

UNIVERSITE PARIS SUD
FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY

ANNEE : 2015-2016

DES N°

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE

Pour l'obtention du Diplôme d'Etat de

DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté devant le Jury Interrégional

Le 16/12/2016

Par **M. Mathieu FUSARO**

**Mise en place de la caractérisation GCB / ABC des lymphomes diffus à
grandes cellules B par une technique de *Reverse Transcription – Multiplex
Ligation-Dependent Probe Amplification***

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Marc VASSE

Membres : Madame le Professeur Marie-Hélène DELFAU-LARUE (Directrice de thèse)

Madame le Professeur Christiane COPIE-BERGMAN

Monsieur le Docteur Philippe RUMINY

RESUME :

Le Lymphome Diffus à Grandes Cellules B (LDGCB) est le plus fréquent des lymphomes non Hodgkiniens. L'étude du transcriptome de ces tumeurs a mis en évidence trois groupes moléculaires de pronostic distincts. Le transfert de cette classification pour une utilisation en routine est à l'étude depuis plusieurs années. Les algorithmes immunochimiques tel que celui de Hans ont trouvé leur utilité mais le manque de reproductibilité de certains immunomarquages reste une limite importante. La *Reverse Transcription Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (RT-MLPA) est une technique récente permettant l'amplification de sondes spécifiques de près de 40 gènes cibles. L'application de cette technique à la classification des LDGCB possède de multiples avantages en termes de coût, de rapidité et de reproductibilité.

Nous avons mis en place la RT-MLPA pour le typage GCB/ABC des LDGCB à l'hôpital Henri Mondor. La validation de la méthode s'est effectuée sur 11 ARN extraits de lignées et 39 ARN issus de tissus de patients diagnostiqués par le département d'anatomopathologie et classifiés GCB/non GCB par l'algorithme de Hans. Les résultats ont été comparés selon le traitement subi par le tissu (fixation au formol et inclusion en paraffine ou congélation) et avec l'algorithme de Hans. Une comparaison inter-laboratoires bicentrique puis multicentrique a ensuite été initiée.

Les résultats montrent l'excellente reproductibilité de la méthode entre opérateurs et entre différents laboratoires. La concordance avec l'algorithme de Hans est de 80% quel que soit le type d'échantillons étudiés. Ces données sont une étape préliminaire à la validation de méthode pour l'accréditation de cette analyse selon la norme ISO 15 189. L'intégration de cette technique à la routine du laboratoire nous permettra de participer au protocole *Real Time Tailored Therapy* (RT3) en tant que plateforme de RT-MLPA.

MOTS CLES :

Lymphome Diffus à Grandes Cellules B, RT-MLPA, classification GCB/ABC, théranostique

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT :

Laboratoire d'Hématologie EA 4531
Faculté de Pharmacie
5, rue Jean-Baptiste Clément
92296 CHATENAY-MALABRY CEDEX

Remerciements

A Monsieur le Professeur Marc Vasse, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury.

A Madame le Professeur Delfau-Larue, pour m'avoir fait découvrir les joies de la biologie moléculaire et pour m'avoir encadré tout au long de ce travail de thèse. Ce manuscrit n'aurait jamais vu le jour aussi rapidement sans vos conseils et vos encouragements.

A Madame le Professeur Copie-Bergman, pour avoir pris le temps de rechercher les échantillons sans lesquels nous n'aurions pas pu aboutir, et pour les figures histologiques qui illustrent cette thèse.

A Monsieur le Docteur Philippe Ruminy, pour tous nos échanges sur la RT-MLPA et ses conseils précieux.

A Hélène Fouché, qui a été bien plus qu'une collaboratrice, surtout lorsque les résultats n'étaient pas ceux escomptés. Je sais que je laisse notre technique entre de bonnes mains.

A l'ensemble des BMiens, les anciens comme les nouveaux, pour leur aide, leur soutien et leur bonne humeur : Valérie, Isabelle, Tony, Ichrafe, Anne, Carine, Cécile, Andréa, Jacques.

A tout le laboratoire d'Immunologie pour ces bons moments de pause passés ensemble.

A toutes les personnes géniales que j'ai rencontré au cours de ma scolarité, de la primaire à l'internat. Et notamment mes copains de pharma : Lydiane, Morgan, Aymeric, Guillaume, Charles, Aina, Seb, Auriane, Guillem,...

A mon ancien colocataire et ami, Kim, tu avais raison, une fois la deadline fixée tout va plus vite...

A tous les co-internes qui ont accompagné ces trois premières années d'internat : Cécile, Laetitia, Anthony, Antonin, Guillaume, Thomas, Salma, Daphné, Jaja, Matthieu ; et tous les autres avec qui j'aurais adoré partager six mois de stage.

Au bureau SIPHIF 2015-2016, pour cette année de labeur et de rires.

A tous les laboratoires où j'ai eu la chance de passer 6 mois et qui ont participé à ma formation de biologiste : le personnel médical et paramédical, et en particulier les habitués de la Fut Gueuze...

A ma famille pour avoir construit la personne que je suis à présent. Et particulièrement à mon frère, Romain, qui me connaît mieux que quiconque ; à ma mère et à mon père qui ont toujours été fiers de moi ; à Coco qui aimerait être là si elle le pouvait ; à mes grands-parents partis trop tôt ; à Didier, sur qui je peux compter depuis de nombreuses années.

Et surtout à Toi, qui me soutiens et me fais rire depuis bientôt 4 ans. Tes encouragements et ta présence dans les moments difficiles me font plus de bien que tu ne le crois.

« Home is wherever I'm with you »

Liste des abréviations

ABC : *Activated B Cell-like*
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc : ADN complémentaire
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
EBV : Epstein-Barr Virus
ECOG : *Easter Cooperative Oncology Group*
FFPE : *Formalin-Fixed, Paraffin-embedded*
FISH : *Fluorescence In Situ Hybridation* (Hybridation *in situ* en fluorescence)
GCB : *Germinal Center B cell-like*
Ig : Immunoglobuline
IPI : Index de Pronostic International
LBMP : Lymphome B Médiastinal Primitif à grandes cellules
LDGCB : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B
LDH : Lactate DésHydrogénase
LPS : *Linear Prediction Score* (Score Linéaire de Prédiction)
LYSA : *LYmphoma Study Association*
MALT : *Mucosae Associated Lymphoid Tissue*
NGS : Séquençage de Nouvelle Génération
NK : *Natural Killer*
NPA : *Nuclease Protection Assay*
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
RAG : *Recombination Activating Gene*
RT : Reverse Transcription
RT3 : *Real Time Tailored Therapy*
RT-MLPA : *Reverse Transcription Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*
TdT : *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*
TI : Transcriptase Inverse
VHC : Virus de l'Hépatite C
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

Remerciements.....	4
Liste des abréviations.....	7
Table des matières	9
Liste des illustrations	13
Liste des tableaux	15
Liste des annexes	15
I. Généralités	17
I.1. Généralités sur les lymphomes	17
I.1.1. Historique.....	17
I.1.2. Lymphomes B	18
I.2. Ontogénie B et physiopathologie des lymphomes B.....	19
I.2.1. Différenciation antigène-indépendante	19
I.2.2. Différenciation antigène-dépendante	22
I.2.3. Physiopathologie des lymphomes B	25
I.3. Classification des lymphomes	26
I.3.1. Historique des classifications	26
I.3.2. Classification OMS.....	26
I.3.3. Place du Lymphome Diffus à Grandes Cellules B	27
II. Lymphome Diffus à Grandes Cellules B.....	28
II.1. Généralités	28
II.1.1. Epidémiologie	28
II.1.2. Diagnostic	29
II.1.2.1. Signes d'appel clinique	29
II.1.2.2. Examen clinique	30
II.1.2.3. Diagnostic anatomopathologique	31
II.1.3. Examens biologiques complémentaires.....	33
II.1.4. Evaluation du pronostic	33
II.1.4.1. Stadification.....	33
II.1.4.2. Index de Pronostic International	34
II.1.5. Traitement de référence.....	36
II.1.5.1. L'ère du Rituximab	36
II.1.5.2. Autres options thérapeutiques	37
II.1.6. Suivi et évolution	37
II.2. Caractérisation de sous-groupes moléculaires.....	38
II.2.1. Historique	38
II.2.1.1. L'avènement des puces à ADN	38
II.2.1.2. Algorithmes immuno-histochimiques	43

II.2.1.3. Cytogénétique.....	47
II.2.2. Impact thérapeutique.....	49
II.2.2.1. Lymphomagenèse et aberrations génétiques.....	49
II.2.2.1.1. Sous-type GCB.....	49
II.2.2.1.2. Sous-type ABC.....	50
II.2.2.2. Traitements à l'étude	50
II.2.2.2.1. Traitements actifs dans les sous-types GCB	50
II.2.2.2.2. Traitements actifs dans les sous-types ABC	51
II.2.3. Techniques applicables en routine.....	52
II.2.3.1. Algorithme de Hans	53
II.2.3.2. Quantitative Nuclease Protection Assay	53
II.2.3.3. NanoString.....	54
III. Reverse Transcriptase – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (RT-MLPA)	56
III.1. Principe de la technique.....	56
III.1.1. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification	56
III.1.2. Profil d'expression génique par RT-MLPA	57
III.2. Application au LDGCB	59
IV. Objectifs de l'étude.....	62
V. Matériels et méthodes	63
V.1. Collaboration	63
V.2. Lignées utilisées pour la mise au point.....	63
V.3. Cohorte de patients étudiée.....	64
V.4. Description de la technique	64
V.5. Adaptations réalisées.....	67
V.6. Statistiques	67
VI. Résultats.....	68
VI.1. Lignées cellulaires	68
VI.2. Echantillons d'Henri Mondor.....	69
VI.2.1. Vérification de la cohérence du modèle.....	69
VI.2.2. Effet de la qualité de l'ARN extrait.....	70
VI.2.3. Comparaison de la RT-MLPA à l'algorithme de Hans.....	71
VI.2.4. Comparaison échantillons FFPE et congelés	72
VI.2.5. Expression de MYC et BCL2.....	74
VI.3. Comparaisons inter-laboratoires.....	76
VI.3.1. Comparaison Henri-Mondor/Centre Henri Becquerel (Rouen)	76
VI.3.2. Comparaison inter-laboratoires.....	77
VI.4. Validation de méthode	78
VI.4.1. Répétabilité	78
VI.4.2. Reproductibilité inter-opérateurs.....	78

VI.4.3.	Quantité minimale d'ARN.....	79
VI.4.4.	Changement du réactif de PCR finale	83
VII.	Discussion	86
VII.1.	Validation de la technique	86
VII.2.	Problématiques actuelles.....	88
VII.3.	Aller plus loin dans la caractérisation ?	90
Conclusion		92
Annexes		93
Bibliographie		96

Liste des illustrations

Figure 1.	Répartition des lymphomes non hodgkiniens aux Etats-Unis d'après Teras et al (3).....	18
Figure 2.	Réarrangement VDJ conduisant à la synthèse d'une chaîne lourde d'Ig.....	20
Figure 3.	Interaction entre un lymphocyte B activé et un lymphocyte T auxiliaire spécifique du même antigène	22
Figure 4.	Schéma simplifié de la réaction du centre germinatif.....	23
Figure 5.	Correspondance des principales néoplasies lymphoïdes matures avec les stades de maturations physiologiques	25
Figure 6.	Incidence du LDGCB en France par âge en 2012 (Source : InVS 2013).	29
Figure 7.	Coupes histologiques diagnostiques d'un LDGCB.....	32
Figure 8.	Regroupement hierachique par puces à ADN. D'après Alizadeh et al, 2000	39
Figure 9.	Courbes de survie de Kalplan-Meier des sous-types de LDGCB. D'après Alizadeh et al, 2000	40
Figure 10.	Validation du sous-typage moléculaire (D'après Rosenwald et al, 2002 (29))	41
Figure 11.	Prédicteur Bayésien développé par Wright et al.	42
Figure 12.	Algorithme de Hans (D'après Hans et al, 2004).	44
Figure 13.	Exemples d'interprétation des trois marquages de l'algorithme de Hans.....	45
Figure 14.	Principe et exemple de l'utilisation des sondes break-apart	48
Figure 15.	Principe de la technique quantitative Nuclease Protection Assay.....	54
Figure 16.	Principe de la technologie nCounter® (NanoString Technologie)	55
Figure 17.	Représentation schématique d'un couple de sondes pour MLPA.....	57
Figure 18.	Schéma explicatif de la RT-MLPA.....	58
Figure 19.	Séquences oligonucléotidiques d'une hémi-sonde spécifique de NEK6 et de son compétiteur.	59
Figure 20.	Interface du logiciel RT-MLPA processor et exemple d'une représentation graphique produite.....	61
Figure 21.	Programme de la PCR finale de la RT-MLPA.....	65
Figure 22.	Différentes conclusions obtenus avec le même échantillon (SUDHL6) lorsque le score est à la limite du seuil de décision.....	68
Figure 23.	Classification ascendante hiérarchique des 8 gènes utilisés pour la classification GCB/ABC par RT-MLPA.....	69
Figure 24.	Boîte à moustaches représentant la répartition des RIN pour les ARN issus de tissus congelés.....	70
Figure 25.	Graphique de Bland-Altman évaluant la concordance des scores entre les tissus FFPE et les tissus congelés.....	73
Figure 26.	Corrélation des scores et conclusions obtenues selon le traitement subi par l'échantillon	73
Figure 27.	Comparaison des moyennes d'expression génique selon le traitement subi par l'échantillon	74

Figure 28.	Graphique de Bland-Altman évaluant la concordance entre les résultats obtenus par le laboratoire et l'équipe de Rouen	77
Figure 29.	Graphique de Bland-Altman évaluant la concordance inter-opérateurs	78
Figure 30.	Comparaison des moyennes d'expression génique obtenues par deux opérateurs différents.....	79
Figure 31.	Evolution du score en fonction de la quantité d'ARN initiale	81
Figure 32.	Evolution comparée de l'expression des 14 gènes cibles en fonction de la quantité d'ARN.....	82
Figure 33.	Graphique de Bland-Altman évaluant la concordance entre les réactifs de PCR Reddymix et Qiagen.....	84

Liste des tableaux

Tableau 1.	Fréquence des localisations des LDGCB (d'après Castillo et al. 2014).....	30
Tableau 2.	Score d'activité ECOG/OMS.	31
Tableau 3.	Classification de Lugano (d'après Cheson et al. 2014).	34
Tableau 4.	Index de Pronostic International.	35
Tableau 5.	Comparaison des différents algorithmes immuno-histochimiques.....	44
Tableau 6.	Paramètres de passage des échantillons sur séquenceur capillaire.....	66
Tableau 7.	Test de corrélations de Spearman entre l'expression génique et le RIN.....	70
Tableau 8.	Tableau comparatif Hans/RT-MLPA pour les tissus FFPE et congelé.....	71
Tableau 9.	Hyper-expression des gènes MYC et BCL2 évaluée par RT-MLPA sur tissus congelés et FFPE et par IHC.	75
Tableau 10.	Tableau comparatif des résultats obtenus par le laboratoire d'Immunologie (Créteil) et le centre Henri Becquerel (Rouen).	76
Tableau 11.	Tableau comparatif des résultats de la comparaison inter-laboratoires.....	77
Tableau 12.	Comparaison des résultats obtenus avec des quantités décroissantes d'ARN pour deux échantillons différents	80
Tableau 13.	Comparatif du coût en réactifs par échantillon avec les réactifs de PCR Reddymix ou Qiagen	83
Tableau 14.	Tableau comparatif des conclusions obtenues en RT-MLPA selon le réactif utilisé et en IHC	85

Liste des annexes

Annexe 1.	Schéma descriptif de l'étape oligocentrique du protocole RT3 (<i>Real Time Tailored Therapy</i>).....	94
Annexe 2.	Dégradation progressive de la qualité des signaux en fonction de la quantité d'ARN.....	95

I. Généralités

I.1. Généralités sur les lymphomes

I.1.1. Historique

Depuis la première description en 1832, par Thomas Hodgkin (1), d'un « désordre des glandes absorbantes », les connaissances sur les lymphomes se sont largement étoffées. Basées sur l'examen clinique et l'étude anatomopathologique pendant plus d'un siècle, elles vont s'amplifier grâce à l'avènement de l'immunologie et de la biologie moléculaire à la fin du XXème siècle. Ainsi les multiples classifications proposées depuis le début du siècle dernier sont le reflet des évolutions techniques et conceptuelles de leur époque.

Durant ces 50 dernières années, de multiples découvertes ont permis d'apprécier l'hétérogénéité de ces néoplasies (2). Dans les années 1960, la découverte du potentiel de prolifération des lymphocytes (Fagraeus), de l'existence de plusieurs lignées B, T et NK (Miller) et enfin de la sélection clonale des lymphocytes (Burnet et Fenner) révolutionne la conception du système immunitaire. D'un point de vue plus technique, c'est le développement des anticorps monoclonaux (Kohler et Milstein) en 1975 qui apportera aux pathologistes et aux immunologistes un outil fiable pour le diagnostic. L'apport de la biologie moléculaire sera tout aussi crucial, les réarrangements VDJ des gènes codant les immunoglobulines (Tonegawa) amenant une preuve génétique de la monoclonalité. Quelques années plus tard, la caractérisation d'aberrations chromosomiques et génétiques spécifiques d'un type de lymphome et les dérégulations géniques qui en résultent ont permis une plus grande compréhension des mécanismes oncogéniques.

Depuis le début des années 2000, les techniques de biologie moléculaire associées à la bio-informatique ne cessent de s'améliorer. Elles ont permis des avancées extrêmement importantes démontrant l'hétérogénéité moléculaire de certains lymphomes auparavant classés au sein d'une seule entité. La synthèse des études concernant le lymphome diffus à grandes cellules B et de leur application au diagnostic de routine sont l'objet de la première partie de ce mémoire.

I.1.2. Lymphomes B

Plus de 80% des lymphomes non-Hodgkiniens sont de phénotype B, les formes histologiques les plus courantes étant les Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B (LDGCB) et les Lymphomes Folliculaires suivi par les Lymphomes de la Zone Marginale de type MALT (*Mucosae Associated Lymphoid Tissue*) et les Lymphomes du Manteau (figure 1).

Au-delà de la problématique de classification de ces lymphomes qui sera plus amplement évoquée dans la partie I.3, les cliniciens ont l'habitude de distinguer les lymphomes en trois catégories en fonction des données de survie. Ainsi les lymphomes indolents, comme le lymphome folliculaire, ont une survie sans traitement se mesurant en années. Les lymphomes agressifs, dont le LDGCB est le plus représentatif, ont une survie réduite à quelques mois sans traitement. Enfin, pour les patients atteints de lymphomes très agressifs, comme le lymphome de Burkitt, la survie ne dépasserait pas quelques semaines.

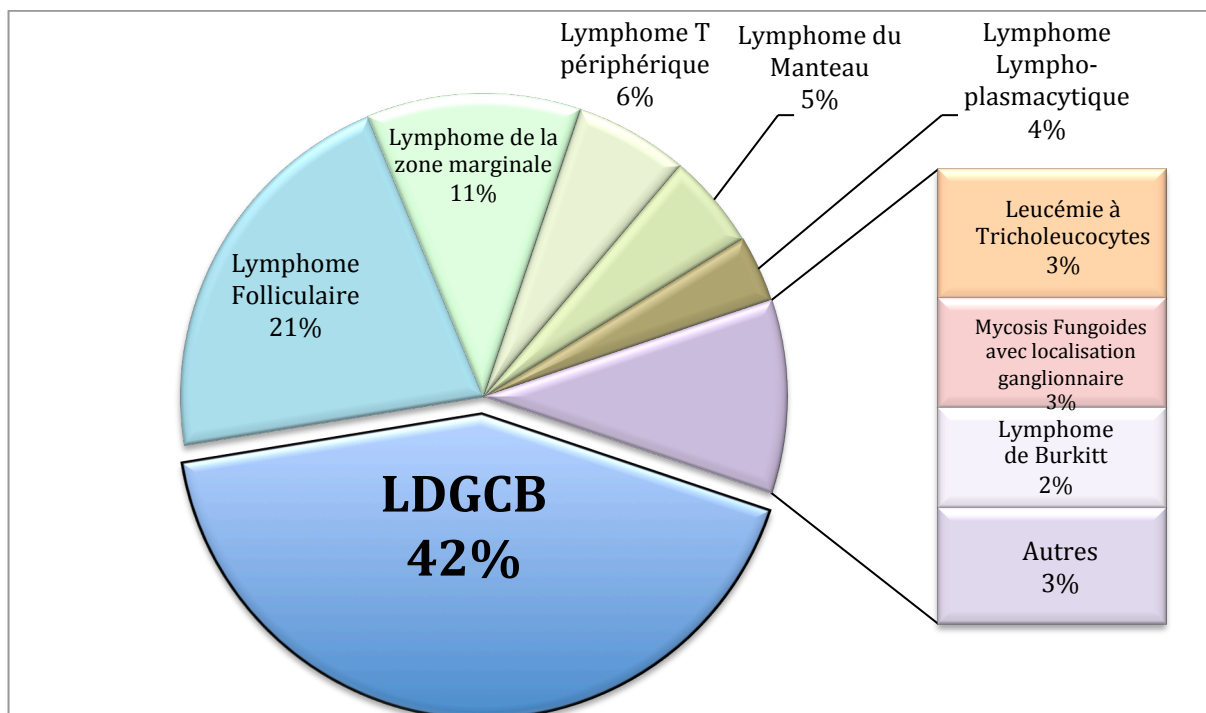


Figure 1. Répartition des lymphomes non hodgkiniens aux États-Unis d'après Teras et al (3)

La présentation clinique est en général homogène, plus volontiers bruyante en cas de lymphomes agressifs. La consultation d'un médecin se fait généralement devant la présence d'adénopathies persistantes mais certains lymphomes ayant des formes circulantes, le diagnostic peut être fortuit sur l'examen d'un frottis sanguin anormal.

I.2. Ontogénie B et physiopathologie des lymphomes B

I.2.1. Différenciation antigène-indépendante

Les lymphocytes B représentent 10 à 15% des lymphocytes circulants. Ils se caractérisent par l'expression d'un récepteur membranaire, le BCR (*B Cell Receptor*), dont la forme excrétée constitue les immunoglobulines (Ig) ou anticorps, un des piliers de l'immunité adaptative. Chaque lymphocyte possède un BCR qui lui est propre, spécifique d'un antigène donné.

La différenciation de la lignée lymphocytaire B débute dans la moelle osseuse à partir d'un progéniteur lymphoïde commun, lui-même dérivé d'une cellule souche hématopoïétique plus immature. L'engagement dans la lignée lymphocytaire B commence avec la cellule pro-B. Les premières étapes de la différenciation ont pour but l'expression d'un BCR, forme membranaire de l'immunoglobuline. L'action des enzymes RAG1 et RAG2 (*Recombination Activating Gene 1 et 2*) induit le réarrangement des gènes IgH codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines. Ce réarrangement VDJ se produit en deux étapes successives (figure 2) : la fusion aléatoire d'un segment D (Diversité) et d'un segment J (Jonction) est suivie par l'accolement d'un segment V (Variable).

A la diversité combinatoire engendrée par la fusion des segments au hasard s'ajoute une diversité de jonction due à différents mécanismes (endonucléase Artemis, enzyme *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* ou TdT) permettant ainsi l'acquisition d'un répertoire B extrêmement diversifié. En cas de réarrangement VDJ productif, le lymphocyte exprime un pré-BCR qui transmet un signal autorisant la transition vers le stade de cellule pré-B. Au contraire, si le réarrangement est non productif, le deuxième allèle subi à son tour un réarrangement. En cas d'issue identique, la cellule B entre en apoptose.

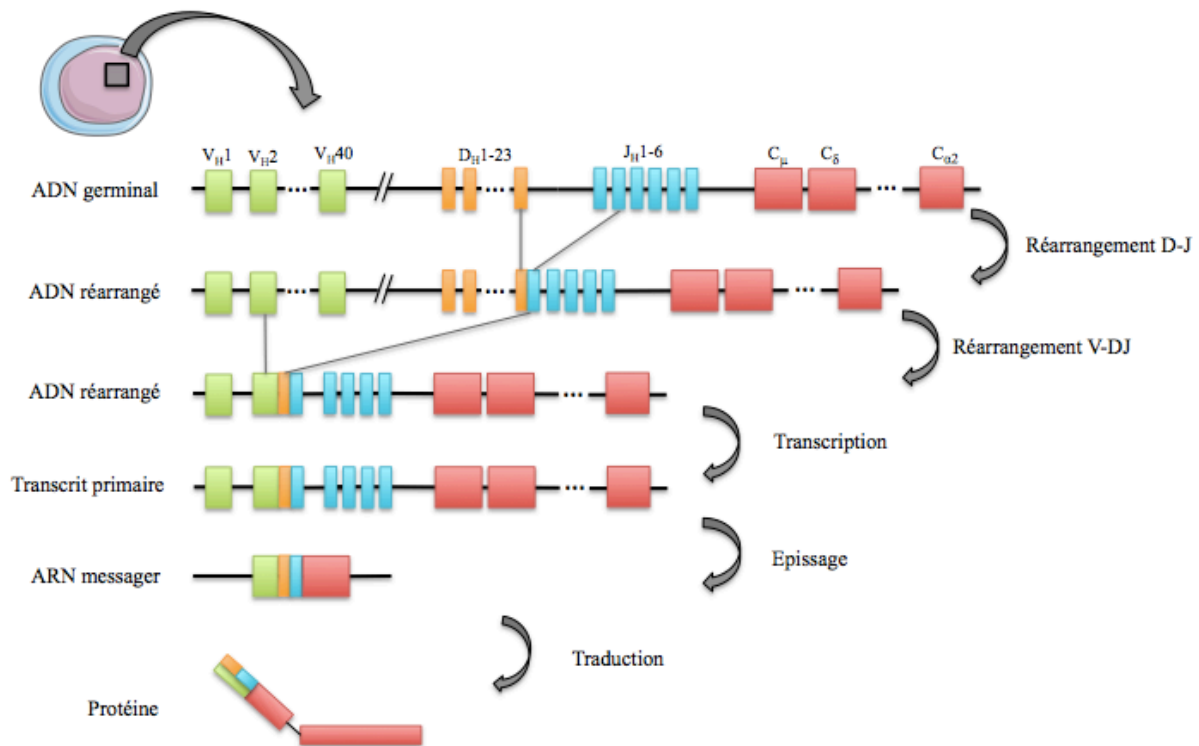


Figure 2. Réarrangement VDJ conduisant à la synthèse d'une chaîne lourde d'Ig

Le réarrangement des gènes codant pour les chaînes légères repose sur le même principe. L'absence de segments géniques D conduit à une diversité moins importante. Le réarrangement a lieu d'abord sur les gènes kappa (κ) puis sur les gènes lambda (λ) en cas d'échec. Le phénomène d'exclusion allélique empêche d'autres réarrangements une fois l'expression d'un BCR fonctionnel, ainsi en théorie un lymphocyte ne peut exprimer deux BCR différents.

