoin interne
13.1235	> Q75	30-40%	Première lecture plutôt 10%, à postériori présence de clusters positifs
13.1458	> Q75	80%	
14.0206	> Q75	10%	Première lecture 0%, à postériori discret marquage en dot sur 10% (figure n°25)

Tableau n°16 : Résultats de corrélation de CD30 en IHC et RT-MLPA.

Référence Gela-P	PDL1 RT-MLPA	PDL1 IHC	Commentaire
13.0966	< Q25	0%	Présence de macrophages positifs
14.0210	< Q25	0%	
15.0618	< Q25	0%	Présence de macrophages positifs
13.0841	Q75	100%	
13.0229	> Q75	40%	
13.0236	> Q75	30%	
13.0455	> Q75	100%	
13.1235	> Q75	100%	
13.1458	> Q75	100%	
14.0206	> Q75	100%	

Tableau n°17 : Résultats de corrélation de PDL1 en IHC et RT-MLPA.

Référence Gela-P	CD23 RT-MLPA	CD23 IHC	Commentaire
14.0210	< Q25	0%	
13.0236	< Q25	0%	
13.0841	< Q25	0%	
13.0966	< Q25	0%	Marquage en dot de faible intensité sur moins de 10 %
15.0618	< Q25	0%	Présence de réseau folliculaire dendritique positif (figure n°26)
13.0229	> Q75	80%	
13.0455	> Q75	80%	
13.1235	> Q75	50%	
13.1458	> Q75	100%	
14.0206	> Q75	10-20%	Marquage en dot de faible intensité sur 10 à 20 %

Tableau n°18 : Résultats de corrélation CD23 en IHC et RT-MLPA.

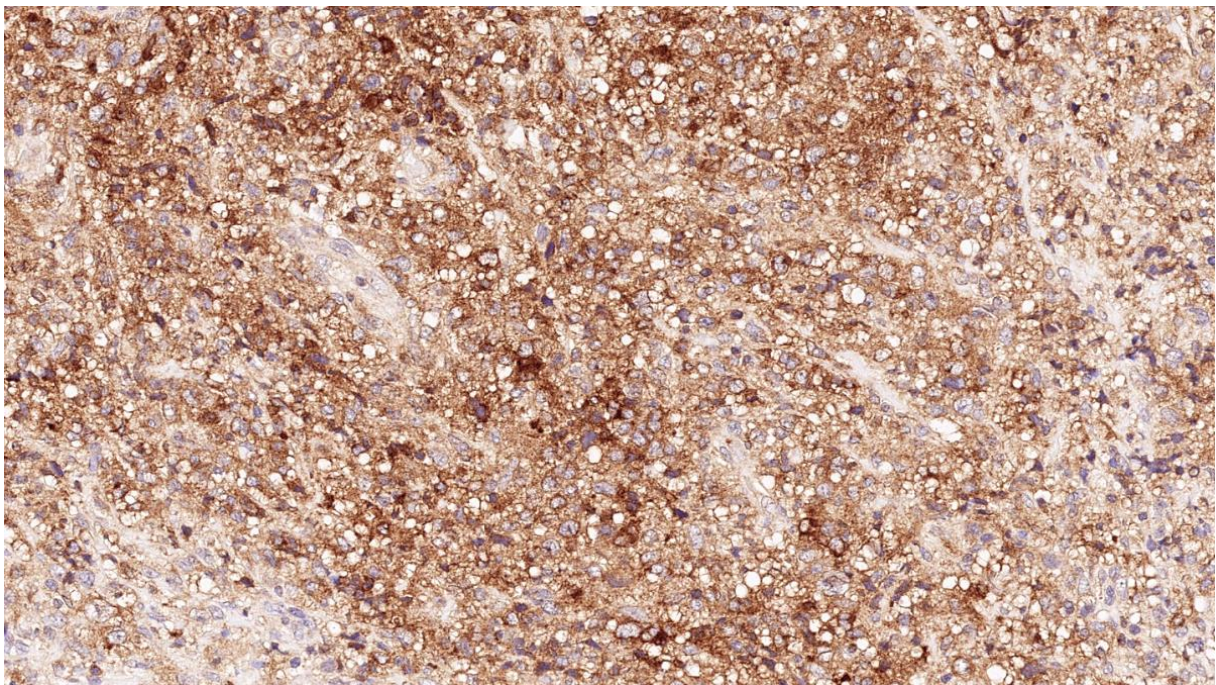
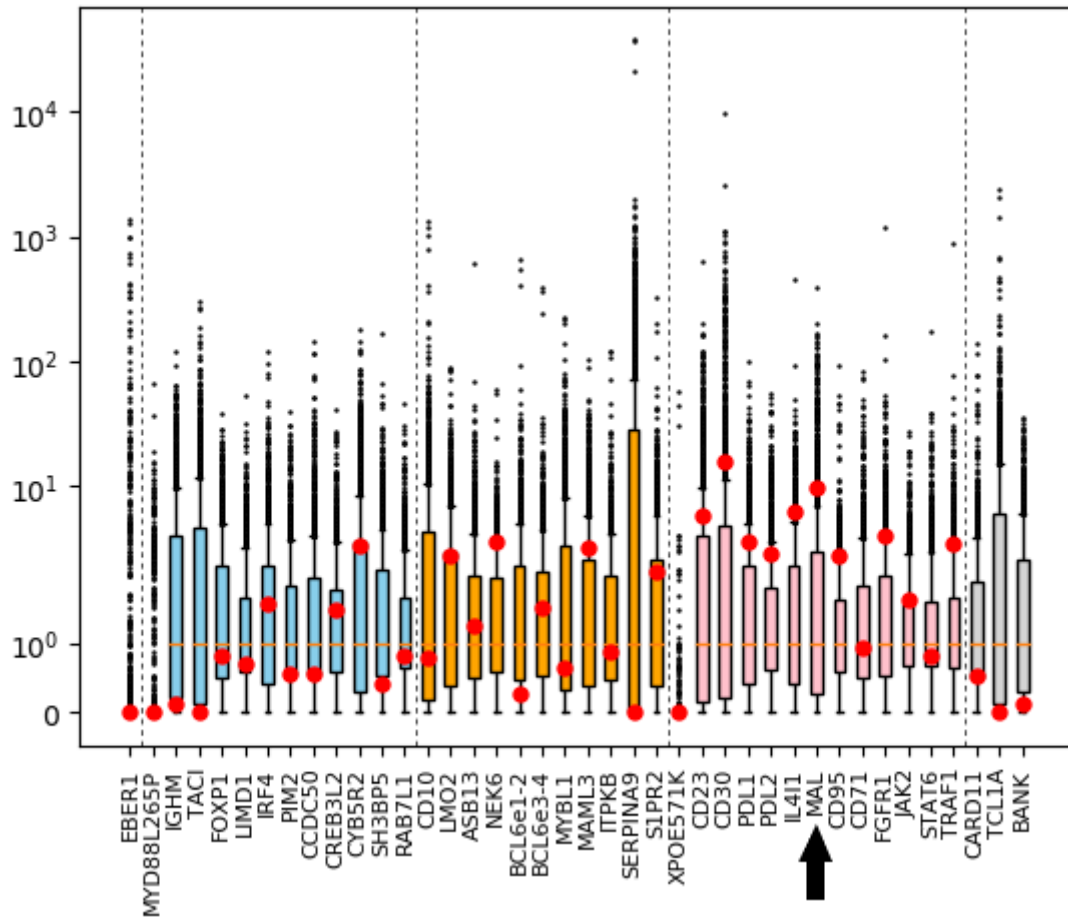


Figure n° 24 : Exemple du cas n°13.0455 : expression de MAL supérieure au 3<sup>ème</sup> quartile en RT-MLPA et dans 100% des cellules tumorales en immunohistochimie (objectif x10).

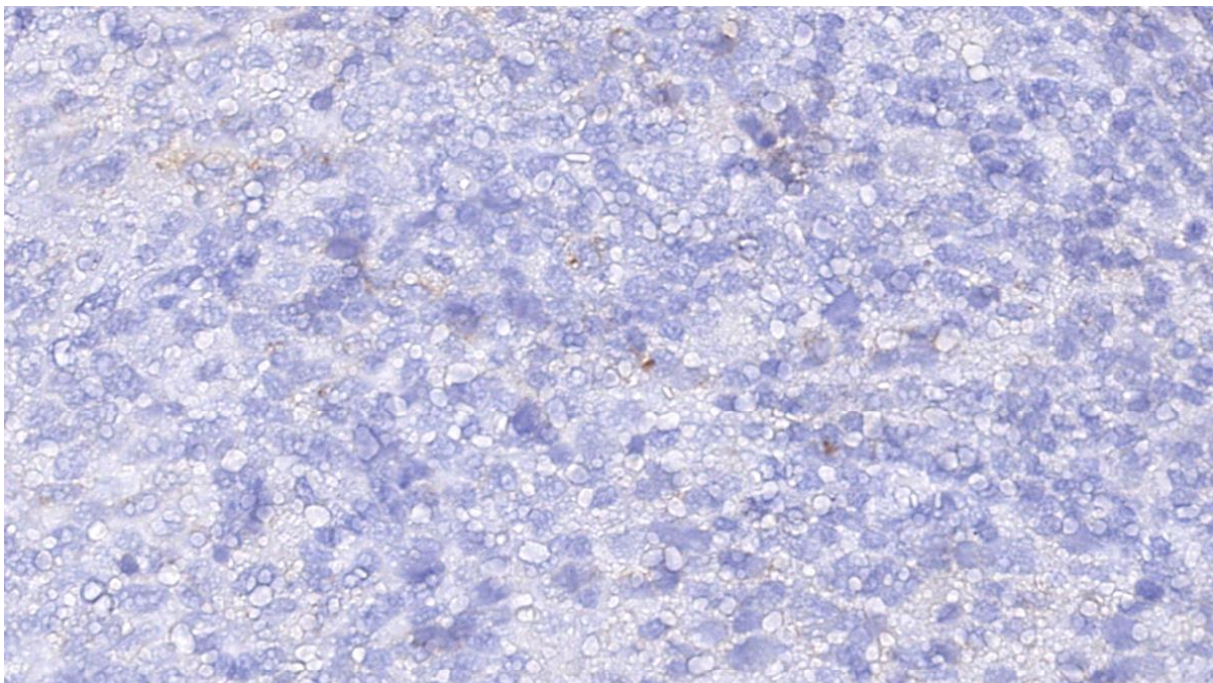
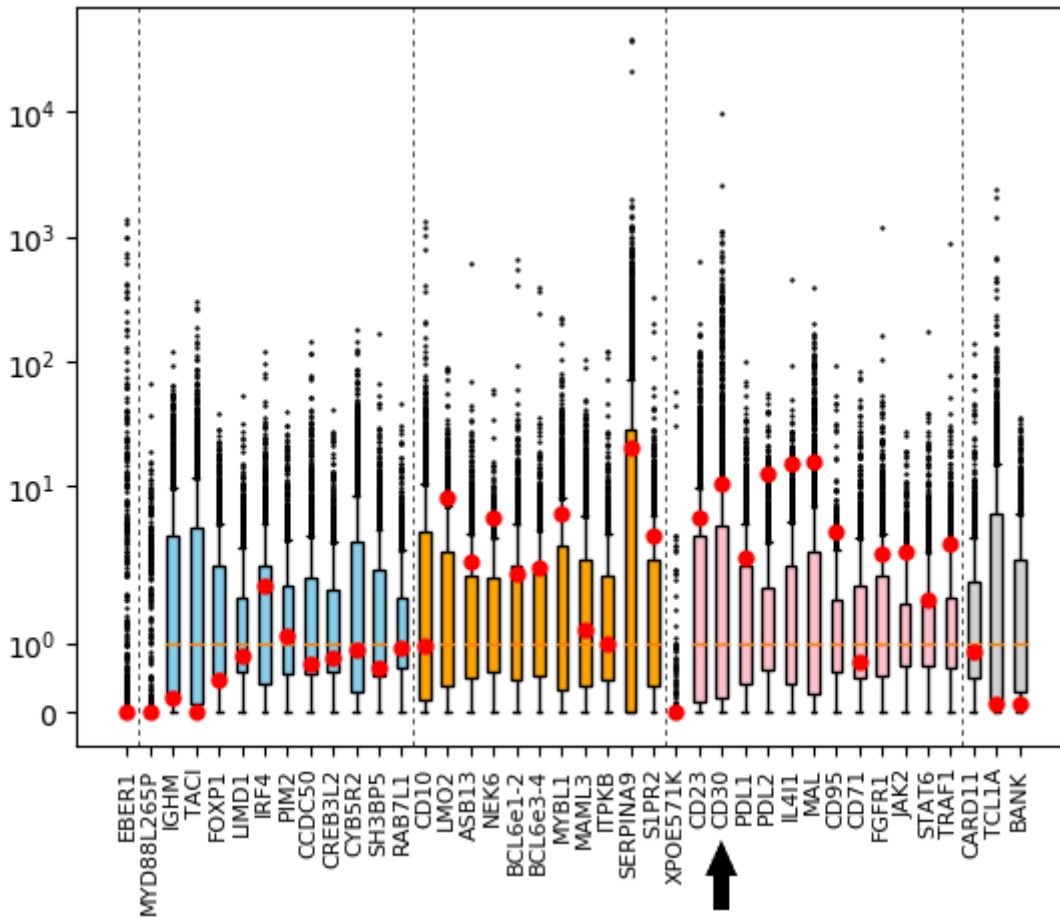