L'expression d'une IgM de surface est caractéristique du passage au stade de cellule B immature. A ce niveau de différenciation, des mécanismes de tolérance centrale sont nécessaires pour empêcher la génération de clones B auto-réactifs. Si un BCR reconnaît un auto-antigène, il est alors mis hors d'état de nuire par différents moyens : l'édition du récepteur par le biais d'un nouveau réarrangement, la délétion clonale ou apoptose, l'anergie qui est un état de non-réponse permanent ou bien l'ignorance immunologique si la concentration antigénique est trop faible pour induire une réponse.

La fin de la maturation des lymphocytes B a lieu dans la rate, après migration sous l'effet de chimiokines. A cet endroit, les cellules B récemment immigrées reçoivent un signal de survie transmis par la cytokine BAFF (*B-cell Activating Factor*). Les macrophages résidents ont alors pour rôle d'épurer les lymphocytes non fonctionnels. La dernière étape consiste en la spécialisation des lymphocytes B qui deviennent en grande majorité des lymphocytes B folliculaires. Ils expriment alors un BCR d'isotype δ en plus du BCR d'isotype μ (figure 3). Ces lymphocytes matures mais encore naïfs car n'ayant jamais rencontré l'antigène ont pour rôle de circuler dans le système lymphatique à la recherche d'un antigène reconnu par leur BCR.

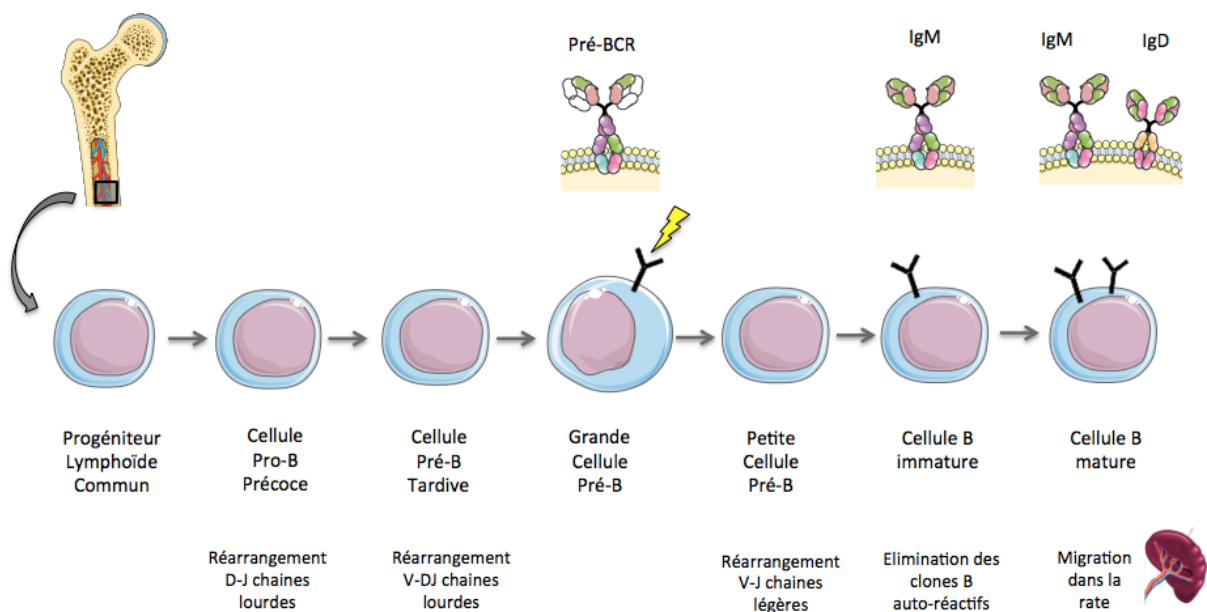


Figure 3. Schéma récapitulatif des différentes étapes de la différenciation antigène-indépendante des lymphocytes B (Réalisé à partir du kit Servier Medical Art, sous licence Creative Common BY)

Les lymphocytes B de la zone marginale représentent l'autre spécialisation possible, bien que minoritaire. Caractérisées par une expression forte du CD21 (Cluster de Différenciation), le récepteur du complément, leur rôle est de promouvoir une réponse rapide contre les pathogènes véhiculés par le sang.

I.2.2. Différenciation antigène-dépendante

La rencontre avec un antigène reconnu par le BCR entraîne l'internalisation du complexe BCR-antigène et la présentation de peptides dérivés de la dégradation de l'antigène par les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (CMH II). Les voies de signalisation activées par cette endocytose vont induire la prolifération et la survie du clone B. Les lymphocytes B activés vont migrer jusqu'à la frontière des zones T et des zones B du ganglion lymphatique.

A cet endroit se produisent des interactions entre les lymphocytes B et des lymphocytes T auxiliaires spécifiques du même antigène (figure 4). Ce dialogue immunologique via le complexe CMH/peptide et le TCR, associé à des cytokines et des molécules d'adhésion et de co-stimulation, notamment CD40/CD40L, va accentuer la prolifération des lymphocytes B et induire des mécanismes immunologiques nécessaires à une réponse immunitaire adaptée.

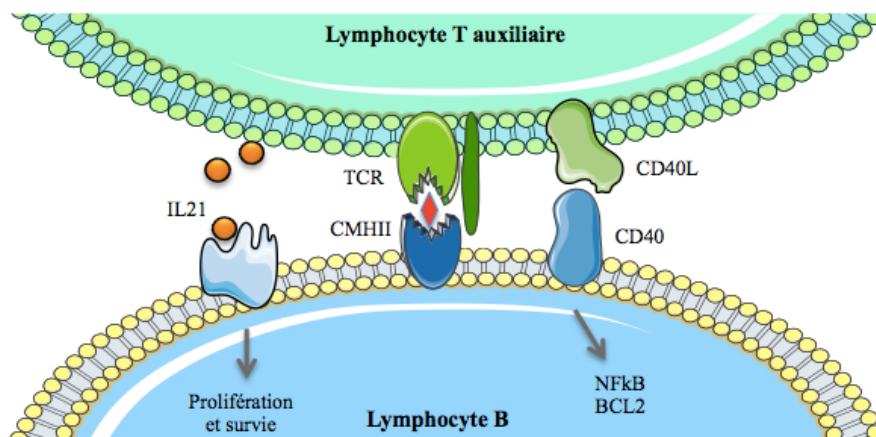


Figure 4. Interaction entre un lymphocyte B activé et un lymphocyte T auxiliaire spécifique du même antigène (Réalisé à partir du kit Servier Medical Art, sous licence Creative Common BY)

Une partie de ces lymphocytes B constitue alors un premier groupe de différenciation à l'origine des plasmablastes, responsables d'une production précoce d'IgM. Le reste des lymphocytes B ainsi que quelques lymphocytes T auxiliaires se déplacent jusqu'au follicule primaire et forme un centre germinatif. Ce centre germinatif est constitué d'une zone sombre, siège d'une prolifération très importante de lymphocytes B appelés centroblastes. La zone

claire qui l'entoure est quant à elle composée de lymphocytes B se divisant moins rapidement appelés centrocytes, ainsi que de lymphocytes T auxiliaires et de cellules folliculaires dendritiques. Les lymphocytes B au repos sont poussés à l'extérieur et forment la zone du manteau (figure 5).

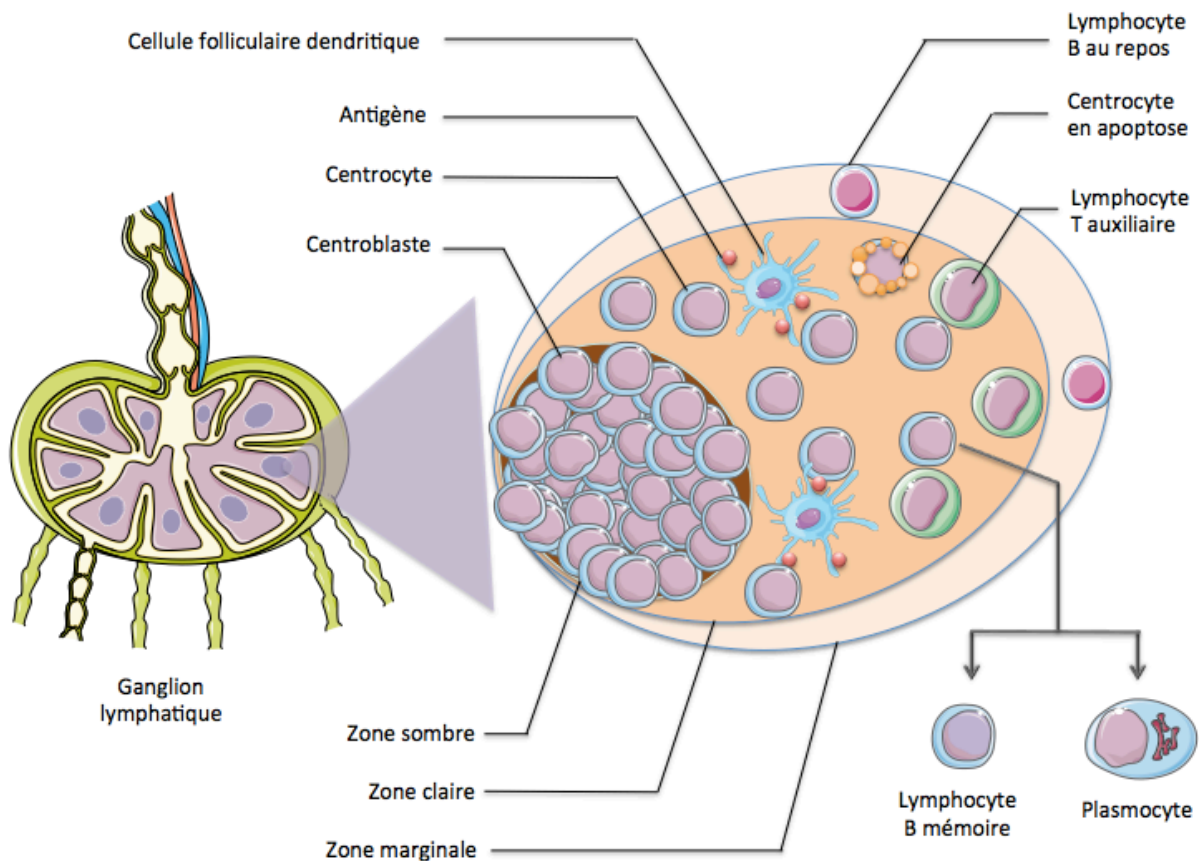


Figure 5. Schéma simplifié de la réaction du centre germinatif. (Réalisé à partir du kit Servier Medical Art, sous licence Creative Common BY)

L'expression du gène *BCL6* est cruciale pour l'établissement du centre germinatif. Il régule de nombreux gènes permettant la prolifération des centroblastes et inhibant la différenciation en plasmocytes. La protéine BCL6 tout comme le CD10 a une expression limitée, pour la lignée lymphoïde B, aux centroblastes et aux centrocytes du centre germinatif.

Le phénomène de maturation d'affinité repose sur des mutations ponctuelles des gènes codant la partie variable de l'immunoglobuline, préférentiellement sur les zones hypervariables. Ces mutations sont initiées par l'*Activation-Induced cytidine Deaminase* (AID), qui convertit la cytosine de l'ADN en uracile, induisant par là même des systèmes de réparations de l'ADN, responsables du remplacement aléatoire de la base concernée. Ces mutations, pour la plupart infructueuses, entraînent parfois une augmentation de l'affinité du BCR pour l'antigène. La sélection des BCR les plus affins est effectuée dans la zone claire. Les centrocytes captent les antigènes présentés par les cellules folliculaires dendritiques. Ils présentent ensuite ces antigènes aux lymphocytes T auxiliaires qui génèrent des signaux de survie. Ces centrocytes sélectionnés peuvent alors se reconvertir en centroblastes pour proliférer de nouveau ou bien sortir du centre germinatif pour continuer leur différenciation.

La commutation isotypique est un mécanisme permettant à un lymphocyte donné de changer d'isotype d'anticorps tout en conservant sa spécificité antigénique. Ce changement est rendu possible par des réarrangements géniques qui juxtaposent les segments VDJ de la partie variable à un segment C (Constant) d'un autre isotype. Les classes d'anticorps ayant toutes des spécificités d'actions différentes, ceci permet d'optimiser la réponse immunitaire en fonction du pathogène rencontré.

La sortie du centre germinatif est induite par l'expression du facteur de transcription IRF4 qui inhibe l'expression du gène BCL6. Le lymphocyte B peut alors se différencier en plasmocyte et migrer jusqu'à la moelle osseuse pour sécréter des anticorps. Une partie du pool de lymphocytes B se transformera en cellules mémoires qui auront pour but de promouvoir une réaction immunitaire secondaire plus rapide et plus intense lors d'un nouveau contact avec le même antigène.

I.2.3. Physiopathologie des lymphomes B

Comme détaillé ci-avant, un lymphocyte B subit, au cours de son développement, de nombreux réarrangements géniques et mutations somatiques au niveau des gènes codant son immunoglobuline. Chacune de ces étapes, qu'elle intervienne au cours de la différenciation antigène-indépendante ou antigène-dépendante, peut conduire accidentellement à un événement oncogénique. La multitude des lymphomes B n'est donc pas étonnante, chacun correspondant à un stade de différenciation ayant dévié vers un processus tumoral.

Les lymphomes B ont tendance à mimer des stades de différenciation physiologiques à partir duquel ils ont bloqué leur différenciation et commencé le processus tumoral (figure 6). Ainsi on peut distinguer les lymphomes pré-Centre Germinatif comme le lymphome du manteau, caractérisé par des lymphocytes B CD5+ circulants et/ou occupant des follicules primaires. Les lymphomes issus du centre germinatif sont représentés par les lymphomes folliculaires, les lymphomes de Burkitt, et les LDGCB. Enfin, les autres lymphomes sont pour la plupart post-centre germinatif. A titre d'exemple, les myélomes, les leucémies lymphoïdes chroniques et les lymphomes de la zone marginale font partie de cette catégorie.

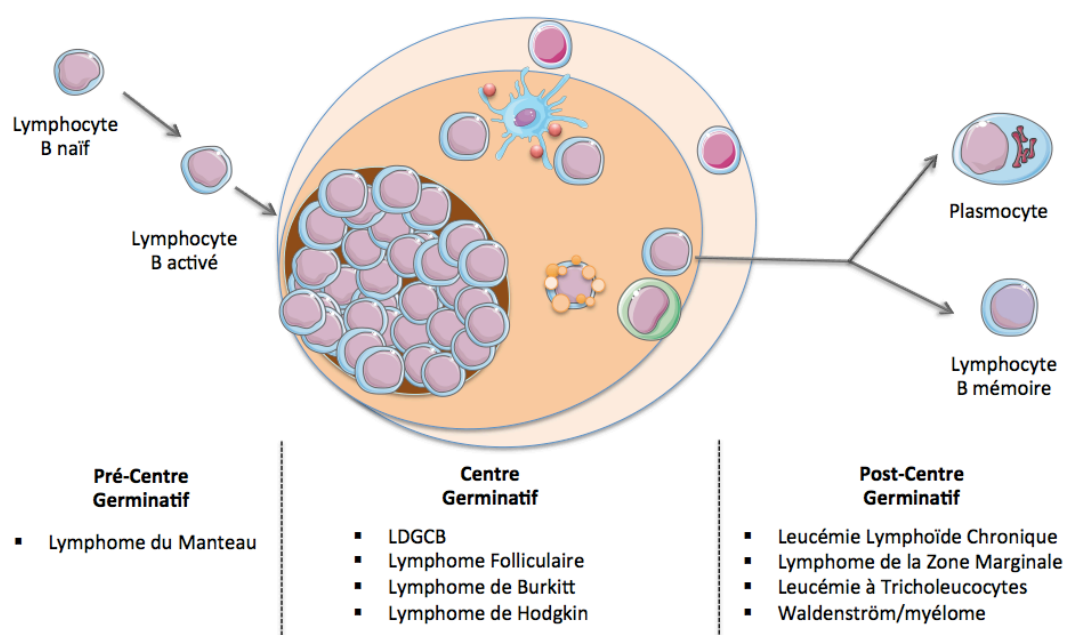


Figure 6. Correspondance des principales néoplasies lymphoïdes matures avec les stades de maturations physiologiques (Réalisé à partir du kit Servier Medical Art, sous licence Creative Common BY)

I.3. Classification des lymphomes

I.3.1. Historique des classifications

Basées dans un premier temps sur des critères uniquement morphologiques, de nombreuses classifications ont été proposées par les pathologistes. Un premier consensus est trouvé avec celle de Rappaport en 1966, avant d'y ajouter des données immunologiques après la découverte de la dualité T et B des lymphocytes (Luke-Collins aux Etats-Unis et Kiel en Europe dans les années 1970). En 1982, la Formulation Internationale de Travail (ou *Working Formulation*) rencontre un succès auprès des cliniciens mais perdra de son intérêt après l'utilisation des polychimiothérapies.

En 1994, une classification plus pragmatique voit le jour. La classification REAL pour *Revised European American Lymphoma* (4) servira de base à la conception de la classification OMS actuelle reconnue par les pathologistes les cliniciens et les biologistes.

I.3.2. Classification OMS

Idéalement, les récentes classifications s'attachent à classer les lymphomes en fonction de leur relation avec un type cellulaire et un stade de différenciation physiologique. La compréhension du système immunitaire et des lymphomes étant loin d'être exhaustive, cette correspondance est parfois difficile à établir en pratique et peu utile pour le clinicien. Une approche plus pragmatique de ce concept est de définir la maladie avec tous les outils disponibles pour les praticiens.

Ainsi la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) intègre des données morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques, moléculaires ainsi que les différentes présentations cliniques (5). Certaines entités sont encore considérées comme provisoires, et la classification admet la probable hétérogénéité de certains types de lymphomes. La classification OMS est donc un outil en perpétuelle évolution, dont les mises à jour (6) permettent d'intégrer les nouvelles données disponibles en particulier dans le domaine de la biologie moléculaire.

I.3.3. Place du Lymphome Diffus à Grandes Cellules B

La classification des LDGCB a subi de grandes évolutions dans les deux dernières décades. Ces changements, effectués au gré des actualisations de la classification OMS, vont globalement vers une compartimentation moléculaire de ces lymphomes. Cette nouvelle vision, acceptée par tous, peine malgré tout à supplanter complètement les entités clinico-pathologiques existantes. A l'heure de la version 2016 de la classification OMS, neuf sous-types clinico-pathologiques existent encore alors que 92% des nouveaux diagnostics sont classés dans les « LDGCB, sans particularités » (3). Loin derrière on retrouve le LDGCB du système nerveux central, suivi du LDGCB cutané primaire de la jambe et du Lymphome B Médiastinal Primitif à grandes cellules (LBMP).

II. Lymphome Diffus à Grandes Cellules B

II.1. Généralités

II.1.1. Epidémiologie

Le Lymphome Diffus à Grandes Cellules B est le plus fréquent des lymphomes non hodgkiniens de l'adulte. Il représente 30% à 40% des cas dans les pays occidentaux et plus encore dans les pays en développement. Le taux d'incidence en France en 2012 était estimé à 4,5 cas pour 100 000 personne-années chez l'homme et 2,2 cas pour 100 000 personne-années chez la femme (données standardisées par rapport à la population mondiale). Ces taux cumulés représentent un effectif de 4 096 nouveaux cas durant cette année (7). Au cours des deux dernières décennies, le taux d'incidence a augmenté chez les hommes tandis qu'il s'est stabilisé chez les femmes.

Ces chiffres sont globalement comparables en Europe (3,8 cas pour 100 000 personnes années) et aux Etats-Unis. Cependant il existe de grandes variations en fonction de la région de l'Europe ainsi que de l'ethnie considérée (8). L'âge médian au diagnostic est de 69 ans chez l'homme et de 74 ans chez la femme. L'incidence augmente fortement après 60 ans et dans deux tiers des cas les patients ont plus de 65 ans (figure 7).

Le sexe ratio diffère selon les études (entre 1,2 et 2) mais la plus grande incidence chez l'homme reste une donnée constante. Parmi les facteurs de risques identifiés, on dénombre : des antécédents familiaux de lymphomes, l'auto-immunité, une infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et/ou le virus de l'hépatite C (VHC) (9). L'immunodéficience augmente significativement le risque de développement d'un LDGCB, la maladie est dans ce cas plus souvent liée à une infection par le Virus Epstein-Barr (EBV).

Le LDGCB se développe fréquemment *de novo* mais il peut être la conséquence d'une transformation d'un lymphome moins agressif parmi les suivants : Leucémie Lymphoïde Chronique, Lymphome Folliculaire, Lymphome de la Zone Marginale.

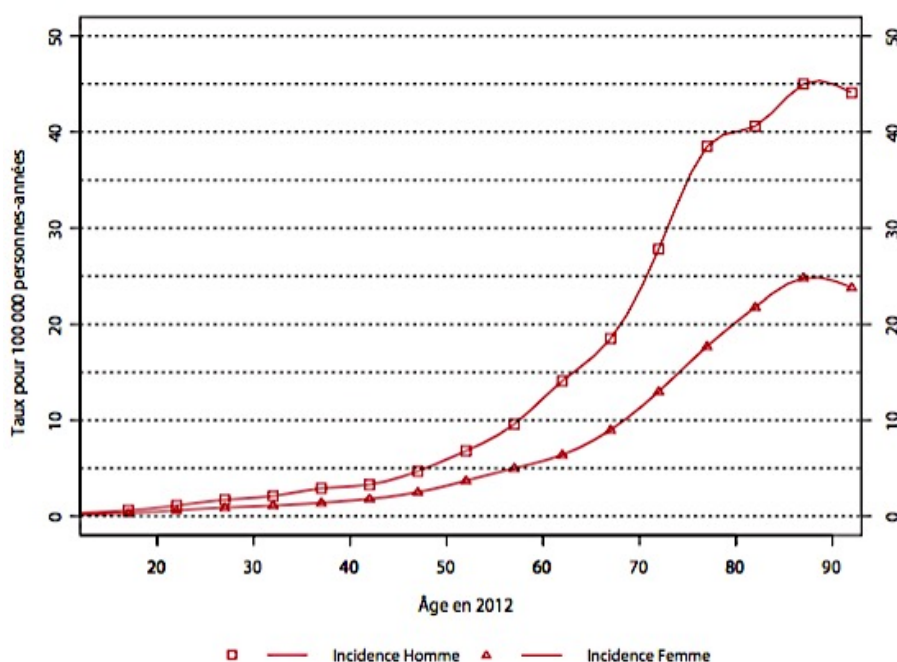


Figure 7. Incidence du LDGCB en France par âge en 2012 (Source : InVS 2013).

L'incidence est plus élevée chez les hommes et elle augmente avec l'âge quelle que soit le genre considéré.

II.1.2. Diagnostic

II.1.2.1. Signes d'appel clinique

Dans la plupart des cas, les patients se présentent avec une masse ganglionnaire unique ou multiple de progression rapide. Cependant, les atteintes primaires extra-ganglionnaires sont fréquentes (30 à 40% des cas). Le site d'envahissement extra-ganglionnaire le plus courant est le tractus gastro-intestinal (tableau 1). Néanmoins, le site primaire peut se situer dans n'importe quel organe, notamment : l'os, les testicules, la rate, l'anneau de Waldeyer, les glandes salivaires, la thyroïde, le foie, le rein, les glandes surrénales, ...

Les patients sont fréquemment asymptomatiques au diagnostic, se présentant avec un gonflement important, douloureux ou non, au niveau cervical, axillaire ou inguinal. Lorsque les atteintes primaires extra-ganglionnaires sont présentes, la nature des symptômes varie selon l'organe atteint. Des gastralgies, une toux ou encore une gêne respiratoire peuvent notamment se manifester.

Site primaire		Nombre	Pourcentage
Ganglion		17 788	68,4
Extra-ganglionnaire	TOTAL	8 204	31,6
	Tractus gastro-intestinal	2 785	10,7
	Tête et cou	1 115	4,3
	Peau et tissus mous	867	3,3
	Tractus génito-urinaire	665	2,6
	Tissu squelettique	548	2,1
	Système respiratoire	456	1,8
	Système hématopoïétique	451	1,7
	Foie/pancréas	417	1,6
	Thyroïde	311	1,2
	Tissu mammaire	254	1,0
	Autres	315	1,3

Tableau 1. Fréquence des localisations des LDGCB (d'après Castillo et al. 2014).

Les localisations primaires extra-ganglionnaires sont fréquentes dans le LDGCB. Le tractus gastro-intestinal est l'organe le plus fréquemment atteint.

II.1.2.2. Examen clinique

L'examen clinique doit dans un premier temps évaluer le retentissement du lymphome sur l'état général du patient. Pour cela, il convient d'utiliser l'échelle d'activité ECOG (*Easter Cooperative Oncology Group*) reprise par l'OMS (tableau 2).

Echelle ECOG/OMS	
0	Activité normale : aucune restriction pour poursuivre les activités précédant l'affection.
1	Restreint dans les activités physiquement fatigantes mais patient ambulatoire, pouvant réaliser une activité sans contraintes physiques importantes.
2	Ambulatoire et capable de s'occuper de lui-même mais incapable d'exercer une activité. Alité moins de 50% de la journée.
3	Capacité limitée à prendre soin de lui-même. Alitement plus de 50% de la journée.
4	Complètement dépendant, nécessité d'une assistance pour ses soins quotidiens. Alitement permanent.

Tableau 2. Score d'activité ECOG/OMS.

Ce score évalue le retentissement de la maladie sur l'activité du patient

Il est primordial de rechercher les signes systémiques décrits dans les lymphomes. Aussi appelés symptômes B, ils sont au nombre de trois et doivent satisfaire certaines conditions pour être pris en compte.

- Fièvre : devant être supérieure à 38°C pendant au moins une semaine
- Amaigrissement : devant être supérieur à 10% du poids corporel durant les six derniers mois
- Sueurs nocturnes : obligeant le malade à se changer

II.1.2.3. Diagnostic anatomopathologique

Le diagnostic du LDGCB nécessite une exérèse du ganglion entier ou une biopsie d'une masse extra-ganglionnaire. Idéalement, le matériel doit être assez important afin de pouvoir réaliser des études immuno-phénotypiques et moléculaires en complément du diagnostic histologique. Les biopsies à l'aiguille fine sont donc à éviter dans la mesure du possible.

On observe une prolifération diffuse de grandes cellules lymphoïdes ayant totalement ou partiellement effacé l'architecture normale du ganglion lymphatique (5) (figure 8). Au niveau cyto-morphologique, les formes sont diverses, trois variants communs existent ainsi que d'autres formes plus rares. Le variant centroblastique est le plus fréquent, il est entièrement composé de centroblastes ou d'un mélange centroblastes/immunoblastes. Le variant immunoblastique est caractérisé par la présence uniquement d'immunoblastes, présentant parfois une différenciation plasmacytoïde. Les arguments cliniques et phénotypiques sont essentiels pour différencier cette forme d'un lymphome plasmablastique ou d'un myélome plasmablastique. Le variant anaplasique présente de très grandes cellules rondes, ovales ou polygonales pouvant ressembler à des cellules de Hodgkin et/ou de Reed-Sternberg. La distinction morphologique de ces trois variants n'est cependant pas utile pour le clinicien en l'absence de corrélation clinique clairement établie.