Figure n°25 : Exemple du cas n°14.0206 : expression de CD30 supérieure au 3<sup>ème</sup> quartile en RT-MLPA et dans 10% des cellules tumorales en immunohistochimie avec un marquage discret en « dot » (objectif x40).

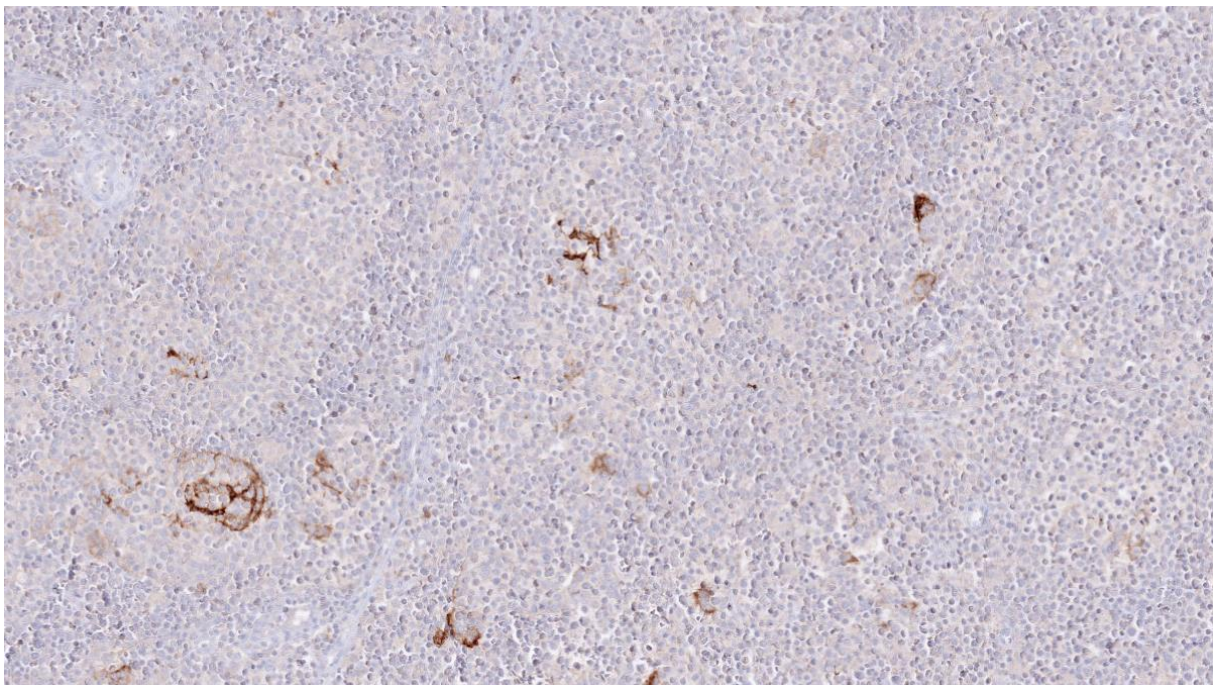
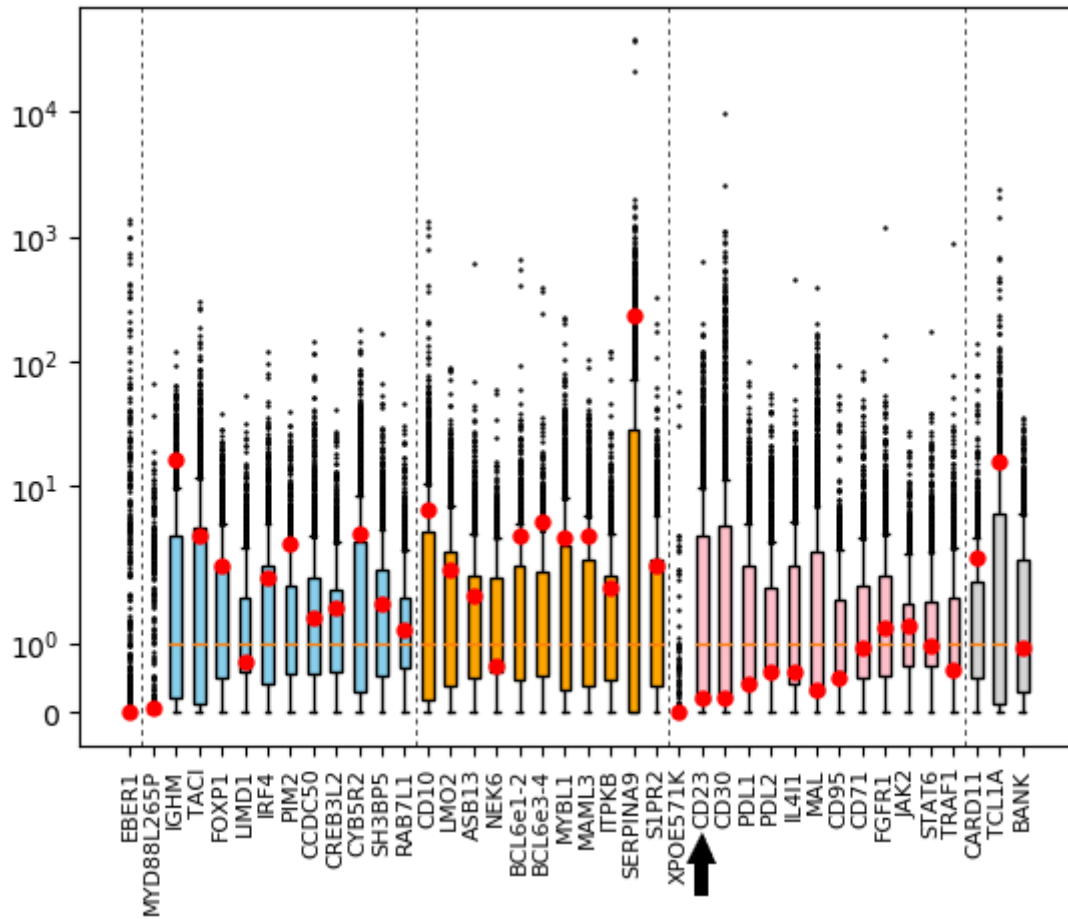


Figure n°26 : Exemple du cas n°15.0618 : expression de CD23 inférieure au 1<sup>er</sup> quartile en RT-MLPA et dans 0% des cellules tumorales en immunohistochimie (témoin interne : réseau folliculaire dendritique résiduel, objectif x10).

## IV. Discussion

Notre étude a mis en évidence des avantages indéniables à l'utilisation du classificateur moléculaire en complément d'une relecture histologique expertale. Bien que la relecture LYSA-P avait seulement pour objectif de valider les critères d'inclusion du protocole GAINED, à savoir d'identifier les lymphomes B diffus à grandes cellules et pas de différencier les DLBCL NOS des autres sous-types de DLBCL et notamment du PMBL, l'utilisation du classificateur moléculaire a permis d'aider à repérer certaines erreurs diagnostiques de relecture expertale. Ainsi, un DLBCL a été classé FL grade 3B après relecture LYSA-P, puis reclassé à la lumière du classificateur moléculaire et de la réévaluation histologique en lymphome T folliculaire TFH. Le diagnostic de cette entité rare de lymphome T est souvent très difficile et pose des problèmes diagnostiques différentiels souvent avec les lymphomes folliculaires, les hyperplasies lymphoïdes folliculaires ou les lymphomes Hodgkiniens nodulaires à prédominance lymphocytaire. La mise en évidence de la mutation *RHOA* joue un rôle clé dans