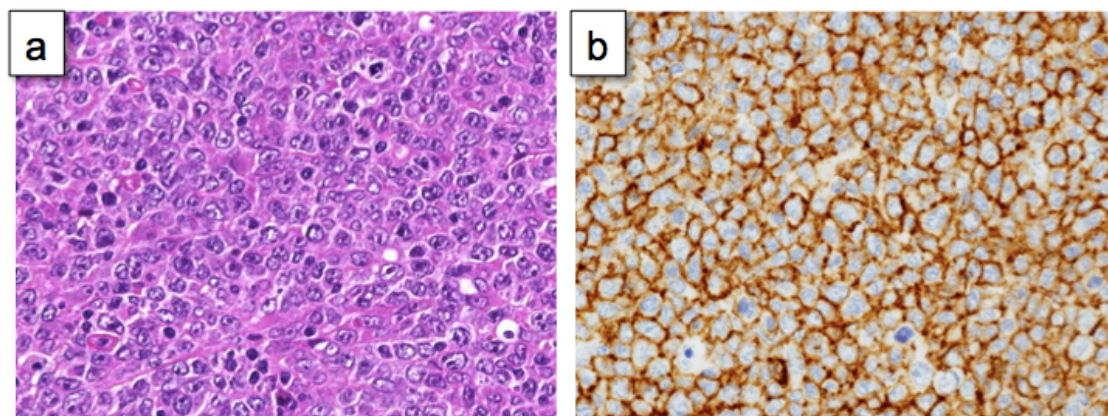


Figure 8. Coupes histologiques diagnostiques d'un LDGCB (Photos : Pr. Copie-Bergman)

- a. Coloration Hématoxyline Eosine Safran (HES)
- b. Immunomarquage CD20 positif

Sur le plan phénotypique, les cellules tumorales expriment les marqueurs B (CD19, CD20, CD22, CD79a), néanmoins, un ou plusieurs d'entre eux peuvent être absents. Le CD5 est positif dans 10% des cas mais représente des cas *de novo* plutôt que des complications de leucémie lymphoïde chronique. D'autres marquages ont pour but de distinguer l'origine du clone lymphocytaire : issu d'une cellule du centre germinatif ou non. Ces marqueurs sont principalement CD10, BCL6 et MUM1/IRF4 ; leur intérêt sera plus longuement détaillé dans la partie II.2.1.2. L'index de prolifération mesuré par le marquage Ki67 est d'ordinaire élevé avec des valeurs supérieures à 40%.

En cas de doute diagnostique, la démonstration d'une clonalité lymphocytaire B par des méthodes de biologie moléculaire recherchant la présence d'un réarrangement unique des gènes du BCR peut s'avérer utile (10).

II.1.3. Examens biologiques complémentaires

Plusieurs examens biologiques de routine sont recommandés au diagnostic d'un LDGCB. Ainsi les analyses à prescrire comptent une numération formule sanguine, les analyses de chimie sanguine classiques incluant un ionogramme complet, un dosage de lactate déshydrogénase (LDH) et l'uricémie. Des tests de dépistage du VIH, du VHB et du VHC et une électrophorèse des protéines sériques sont aussi recommandés.

II.1.4. Evaluation du pronostic

II.1.4.1. Stadification

La stadification est importante pour définir la localisation et l'extension de la maladie, elle permet aussi d'apporter des critères objectifs de réponse au traitement ou au contraire de progression. La classification d'Ann Arbor, initialement décrite pour la maladie de Hodgkin, est utilisée depuis des dizaines d'années. Elle répartit les patients en quatre stades (de I à IV) selon l'extension de la tumeur et lui affecte une lettre en fonction de différents critères : absence (A) ou présence (B) de signes généraux, tumeur volumineuse (X), atteinte splénique (S).

L'adaptation pour les lymphomes non hodgkiniens est au contraire assez récente. La classification actuellement utilisée est celle de Lugano (tableau 3), qui reprend les grands principes d'Ann Arbor (11).

Stade	Atteinte	Atteinte extra-ganglionnaire
Limité		
I	Un ganglion ou un groupe de ganglions adjacents	Une seule lésion extranodale sans atteinte ganglionnaire
II	≥ 2 groupes de ganglions du même côté du diaphragme	Stade I ou II par extension ganglionnaire avec atteinte contiguë limitée
II volumineux	Identique au II mais présentant une tumeur volumineuse	Non applicable
Avancé		
III	Ganglions des deux côtés du diaphragme ; ganglions au-dessus du diaphragme avec une atteinte splénique	Non applicable
IV	Atteinte extra-lymphatique additionnelle non-contiguë	Non applicable

Tableau 3. Classification de Lugano (d'après Cheson et al. 2014).

Actuellement utilisée pour les LDGCB, elle reprend les grands principes de la classification d'Ann Arbor.

II.1.4.2. Index de Pronostic International

Introduit en 1993, l'Index de Pronostic International (IPI) est un score pronostic largement utilisé pour les patients ayant un lymphome agressif (12). Cinq facteurs facilement accessibles sont considérés : l'âge, le taux plasmatique de Lactate Déshydrogénase (LDH), le score d'activité ECOG/OMS, le stade selon la classification d'Ann Arbor et le nombre d'envahissements extra-ganglionnaires (tableau 4). Un point est attribué à chaque facteur en fonction de critères définis, rappelés dans le tableau ci-dessous.

Critères	Valeurs
Age	> 60 ans
LDH	> Valeur normale
Score ECOG/OMS	> 2
Stade (Ann Arbor)	Stade III ou IV
Site extra-ganglionnaire	> 1

Tableau 4. Index de Pronostic International.

Le score IPI permet de séparer quatre groupes pronostiques avec une survie à 5 ans allant de 26 à 73% : faible risque ($IPI \leq 1$), risque intermédiaire-bas ($IPI = 2$), risque intermédiaire-élevé ($IPI = 3$), risque élevé ($IPI \geq 4$). L'IPI ajusté à l'âge (aaIPI) est une version simplifiée utilisée lorsque l'on compare un même groupe d'âge (supérieur ou inférieur à 60 ans), on tient alors uniquement compte du stade, du taux de LDH et du score d'activité ECOG/OMS (13).

Le score IPI a été testé et validé sur plusieurs cohortes ayant reçus des doses de chimiothérapies différentes. Néanmoins sa valeur pronostique a été remise en question depuis l'utilisation du Rituximab. En effet, cet anticorps monoclonal a amélioré la survie dans tous les groupes et la capacité de l'IPI à discriminer ces derniers a diminué, notamment au niveau des groupes à haut risque.

Devant ce constat d'échec, plusieurs groupes ont tenté d'améliorer le score IPI. Certains en remaniant la répartition des groupes sans changer les critères comme le R-IPI (14). D'autres équipes ont modifié les critères en augmentant les catégories d'âge et des taux de LDH et en limitant le critère « maladie extra-ganglionnaire » aux organes majeurs (moelle osseuse, système nerveux central, foie, tractus gastro-intestinal, poumons). Ces derniers, nommés *National Comprehensive Cancer Network-IPI* (NCCN-IPI) (15) ou encore *Kyoto Pronostic Index* (KPI) (16), sont les plus récents et semblent être les plus efficaces. L'adhésion des cliniciens à ces nouveaux scores reste toutefois marginale.

II.1.5. Traitement de référence

II.1.5.1. L'ère du Rituximab

La polychimiothérapie CHOP, composée de Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone sur 6 cycles en général, est resté le traitement de référence du LDGCB pendant près de 25 ans (17). Cependant, ce protocole induit une réponse complète chez moins de la moitié des patients. Les tentatives d'intensification des doses se sont confrontées à une augmentation importante de la toxicité, en particulier chez les patients âgés (> 60 ans).

L'avènement du rituximab, un anticorps monoclonal chimérique anti-CD20, à la fin des années 1990 a largement amélioré le traitement des lymphomes (18). Ce nouvel agent thérapeutique induit la lyse des cellules lymphomateuses via différents mécanismes immunologiques (cytotoxicité dépendante des anticorps, cytotoxicité dépendante du complément, induction de l'apoptose) et a une action synergique avec la polychimiothérapie CHOP.

Le suivi à long terme des patients traités par Rituximab en association avec du CHOP (essai clinique LNH98-5 (19)) montre une amélioration significative à long terme sur tous les paramètres étudiés : survie globale, survie sans maladie, survie sans progression et survie sans événement. La survie globale à 5 ans était de 58% dans le bras R-CHOP contre 45% dans le bras CHOP. De plus, le Rituximab n'ajoute pas de toxicité supplémentaire lorsqu'il est associé au CHOP.

Une autre étude randomisée menée par le Groupe allemand (*MabThera International Trial* - MInT) a comparé le R-CHOP avec le CHOP chez 824 patients naïfs âgés de 18 à 60 ans et présentant un bon pronostic selon l'aalPI.

II.1.5.2. Autres options thérapeutiques

Le traitement de référence actuel repose donc sur 6 cures de R-CHOP administrées tous les 21 jours avec une dose de Rituximab à chaque début de cure. Bien que très efficace chez les patients de moins de 60 ans avec un bon pronostic, ce traitement se révèle parfois inadapté chez d'autres catégories de patients. Des tentatives d'intensification de ce protocole chez les patients jeunes avec un risque intermédiaire ou élevé ont été mises à l'essai ces dernières années (20) (21) (22). Au contraire, une version atténué du protocole, le R-miniCHOP fait preuve d'un bon compromis entre efficacité et tolérance chez les patients âgés de plus de 80 ans (23). Pour les patients non répondeurs ou rechuteurs, des traitements de rattrapage existent, ils reposent sur une chimiothérapie à haute dose suivie d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues (24). De nouvelles thérapies ciblées sont aussi à l'étude, une partie d'entre elles sera détaillée dans la section II.2.2.2.

II.1.6. Suivi et évolution

La Tomographie par Emission de Positions (TEP-Scan) est l'examen d'imagerie recommandé pour l'évaluation de la réponse au traitement (25). La fixation du marqueur radioactif, le ^{18}F -DesoxyGlucose (18-FDG) permet de repérer les zones métaboliquement actives et ainsi de littéralement « allumer » la tumeur résiduelle. Une réponse métabolique complète est définie par l'absence d'activité résiduelle ou une activité inférieure ou égale à celle du foie. Au contraire, les patients non ou mauvais répondeurs auront une réponse métabolique que l'on qualifiera de partielle, nulle ou progressive selon l'imagerie.

Une rechute ou une progression sous traitement sont détectées chez environ 30% des patients malgré l'efficacité du traitement R-CHOP, la plupart du temps dans les 2 années suivantes. C'est donc durant ce laps de temps qu'un suivi clinique et radiologique rapproché est nécessaire. Au-delà de 2 ans de survie sans évènement, les patients ont une survie globale identique à celle de la population générale (26).

II.2. Caractérisation de sous-groupes moléculaires

II.2.1. Historique

II.2.1.1. L'avènement des puces à ADN

L'hétérogénéité des LDGCB était suspectée depuis longtemps mais ce sont les avancées en génétique moléculaire qui ont permis de pointer du doigt la diversité biologique de ce grand ensemble. Malgré des caractères communs morphologiques, immunophénotypiques et cliniques permettant leur regroupement, la variabilité de leur histoire naturelle était flagrante.

En 2000, Alizadeh et al (27) émettent l'hypothèse que les différents groupes pronostiques reflètent une hétérogénéité moléculaire encore méconnue. Pour étayer cette supposition, ils décident d'étudier le profil d'expression génique de ces tumeurs à l'aide de micropuces à ADN complémentaires (ADNc). Le « *Lymphochip* », puce à ADN « maison », contient un large panel de gènes exprimés par les lymphocytes, notamment des cellules du centre germinatif, ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'immunologie et le cancer.

L'analyse par classification ascendante hiérarchique a mis en évidence deux groupes distincts (figure 9). Le premier est caractérisé par une expression importante des gènes normalement retrouvés chez les lymphocytes B du centre germinatif, il est nommé GCB (*Germinal Center B-like*). Le second se démarque par une faible expression de ces gènes et au contraire une forte expression des gènes induits durant l'activation *in vitro* de lymphocytes B périphériques, il est donc désigné ABC (*Activated B Cell-like*).

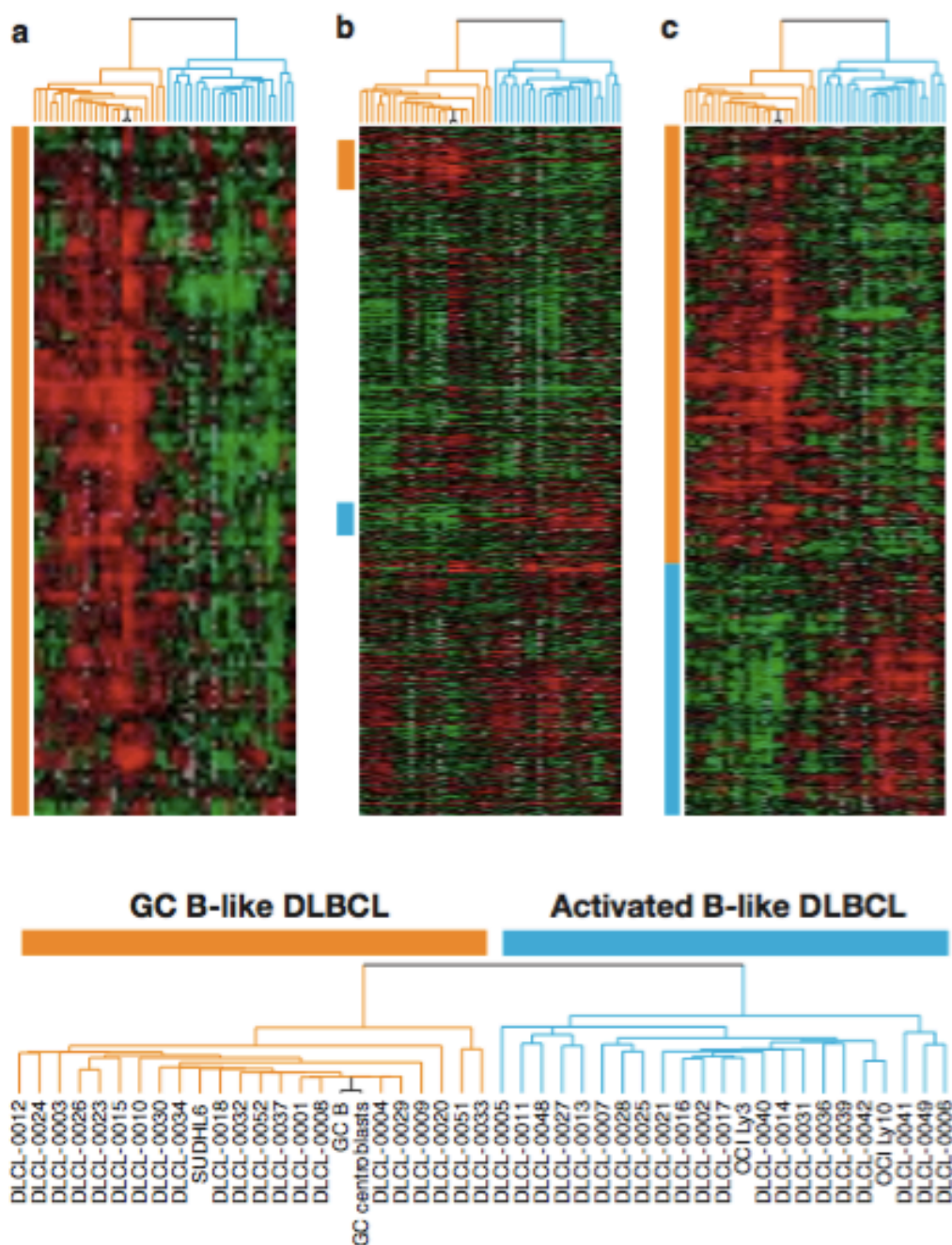


Figure 9. *Regroupement hierarchique par puces à ADN. D'après Alizadeh et al, 2000*

Les 3 figures représentent différentes étapes du regroupement hiérarchique avec inclusion de gènes spécifiques du groupe ABC (en bleu) permettant de distinguer clairement les différences d'expression génique.

Ces deux sous-types de LDGCB sont associés avec une survie globale et une survie sans évènement significativement différentes (figure 10), le groupe GCB ayant un pronostic plus favorable que le groupe ABC. Cette distinction pronostique est indépendante des groupes définis par l'IPI.

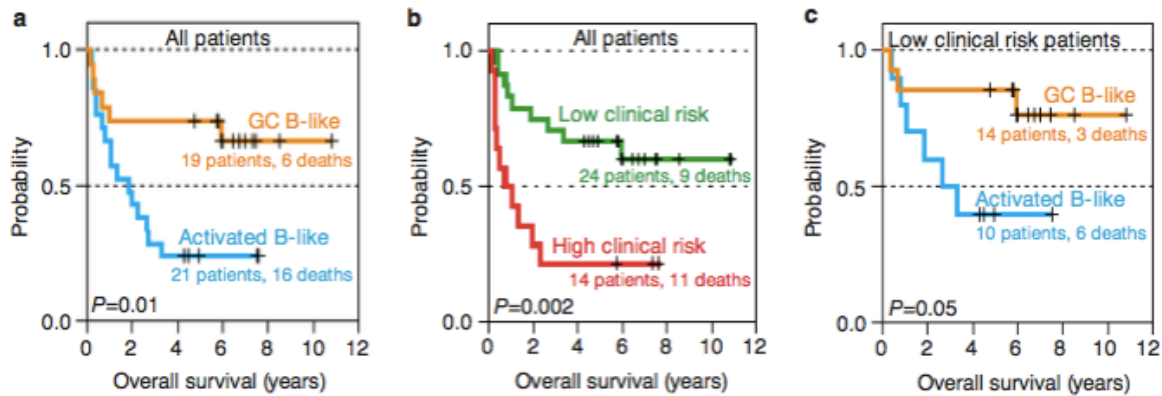


Figure 10. Courbes de survie de Kaplan-Meier des sous-types de LDGCB. D'après Alizadeh et al, 2000

- Courbe de survie de Kaplan-Meier en fonction du profil d'expression génique
- Courbe de survie de Kaplan-Meier en fonction du score IPI (Bas risque de 0 à 2, haut risque de 3 à 5)
- Courbe de survie de Kaplan-Meier du groupe de bas risque selon l'IPI en fonction du profil d'expression génique

Sur la base de ce travail, le *Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project* (LLMPP) a appliqué cette technologie sur une cohorte de 240 patients en utilisant les données d'expression de seulement 100 gènes, sélectionnés parmi ceux dont l'expression était la plus divergente entre les deux sous-types.

La classification hiérarchique a identifié trois profils : ABC, GCB et un troisième sous-type nommé « type 3 » qui n'exprime pas les gènes des deux autres groupes à un haut niveau (figure 11). L'hétérogénéité d'expression observée dans le type 3 suggère qu'il représente plus d'un seul type de LDGCB. Certains groupes suggèrent que ce profil, à présent étiqueté « inclassable », est en fait un ensemble composé de tumeurs faiblement infiltrées et de certains cas de LBMP mal diagnostiqués (28). Toujours est-il que ce groupe, représentant 10-15% des LDGCB, présente un mauvais pronostic équivalent au groupe ABC alors que les LBMP sont plutôt de bon pronostic. Ces malades sont cependant exclus de la plupart des essais cliniques diminuant ainsi les options thérapeutiques pour cette catégorie particulière.

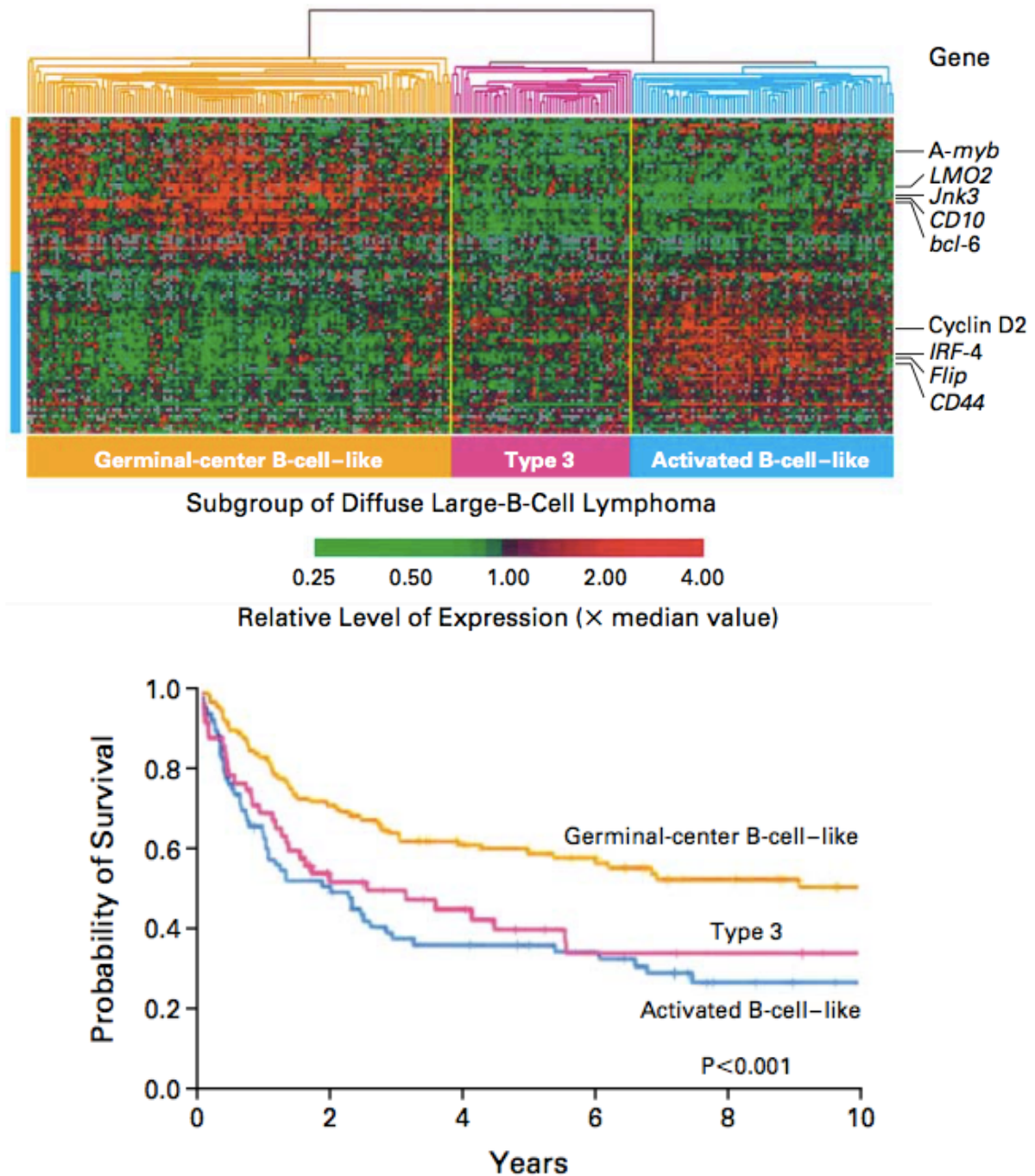


Figure 11. Validation du sous-typage moléculaire (D'après Rosenwald et al, 2002 (29))

- Détermination de trois groupes par profil d'expression génique
- Courbe de survie de Kaplan-Meier des 3 groupes identifiés

Il n'y a pas de relation strictement spécifique entre le groupe moléculaire et le résultat histologique. Néanmoins, les sous-types GCB ont plus souvent un type histologique centroblastique monomorphe alors que les sous-types ABC et les inclassables sont plus fréquemment associés aux types centroblastique polymorphe et immunoblastique.

D'autres points diffèrent entre ces groupes, notamment la présence d'anomalies génétiques récurrentes exclusives comme la translocation t(14,18) et l'amplification du locus c-rel, uniquement retrouvés chez les GCB. Les différentes aberrations génétiques caractéristiques des sous-types seront détaillées dans le point II.2.2.1.

Une autre étude a mis en évidence une augmentation de la proportion des sous-types ABC lorsque l'âge des patients augmente. Il a par ailleurs été démontré que ce déséquilibre d'âge n'explique pas le mauvais pronostic du sous-type ABC (30).

Pour s'affranchir de la méthode de classification hiérarchique pas toujours reproductible, Wright *et al* (31) propose un algorithme permettant une classification individuelle des cas (figure 12). Cet algorithme se sert du niveau d'expression des 27 gènes les plus discriminants du Lymphochip auquel est affecté un coefficient (statistique t du test de Student comparant l'expression entre les deux groupes) et produit un score linéaire de prédiction (LPS). Par l'utilisation du théorème de Bayes, ce score établit la probabilité que l'échantillon appartienne à un sous-groupe, les auteurs ayant fixé une probabilité-seuil à 0,9. L'avantage d'un système linéaire par rapport à un système binaire est de créer une zone tampon représentée par le groupe inclassable qui évite de passer de GCB à ABC en cas de légère variation du score. La concordance de l'ordre de 90% avec les résultats précédents prouve que les deux méthodes de classifications donnent des résultats similaires mais non identiques.

$$LPS(X) = \sum_j a_j X_j, \quad \begin{array}{l} X_j = \text{niveau d'expression du gène } j \\ a_j = \text{coefficient de discrimination (t-test)} \end{array}$$

$$P(X \text{ in group } 1) = \frac{\phi(LPS(X); \hat{\mu}_1, \hat{\sigma}_1^2)}{\phi(LPS(X); \hat{\mu}_1, \hat{\sigma}_1^2) + \phi(LPS(X); \hat{\mu}_2, \hat{\sigma}_2^2)},$$

Figure 12. Prédicteur Bayésien développé par Wright *et al*.

Le LPS est une variable suivant une loi Normale de paramètre (μ_1, σ_1) et (μ_2, σ_2) , dans chaque sous-groupe. Il est donc possible d'utiliser le théorème de Bayes pour calculer la probabilité de chaque échantillon d'appartenir à un groupe ou l'autre.

Une autre version de cet algorithme a été élaborée à partir de 14 des 27 gènes sélectionnés qui étaient présents dans la puce à ADN HU6500 commercialisée par Affymetrix (Santa Clara, CA). Elle a été utilisée avec succès à partir des données de la publication de Shipp *et al* (32) et a permis de retrouver les différences de survie entre les sous-groupes alors que la classification hiérarchique donnait des résultats discordants avec les découvertes initiales.

Aujourd'hui reconnu comme le gold standard en matière de sous-typage moléculaire des LDGCB, les principaux inconvénients de la détermination du profil d'expression génique par puces à ADN restent leur coût élevé, leur faible disponibilité et surtout la nécessité de travailler sur des échantillons congelés. Or, la grande majorité des échantillons disponibles au diagnostic sont des tissus inclus en paraffine (*Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded* ou FFPE) pour lesquels l'extraction d'ARN aboutit fréquemment à du matériel dégradé. Malgré des efforts pour adapter la technologie des micro-puces à ce type d'échantillon (33), cette utilisation reste marginale.

La confirmation de l'intérêt pronostique de la classification GCB/ABC depuis l'utilisation du Rituximab, publiée en 2008 (34) souligne la nécessité d'apporter cette information en routine par le biais de techniques applicables par tous les laboratoires.

II.2.1.2. Algorithmes immuno-histochimiques

La facilité d'utilisation et la disponibilité de l'immunohistochimie (IHC) pour les anatomopathologistes en fait une technique très intéressante pour classer les LDGCB. Parti de ce postulat, Hans *et al* (35) développent en 2004 un algorithme séquentiel basé sur l'IHC et applicable aux tissus FFPE (figure 13). Utilisant des anticorps dirigés contre le CD10, BCL6, MUM1 (IRF4), il permet de séparer les cas en sous-type GCB ou non-GCB (figure 14), ce dernier groupe incluant le sous-type ABC et les cas inclassables. La concordance avec le profil d'expression génique établi par puce à ADN était de 79% dans la publication initiale.

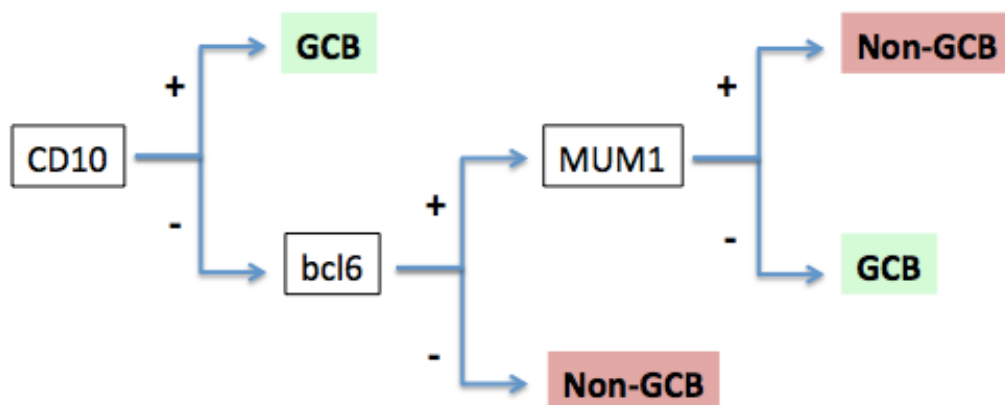


Figure 13. *Algorithme de Hans (D'après Hans et al, 2004).*

L'algorithme de Hans utilise trois marqueurs de manière séquentielle pour déterminer le sous-type GCB ou non-GCB.

De nombreux autres algorithmes décisionnels ont été publiés par la suite, notamment ceux de Choi *et al* (36), Meyer *et al* nommé algorithme de « Tally » (37) et Visco *et al* (38). Ces trois derniers ont l'avantage d'avoir été testés sur des cohortes typées par puces à ADN, leurs caractéristiques sont détaillées dans le tableau 5.

Algorithme	Hans	Choi	Tally	Visco-Young
Marquages	CD10 BCL6 MUM1	CD10 BCL6 MUM1 GCET1 FoxP1	CD10 LMO2 MUM1 GCET1 FoxP1	CD10 BCL6 FoxP1
Echantillons testés	142	84 (entraînement) 63 (validation)	229	431
Concordance avec le gold-standard	79%	88%	93%	93%

Tableau 5. *Comparaison des différents algorithmes immuno-histochimiques*

D'utilisation plus ou moins complexe, ces algorithmes présentent certaines spécificités d'utilisation. Le seuil de positivité varie d'une méthode à l'autre et parfois même selon les marqueurs au sein même d'un algorithme (30% ou 80% dans celui de Choi, 30% ou 60% dans celui de Visco-Young). Au contraire des 3 autres qui reposent sur une logique séquentielle l'algorithme de Tally attribue un score GCB et un score ABC à l'aide de quatre marqueurs (deux pour chaque groupe) et utilise le LMO2 pour trancher en cas d'égalité. Le choix d'un algorithme par un laboratoire d'anatomopathologie doit tenir compte de sa concordance avec le *gold standard*, de la disponibilité des anticorps utilisés ainsi que l'habitude des pathologistes à les interpréter.

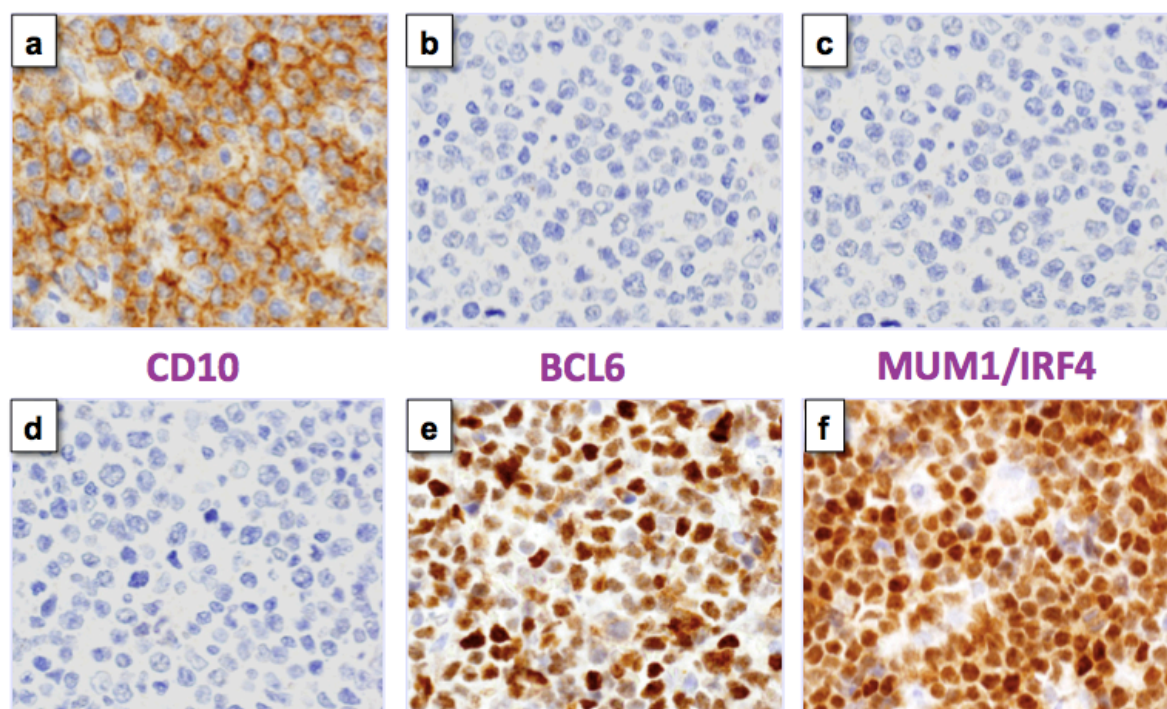


Figure 14. Exemples d'interprétation des trois marquages de l'algorithme de Hans (Photos : Pr. Copie-Bergman)

a, b, c : LDGCB de type GCB (CD10 positif, BCL6 négatif, MUM1 négatif)

d, e, f : LDGCB de type non-GCB (CD10 négatif, BCL6 positif, MUM1 positif)

Malgré des performances en apparence très prometteuses, il faut préciser que le calcul du taux de concordance est effectué après exclusion des cas inclassables. De plus, plusieurs études ont souligné les problèmes de reproductibilité inhérents à la technique employée. Le marquage BCL6 en particulier présente des soucis importants de variabilité inter-laboratoire. A tel point qu'il a été suggéré que les algorithmes de Hans et de Choi soient modifiés en retirant le marquage BCL6 (37).

En 2007, le *Lunenburg Lymphoma Biomarker Consortium* (LLBC) publie une étude collaborative ayant pour but de comparer le sous-typage par immuno-histochimie et de standardiser les pratiques (39). Malgré la participation de 9 laboratoires expérimentés en hémopathies, le premier essai a montré de grandes divergences des résultats dans la plupart des marqueurs, en partie imputable aux techniques de marquage. Suite à une concertation pour fixer les techniques optimales de marquage et des recommandations d'établissement du score, le pourcentage de concordance de sous-typage est passé de 57% à 77%.

Les conclusions de Gutierrez-Garcia *et al* sur une population homogène traitée par immunochimiothérapie sont moins encourageantes (40). Après avoir testé 5 algorithmes différents sur 60 échantillons ayant des résultats disponibles en profil d'expression génique, les résultats montraient que 30-50% des GCB et 15-25% des ABC étaient mal classés. Aucun des algorithmes ne met en évidence de différence significative en survie globale entre les groupes GCB et non-GCB. Une des faiblesses de ces études réside dans le fait que les cas inclassables sont retirés dans le calcul du taux de concordance.

Plus récemment, plusieurs études contradictoires défendent l'utilisation de l'immunohistochimie (41) alors que d'autres déconseillent son utilisation pour le choix thérapeutique (42). Ce sujet reste donc encore une controverse d'actualité.

II.2.1.3. Cytogénétique

A côté du sous-typage ABC/GCB, un autre groupe de patients mérite une attention particulière de la part du clinicien, il s'agit des LDGCB cumulant deux voire trois translocations impliquant les gènes MYC, BCL2 et BCL6 (43).

Représentant environ 6% des LDGCB, ces ensembles, nommés « *double-hit lymphoma* » ou « *triple-hit lymphoma* » ne sont pas reconnus dans la dernière classification OMS. Il est difficile de les classer puisque la plupart d'entre eux présentent des caractéristiques intermédiaires entre le LDGCB et le lymphome de Burkitt. Ces types de LDGCB sont de très mauvais pronostic avec une médiane de survie d'environ 1,5 ans, malgré l'utilisation du rituximab (44). Trouver des traitements alternatifs pour cette catégorie à part est donc d'une importance cruciale. C'est pourquoi il est recommandé de rechercher ces translocations en pratique courante (45).

Ces translocations sont détectées par le biais de méthodes cytogénétiques. Le caryotype auparavant utilisé est largement remplacé par des techniques d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH de l'anglais *Fluorescence In Situ Hybridation*). Ces dernières ont l'avantage d'être utilisables sur des tissus FFPE et de posséder une excellente reproductibilité. Les sondes « *break-apart* » dont les séquences complémentaires se situent de part et d'autre du point de cassure du gène d'intérêt permettent de repérer aisément les translocations (figure 15).

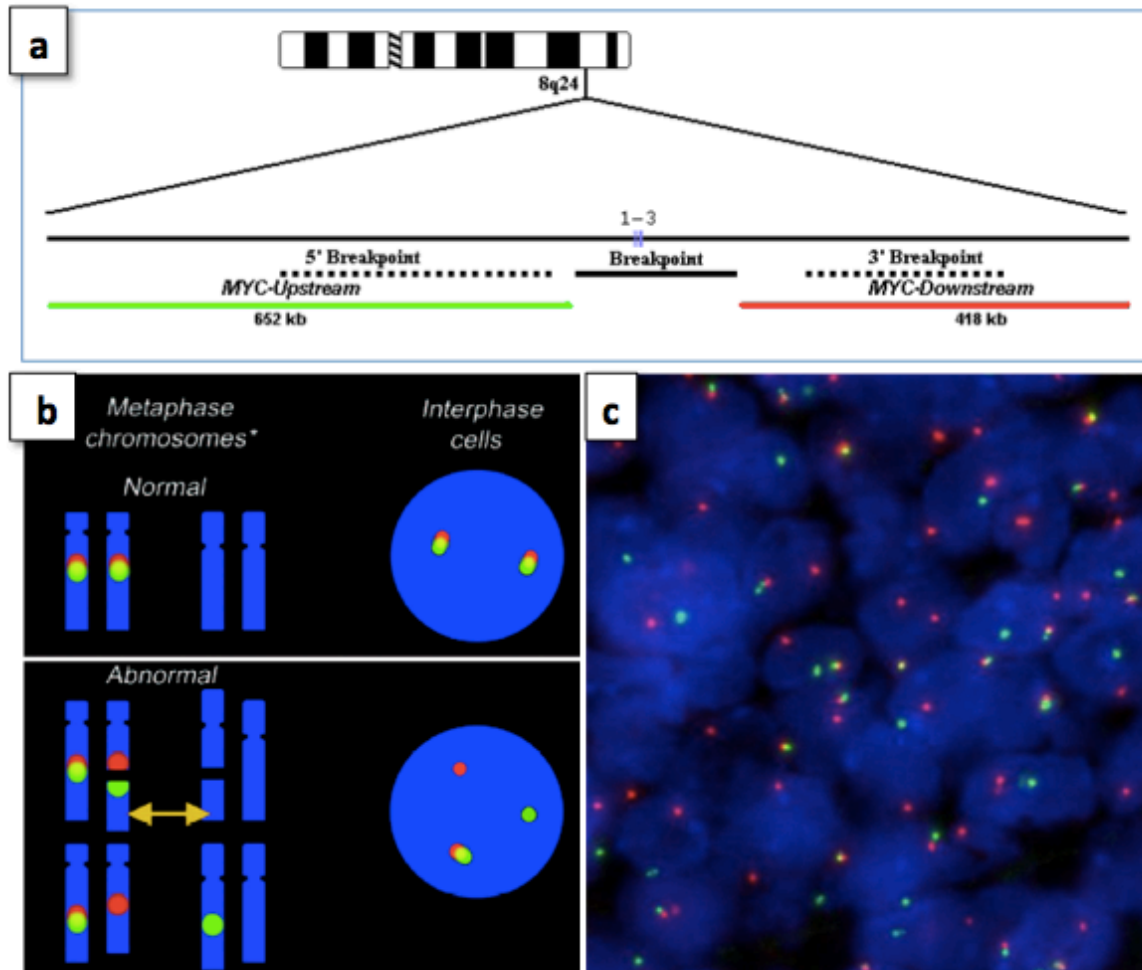


Figure 15. Principe et exemple de l'utilisation des sondes break-apart

- Sondes break-apart 5' et 3' (Dako, Agilent Technologies®) placées de part et d'autre du point de cassure (breakpoint)
- Principe d'interprétation du résultat, adapté de Ventura et al, 2006 (46)
- Exemple de recherche de translocation MYC positive (Photos : Pr. Copie-Bergman)

La mesure de l'expression des gènes MYC, BCL2 et BCL6 en immunohistochimie a permis d'identifier un groupe de double-expresser, qui, s'il ne concorde pas vraiment avec les *double-hit lymphoma*, possède lui aussi un pronostic sombre (47).

II.2.2. Impact thérapeutique

II.2.2.1. Lymphomagenèse et aberrations génétiques

La caractérisation des sous-groupes moléculaires et l'avancée des techniques apportent une meilleure compréhension de la physiopathologie des LDGCB. De nombreuses anomalies génétiques ont été mises en évidence, elles sont parfois spécifiques d'un seul sous-type mais peuvent aussi être observées dans d'autres types de lymphome.

II.2.2.1.1. Sous-type GCB

Comme son nom l'indique, le sous-type GCB dérive de lymphocytes résidant dans un centre germinatif B, il est donc logique de retrouver l'expression de gènes caractéristiques de ce type de cellules tels que CD10, LMO2 et BCL6 (48).

Bien que non spécifique du LDGCB, la translocation t(14,18) est retrouvée dans 40% des cas du groupe GCB. Cette translocation qui juxtapose le gène *BCL2* et l'*enhancer* du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (IGHV) induit l'hyper-expression constitutive de BCL2 et donc un effet anti-apoptotique.

L'histone méthyltransférase EZH2 est quant à elle mutée chez plus de 20% des patients. Une mutation récurrente (Y646) dans l'exon 15 du gène *EZH2* entraîne un gain de fonction de la protéine et une augmentation de la méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27). Ces modifications épigénétiques participent à la lymphomagenèse en éteignant certains gènes régulateurs de la prolifération (49).

La délétion du gène suppresseur de tumeur *PTEN* est observée dans 10% des cas, cependant les techniques d'IHC montrent une perte d'expression dans 55% des coupes de GCB contre 14% pour les cas non-GCB. Ce gène a normalement un effet négatif sur la voie de signalisation PI3K/AKT/MTOR, importante dans la croissance cellulaire et le métabolisme.

II.2.2.1.2. Sous-type ABC

Les cellules lymphomateuses du sous-type ABC expriment fortement les gènes caractéristiques des plasmocytes matures ainsi que des gènes exprimés dans les lymphocytes B activés *in vitro*. Il est vraisemblable qu'elles dérivent de cellules à un stade précoce de différenciation plasmocytaire, juste avant la sortie du centre germinatif (31).

Le sous-type ABC est dépendant d'une activation constitutive de la voie de signalisation NFκB qui induit une inhibition de l'apoptose, la prolifération et la survie cellulaire. Ce mécanisme physiopathologique peut être dû à des mutations sur un nombre varié de gènes pouvant se situer plus ou moins en amont du facteur de transcription NFκB. Ainsi le complexe de signalisation CBM composé de CARD11, BCL10 et MALT1 peut être activé de manière chronique par des mutations sur CARD11. Plus en amont du signal, une activation constitutive du BCR peut intervenir via des mutations de CD79A ou CD79B (50). Loin d'être exhaustifs, ces exemples soulignent l'intérêt d'inhiber la voie du BCR chez ces patients (51).

II.2.2.2. Traitements à l'étude

II.2.2.2.1. Traitements actifs dans les sous-types GCB

Le sous-type GCB étant de bon pronostic, la recherche de thérapies spécifiques est moins active. Cependant certains patients rechutent après la chimiothérapie initiale et il est important de renforcer l'arsenal thérapeutique pour ces cas difficiles.

Les inhibiteurs d'EZH2 semblent être de bons candidats pour ce sous-type, démontrant une activité sur des lignées cellulaires et des modèles murins. Un essai clinique teste actuellement la molécule E7438 chez des patients ayant un LDGCB en rechute, quelque soit le sous-type (NCT01897571) (52).

L'inhibition de BCL2, le gène le plus muté dans les sous-type GCB ainsi que BCL6, un des gènes régulateurs les plus importants de la réaction du centre germinatif, sont deux autres rationnels intéressants (53). La première stratégie fait déjà l'objet d'un essai de phase 1 en association avec la bendamustine et le rituximab chez des LNH réfractaires ou en rechute (NCT01594229).

II.2.2.2.2. Traitements actifs dans les sous-types ABC

Caractérisé par un pronostic plus sombre, le sous-type ABC est au contraire l'objet de toutes les attentions pour la recherche de thérapies ciblées. La compréhension grandissante des mécanismes oncogéniques est une aide précieuse pour rechercher de nouvelles cibles d'action spécifiques de ce sous-type.

Le lenalidomide est un traitement *per os* dont l'effet antitumoral s'exerce par de multiples mécanismes d'action. Son effet immunomodulateur (qui donne son nom à la classe thérapeutique des « IMiD » pour *Immunomodulatory drugs*) s'effectue par une stabilisation de la synapse immunologique, une promotion de l'activité des cellules NK, une augmentation des lymphocytes T CD8 et une diminution des T régulateurs. Outre la mobilisation du système immunitaire, le lenalidomide possède aussi des propriétés antiproliférative, notamment par régulation de l'IRF4 et indirectement de la voie de signalisation NF-κB, ainsi qu'une action anti-angiogénique (54).

De nombreux essais cliniques se sont intéressés à l'efficacité de ce médicament dans le LDGCB mais aussi dans d'autres lymphomes comme le lymphome du Manteau, le lymphome Folliculaire ou encore les lymphomes T. Le lenalidomide semble plus efficace dans les sous-types non-GCB, probablement de par son activité anti-NFκB. Son addition au protocole R-CHOP (R2-CHOP) permet de supprimer la différence de pronostic entre les sous-types GCB et non-GCB. L'essai randomisé de phase 2 ROBUST est en cours pour comparer le R-CHOP au R2-CHOP chez des patients naïfs ayant un LDGCB de sous-type ABC (55).

Les inhibiteurs de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK), protéine faisant le lien entre le BCR et la voie NF- κ B, sont une autre piste intéressante. L'ibrutinib est un inhibiteur sélectif qui se lie de façon covalente à la BTK. Son activité semble là aussi plus importante dans les sous-types ABC par inhibition de l'activation chronique du signal BCR (56). Après des résultats très prometteurs chez des patients rechuteurs/réfractaires ayant un LDGCB de sous-type ABC, un essai de phase 3 est actuellement en cours pour évaluer la supériorité de l'association ibrutinib et R-CHOP par rapport au R-CHOP + placebo (NCT01855750) (57).

D'autres molécules inhibant la voie du BCR par d'autres moyens sont à l'étude. C'est le cas par exemple du fostamatinib qui inhibe la kinase SYK (58), ou encore des inhibiteurs de PI3K.

La question de combiner ces nouvelles drogues se pose déjà au vu de l'action synergique de l'association lenalidomide + inhibiteurs du BCR dans les sous-types ABC (59).

II.2.3. Techniques applicables en routine

Depuis quelques années, de nombreuses équipes académiques et industrielles se sont attelées à résoudre le problème du passage en routine des tests de profil d'expression génique des LDGCB. C'est en effet une problématique clé pour accompagner la mise en place d'essais thérapeutiques pour les thérapies ciblées précédemment citées. Si certains travaillent sur le génome entier comme la technologie DASL d'Illumina®, la plupart se limitent à un nombre réduit de gènes, en général inférieur à 20. Les techniques reposent sur des principes parfois comparables et toutes sont applicables aux tissus FFPE. Quelques-unes sont détaillées ci-dessous, tandis que la technique de RT-MLPA (MRC Holland®) fera l'objet de la partie III de ce mémoire.

II.2.3.1. Algorithme de Hans

Le premier algorithme immuno-histochimique publié est resté le plus utilisé auprès des pathologistes. Sa simplicité d'utilisation et la disponibilité des marqueurs employés ont contribué à sa popularité. Malgré sa concordance imparfaite et les problèmes de reproductibilité, il est resté jusqu'à maintenant un outil fort utile. En 2016, la révision de la classification OMS recommande son utilisation ou celle d'un autre algorithme pour le sous-typage des « LDGCB, sans particularité » (60). Leur emploi est considéré comme acceptable en l'absence d'alternatives utilisable en routine. Les nouvelles techniques basées sur la quantification d'ARN messagers (ARNm) sur tissus FFPE sont notamment citées comme une alternative prometteuse.

II.2.3.2. Quantitative Nuclease Protection Assay

En 2007, Roberts *et al* mettent au point un test quantitatif de protection aux nucléases (*quantitative Nuclease Protection Assay* – qNPA) ayant l'avantage de pouvoir être utilisé sur des tissus FFPE avec une excellente corrélation des résultats avec le matériel congelé (61).

Après avoir subi une lyse, les échantillons sont incubés avec des sondes spécifiques de l'ARNm des gènes d'intérêt. Les duplexes ARNm/sondes ainsi formés sont protégés contre l'action de la nucléase S1 qui digère les sondes non hybridées. L'ARNm des duplexes est ensuite détruit par une hydrolyse alcaline ne laissant que les sondes dans des concentrations proportionnelles à l'abondance des ARNm spécifiques. Les échantillons sont transférés sur des plaques de puces pour une détection des sondes via un système de capture et une quantification par chimiluminescence (figure 16).

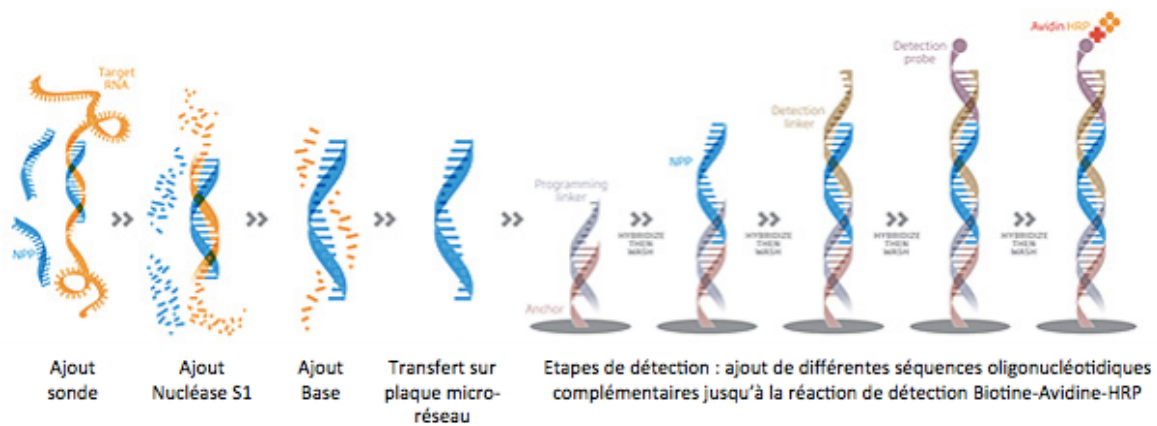


Figure 16. Principe de la technique quantitative Nuclease Protection Assay, adapté de www.htgmolecular.com/science/qnpa-chemistry (62)

L'optimisation de cette technique a permis de sélectionner les 12 gènes les plus pertinents pour le sous-typage : *CD10*, *LRMP*, *CCND2*, *ITPKB*, *PIM1*, *IL16*, *IRF4*, *FUT8*, *BCL6*, *LM02*, *CD39* et *MYBL1*. Leur expression est normalisée par un gène de ménage (*TATA Box Binding Protein* - TBP). La qNPA affiche des taux de concordance avec le *gold standard* d'environ 79% avec un seuil de confiance de 0,9. Cette proportion atteint 92% lorsque les cas inclassables sont exclus (63).

Les principaux avantages de cette technique sont l'absence d'extraction d'ARN, l'application possible aux tissus FFPE et le pourcentage de succès de 100% avec aucun cas ininterprétable. Il faut cependant déplorer la complexité relative de cette technique nécessitant des plaques de puces et une plateforme d'imagerie encore assez peu répandues.

II.2.3.3. NanoString

La technologie nCounter® développée par NanoString Technologies offre une solution séduisante pour la classification des LDGCB. Son principe repose sur l'utilisation de deux sondes qui s'hybrident aux ARNm cibles : l'une marquée par un code-barres fluorescent permettant la détection spécifique d'un ARNm, l'autre biotinylée assurant la capture et l'immobilisation du complexe hybridé (figure 17). Après élimination des sondes non hybridées, le comptage direct apporte un résultat quantitatif sans amplification nécessaire. Composé de 6 fluorochromes, le système de code-barres autorise la distinction de près de 800 séquences différentes (64).