le diagnostic des lymphomes T de phénotype TFH, présente dans environ 60% des cas (37), et semble fréquemment retrouvée dans le lymphome T folliculaire TFH (38). Nous observons également un diagnostic en relecture LYSA-P de lymphome de la zone marginale transformé, n'exprimant pas CD5, reclassé en MCL par le classificateur moléculaire. La cycline D1, analysée en immunohistochimie à posteriori, était positive. En 2013, l'étude immunohistochimique de la cycline D1 devant un lymphome B à petites cellules CD5 négatif n'était pas systématique alors qu'aujourd'hui, un diagnostic de lymphome de la zone marginale ne se pose qu'après l'étude de l'expression de la cycline D1. L'utilisation du classificateur moléculaire a surtout apporté une précision diagnostique supplémentaire pour sous-classer les DLBCL. Dans notre étude, son utilisation a permis de classer 23 DLBCL en PMBL et 1 PMBL en DLBCL ABC. Nous observons également un diagnostic de DLBCL reclassé en DLBCL EBV +, la réévaluation moléculaire du classificateur mettant en évidence une expression d'EBV, vérifiée in situ secondairement sur les coupes histologiques. Au total, l'utilisation du classificateur moléculaire a permis de mieux identifier 5,7% de l'ensemble des diagnostics de réconciliation. La concordance finale entre le classificateur moléculaire et le diagnostic de réconciliation était de 92,1%, comparable aux résultats de concordance entre le classificateur moléculaire et la cohorte de validation publiés dans l'article princeps (32). Au-delà de l'aide apportée au diagnostic, le classificateur moléculaire par sa nature même est une technique performante afin de