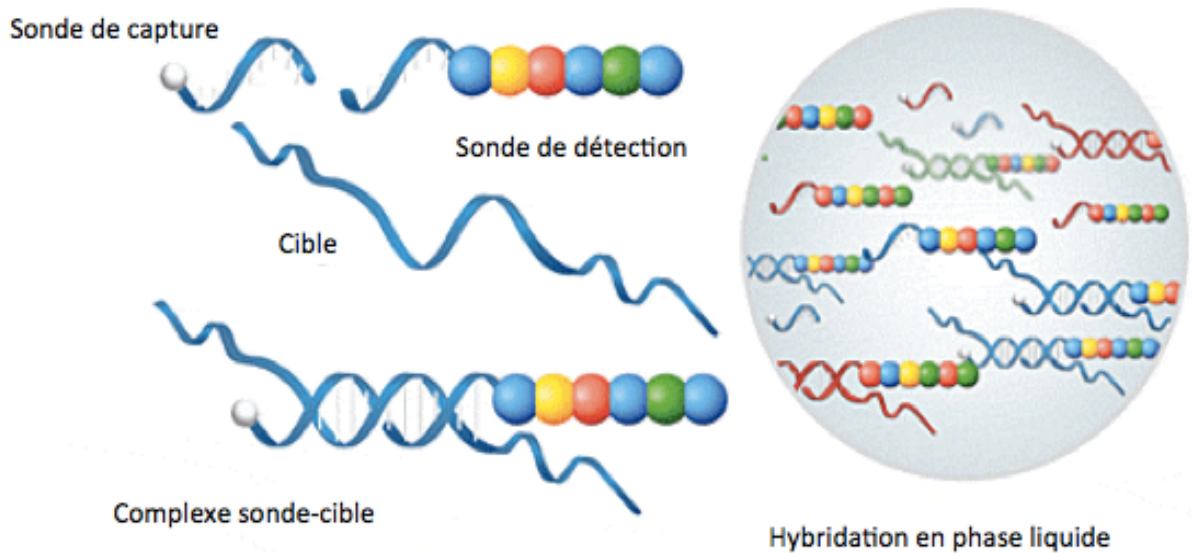


Figure 17. Principe de la technologie nCounter® (NanoString Technologie), adapté de <http://www.nanostring.com/applications/technology> (64)

Le système NanoString semble présenter plusieurs avantages. Sa flexibilité sur le nombre de gènes à inclure en évitant les biais imposés par l'amplification par PCR en sont des atouts majeurs. Outre son utilisation possible sur ARN extrait de tissus FFPE, la facilité d'utilisation de la plateforme et le temps d'exécution de la technique (15 minutes de manipulation au total pour un délai de rendu inférieur à 36 heures) permettent d'envisager son utilisation en routine. Plusieurs équipes se sont donc intéressées à ce système en proposant des modèles incluant respectivement 145 gènes (65) ou 20 gènes (66). Ce dernier, avec son test « Lymph2Cx » semble le plus abouti. Leur cohorte de validation, composée de 58 biopsies FFPE après exclusion des inclassables, ne rapporte qu'une seule discordance par rapport au *gold standard* (puces Affymetrix). Une comparaison inter-laboratoire a mis en évidence une concordance supérieure à 95%, attestant de la reproductibilité de la technique.

III.Reverse Transcriptase – Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (RT-MLPA)

III.1. Principe de la technique

III.1.1. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

La MLPA est une technique de PCR multiplexée permettant l'amplification simultanée de 40 séquences nucléotidiques avec un seul couple d'amorces. Cette méthode, mise au point par Schouten *et al* (67) en 2002 est développée soit sous forme de « techniques maisons » soit sous forme de kit adaptés à différentes pathologies et commercialisés par MRC Holland. Elle est rapide, simple, peu coûteuse et ne nécessite pas de plateforme dédiée.

L'originalité réside dans le fait que les produits amplifiés lors de la réaction de PCR sont les sondes et non l'ADN de l'échantillon. Chaque sonde est initialement composée de deux oligonucléotides qui s'hybrident sur deux sites immédiatement adjacents de la séquence ADN cible. Si les deux sondes sont parfaitement hybridées à immédiate proximité l'une de l'autre, elles sont liguées par une ligase thermostable. Une réaction de PCR utilisant des amorces universelles permet l'amplification conjointe de toutes les sondes liguées.

Chaque couple de sondes diffère en taille (entre 80 et 480 paires de bases (pb) une fois liguées), autorisant ainsi la reconnaissance des sondes (et donc des gènes) après séparation des produits de PCR par électrophorèse capillaire. Leur construction est néanmoins identique : elles possèdent une séquence complémentaire des amorces de PCR sur les extrémités 5' et 3' respectivement, une séquence complémentaire de l'ADN cible et une séquence « espaceur » plus ou moins longue qui définit leur taille finale (figure 18). La synthèse chimique devenant plus inexacte au-delà de 180 nucléotides, le clonage dans des vecteurs M13, est utilisé pour les sondes de taille plus importante (67). Pour éviter d'avoir recours à cette dernière méthode plus complexe, il peut être opportun de répartir les séquences espaceurs sur les deux sondes lors de la conception des sondes.

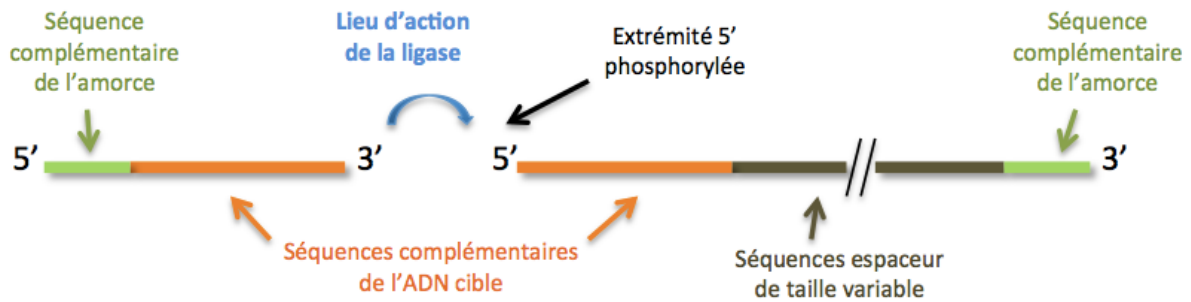


Figure 18. Représentation schématique d'un couple de sondes pour MLPA

III.1.2. Profil d'expression génique par RT-MLPA

Les avantages de la MLPA ont conduit au développement de techniques dérivées pour l'étude de l'expression génique. La ligase ne pouvant pas agir sur des sondes hybridées sur de l'ARN, il est nécessaire de travailler sur l'ADN complémentaire (ADNc). Ainsi la RT-MLPA décrite par Eldering *et al* (68) en 2003 associe une étape de reverse-transcription (RT) au principe de la MLPA détaillé ci-dessus (et illustré par la figure 19). Pour éviter l'éventuelle contamination par de l'ADN génomique, les séquences complémentaires des sondes chevauchent une jonction entre deux exons.

Initialement testée sur deux signatures d'expression génique (apoptose et inflammation), cette technique possède de nombreux avantages comparés aux techniques de micro-puce ou de PCR en temps réel. L'utilisation d'un seul couple d'amorce autorise une quantification relative par rapport aux gènes de référence. La partie la plus laborieuse réside dans la mise au point des sondes oligonucléotidiques. En effet, celle-ci est à l'initiative du laboratoire puisque très peu de kits de RT-MLPA sont actuellement disponibles dans le commerce.

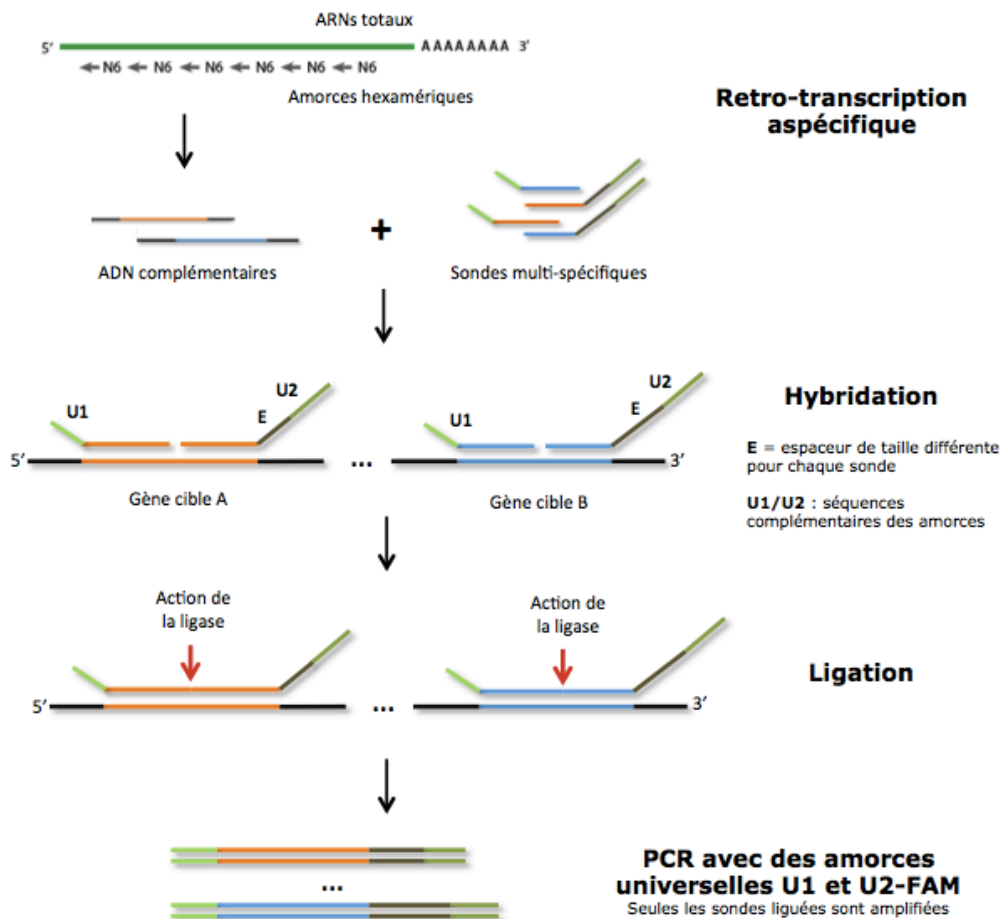


Figure 19. Schéma explicatif de la RT-MLPA.

Les séquences s'hybridant aux ADNc cibles sont par ailleurs assez courtes, entre 50 et 70 nucléotides en général. Elles peuvent donc s'hybrider à des fragments d'ADNc relativement courts et l'influence de la dégradation de l'ARN est en principe limitée. Il est par conséquent possible d'utiliser cette technique sur des ARN extraits à partir de biopsies FFPE, le succès dépendant tout de même des conditions de conservation de ces tissus.

III.2. Application au LDGCB

Récemment, Mareschal *et al* ont mis au point une technique de RT-MLPA permettant le sous-typage moléculaire des LDGCB (69). Cette dernière utilise une signature d'expression de 14 gènes, 4 hyperexprimés dans le sous-groupe GCB (LMO2, MYBL1, BCL6, NEK6), 4 hyperexprimés dans le sous-groupe ABC (IRF4, FOXP1, IGHM, TNFRSF13B), 3 considérés comme pronostiques (MYC, BCL2, TNFRSF9) et 3 gènes de contrôle (CCDN1, CCDN2, MS4A1).

Les 8 gènes discriminants ont été sélectionnés en fonction de leur importante différence d'expression entre les deux sous-types. Un autre élément à prendre en compte est le niveau d'expression de ces gènes qui doit être dans le même ordre de grandeur. En effet si un des gènes est beaucoup trop exprimé par rapport aux autres, son signal en RT-MLPA écrasera ceux des autres gènes et faussera la conclusion finale. Pour deux gènes en particulier, NEK6 et IGHM, dont l'expression surpassait trop celle des autres gènes, des sondes compétitrices ont été ajoutées au mélange de sondes (figure 20). Ces oligonucleotides compétiteurs s'hybrident sur la même séquence génique mais ne peuvent être ni ligués (car non phosphorylés en 5'), ni amplifiés (sans séquence complémentaire de l'amorce de PCR).

NEK6 : 5'-Pho-AGGCATCCCAACACGCTGTCTTTTCCAACCCTTAGGGAACCC-3'

NEK6_comp : 5'-AGGCATCCCAACACGCTGTCTTT-3'

Figure 20. Séquences oligonucléotidiques d'une héli-sonde spécifique de NEK6 et de son compétiteur.

La quantification relative du niveau d'expression génique des 14 cibles est rendue possible par une PCR utilisant une amorce fluorescente par couplage au FAM. Les produits de PCR sont ensuite passés sur un séquenceur capillaire. La séparation s'effectue en fonction de la taille des sondes spécifiques des gènes cibles. Le couple d'amorce étant unique pour toutes les sondes, la quantité finale de chaque produit de PCR sera représentative de la quantité initiale d'ARNm du gène considéré. Cette quantité est évaluée par l'intensité du signal fluorescent, c'est à dire par la hauteur du pic détecté.

Le résultat final prend en compte l'expression normalisée des 8 gènes discriminants auxquels est attribué un coefficient dépendant de leur différence d'expression dans les 2 sous-types (déterminé à partir du t-test de Student). Le score ainsi calculé est adapté du score linéaire de prédiction proposé par Wright *et al* et détaillé dans la partie II.2.1.1 (31). Le développement d'un prédicteur Bayésien à partir de données issues d'une autre technique de profil d'expression génique (DASL – Illumina®) a permis de fixer les seuils de décision et de produire une probabilité d'appartenir à chacun des sous-types. Si l'échantillon n'affiche pas une probabilité supérieure à 0,95 pour l'un ou l'autre des deux sous-types, il est considéré comme inclassable. Entre les scores de -12,9 et 1,957, l'échantillon est considéré comme inclassable, un score en dessous le classe dans le groupe GCB et au-dessus dans le groupe ABC.

Toutes ces étapes d'analyse des résultats sont complètement prises en charge par le logiciel dédié et en téléchargement libre créé par Sylvain Mareschal (figure 21). Celui-ci produit, à partir des données brutes d'électrophorèse capillaire (*Input directory*) et d'un fichier d'alignement (*design file*), une représentation graphique des gènes exprimés comportant un encart donnant le score et la prédiction correspondante. Ce fichier sous format .pdf est accompagné d'autres fichiers sous format .tsv détaillant toutes les données brutes de hauteur des pics et d'expressions normalisées.

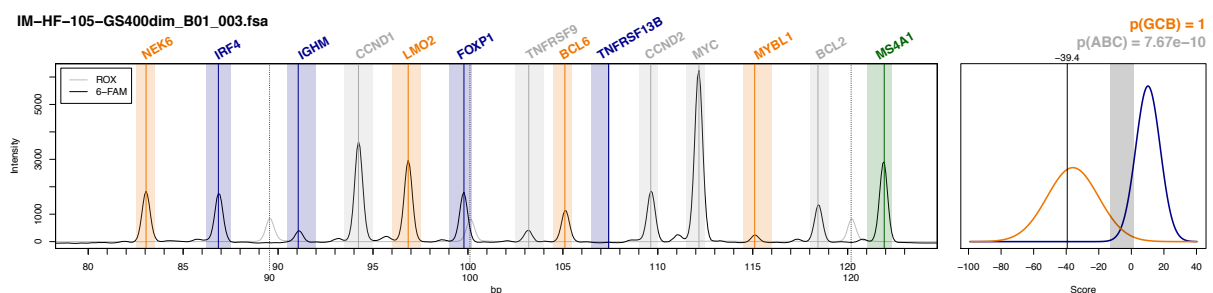
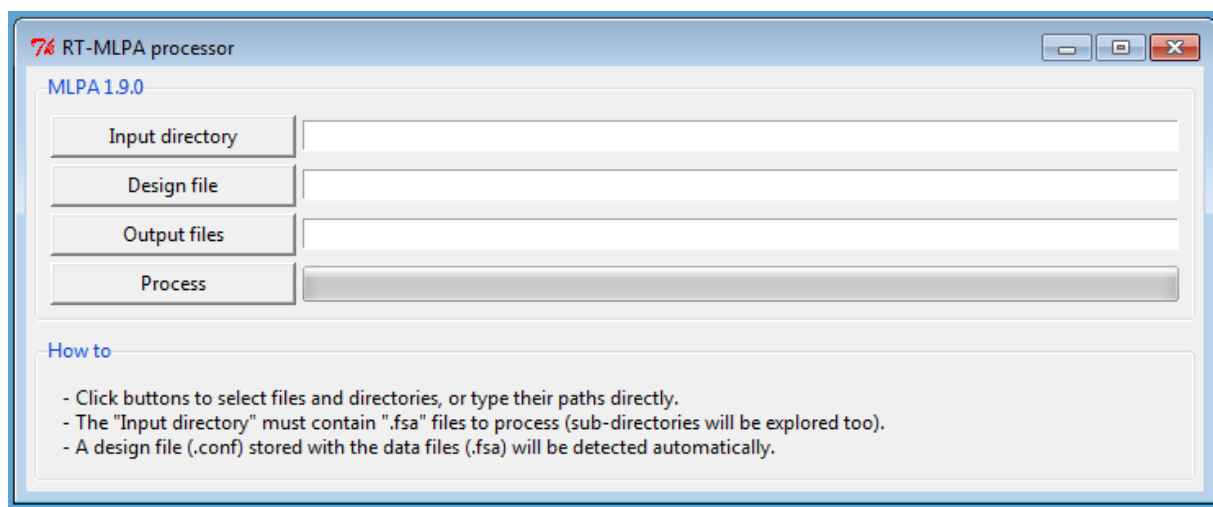


Figure 21. Interface du logiciel RT-MLPA processor et exemple d'une représentation graphique produite. La représentation graphique permet de visualiser les gènes du sous-type ABC (en bleu) et ceux du sous-type GCB (en orange), les autres couleurs étant pour les gènes ayant un intérêt pronostique et diagnostique. Les courbes à droite permettent de visualiser le score et la probabilité d'appartenir à un des sous-types.

IV.Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude consiste en la mise en place en routine de la RT-MLPA au laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Henri Mondor. Le laboratoire d'Immunologie et plus particulièrement le secteur de biologie moléculaire travaille en étroite collaboration avec le département de pathologie du Pr Philippe Gaulard. Il effectue en particulier toutes les recherches de clonalité T et B des prélèvements diagnostiques posant des difficultés d'interprétation anatomopathologique.

Le laboratoire d'anatomopathologie utilise l'algorithme de Hans pour classer les nouveaux cas de LDGCB. Un résultat de RT-MLPA viendrait donc en complément de cette information. Son application en routine est tout à fait possible du fait du faible coût par échantillon et de son temps de technique relativement réduit.

Le laboratoire d'immunologie et le département de pathologie ont aussi pour objectif de se préparer à la participation au protocole RT3 (*Real Time Tailored Therapy*) mis en place par le LYSA (*LYmphoma Study Association*). Cet essai vise à évaluer la capacité des plateformes de génétiques moléculaires à fournir des résultats d'IHC, de FISH, de RT-MLPA et de NGS (*Next Generation Sequencing*) dans un délai de 38 jours après inclusion du patient. Le respect d'un tel délai dans plusieurs centres différents permettrait d'envisager de construire des essais cliniques multicentriques avec un traitement adapté aux résultats fournis (Annexe 1).

V. Matériels et méthodes

V.1. Collaboration

Afin de permettre un déploiement efficace de la technique sur plusieurs sites, l'équipe INSERM 0918 du Centre Henri Becquerel de Rouen a transmis son protocole technique ainsi qu'un échantillon du mélange final de sondes. L'utilisation d'un même lot de réactif est, d'importance cruciale pour la reproductibilité inter-centre des résultats. Nous sommes entrés en relation avec l'équipe de Philippe Ruminy afin de lever nos interrogations sur le protocole à la lecture de l'article.

V.2. Lignées utilisées pour la mise au point

La technique a été testée sur des ARN extraits de lignées de LDGCB.

Dans un premier temps, trois ARN issus de lignées de LBMP nous ont été communiqués par l'équipe INSERM U955-équipe 9 : MedB1, Karpas 1106 et U2940. Ces lignées ne répondent pas exactement à la classification GCB/ABC mais la littérature leur affecte un profil similaire au GCB.

Dix ARN extraits de lignées de LDGCB nous ont été ensuite transmis. Selon la littérature, deux d'entre elles présentaient un profil d'expression génique de sous-type ABC (OCILY3 et OCILY10) tandis que les neuf autres avaient un profil GCB (OCILY1, OCILY7, SUDHL4, SUDL6, NUDHL1, RL, Carnaval, Val, HT).

V.3. Cohorte de patients étudiée

La technique a ensuite été validée sur une cohorte de patients diagnostiqués à Henri Mondor. Ce groupe était constitué de vingt patients ayant été classés par l'algorithme de Hans et pour lesquels le laboratoire d'anatomopathologie avait stocké un échantillon de tissu FFPE ainsi que du tissu congelé. Pour un des vingt patients (P653492), il n'a pas été possible d'obtenir un échantillon de tissu congelé correspondant.

Pour comparer les résultats obtenus par notre laboratoire et celui du Centre Henri Becquerel, nous avons procédé à un échange d'échantillons. Dans les deux cas, ceux-ci ont été envoyés après l'étape de RT pour éviter une dégradation de l'ARN lors du transport. Huit ADNc issus d'ARN de tissus congelés nous ont été envoyés de Rouen, suivi par un envoi de sept nouveaux ADNc pour une comparaison multi-sites (Rouen, Créteil, Lyon, Dijon, Nantes, Lille, Strasbourg, Rennes). De notre côté, nous avons envoyé les vingt ADNc issus des tissus FFPE de notre cohorte de patients pour comparaison avec l'équipe de Rouen.

V.4. Description de la technique

Les extractions d'ARN ont été réalisées par le laboratoire d'anatomo-pathologie d'Henri Mondor. Les extractions ont été effectuées à l'aide du kit AllPrep DNA/RNA extraction FFPE de Qiagen pour les tissus FFPE et sur l'automate Maxwell® 16 de Promega pour les tissus congelés. L'analyse de la qualité de l'ARN extrait des tissus congelés a été estimée par la mesure du *RNA Integrity Number* (RIN) sur Bioanalyser® (Agilent Technologies, Santa Clara, US).

La suite de la technique correspond à la RT-MLPA proprement dite. Brièvement, après dosage par le Multiskan GO (Thermo Fischer Scientific), l'ARN est ramené à une concentration de 250 ng/μL et conservé dans la glace. La réaction s'effectue dans des barrettes de tubes de 200 μL et en utilisant un thermocycleur à couvercle chauffant. Une quantité totale de 1 μg (dans 4 μL) est utilisée pour l'étape de RT. Les réactifs de RT sont préparés suivant le mélange suivant (par tube) : 2.5 μL de Tampon 5X de Transcriptase Inverse (TI) du Virus de Leucémie murine Moloney, 1 μL de dithiothreitol à 100 mmol/L, 2 μL

de dNTPs à 10 mmol/L, et 2 µL d'amorces hexamériques à 100 mmol/L. Les échantillons sont chauffés 1 minute à 80°C pour détruire la structure secondaire de l'ARN, suivi d'une descente à 37°C pendant 5 minutes permettant l'hybridation des amorces. Après un refroidissement à 4°C, 1µL de TI du Virus de Leucémie murine Moloney est ajouté dans chaque tube. La synthèse ADNc s'effectue pendant les 15 minutes d'incubations à 37°C, elle est suivie d'une étape de destruction de l'enzyme par chauffage à 98°C pendant 2 minutes.

Pour l'étape d'hybridation, 5µL d'ADNc sont transférés dans un nouveau tube et mélangés à 1,5 µL de tampon SALSA-MLPA et 1,5 µL du mélange de sondes. Les échantillons sont chauffés 2 minutes à 95°C pour dénaturer l'ADNc puis 1 heure à 60°C pour permettre l'hybridation des sondes MLPA à leurs cibles sur l'ADNc. La ligation intervient après ajout de 32 µL de réactifs de ligation à 54°C, directement dans le thermocycleur (3 µL de Tampon A de SALSA-Ligase 65, 3 µL de Tampon B de SALSA-Ligase 65, 25 µL d'eau dépourvue de RNase et 1 µL de SALSA-Ligase 65). L'incubation dure ensuite 15 minutes et se termine par une étape d'inactivation de 5 minutes à 98°C.

La PCR finale nécessite l'utilisation de 5 µL de produit de ligation, auquel est ajouté 10 µL de PCR Master Mix Hi-Fidelity (Thermo Scientific, Marietta, OH), 1 µL de l'amorce universelle U1, 1 µL de l'amorce universelle U2 marquée par du FAM et 3 µL d'eau dépourvue de RNase. L'amplification des produits de ligation s'effectue selon le programme ci-dessous (figure 22).

6 minutes	94°C	} 35 cycles
30 secondes	94°C	
30 secondes	58°C	
30 secondes	72°C	
4 minutes	72°C	
Refroidissement	4°C	

Figure 22. Programme de la PCR finale de la RT-MLPA

Les produits de PCR sont ensuite dilués au 1/60^e dans de l'eau stérile et 2 µL de cette dilution sont ajoutés à 18,9 µL de formamide et 0,1 µL de marqueur de taille GS400 HD ROX sur une plaque 96 puits. Après dénaturation, la plaque est passée sur un séquenceur capillaire 3130xl Genetic Analysers (Applied Biosystems, Warrington, UK) avec un polymère POP7 (tableau 6).

Oven temperature	60°C
Poly Fill Vol	7300 steps
Current Stability	5,0 uAmps
PreRun Voltage	15,0 kVolts
PreRun Time	180 sec
Injection Voltage	1,6 kVolts
Injection Time	15 sec
Voltage Number of Steps	30 nk
Voltage Step Interval	15 sec
Data Delay Time	250 sec
Run Voltage	13,4 kVolts
Run time	2800 sec

Tableau 6. Paramètres de passage des échantillons sur séquenceur capillaire

Enfin, les résultats sont analysés en première intention avec le logiciel GeneMapper®. Cette étape préalable permet de vérifier l'absence de contamination des contrôles négatifs (H₂O et ARN sans TI), et la présence de pics dans les tailles attendues (entre 80 et 125 paires de bases). La génération des résultats finaux (score, prédiction, représentation graphique et expression individuelle des gènes) se fait via le logiciel *RT-MLPA processor*, disponible en téléchargement gratuit (<http://bioinformatics.ovsa.fr/MLPA>).

V.5. Adaptations réalisées

Certaines adaptations étaient nécessaires lors de développement de la RT-MLPA au laboratoire, notamment concernant les paramètres de passage des échantillons sur le séquenceur capillaire. Le pôle Biologie de l'hôpital Henri Mondor privilégie une mise en commun des moyens techniques par l'organisation d'une plateforme de séquençage gérée par le département de génétique. L'homogénéisation des pratiques est donc de mise pour la fluidité du passage des échantillons. Les paramètres utilisés sur notre plateforme différaient grandement de ceux choisis par l'équipe du Centre Henri Becquerel de Rouen en terme de temps d'injection.

Ces différences nous ont amené à diluer nos produits de PCR avant injection alors qu'ils étaient utilisés purs dans le protocole initial. Plusieurs dilutions ont été testées pour arriver à obtenir un résultat optimal. La dilution finale des produits de PCR a été fixée à 1/60^e pour éviter une saturation du signal de fluorescence. De même, il a fallu diviser par dix la quantité de marqueur de taille utilisé pour éviter de subir des problèmes d'alignement par le logiciel RT-MLPA Processor (0,1 µL de GS400 ROX HD par puits contre 1 µL dans le protocole publié).