déterminer la cellule d'origine d'un DLBCL NOS, dont la définition précise est moléculaire. Toutefois, à l'heure actuelle, les thérapies ciblées n'ont pas montré leur efficacité dans les essais ciblant des DLBCL GCB ou ABC, soulignant que cette distinction n'a peut-être pas d'intérêt clinique même si l'oncogénèse est sur certains aspects différents entre ces deux groupes. Aujourd'hui, il y a un consensus pour souligner l'hétérogénéité de chaque groupe ABC et GCB mais à l'ère des CAR T-cells et des anticorps bispécifiques, de nouvelles études sont nécessaires pour mieux préciser les critères oncogéniques de résistance à ces nouvelles approches thérapeutiques (39–41).

Cependant, le classificateur moléculaire ne peut se substituer à l'analyse histologique des prélèvements et présente des limites. Dans notre étude, la version utilisée de l'algorithme ne peut proposer qu'un seul diagnostic, ne permettant pas de reconnaître les DLBCL associés à un lymphome B à petites cellules. Lorsque les lymphocytes T prédominent dans l'environnement tumoral, le classificateur moléculaire ne peut proposer de diagnostic et statue en « signature T », ce qui est le cas certes pour l'ensemble des THRLBCL de cette étude, mais également pour d'autres diagnostics (exemples : DLBCL, PMBL, DLBCL EBV+, NLPHL, tableau n°11). Cette signature T ne peut donc se substituer au diagnostic de THRLBCL. Les FL de grade 1-2, et surtout 3A et 3B représentent un réel problème diagnostique pour le classificateur moléculaire, la majorité étant catégorisés en DLBCL dans cette étude (tableau n°12). Cette difficulté face aux diagnostics de FL, notamment de grade 3B, était déjà observée dans l'article original avec 5 cas parmi 8 classés DLBCL, en sachant que le diagnostic de FL grade 3B avait été exclu du modèle de construction de l'algorithme (32). Enfin, dans certains cas, on observait une expression élevée du gène de la Cycline D1 par RT-MLPA, mais l'algorithme sur la version 2019 de ce classificateur ne permettait pas de les identifier en tant que MCL putatif, soulignant également au-delà de la classification, l'intérêt de bien analyser les résultats pour chacun des gènes évalués. Les nouvelles versions de l'algorithme prennent en compte ces limites. L'absence de contrôle morphologique associé au classificateur moléculaire peut conduire à des erreurs diagnostiques, comme nous l'observons dans cette étude lorsque des erreurs de sélection de bloc sont survenues, et lorsque des fragments de parenchyme ganglionnaire réactionnel étaient présents sur le bloc apportant un biais à l'analyse moléculaire (exemple du cas n°13.0251, tableau n°8). Enfin, lorsque le classificateur moléculaire proposait un diagnostic différent de la relecture LYSA-P, il était parfois difficile de statuer sur un diagnostic sans avoir recours à des techniques complémentaires poussées (NGS avec panel lymphoïde ciblé, tableau n°8).

Afin de caractériser certains sous-types de lymphome, une étude immunohistochimique parfois très exhaustive est nécessaire. La technique de RT-MLPA incluse dans le classificateur moléculaire offre une caractérisation complète du profil d'expression moléculaire, et sur nos analyses préliminaires, pourrait être plus sensible que certaines techniques immunohistochimiques (tableaux n°15 à 18), et permettrait de passer outre la difficulté d'accessibilité aux épitopes antigéniques de certains anticorps utilisés en routine qui semblent plus impactés que les acides nucléiques de type ARN même après fixation en formol et inclusion en paraffine. L'interprétation de l'anticorps anti-CD30 est connue pour être difficile avec une mauvaise reproductibilité inter-observateur (42). Ainsi notre étude semble confirmer notamment en multicentrique la difficulté de la quantification de l'immunomarquage anti-CD30 pouvant expliquer des différences de lecture de certaines immunohistochimies. Dans notre étude, on observait pour le cas n°14.0206, une faible expression de l'anticorps anti-CD30 avec un marquage en « dot » difficile à repérer, alors que l'expression de CD30 était élevée en RT-MLPA (figure n°25). On observait également pour le cas n°14.0210 une expression de CD30 en immunohistochimie dans 10% des cellules tumorales alors que l'expression en RT-MLPA était inférieure au 1<sup>er</sup> quartile (tableau n°16). Cette mauvaise concordance pourrait être expliquée, dans l'hypothèse d'une conservation du tissu non optimale, par une dégradation plus rapide de l'ARN par rapport au matériel protéique (43). La technique de RT-MLPA semble être une alternative intéressante permettant une économie de matériel (10 à 30 µm maximum nécessaire, l'équivalent d'une dizaine d'immunohistochimies) en plus de proposer un profil moléculaire exhaustif. De plus, l'utilisation du classificateur moléculaire en routine est envisageable, présentant un coût technique d'environ 175 euros par patient. A titre de comparaison, la cotation CCAM d'une étude immunohistochimique intégrant 10 anticorps ou plus s'élève à 160 euros. La cotation CCAM d'une étude en hybridation in situ, telle que la sonde EBER, s'élève à 140 euros. Cette technique a ainsi l'intérêt de permettre de dépister les éventuels DLBCL EBV+ en limitant le nombre d'hybridation in situ EBER et en les réalisant dans des DLBCL monomorphes seulement si un signal EBER apparaît en RT-MLPA, ce qui apparaît rarement dans notre série.