V.6. Statistiques

Les analyses statistiques ont été menées sur les logiciels Excel (Microsoft Office®) et sur le logiciel d'analyse statistique R (70). La classification ascendante hiérarchique de l'expression des huit gènes discriminants utilise la méthode de Ward. La corrélation entre la qualité des ARN extraits et l'expression des gènes a été testée à l'aide de la méthode non paramétrique de Spearman. Les concordances des résultats (inter-opérateurs, inter-laboratoires et suivant le type d'échantillon) ont été évaluées par la méthode graphique de Bland & Altman (71).

VI. Résultats

VI.1. Lignées cellulaires

Les résultats des lignées de LBMP ont confirmé le profil d'expression génique similaire au GCB de cette catégorie de lymphome, deux des trois lignées étant classées dans ce groupe par le logiciel alors que la dernière tombait dans le groupe inclassable.

Les résultats des lignées de DLBCL montrent une concordance de 9 sur 11 comparés aux sous-types définis dans la littérature. Les 2 discordances concernent des lignées décrites comme GCB et interprétées par la RT-MLPA comme inclassable pour une d'entre elles (OCILY7) et ABC pour une autre (NUDHL1). Cependant, le score obtenu avec la lignée SUDHL6 était à la limite entre les groupes inclassable et GCB et l'échantillon était parfois classé inclassable en reproduisant la technique (figure 23).

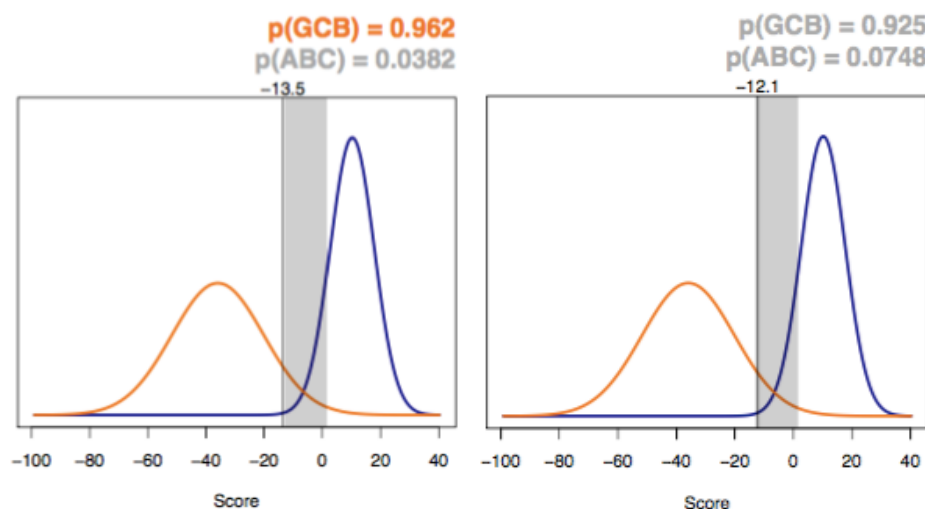


Figure 23. Différentes conclusions obtenus avec le même échantillon (SUDHL6) lorsque le score est à la limite du seuil de décision.

VI.2. Echantillons d'Henri Mondor

VI.2.1. Vérification de la cohérence du modèle

Nous avons testé la cohérence du modèle développé par l'équipe du Centre Henri Becquerel en réalisant une classification hiérarchique ascendante des 8 gènes nécessaires au sous-typage à partir des données d'expression génique obtenues sur les 39 échantillons (figure 24).

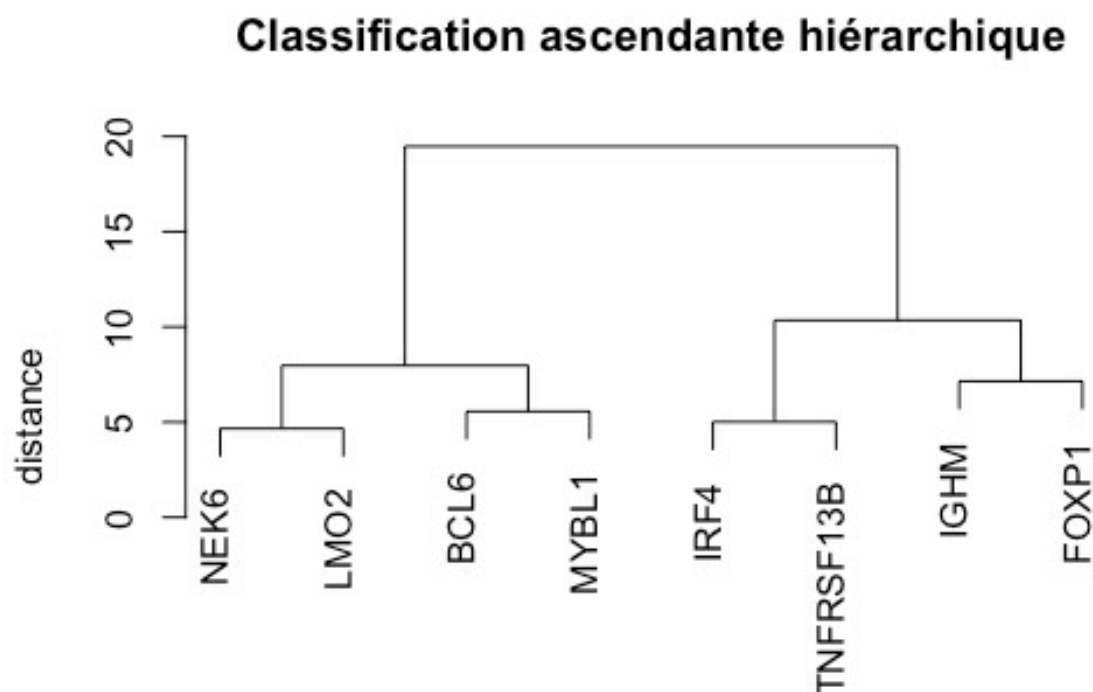


Figure 24. *Classification ascendante hiérarchique des 8 gènes utilisés pour la classification GCB/ABC par RT-MLPA*

La classification hiérarchique obtenue groupe bien les 8 gènes selon leur expression préférentielle dans le sous-type ABC ou GCB. Les signatures d'expression génique caractéristiques sont donc bien conservées dans nos échantillons.

VI.2.2. Effet de la qualité de l'ARN extrait

Le RIN obtenu sur 15 des 19 échantillons de tissus congelés permet d'apprécier la qualité variable l'ARN extrait. Ce score allant de 0 à 10 est déterminé par une technique d'électrophorèse de l'ARN. Il n'existe pas de valeur seuil d'un ARN de bonne qualité, le fournisseur recommande de déterminer une telle valeur en fonction des tests pratiqués en aval. Les RIN vont de 3,7 à 8,4, leur répartition est représentée dans la figure 25.

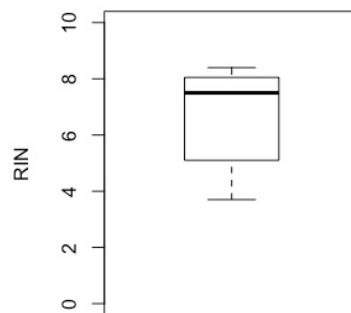


Figure 25. Boîte à moustaches représentant la répartition des RIN pour les ARN issus de tissus congelés

L'effet de la qualité de l'ARN sur l'expression individuelle de chaque gène a été étudié par des tests de corrélations dont les résultats et conclusions sont présentés dans le tableau 7.

Gènes	Rho	p-value	Conclusion
NEK6	-0,3685	0,18	NS
IRF4	0,0893	0,75	NS
IGHM	-0,0429	0,88	NS
CCND1	-0,0465	0,87	NS
LMO2	-0,5000	0,06	NS
FOXP1	0,1679	0,55	NS
TNFRSF9	0,0286	0,92	NS
BCL6	-0,2824	0,31	NS
TNFRSF13	0,0340	0,90	NS
CCND2	0,0071	0,98	NS
MYC	-0,0661	0,81	NS
MYBL1	-0,2115	0,45	NS
BCL2	0,1573	0,58	NS
MS4A1	-0,2036	0,47	NS

Tableau 7. Test de corrélations de Spearman entre l'expression génique et le RIN (NS : Non Significatif)

Aucun des gènes ne possède de corrélation significative avec le RIN mesuré. La mesure de l'expression génique par RT-MLPA est donc indépendante de la qualité de l'ARN jusqu'à des RIN inférieurs à 4.

VI.2.3. Comparaison de la RT-MLPA à l'algorithme de Hans

La totalité des 39 échantillons d'ARN communiqués par le laboratoire d'anatomo-pathologie ont abouti à un résultat interprétable en RT-MLPA. La dégradation de l'ARN classiquement observée sur les tissus FFPE n'empêche donc pas de traiter ce type d'échantillon. Les conclusions obtenues ont été comparées aux résultats d'immunohistochimie disponibles (tableau 8).

Echantillon	Classification Hans	Score RTMLPA sur échantillon FFPE	Classification RTMLPA FFPE	Score RTMLPA sur échantillon congelé	Classification RTMLPA congelé
P609331	GCB	15,6	ABC	10,6	ABC
P639971	GCB	7,2	ABC	8,5	ABC
P585839	GCB	-36,1	GCB	-41,7	GCB
P595288	GCB	-29,5	GCB	-35,3	GCB
P600652	GCB	-34,9	GCB	-42,9	GCB
P641585	GCB	-34,9	GCB	-36,7	GCB
P669608	GCB	-35,3	GCB	-21,1	GCB
P672395	GCB	-19,1	GCB	-17,7	GCB
P650024	GCB	-2,7	<i>Inclassable</i>	-7,3	<i>Inclassable</i>
P655207	GCB	-1,1	<i>Inclassable</i>	-12,1	<i>Inclassable</i>
P558297	NGC	8,6	ABC	12,4	ABC
P580950	NGC	9,1	ABC	-2,6	<i>Inclassable</i>
P582865	NGC	2,6	ABC	-0,4	<i>Inclassable</i>
P616552	NGC	13,6	ABC	9,1	ABC
P647563	NGC	17,8	ABC	15,6	ABC
P653492	NGC	15,2	ABC		
P662614	NGC	13,8	ABC	-1,2	<i>Inclassable</i>
P645194	NGC	-1,0	<i>Inclassable</i>	-12,3	<i>Inclassable</i>
P657669	NGC	-1,5	<i>Inclassable</i>	-11,1	<i>Inclassable</i>
P673134	NGC	-4,7	<i>Inclassable</i>	-12,0	<i>Inclassable</i>

Tableau 8. Tableau comparatif Hans/RT-MLPA pour les tissus FFPE et congelé

Rappel sur l'interprétation des scores RT-MLPA : GCB < -12,9 < Inclassable < 1,957 < ABC

Dans le groupe des tissus FFPE, parmi les 10 échantillons typés GCB par l'algorithme de Hans, 6 sont typés de la même manière par RT-MLPA, les 4 autres se répartissent en 2 ABC et 2 inclassables. Sur les 10 autres échantillons classés non-GCB par l'algorithme de Hans, tous sont confirmés dans ce résultat (7 ABC et 3 inclassables).

Les échantillons appariés congelés et FFPE montrent les mêmes conclusions dans le groupe des GCB par Hans. Néanmoins, les résultats dans le groupe des ABC par Hans montrent une répartition modifiée des ABC et inclassables (3 ABC et 6 inclassables).

VI.2.4. Comparaison échantillons FFPE et congelés

Comme observé sur le tableau comparatif, trois échantillons ont une conclusion différente entre le tissu FFPE et le tissu congelé (figure 27). Dans les trois cas de figures, les échantillons sont classés ABC sur le tissu FFPE et Inclassable sur le tissu congelé. Ces autres conclusions restent en accord avec le résultat d'immunohistochimie puisque les deux font partie du groupe non-GCB de l'algorithme de Hans.

Les scores présentent des variations relativement importantes avec un biais de +3,8 en faveur des échantillons issus de tissus FFPE et certains scores affichant des différences de 15 unités pour un même patient (figure 26).

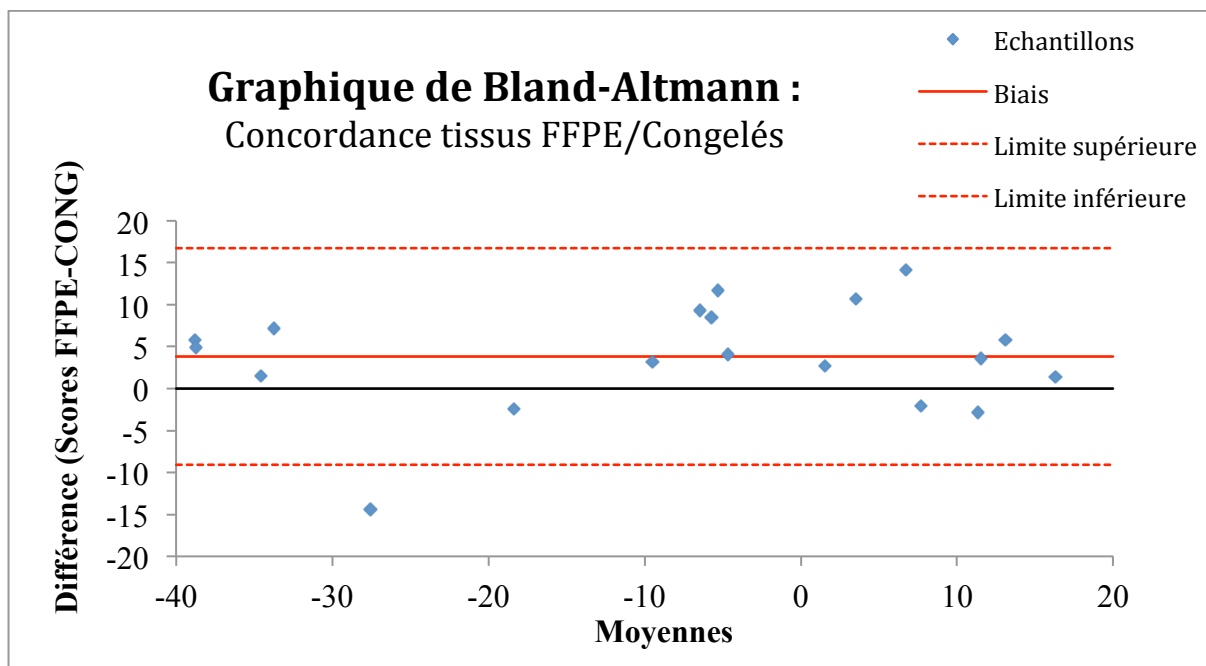


Figure 26. Graphique de Bland-Altman évaluant la concordance des scores entre les tissus FFPE et les tissus congelés

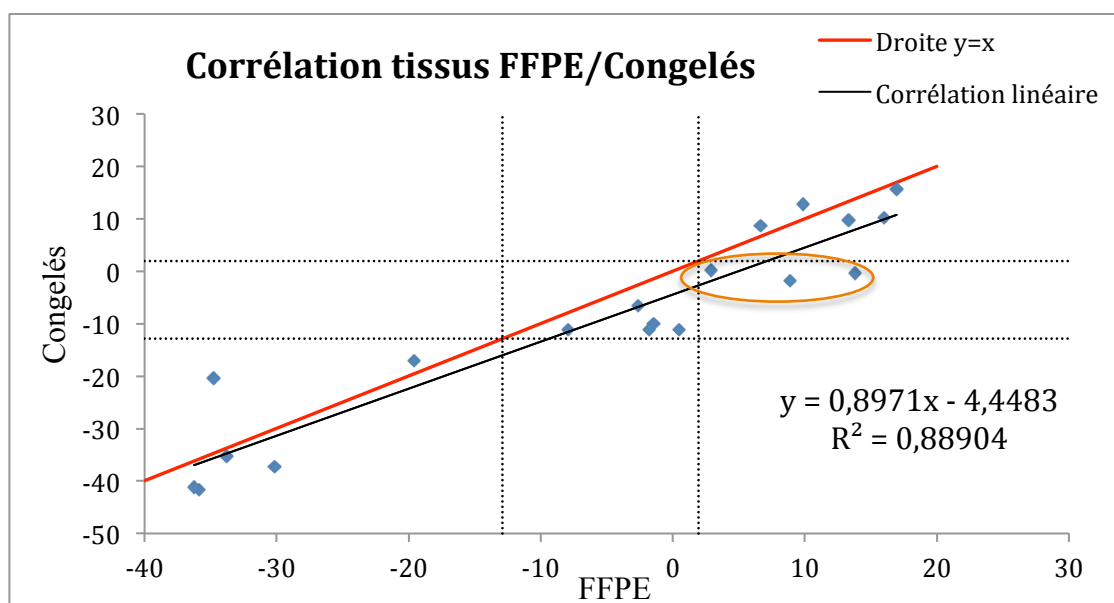


Figure 27. Corrélation des scores et conclusions obtenues selon le traitement subi par l'échantillon
Les trois échantillons discordants sont entourés en orange

Les données de niveaux d'expressions géniques ont été analysées entre ces groupes. Cette étude a mis en évidence une expression différente de certains gènes expliquant les plus grandes variations sur les scores (figure 28). Ainsi l'expression des gènes IGHM, CCND1, CCND2 et MYC est majorée dans les échantillons FFPE comparés aux échantillons congelés alors que les gènes TNFRSF9 et MS4A1 ont une expression relative plus importante dans les échantillons congelés.

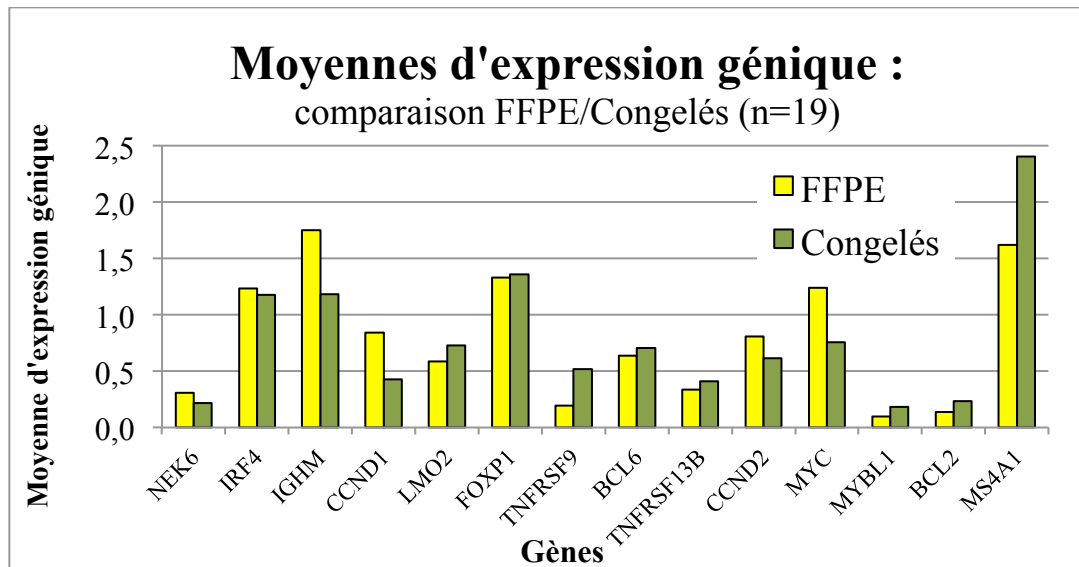


Figure 28. Comparaison des moyennes d'expression génique selon le traitement subi par l'échantillon

VI.2.5. Expression de MYC et BCL2

Il nous a paru pertinent de comparer les données d'expression génique de MYC et BCL2 obtenues par RT-MLPA à l'expression mesurée par immunohistochimie lorsque celle-ci était disponible (figure 29). En effet, les double-expresseurs MYC/BCL2 présentent un pronostic sévère selon la littérature (47). La distinction de ces phénotypes particuliers pourrait donc revêtir un intérêt pour les cliniciens. Les seuils d'hyper-expression de ces deux gènes donnés dans la publication de la technique ont été fixés sur une cohorte de patients en fonction de la différence de pronostic entre les double-expresseurs et les autres. N'ayant pas un nombre d'échantillons suffisant, nous avons repris ces valeurs (1,284 pour MYC et 0,256 pour BCL2). Les seuils d'hyper-expression en immunohistochimie sont de 40% pour MYC et 50% pour BCL2.

	MYC			BCL2		
	RT-MLPA		IHC	RT-MLPA		IHC
	Congelé	FFPE		Congelé	FFPE	
P558297	NON	OUI		OUI	NON	OUI
P580950	NON	OUI		NON	NON	NON
P582865	NON	OUI		OUI	OUI	OUI
P585839	NON	OUI		NON	NON	NON
P595288	NON	NON		NON	NON	OUI
P600652	NON	OUI		OUI	OUI	OUI
P609331	NON	NON		NON	NON	OUI
P616552	NON	OUI		NON	NON	NON
P639971	NON	NON		NON	NON	OUI
P641585	NON	NON		NON	NON	NON
P645194	NON	OUI		NON	NON	OUI
P647563	NON	NON	NON	NON	NON	NON
P650024	NON	OUI	OUI	OUI	NON	OUI
P655207	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
P657669	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
P662614	NON	NON	NON	OUI	OUI	OUI
P669608	NON	OUI	OUI	NON	NON	NON
P672395	NON	NON	NON	NON	NON	OUI
P673134	NON	OUI	OUI	OUI	OUI	OUI

Tableau 9. Hyper-expression des gènes MYC et BCL2 évaluée par RT-MLPA sur tissus congelés et FFPE et par IHC. NON : absence d'hyperexpression. OUI : présence d'hyperexpression

La discordance de l'expression de MYC entre les échantillons Congelé et FFPE était attendue compte tenue de la variabilité d'expression de ce gène suivant le type de traitement des tissus. Au contraire les résultats sont identiques entre la RT-MLPA sur tissus FFPE et l'IHC pour les 11 échantillons ayant des résultats disponibles.

L'expression de BCL2 est quant à elle plus reproductible en RT-MLPA mais très divergente avec les résultats d'IHC. La RT-MLPA affiche 4 à 6 hyper-expresses de BCL2 contre 13 en IHC. Ces différences peuvent néanmoins largement être expliquées par le seuil variable et subjectif de ces deux techniques.

VI.3. Comparaisons inter-laboratoires

VI.3.1. Comparaison Henri-Mondor/Centre Henri Becquerel (Rouen)

Les résultats des huit ADNc fournis par l'équipe de Rouen démontrent une excellente concordance entre les deux équipes. En effet, les huit conclusions rendues sont identiques avec des scores de décision très proches (tableau 10, figure 29). Les niveaux d'expressions des 14 gènes cibles sont également très similaires.

Fichier	Score	p (ABC)	p (GCB)	Conclusion
10181 Creteil.fsa	-39,9	0,0000	1,0000	GCB
10181 Rouen.fsa	-38,9	0,0000	1,0000	GCB
10401 Creteil.fsa	14,0	0,9963	0,0037	ABC
10401 Rouen.fsa	13,7	0,9962	0,0038	ABC
10599 Creteil.fsa	-39,3	0,0000	1,0000	GCB
10599 Rouen.fsa	-39,2	0,0000	1,0000	GCB
11222 Creteil.fsa	16,5	0,9973	0,0027	ABC
11222 Rouen.fsa	17,5	0,9975	0,0025	ABC
11573 Creteil.fsa	-39,6	0,0000	1,0000	GCB
11573 Rouen.fsa	-39,5	0,0000	1,0000	GCB
12639 Creteil.fsa	-11,9	0,0805	0,9195	Inclassable
12639 Rouen.fsa	-11,6	0,0941	0,9059	Inclassable
12855 Creteil.fsa	-6,2	0,5334	0,4666	Inclassable
12855 Rouen.fsa	-5,2	0,6333	0,3667	Inclassable
11061 Creteil.fsa	13,5	0,9961	0,0039	ABC
11061 Rouen.fsa	13,0	0,9958	0,0042	ABC

Tableau 10. Tableau comparatif des résultats obtenus par le laboratoire d'Immunologie (Créteil) et le centre Henri Becquerel (Rouen).

Sont présentés le score, la probabilité d'appartenir au groupe ABC ($p(ABC)$) ou au groupe GCB ($p(GCB)$) et la conclusion rendue par le logiciel.

Cette comparaison a été suivie d'un échange en sens inverse puisque nous avons envoyé à Rouen 20 échantillons d'ADNc issus de tissus FFPE extraits à Créteil. Là encore, la concordance des conclusions rendues était quasiment parfaite puisqu'un seul échantillon était discordant. Il s'agissait cependant d'un échantillon à la limite du seuil entre ABC et Inclassable.

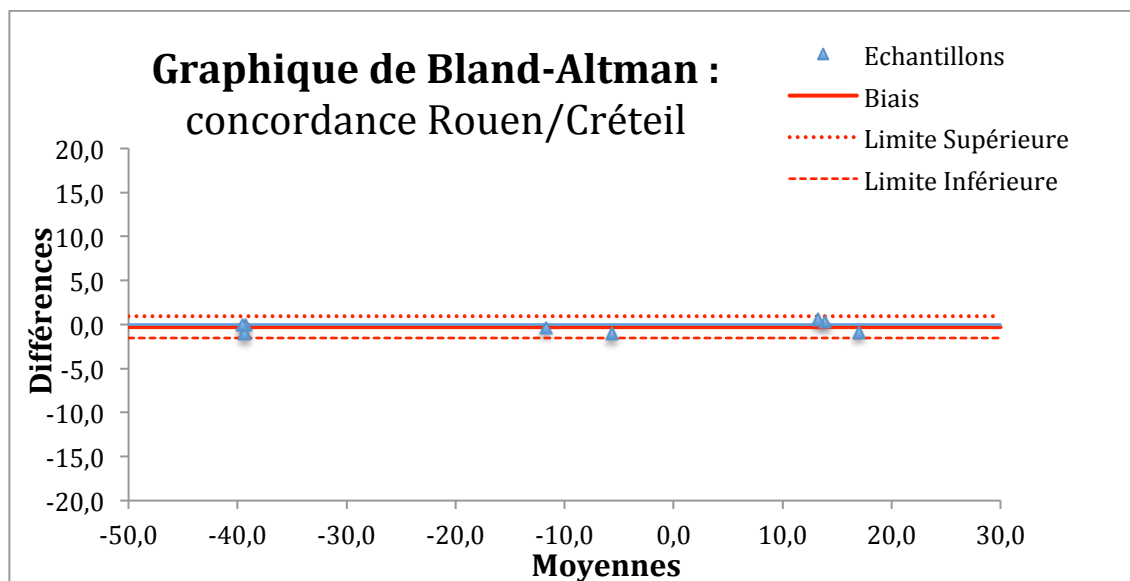


Figure 29. Graphique de Bland-Altman évaluant la concordance entre les résultats obtenus par le laboratoire et l'équipe de Rouen

VI.3.2. Comparaison inter-laboratoires

Plusieurs centres français développent la RT-MLPA selon la technique mise au point par Rouen. Une comparaison inter-laboratoire multi-centrique a été lancée par Rouen. Sept échantillons d'ADNc ont été envoyés en parallèle pour typage dans chaque centre. Les résultats préliminaires sur 4 des participants (Rouen, Créteil, Strasbourg, Lille) sont très encourageants puisque tous les échantillons présentent la même conclusion quel que soit le site (tableau 11).

ARN	Rouen		Strasbourg		Créteil		Lille	
	score	conclusion	score	conclusion	score	conclusion	score	conclusion
10401	11,67	ABC	12,70	ABC	14,53	ABC	8,80	ABC
10599	-35,85	GCB	-37,90	GCB	-38,97	GCB	-38,80	GCB
11222	12,21	ABC	13,40	ABC	16,87	ABC	8,95	ABC
12639	-8,72	Inclassable	-9,69	Inclassable	-10,01	Inclassable	-10,10	Inclassable
12855	-2,46	Inclassable	-4,19	Inclassable	-6,66	Inclassable	-8,60	Inclassable
11061	13,86	ABC	14,90	ABC	16,26	ABC	12,30	ABC
16393	-43,76	GCB	-50,30	GCB	-55,80	GCB	-49,30	GCB

Tableau 11. Tableau comparatif des résultats de la comparaison inter-laboratoires

VI.4. Validation de méthode

VI.4.1. Répétabilité

La répétabilité de la méthode a été évaluée sur deux échantillons (un GCB et un ABC). Chacun d'entre eux ont été répétés sept fois. Les coefficients de variations sur les scores de décisions étaient de 7,7% pour l'échantillon classé ABC et 10,1% pour l'échantillon classé GCB.

VI.4.2. Reproductibilité inter-opérateurs

La reproductibilité de cette technique a été testée avec deux opérateurs différents sur la totalité des 39 échantillons, de la reverse transcription à l'analyse des résultats finaux (figure 30). Le graphique de Bland-Altman montre une excellente concordance des résultats obtenus par deux opérateurs différents avec un biais sur le score très minime (+ 0,96).

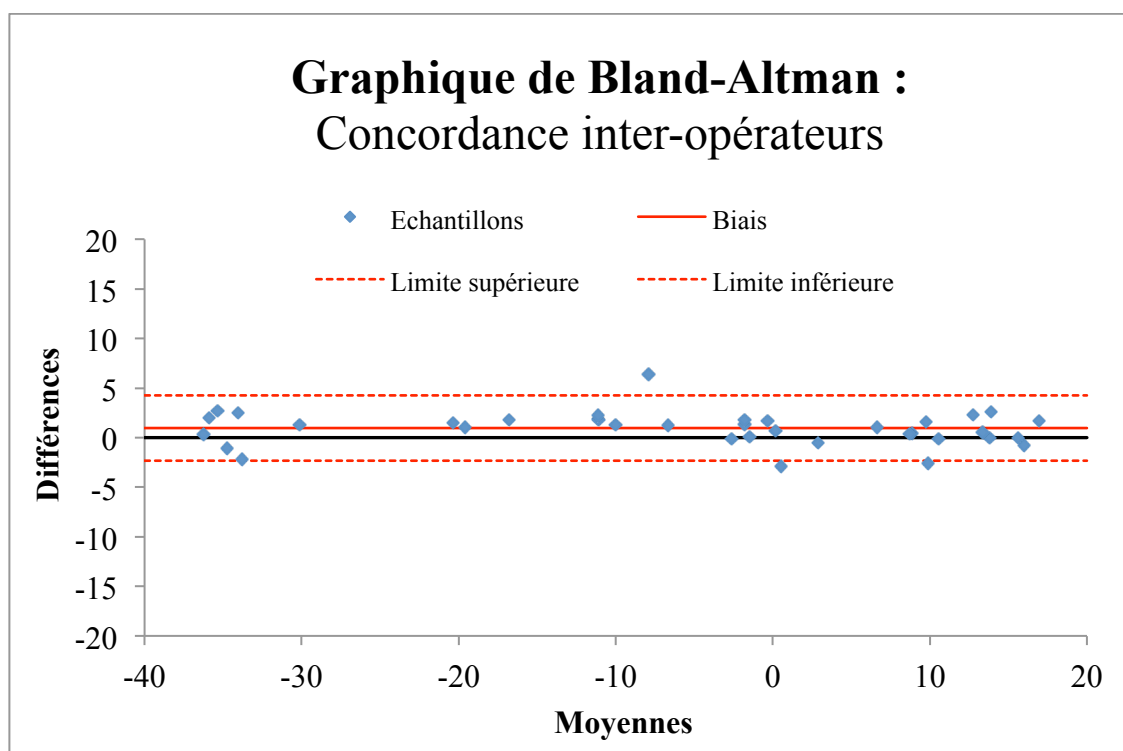


Figure 30. *Graphique de Bland-Altman évaluant la concordance inter-opérateurs*

Un examen plus approfondi au niveau de l'expression individuelle des 14 gènes confirme la reproductibilité de la technique puisque toutes les moyennes d'expression sont graphiquement équivalentes quel que soit l'opérateur (figure 31).

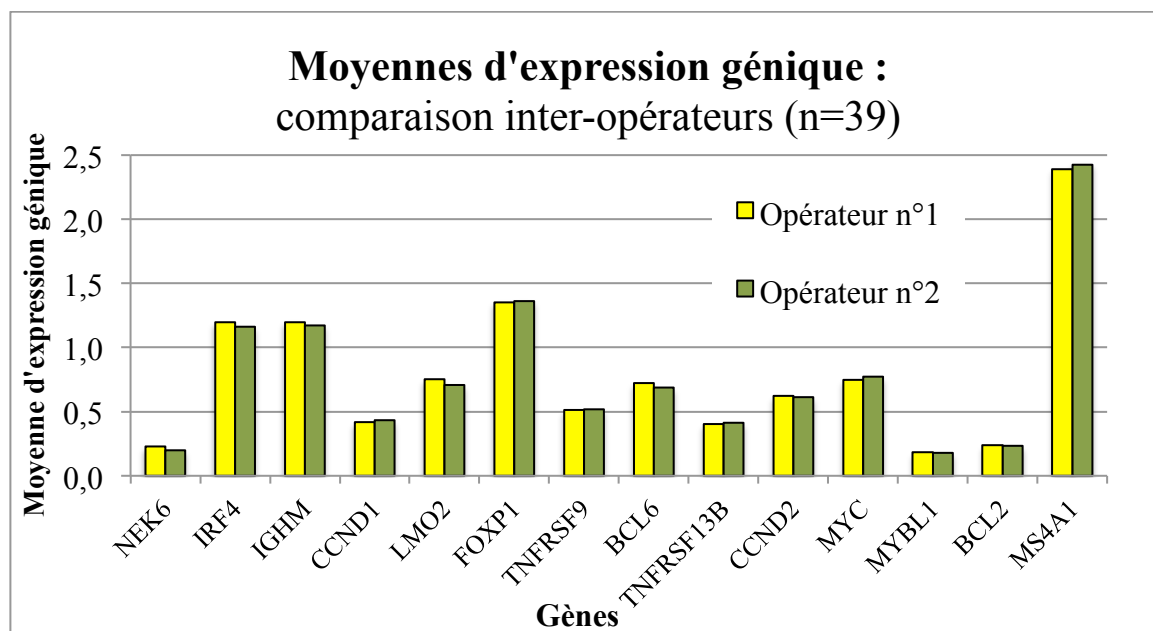


Figure 31. Comparaison des moyennes d'expression génique obtenues par deux opérateurs différents

VI.4.3. Quantité minimale d'ARN

La quantité recommandée d'ARN pour la RT-MLPA est de 1000ng pour l'étape de RT, une quantité importante étant primordiale pour une RT aussi efficace que possible. De plus, une grande quantité d'ARN assure une représentativité des différents ARN présents dans les cellules. La suite de la technique se fait avec 5 des 12,5 μ L d'ADNc produits, ce qui ramène donc la quantité à un équivalent de 400ng d'ARN. Ce cas idéal ne sera certainement pas toujours possible en routine où plusieurs analyses différentes devront être effectuées sur un même prélèvement.

Il est donc nécessaire de fixer la quantité minimale d'ARN à utiliser pour assurer un résultat interprétable et reproductible. Pour connaître cette information, deux échantillons typiques ont été sélectionnés, un GCB et un ABC (respectivement P585839 et P558297 issus des tissus FFPE). Les ARN ont été préalablement dilués à une concentration de 200 ng/μL puis ont subi une dilution en cascade d'un facteur 2. Sur cette gamme de 8 dilutions, les quantités initiales d'ARN utilisées s'étalonnent donc de 800 ng à 6,25 ng, le volume utilisé étant de 4μL.

Les résultats semblent *a priori* très robustes jusqu'à l'avant dernier point, la dernière dilution de l'échantillon P585839 n'est pas interprétable par le logiciel et celle de l'échantillon P558297 change de conclusion par rapport aux précédentes (tableau 12). L'analyse de la variation du score montre cependant une fluctuation plus précoce dans la gamme de dilution (figure 32).

	Echantillon P585839							
Quantité d'ARN (ng)	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25
Score	-36,3	-32,9	-33,8	-38,7	-29,8	-28,8	-44,7	NA
p (ABC)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	NA
p (GCB)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	NA
Conclusion	GCB	GCB	GCB	GCB	GCB	GCB	GCB	NA

	Echantillon P558297							
Quantité d'ARN (ng)	800	400	200	100	50	25	12,5	6,25
Score	11,1	8,5	8,9	6,9	8,5	14,1	15,1	-0,4
p (ABC)	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	1,00	1,00	0,91
p (GCB)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,09
Conclusion	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	ABC	Inclassable

Tableau 12. Comparaison des résultats obtenus avec des quantités décroissantes d'ARN pour deux échantillons différents (NA : Non Alignable)

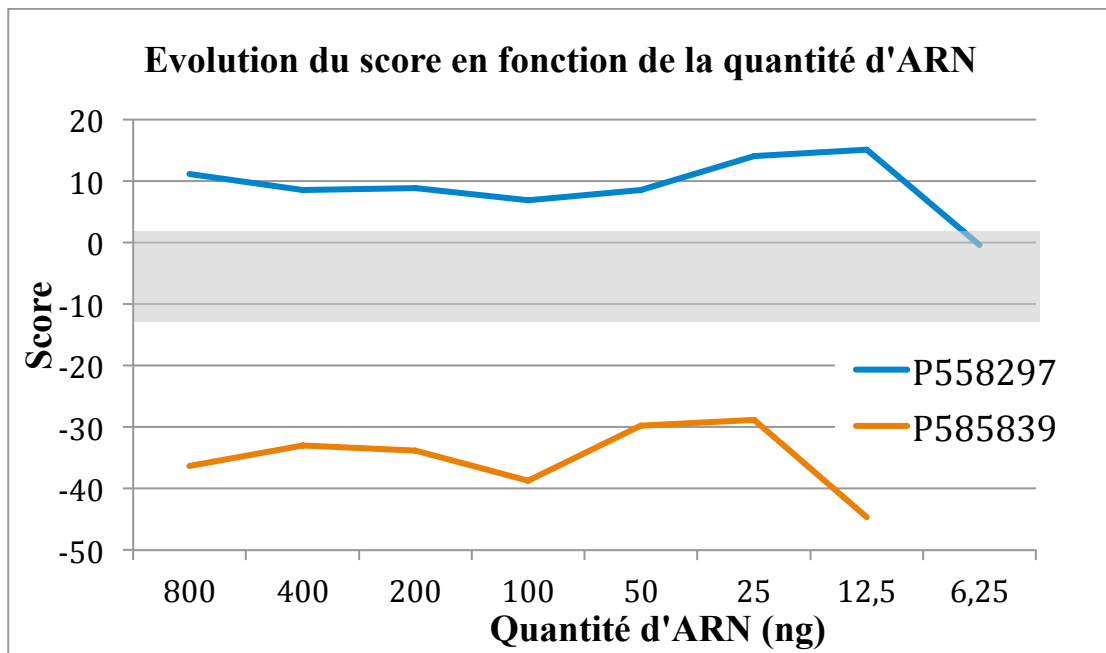


Figure 32. Evolution du score en fonction de la quantité d'ARN initiale

L'évolution de l'expression individuelle de chaque gène cible est elle aussi particulièrement intéressante puisqu'elle permet de détecter un seuil limite de 100 ng à partir duquel la variabilité augmente de façon importante (figure 33). La concentration minimale pour assurer des résultats valables se situerait donc à 25 ng/μL. La visualisation des représentations graphiques produites par le logiciel (Annexe 2) confirme la « non-interprétabilité » des résultats au-delà de cette quantité minimale.

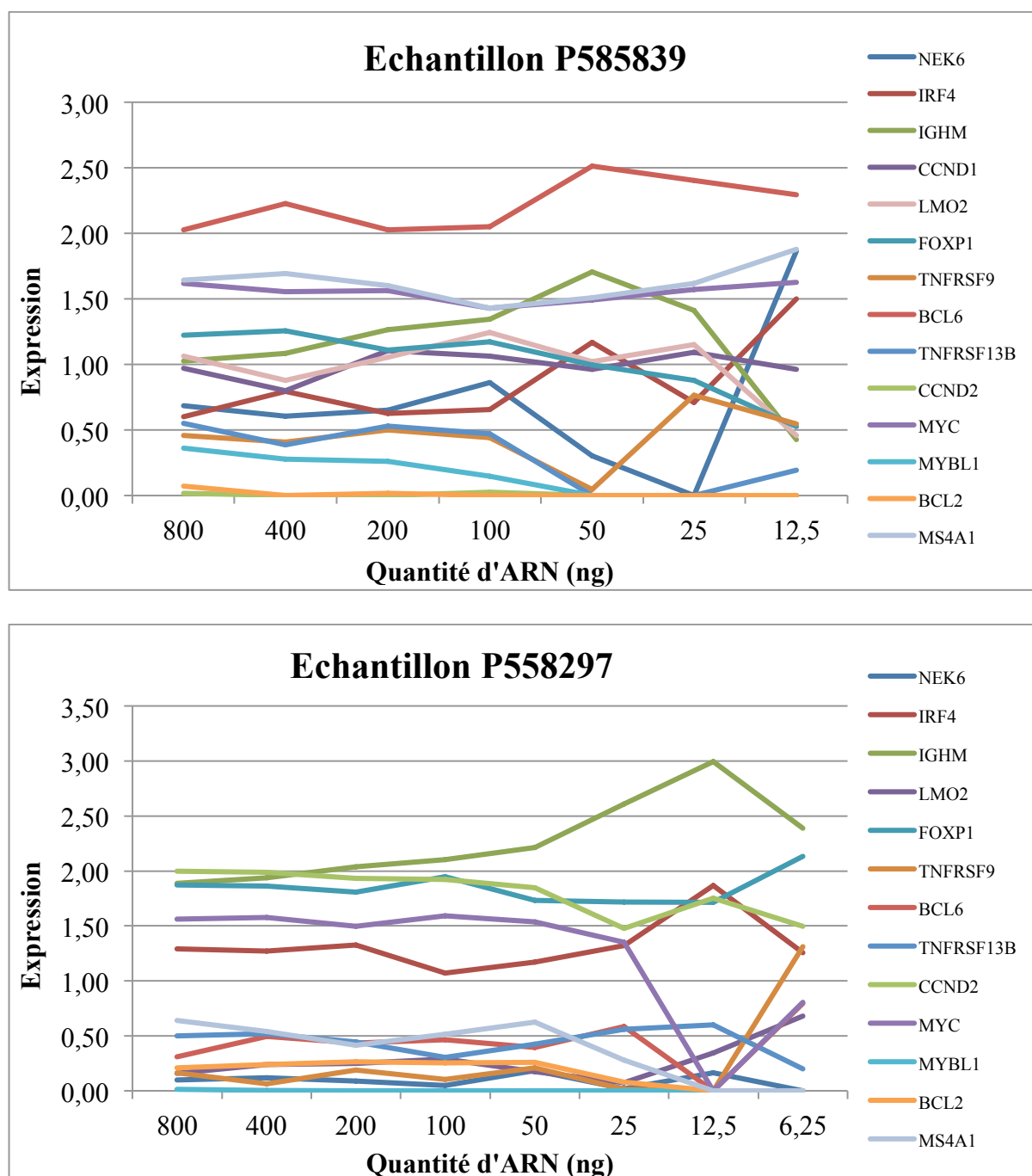


Figure 33. Evolution comparée de l'expression des 14 gènes cibles en fonction de la quantité d'ARN

VI.4.4. Changement du réactif de PCR finale

L'utilisation du réactif de PCR ReddyMix nous a été recommandée par l'équipe ayant mis au point cette technique. Néanmoins, notre laboratoire a l'habitude de travailler avec le fournisseur Qiagen qui commercialise lui aussi un réactif de PCR multiplexe. En plus d'être deux fois plus cher (tableau 13), le ReddyMix a l'inconvénient de ne pas faire partie du marché de réactifs de l'Assistance Publique – Hôpitaux de Paris (AP-HP). La commande de ce type de réactif doit donc se justifier au préalable.

Coût par échantillon			
Etapes	Réactifs	PCR ReddyMix	PCR Qiagen
RT	dNTP	0,02	0,02
	Amorces hexamères	0,27	0,27
	TI	0,68	0,68
Hybridation	Tampon MLPA	0,30	0,30
	Mélange de sondes	0,0002	0,0002
Ligation	Tampon A Ligase	0,15	0,15
	Tampon B Ligase	0,15	0,15
	Ligase	0,88	0,88
PCR	Réactif de PCR	1,15	0,65
	Amorce U1	0,01	0,01
	Amorce U2-FAM	0,02	0,02
Electrophorèse capillaire	GS400 ROX HD	0,03	0,03
	Formamide	0,20	0,20
Coût total par échantillon		3,84 €	3,34 €

Tableau 13. Comparatif du coût en réactifs par échantillon avec les réactifs de PCR Reddymix ou Qiagen

Pour ces raisons, nous avons décidé de comparer les résultats obtenus avec les deux réactifs sur les 39 échantillons (figure 34). Le début de la technique est identique puisque ces réactifs interviennent uniquement au moment de la PCR finale. Nous avons donc repris les mêmes produits de ligation pour diminuer les autres causes de variabilité. Ces manipulations ont été effectuées par le même opérateur.

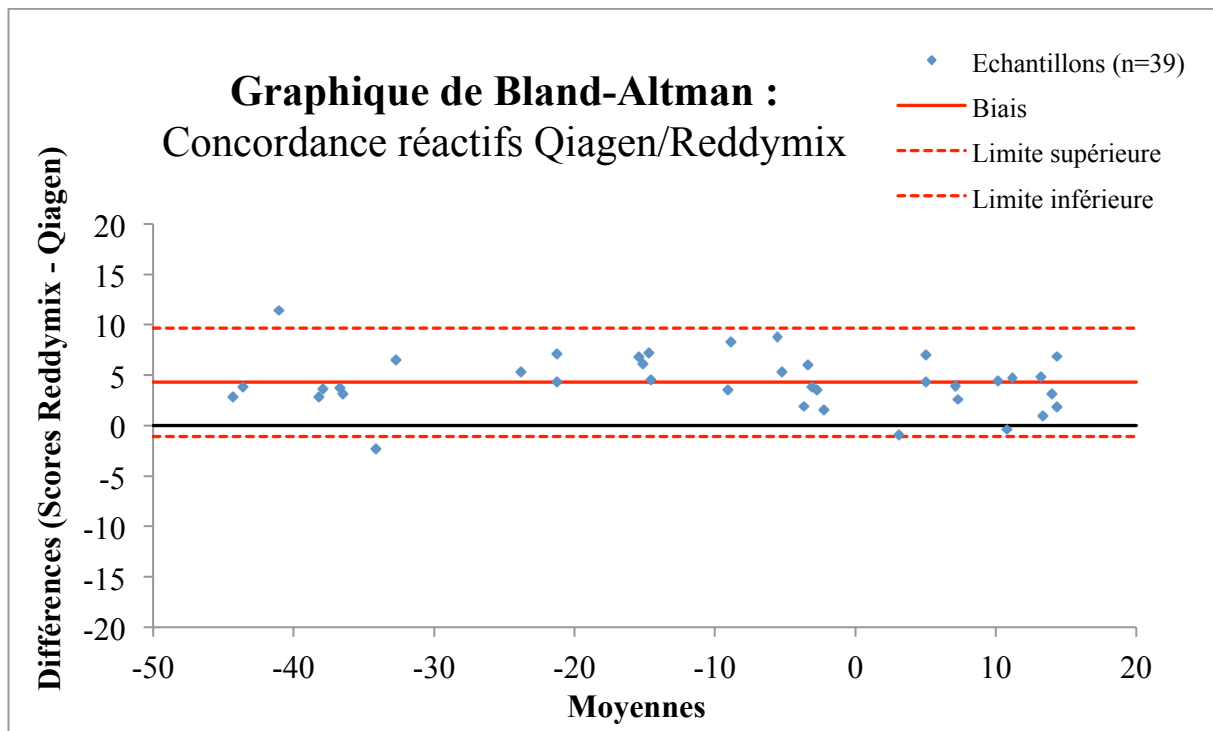


Figure 34. Graphique de Bland-Altman évaluant la concordance entre les réactifs de PCR Reddymix et Qiagen

L'analyse montre un biais positif de +4,28 sur les scores, le réactif de Qiagen a donc tendance à sous-évaluer le score par rapport au ReddyMix. On peut donc s'attendre à une plus grande proportion d'échantillons classés GCB avec le réactif de Qiagen.

Les résultats obtenus montrent qu'avec ce changement de réactif, 6 des 39 échantillons aboutissent à une conclusion différente (tableau 14). Cinq d'entre eux concernent un changement du groupe inclassable (avec le Reddymix) vers un groupe GCB (avec le réactif de Qiagen), le dernier est un échantillon classé ABC (avec le Reddymix) devenant inclassable (avec le réactif de Qiagen). Ces six changements sont la résultante d'une diminution globale des scores de RT-MLPA.

Etonnement, quatre de ces six déclassements ont lieu dans le groupe des échantillons classés non-GCB par Hans, diminuant ainsi le pourcentage de concordance entre la RT-MLPA et l'immunohistochimie. A noter que ces modifications ne se répercutent pas forcément de façon symétrique sur les échantillons FFPE et congelés, ce qui a pour effet de dépareiller certains couples d'échantillons auparavant en accord.

Echantillons	Type	score_R	score_Q	classe_R	classe_Q	HANS
P585839	Congelé	-41,7	-45,5	GCB	GCB	GCB
P585839	FFPE	-36,1	-39,7	GCB	GCB	GCB
P595288	Congelé	-35,3	-46,8	GCB	GCB	GCB
P595288	FFPE	-29,5	-36,0	GCB	GCB	GCB
P600652	Congelé	-42,9	-45,7	GCB	GCB	GCB
P600652	FFPE	-34,9	-38,0	GCB	GCB	GCB
P609331	Congelé	10,6	11,0	ABC	ABC	GCB
P609331	FFPE	15,6	12,4	ABC	ABC	GCB
P639971	Congelé	8,5	1,5	ABC	Inclassable	GCB
P639971	FFPE	7,2	2,9	ABC	ABC	GCB
P641585	Congelé	-36,7	-39,6	GCB	GCB	GCB
P641585	FFPE	-34,9	-38,6	GCB	GCB	GCB
P650024	Congelé	-7,3	-10,8	Inclassable	Inclassable	GCB
P650024	FFPE	-2,7	-4,6	Inclassable	Inclassable	GCB
P655207	Congelé	-12,1	-18,2	Inclassable	GCB	GCB
P655207	FFPE	-1,1	-10,0	Inclassable	Inclassable	GCB
P669608	Congelé	-21,1	-26,4	GCB	GCB	GCB
P669608	FFPE	-35,3	-33,0	GCB	GCB	GCB
P672395	Congelé	-17,7	-24,8	GCB	GCB	GCB
P672395	FFPE	-19,1	-23,4	GCB	GCB	GCB
P558297	Congelé	12,4	7,9	ABC	ABC	NGC
P558297	FFPE	8,6	6,0	ABC	ABC	NGC
P580950	Congelé	-2,6	-7,9	Inclassable	Inclassable	NGC
P580950	FFPE	9,1	5,2	ABC	ABC	NGC
P582865	Congelé	-0,4	-6,4	Inclassable	Inclassable	NGC
P582865	FFPE	2,6	3,6	ABC	ABC	NGC
P616552	Congelé	9,1	5,2	ABC	ABC	NGC
P616552	FFPE	13,6	8,8	ABC	ABC	NGC
P645194	Congelé	-12,3	-16,8	Inclassable	GCB	NGC
P645194	FFPE	-1,0	-4,5	Inclassable	Inclassable	NGC
P647563	Congelé	15,6	10,8	ABC	ABC	NGC
P647563	FFPE	17,8	11,0	ABC	ABC	NGC
P653492	FFPE	15,2	13,4	ABC	ABC	NGC
P657669	Congelé	-11,1	-18,3	Inclassable	GCB	NGC
P657669	FFPE	-1,5	-3,0	Inclassable	Inclassable	NGC
P662614	Congelé	-1,2	-5,0	Inclassable	Inclassable	NGC
P662614	FFPE	13,8	12,8	ABC	ABC	NGC
P673134	Congelé	-12,0	-18,8	Inclassable	GCB	NGC
P673134	FFPE	-4,7	-13,0	Inclassable	GCB	NGC

Tableau 14. Tableau comparatif des conclusions obtenues en RT-MLPA selon le réactif utilisé et en IHC
(R : Reddymix, Q : Qiagen)

VII. Discussion

VII.1. Validation de la technique

L'étude que nous avons menée pour la mise en place de la RT-MLPA au laboratoire d'immunologie nous permet d'affirmer la robustesse de cette technique dans le cadre de la classification GCB/ABC du LDGCB. L'excellente concordance inter-opérateurs obtenue que ce soit sur les échantillons d'ARN extraits de tissus FFPE ou congelés apporte une preuve de sa reproductibilité quel que soit le matériel de départ.

La concordance des résultats obtenus entre les tissus FFPE et congelés montre quant à elle plus de variabilité, avec de plus la présence d'un biais de +3,8 en faveur du score sur tissus FFPE. Il est cependant important de signaler que cette variation sur le score n'engendre que peu de modifications au niveau des conclusions finales. En effet, les trois changements de catégories concernent une bascule du groupe ABC (tissus FFPE) vers le groupe inclassable (tissus congelés), ce qui ne perturbe pas le taux de concordance avec l'algorithme de Hans qui classe ces deux groupes en non-GCB. L'augmentation du nombre d'inclassable est cependant à discuter puisqu'ils passent de 5/20 (tissus FFPE) à 8/19 (tissus congelés), alors que les études en trouvent rarement plus de 15 à 20%.