Après réconciliation diagnostique, nous observons au total 109 cas considérés comme PMBL, dont 23 cas reclassés grâce au classificateur moléculaire. La réévaluation des données morphologiques des PMBL, bien que réalisée à postériori, met en évidence que dans la plupart des cas, les PMBL présentent ces critères histologiques bien identifiables. Cependant,



on observe 9 cas de PMBL sans critère histologique spécifique, dont 2 ayant été classés DLBCL initialement malgré la présence d'un contexte clinique en faveur d'un PMBL (tableau n°13). La réévaluation des données du TEP-scanner a permis de mettre en évidence 3 cas de PMBL se présentant avec une atteinte extra-médiastinale uniquement. Parmi ces 3 cas de PMBL extra-médiastinaux, on observe 1 cas avec un aspect histologique très monomorphe (cas n°15.0364, tableau n°14, figures n°22 et 23), dont la distinction avec un DLBCL NOS aurait été impossible sans étude du profil d'expression génique. L'ensemble de ces résultats souligne la difficulté de faire la distinction entre PMBL et DLBCL NOS dans certaines situations, nécessitant une corrélation clinique, radiologique, histologique et moléculaire, et souligne également l'existence d'entités rares de type PMBL sans lésion médiastinale / DLBCL avec signature moléculaire de type PMBL. Une corrélation avec l'ensemble des données cliniques est en cours afin d'évaluer si la présentation clinique et l'agressivité des DLBCL extra-médiastinaux avec signature PMBL sont vraiment différents des PMBL comme le suggère une étude récente (44).

## V. Conclusion

Dans notre étude, le classificateur moléculaire a permis d'augmenter la précision diagnostique en complément d'une analyse histologique expertale. Il a également permis de mettre en évidence des cas de PMBL sans caractéristique histopathologique de PMBL ou de présentation uniquement extra-médiastinale. Il est naturellement plus performant que l'algorithme de Hans afin de déterminer la COO des DLBCL NOS. Enfin, le classificateur moléculaire a semblé être une technique plus sensible et plus facile d'interprétation que l'immunohistochimie dans certains cas et pour certains anticorps, mais cela reste à confirmer sur une série plus large.

Le classificateur moléculaire est donc un outil moléculaire très intéressant, à la condition d'être couplé à une analyse histologique par un expert. En effet, en l'absence de confrontation entre l'analyse morphologique et moléculaire, le risque d'erreur est élevé, notamment face aux diagnostics différentiels des DLBCL, mais également lorsque le matériel soumis à l'analyse moléculaire contient un environnement lymphocytaire T prédominant, ou lorsque des fragments tissulaires autres que le lymphome sont présents dans le matériel. De nombreux diagnostics ne sont pas encore reconnus par le classificateur moléculaire, mais il s'agit d'un outil ayant la capacité d'évoluer, notamment en adaptant la priorité donnée à l'expression de certains gènes par l'algorithme. A l'heure actuelle, le classificateur moléculaire est perfectible et son utilisation en routine est peu envisageable, mise à part entre les mains d'experts. Son utilisation apporte des avantages indéniables mais impose en contrepartie un délai technique supplémentaire ainsi qu'un plateau technique spécifique dédié à la biologie moléculaire, parfois encore non disponible dans certains laboratoires de pathologie, mais sûrement à développer.

## VI. Références bibliographiques

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., éditeurs. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. 585 p. (World Health Organization classification of tumours).
2. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 3 févr 2000;403(6769):503-11.
3. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 20 juin 2002;346(25):1937-47.
4. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*. 19 août 2003;100(17):9991-6.
5. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC, Staudt LM, Weisenburger DD, Pickering DL, et al. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood*. 1 avr 2002;99(7):2285-90.
6. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, Kohlhammer H, Dave SS, Davis RE, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 sept 2008;105(36):13520-5.
7. Lenz G, Staudt LM. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med*. 15 avr 2010;362(15):1417-29.
8. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 17 déc 2001;194(12):1861-74.
9. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 1 janv 2004;103(1):275-82.
10. Nyman H, Adde M, Karjalainen-Lindsberg M-L, Taskinen M, Berglund M, Amini R-M, et al. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood*. 1 juin 2007;109(11):4930-5.
11. Petrella T, Copie-Bergman C, Brière J, Delarue R, Jardin F, Ruminy P, et al. BCL2 expression but not MYC and BCL2 coexpression predicts survival in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma independently of cell of origin in the phase 3 LNH03-6B trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1 mai 2017;28(5):1042-9.
12. de Jong D, Rosenwald A, Chhanabhai M, Gaulard P, Klapper W, Lee A, et al. Immunohistochemical prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma: validation of

tissue microarray as a prerequisite for broad clinical applications--a study from the Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 mars 2007;25(7):805-12.

13. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, 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 Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 janv 2011;29(2):200-7.
14. Scott DW, Wright GW, Williams PM, Lih C-J, Walsh W, Jaffe ES, et al. Determining cell-of-origin subtypes of diffuse large B-cell lymphoma using gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Blood*. 20 févr 2014;123(8):1214-7.
15. Jais J-P, Molina TJ, Ruminy P, Gentien D, Reyes C, Scott DW, et al. Reliable subtype classification of diffuse large B-cell lymphoma samples from GELA LNH2003 trials using the Lymph2Cx gene expression assay. *Haematologica*. oct 2017;102(10):e404-6.
16. Mareschal S, Ruminy P, Bagacean C, Marchand V, Cornic M, Jais J-P, et al. Accurate Classification of Germinal Center B-Cell-Like/Activated B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Simple and Rapid Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Assay: A CALYM Study. *J Mol Diagn JMD*. 9 avr 2015;
17. Dubois S, Viailly P-J, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 2016;22(12):2919-28.
18. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 24 2018;131(21):2307-19.
19. Fangazio M, Ladewig E, Gomez K, Garcia-Ibanez L, Kumar R, Teruya-Feldstein J, et al. Genetic mechanisms of HLA-I loss and immune escape in diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci*. 1 juin 2021;118(22):e2104504118.
20. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, Johnson CA, Phelan JD, Wang JQ, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 12 avr 2018;378(15):1396-407.
21. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med*. mai 2018;24(5):679-90.
22. Wright GW, Huang DW, Phelan JD, Coulibaly ZA, Roulland S, Young RM, et al. A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell*. avr 2020;37(4):551-568.e14.
23. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular Diagnosis of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma Identifies a Clinically Favorable Subgroup of Diffuse Large B Cell Lymphoma Related to Hodgkin Lymphoma. *J Exp Med*. 15 sept 2003;198(6):851-62.

24. Guiter C, Dusanter-Fourt I, Copie-Bergman C, Boulland M-L, le Gouvello S, Gaulard P, et al. Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 15 juill 2004;104(2):543-9.
25. Ritz O, Guiter C, Dorsch K, Dusanter-Fourt I, Wegener S, Jouault H, et al. STAT6 activity is regulated by SOCS-1 and modulates BCL-XL expression in primary mediastinal B-Cell lymphoma. *Leukemia*. nov 2008;22(11):2106-10.
26. Ritz O, Guiter C, Castellano F, Dorsch K, Melzner J, Jais J-P, et al. Recurrent mutations of the STAT6 DNA binding domain in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Blood*. 6 août 2009;114(6):1236-42.
27. Mottok A, Hung SS, Chavez EA, Woolcock B, Telenius A, Chong LC, et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 05 2019;134(10):802-13.
28. Roschewski M, Phelan JD, Wilson WH. Molecular Classification and Treatment of Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. *Cancer J Sudbury Mass*. juin 2020;26(3):195-205.
29. Yuan J, Wright G, Rosenwald A, Steidl C, Gascoyne RD, Connors JM, et al. Identification of Primary Mediastinal Large B-cell Lymphoma at Nonmediastinal Sites by Gene Expression Profiling. *Am J Surg Pathol*. oct 2015;39(10):1322-30.
30. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D, Ben-Neriah S, Burrioni B, Cornillon J, et al. Gray-zone Lymphoma Between cHL and Large B-Cell Lymphoma: A Histopathologic Series From the LYSA. *Am J Surg Pathol*. mars 2019;43(3):341-51.
31. Mottok A, Wright G, Rosenwald A, Ott G, Ramsower C, Campo E, et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. *Blood*. 29 nov 2018;132(22):2401-5.
32. Bobée V, Drieux F, Marchand V, Sater V, Veresezan L, Picquenot J-M, et al. Combining gene expression profiling and machine learning to diagnose B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J*. 22 mai 2020;10(5):59.
33. Drieux F, Ruminy P, Abdel-Sater A, Lemonnier F, Viailly P-J, Fataccioli V, et al. Defining signatures of peripheral T-cell lymphoma with a targeted 20-marker gene expression profiling assay. *Haematologica*. juin 2020;105(6):1582-92.
34. Le Gouill S, Ghesquieres H, Obéric L, Morschhauser F, Tilly H, Ribrag V, et al. Obinutuzumab versus Rituximab in young patients with advanced DLBCL, a PET-guided and randomized phase 3 study by LYSA. *Blood*. 19 nov 2020;
35. Scherer F, Kurtz DM, Newman AM, Stehr H, Craig AFM, Esfahani MS, et al. Distinct biological subtypes and patterns of genome evolution in lymphoma revealed by circulating tumor DNA. *Sci Transl Med*. 9 nov 2016;8(364):364ra155.
36. Mareschal S, Dubois S, Viailly P-J, Bertrand P, Bohers E, Maingonnat C, et al. Whole exome sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. mars 2016;55(3):251-67.

37. Lunning MA, Vose JM. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: the many-faced lymphoma. *Blood*. 2 mars 2017;129(9):1095-102.
38. Miyoshi H, Sakata-Yanagimoto M, Shimono J, Yoshida N, Hattori K, Arakawa F, et al. RHOA mutation in follicular T-cell lymphoma: Clinicopathological analysis of 16 cases. *Pathol Int*. sept 2020;70(9):653-60.
39. Chiappella A, Crombie J, Guidetti A, Vitolo U, Armand P, Corradini P. Are We Ready to Treat Diffuse Large B-cell and High-Grade Lymphoma According to Major Genetic Subtypes? *HemaSphere*. oct 2019;3(5):e284.
40. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, Siddiqi T, Chavez JC, Hosing CM, et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 4 janv 2017;25(1):285-95.
41. Dufner V, Sayehli CM, Chatterjee M, Hummel HD, Gelbrich G, Bargou RC, et al. Long-term outcome of patients with relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma treated with blinatumomab. *Blood Adv*. 27 août 2019;3(16):2491-8.
42. Koens L, van de Ven PM, Hijmering NJ, Kersten MJ, Diepstra A, Chamuleau M, et al. Interobserver variation in CD30 immunohistochemistry interpretation; consequences for patient selection for targeted treatment. *Histopathology*. sept 2018;73(3):473-82.
43. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PloS One*. 5 déc 2007;2(12):e1261.
44. Duns G, Viganò E, Ennishi D, Sarkozy C, Hung SS, Chavez E, et al. Characterization of DLBCL with a PMBL gene expression signature. *Blood*. 15 juill 2021;138(2):136-48.

# APPORT D'UN CLASSIFICATEUR MOLÉCULAIRE DANS L'ESSAI GAINED DU LYSA CIBLANT LES LYMPHOMES B DIFFUS À GRANDES CELLULES

## INTEREST OF A MOLECULAR CLASSIFIER IN THE GAINED LYSA TRIAL TARGETING DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

### RÉSUMÉ

**Introduction :** L'équipe de Bobée et al (2020) a récemment décrit un nouveau classificateur moléculaire des lymphomes B combinant le profil d'expression de 137 gènes avec une technique de machine learning. Nous avons évalué son apport dans le cadre de l'essai GAINED du LYSA ciblant les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL).

**Matériel et Méthodes :** 646 patients ont eu une relecture centralisée. Si le matériel était suffisant, une extraction ARN pour le classificateur moléculaire et le Nanostring Lymph2CX ainsi qu'une extraction ADN pour NGS ciblé ont été réalisés. Le classificateur moléculaire a identifié 8 signatures : DLBCL GCB, DLBCL ABC, lymphome B primitif du médiastin (PMBL), lymphome folliculaire (FL), lymphome du manteau (MCL), lymphome de la zone marginale (MZL), LLC, signature T. Les cas discordants entre la relecture histologique et la classification moléculaire étaient réévalués, et un diagnostic de réconciliation était proposé.

**Résultats :** 470 patients ont eu un résultat de classificateur moléculaire. Une réconciliation diagnostique pour 144 patients discordants a permis d'identifier un cas de MCL CD5- initialement classé comme MZL transformé, un cas de lymphome T folliculaire CD10+ initialement classé comme FL 3B, 23 PMBL, 1 DLBCL EBV+, 1 DLBCL ABC. Cependant, 14 FL principalement de grade 3A et 3B étaient classés comme DLBCL. Bien que l'ensemble des lymphomes à grandes cellules B riche en T étaient classés signature T, on observait également pour cette signature des diagnostics de DLBCL NOS, PMBL, DLBCL EBV+ et lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire. La concordance GCB/ABC avec le Nanostring était de 97,3% pour le classificateur moléculaire et de 84,5% pour l'algorithme de Hans. Parmi les 109 cas de PMBL, on observait 3 cas sans masse médiastinale au TEP-scanner, correspondant aux rares cas de lymphomes non médiastinaux avec signature PMBL.

**Conclusion :** En complément d'une relecture expertale, le classificateur moléculaire a permis d'augmenter la précision diagnostique des cas difficiles, et de mieux identifier les PMBL ainsi que les DLBCL GCB/ABC. Cependant, les pathologistes doivent être conscients des limites de cet outil, particulièrement pour l'identification des FL 3A et 3B, ainsi que pour les cas avec un microenvironnement riche en lymphocytes T.

**Mots clés :** Lymphome B diffus à grandes cellules, Classification, Histopathologie, Pathologie moléculaire, Profil d'expression génique.

### ABSTRACT

**Introduction :** Bobée et al (2020) have recently described a new molecular classifier of B-cell lymphoma combining gene expression profiling of 137 genes and machine learning. We evaluated how it may be useful in a LYSA diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) clinical trial, the GAINED trial.

**Methods :** 646 patients underwent a central review. If sufficient material was available, RNA extraction for the molecular classifier, the Nanostring Lymph2CX and DNA extraction for targeted NGS were performed. The molecular classifier was able to deliver 8 different signatures : DLBCL GCB, DLBCL ABC, primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBL), follicular lymphoma (FL), mantle cell lymphoma (MCL), marginal zone lymphoma (MZL), CLL, T-cell rich. Discordant cases between histopathology and molecular classification were reviewed and a reconciliation diagnosis was proposed.

**Results :** Among the 470 patients evaluated by the molecular classifier, the reconciliation diagnosis for the 144 discordant cases identified one case of CD5- MCL initially diagnosed as MZL as well as one case of CD10+ follicular T-cell lymphoma initially diagnosed as FL 3B, 23 PMBL, 1 DLBCL EBV+, 1 DLBCL ABC. However, 14 FL mainly grade 3A and 3B were diagnosed molecularly mainly as DLBCL. Although all of the T-cell rich large B-cell lymphoma were in the T-cell signature, this signature included also DLBCL NOS, PMBL, DLBCL EBV+ and nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma. GCB/ABC concordance with the Nanostring was 97.3% for the molecular classifier and 84.5% for the Hans algorithm. Overall, among the 109 PMBL cases, there were 3 cases without mediastinal mass on PET-scan, fitting with the rare cases of non-mediastinal lymphoma with PMBL signature.

**Conclusion :** The molecular classifier in addition to the expert pathologic review increased accuracy of diagnostic for difficult cases, as well as it strongly helped to identify PMBL and GCB/ABC DLBCL. However, the pathologist should be aware of the limit of the tool particularly for the identification of FL3A, FL3B or for cases with a T-cell rich microenvironment.

**Keywords :** Diffuse large B-cell lymphoma, Classification, Histopathology, Molecular pathology, Gene expression profiling.