Ces variations importantes des scores sont à interpréter en sachant que les tissus appariés bien que provenant du même patient représentent deux parties différentes de la tumeur. Ainsi les notions d'infiltration et de microenvironnement tumoral doivent être prises en compte dans cette analyse. L'examen histologique reste donc primordial en amont de la technique.

Les résultats de RT-MLPA des 20 échantillons de notre cohorte de patients ont été comparés aux résultats d'immunohistochimie utilisant l'algorithme de Hans, technique de routine du laboratoire d'anatomopathologie d'Henri Mondor. Les quatre échantillons discordants entre les deux techniques appartiennent intégralement au groupe GCB par Hans. Seulement deux d'entre eux aboutissent à une bascule totale vers le groupe ABC, les deux autres étant inclassables. Un pourcentage de concordance égal à 80% est obtenu même en

incluant les inclassables dans le calcul (ce qui est en général peu fait dans les études). Ce taux est tout à fait satisfaisant si l'on considère les différences importantes de méthodologie de ces deux approches. De plus, il est en accord avec ce qui avait été trouvé sur les 100 cas de la série initiale (69).

L'algorithme de Hans est par nature sujet à une variabilité inter-observateur puisque le seuil de 30% attestant la positivité d'un marquage est déterminé en balayant le champ, tout comptage étant impossible en pratique de routine. Il nous a donc paru intéressant de revoir les lames des échantillons de notre cohorte afin de chercher des éléments susceptibles d'expliquer la discordance de certains échantillons.

Les adaptations techniques réalisées ont été mineures mais essentielles pour la fluidité de l'obtention des résultats. Elles concernent surtout la conformation aux paramètres de passage des échantillons sur séquenceur capillaire de la Plateforme Séquençage de l'Hôpital Henri Mondor.

Le test de la quantité minimale d'ARN initial a permis de fixer des critères d'acceptation pré-analytiques des échantillons venant du laboratoire d'anatomopathologie. Le seuil étant de 100 ng, une concentration d'ARN à 25 ng/ μ L sera nécessaire pour que le laboratoire d'immunologie technique le prélèvement. La limite de confiance dans l'interprétation identifiée à 12 ng par Mareschal *et al* nous paraît étonnamment basse. Il est possible que cette divergence soit due au type d'échantillon étudié pour établir le seuil (congelé pour Mareschal *et al*, FFPE pour notre laboratoire). Cependant il nous paraissait plus pertinent d'établir cette quantité minimale sur le type d'échantillon le plus courant en diagnostic et le plus souvent sujet à des variations de qualité de l'ARN extrait.

La comparaison des résultats produits par deux réactifs de PCR différents (Qiagen et Reddymix) montre des résultats assez comparables. Néanmoins, le biais mesuré et les divergences d'interprétation allant à l'encontre du Hans avec le réactif de Qiagen justifient la préférence pour le réactif initial préconisé par l'équipe du centre Henri Becquerel. La différence de prix étant seulement de 0,50 € par échantillon, il nous apparaît peu utile de créer une variabilité supplémentaire. D'autant plus que la mise en place de cette technique a aussi pour but la participation du laboratoire en tant que plateforme technique pour le protocole RT3. Les résultats de RT-MLPA seront fournis par les laboratoires participants (plateformes RT3) et confirmés par Rouen.

Cette étude préliminaire comporte certaines limites. La taille réduite de l'échantillon et les informations partielles concernant le suivi des patients ne permettent pas de vérifier la conservation des groupes pronostiques établis par la classification RT-MLPA. Les résultats n'ont pas pu être comparés à des données de puces à ADN, qui est pourtant le *gold-standard* pour la classification GCB/ABC. Le mélange de sonde, étape essentielle de la technique, nous a été envoyé par l'équipe de Rouen. La commande des sondes et la préparation du mélange par les techniciens de laboratoire du secteur de Biologie Moléculaire seront des étapes critiques à l'avenir. Des tests de concordance devront être mis en place sur des échantillons déjà typés avant l'utilisation en routine du nouveau mélange de sondes.

VII.2. Problématiques actuelles

L'algorithme décisionnel du logiciel de RT-MLPA développé par Sylvain Mareschal produit un score et une probabilité de classement quel que soit le profil de pic obtenu. Ainsi les contrôles négatifs (H₂O et ARN sans TI) sont attribués à un sous-groupe malgré l'absence de pics et un bruit de fond négligeable. De même la dégradation du signal lors du test de dilution en série n'a pas empêché la production d'un résultat jusqu'à la dernière dilution. Cette constatation nous a poussés à mener une réflexion sur les critères de validation de la technique. L'absence du gène de référence MS4A1 n'est pas contributive puisque certains LDGCB ont une expression partielle du CD20. Après examen des profils obtenus avec très peu d'ARN, nous avons retenu le critère du retour à la ligne de base comme critère principal de validation analytique des résultats. De plus, l'intensité du signal doit être au minimum de 500 pour accepter un profil de RT-MLPA. En effet celui-ci doit pouvoir se distinguer du bruit de fond qui peut atteindre une intensité de 200 dans certains cas.

Les différents tests effectués constituent une base préliminaire pour le processus d'accréditation de cette technique selon la norme ISO 15 189. Les réactifs utilisés n'ayant pas le marquage CE-IVD, la validation de la méthode se fera en portée flexible. Il peut être opportun de séparer la technique en processus analytiques (72) puisque certains sont communs à d'autres techniques déjà réalisées au laboratoire (RT, analyse de fragments sur

séquenceur capillaire). La définition d'un contrôle interne de qualité est aussi primordiale. Celui-ci pourra être une lignée déjà caractérisée par le laboratoire. De même, les comparaisons inter-laboratoires comme celle initiée avec Rouen sont à maintenir sur un rythme régulier à l'avenir.

La RT-MLPA se pose en concurrent principal de la société NanoString et de sa solution Lymph2x sur nCounter dont le principe a été détaillé précédemment. Déjà présent sur le domaine du typage tumoral individuel avec le test Prosigna® dans le cancer du sein (73), leur développement intensif dans le domaine du LDGCB s'appuie sur une collaboration avec Celgene®. Cette compagnie qui commercialise le Lenalidomide, souhaite faire du Lymph2x son test compagnon pour les essais cliniques à venir (74). Les caractéristiques de la technique sont tout à fait compatibles avec une utilisation en routine diagnostique. La reproductibilité de la méthode, son économie en temps-technicien et son temps de rendu relativement faible en sont les principaux avantages. Des améliorations sont notamment possibles en terme de multiplexage, le nombre de gènes cibles pouvant aller jusqu'à 800. La construction du test en système fermé et automatisé et les moyens plus importants d'une société privée en font une technique plus facile à accréditer que la RT-MLPA selon la norme ISO 15 189.

Néanmoins la comparaison des coûts de revient entre le Lymph2x et la RT-MLPA pose clairement la question d'un choix raisonné sur le plan financier. En effet si l'on se base sur le test Prosigna® déjà commercialisé, celui-ci revient à 1 500€ par échantillon avec un investissement initial d'environ 200 000€ pour le nCounter, auquel s'ajoute un contrat de maintenance annuelle de 15 000€ (73). Le laboratoire de Biologie médicale spécialisée Biomnis facture actuellement ce test à 1 800€ (non remboursés par la sécurité sociale) (75). Au contraire, la RT-MLPA a un coût en réactifs inférieur à 5 € et un investissement initial nul puisque les appareils utilisés sont ceux qui garnissent actuellement le parc d'automates de n'importe quel laboratoire de biologie moléculaire (thermocycleur et séquenceur capillaire). Dans un contexte économique où la médecine de précision se développe et augmente drastiquement le prix des soins prodigués, il peut être intéressant de préférer une technique avec un rapport coût/efficacité bas, même si cela se traduit par un travail plus profond sur la validation de la méthode.

Le nombre de patients classés dans le groupe inclassable s'est révélé assez important dans notre groupe de patients (25%). Ce taux important, probablement lié à la faible taille de notre échantillon, nous a malgré tout fait réfléchir sur le sort de ces patients, en particulier pour les essais cliniques à venir. Souvent exclus de ceux-ci car n'appartenant pas au groupe étudié et susceptible de répondre au nouveau traitement à tester, la question de l'amélioration de leur prise en charge se pose pourtant. Les données de séquençage laissent à penser que ce groupe défini par exclusion serait plutôt un conglomerat hétérogène incluant des mutations dans les voies de signalisations caractéristiques des sous groupes GCB et ABC (76). La RT-MLPA ne serait donc *a priori* pas suffisante pour aiguiller le traitement de ces cas complexes.

VII.3. Aller plus loin dans la caractérisation ?

La RT-MLPA est un outil ayant l'avantage de pouvoir évoluer dans le temps en ajoutant d'autres gènes cibles aux 14 initiaux, avec, malgré tout, une limite fixée à 40 séquences nucléotidiques. L'équipe de Rouen travaille en permanence à l'amélioration de la technique. Les nouvelles avancées concernent principalement la caractérisation des LBMP qui se différencie par une signature particulière (77). A cela s'ajoute la recherche de mutations ponctuelles récurrentes, notamment la mutation L265P du gène MYD88 (30% des sous-types ABC) et la mutation Y646 du gène EZH2 (23% des sous-types GCB) (78). La recherche de ces variants repose sur le principe qu'un mauvais appariement à proximité du site de ligation empêchera l'action de l'enzyme et conduira à l'absence de signal en RT-MLPA. Ces nouveaux éléments, en plus d'augmenter la précision du score obtenu, pourront avoir une implication directe sur le choix du traitement puisque certaines nouvelles thérapies ciblent ces voies de signalisation dérégulées (56)(79).

Parallèlement au développement de cet outil, l'utilisation du Séquençage de Nouvelle Génération (NGS) se démocratise dans les laboratoires académiques présageant de son utilisation prochaine en routine clinique pour la prise en charge du patient. Cette approche théranostique s'attache à identifier les mutations pertinentes de chaque patient pour choisir la thérapie la mieux adaptée à sa maladie. Dans cette optique, une étude du LYSA a sélectionné 34 gènes d'intérêt constituant le « Lymphopanel » à séquencer par NGS à chaque nouveau

diagnostic de DLBCL (76). Ces gènes ont été choisis d'après des études de Séquençage d'Exome Complet (SEC) sur des DLBCL, ils ciblent 8 voies de signalisation spécifiques présentant un intérêt particulier dans la physiopathologie de ces lymphomes. Il deviendrait alors envisageable d'adapter le traitement en fonction du spectre de mutations ponctuelles découvertes chez un patient ainsi que de prédire l'évolution clinique, certaines mutations ayant un impact individuel sur le pronostic. Cette technique a l'avantage de pouvoir être utilisée sur des tissus FFPE ainsi que sur de l'ADN libre plasmatique circulant (80).

Le Lymphopanel ainsi que la RT-MLPA sont actuellement intégré dans la prise en charge des patients du Centre Henri Becquerel de Rouen. Les résultats des analyses moléculaires sont ainsi discutés dans une Réunion de Concertation Pluridisciplinaire réunissant cliniciens, pathologistes, biologistes et bio-informaticiens. Ces deux tests font partie du panel d'analyses qui composera le protocole RT3.

Conclusion

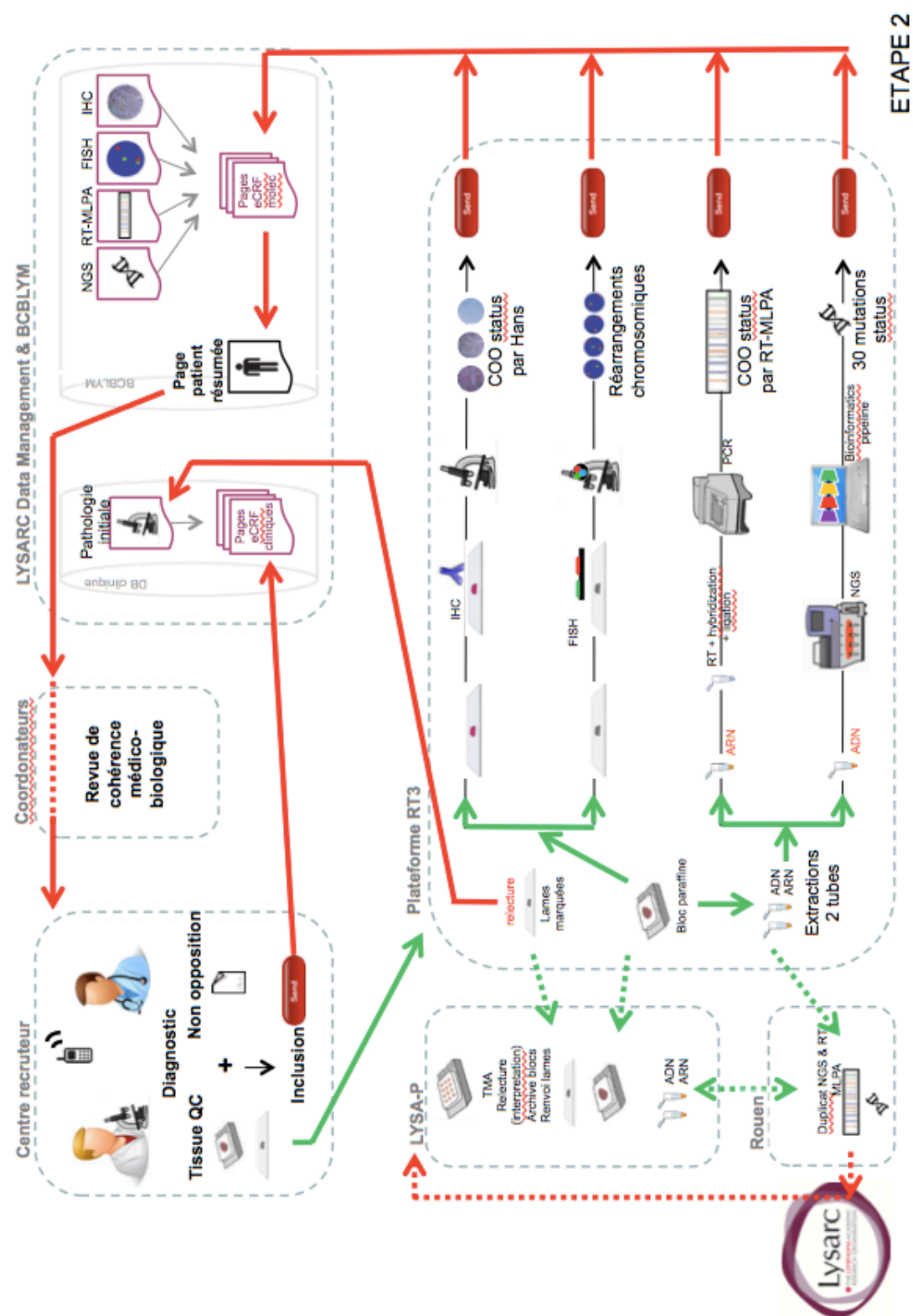
La classification GCB/ABC du LDGCB revêt une importance particulière pour les essais cliniques à venir. Il est par conséquent primordial de pouvoir déterminer ce sous-type dans une pratique de routine. La RT-MLPA est une technique applicable sur l'ARN extrait de tissus FFPE. Elle a de plus l'avantage d'être simple et peu coûteuse.

Notre étude visait à valider son utilisation en routine au laboratoire d'immunologie de l'Hôpital Henri Mondor. Les résultats obtenus confirment la concordance de 80% avec l'algorithme de Hans. La reproductibilité de la technique a été mise en évidence par les excellents résultats des comparaisons inter-laboratoires avec une concordance de 27 des 28 échantillons. Les autres tests nous ont permis de définir la quantité minimale d'ARN pour accepter un prélèvement et d'argumenter le choix du réactif de PCR. Des études plus poussées sont à prévoir sur la corrélation de l'expression des gènes MYC et BCL2 avec les données d'immuno-histochimie.

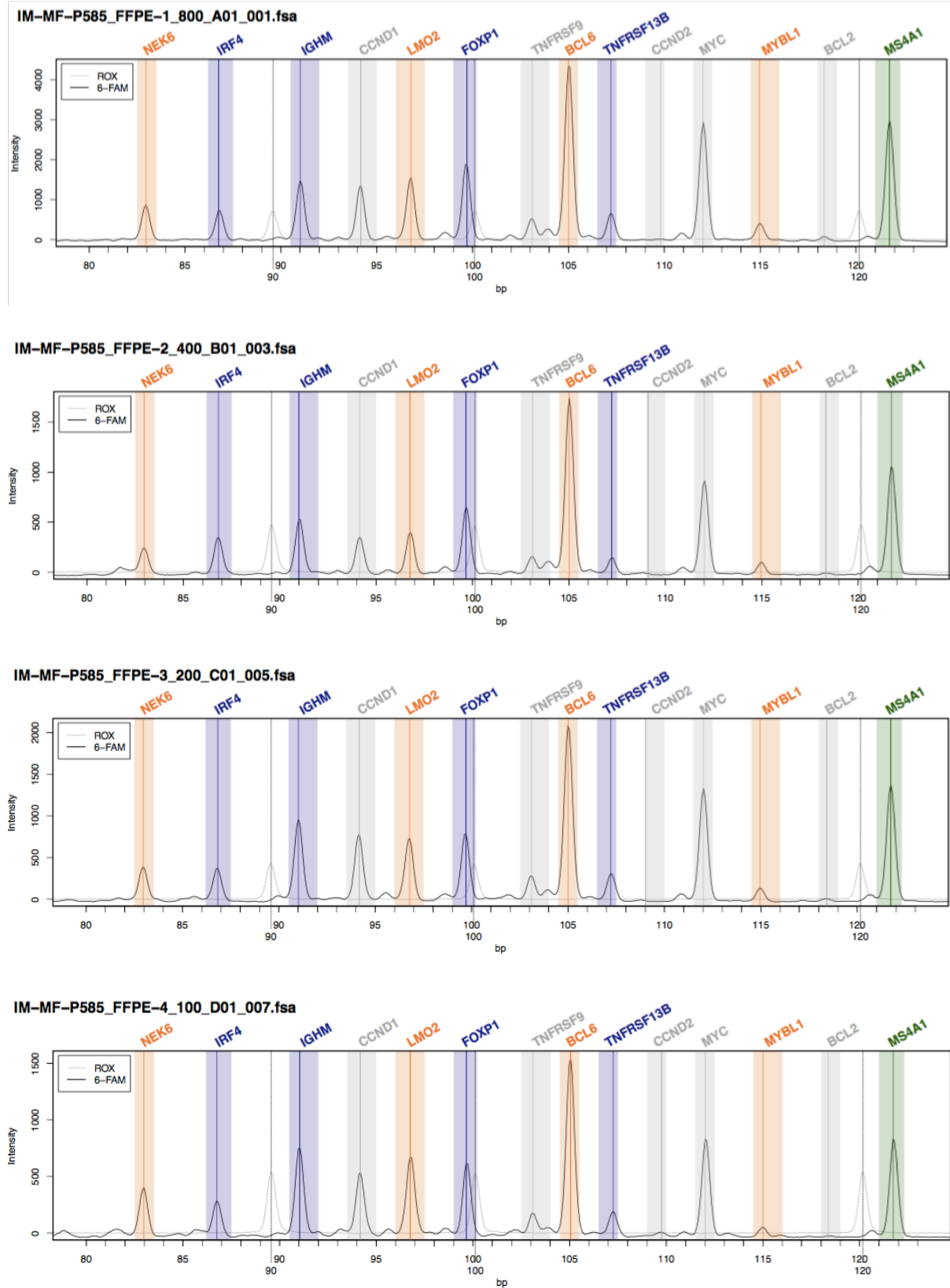
L'intégration des résultats de RT-MLPA à une réunion de concertation pluridisciplinaire en lien avec le département d'anatomopathologie et le service d'hématologie clinique au sein de l'hôpital Henri Mondor serait une réelle avancée dans la prise en charge des nouveaux cas de LDGCB.

Annexes

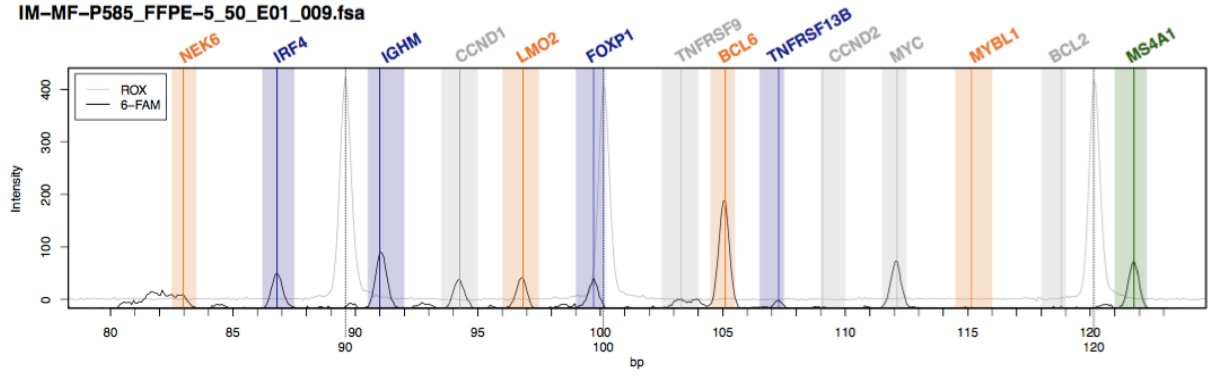
Annexe 1 : schéma descriptif de l'étape oligocentrique du protocole RT3 (*Real Time Tailored Therapy*)



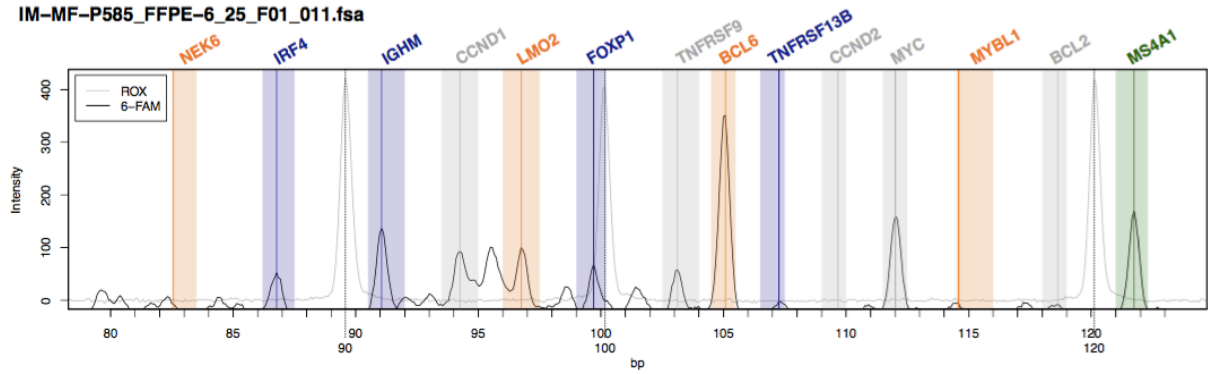
Annexe 2 : Dégradation progressive de la qualité des signaux en RT-MLPA en fonction de la quantité d'ARN initiale



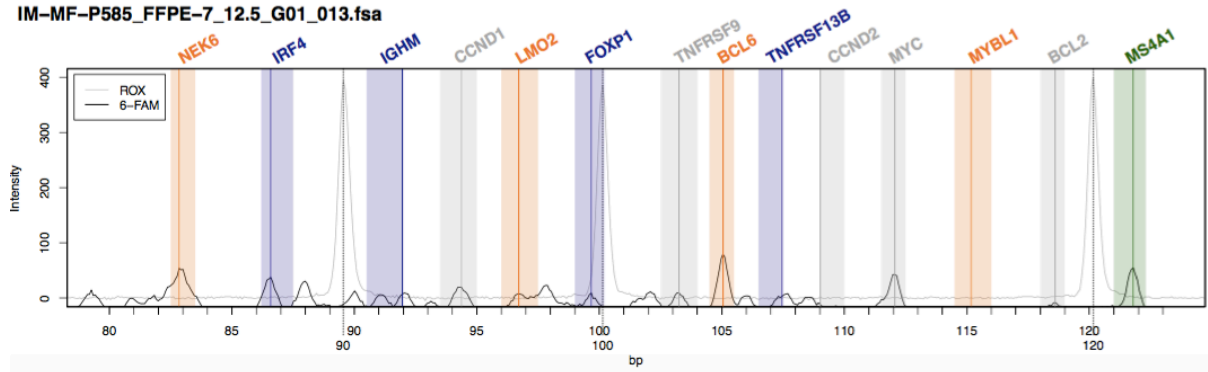
IM-MF-P585_FFPE-5_50_E01_009.fsa



IM-MF-P585_FFPE-6_25_F01_011.fsa



IM-MF-P585_FFPE-7_12.5_G01_013.fsa



Bibliographie

1. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-Chir Trans.* 1832;17:68–114.
2. Bruch J-F, Duprez-Paumier R, Sizaret D, Kervarrec T, Maître F. Étude historique des lymphomes et de leurs classifications. *Rev Francoph Lab.* 2014 Jan;2014(458):59–65.
3. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes: 2016 US Lymphoid Malignancy Statistics by World Health Organization Subtypes. *CA Cancer J Clin* 2016 Sep
4. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994 Sep 1;84(5):1361–92.
5. Swerdlow SH. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer; 2008. 452 p.
6. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 2011;117(19):5019–32.
7. Alain Monnereau, Laurent Remontet, Marc Maynadié, Florence Binder Foucard, Aurélien Belot, Xavier Troussard, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Partie 2 – Hémopathies malignes. InVS. 2013
8. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood.* 2010 Nov 11;116(19):3724–34.
9. Morton LM, Slager SL, Cerhan JR, Wang SS, Vajdic CM, Skibola CF, et al. Etiologic Heterogeneity Among Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes: The InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *JNCI Monogr.* 2014 Aug 1;2014(48):130–44.
10. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia.* 2012 Oct;26(10):2159–71.
11. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Schwartz LH, Zucca E, Lister TA. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol.* 2014 Sep 20;32(27):3059–67.
12. Project TIN-HLPF. A Predictive Model for Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 1993 Sep 30;329(14):987–94.
13. Hamlin PA, Zelenetz AD, Kewalramani T, Qin J, Satagopan JM, Verbel D, et al. Age-adjusted International Prognostic Index predicts autologous stem cell transplantation outcome for patients with relapsed or primary refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):1989–96.
14. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood.* 2007 Mar 1;109(5):1857–61.
15. Zhou Z, Sehn LH, Rademaker AW, Gordon LI, Lacasce AS, Crosby-Thompson A, et al. An enhanced International Prognostic Index (NCCN-IPI) for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the rituximab era. *Blood.* 2014 Feb 6;123(6):837–42.
16. Kobayashi T, Kuroda J, Yokota I, Tanba K, Fujino T, Kuwahara S, et al. The Kyoto Prognostic Index for patients with diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Blood Cancer J.* 2016 Jan 15;6(1):e383.
17. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlborg S, Oken MM, Grogan TM, Mize EM, et al. Comparison of a Standard Regimen (CHOP) with Three Intensive Chemotherapy Regimens for Advanced Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med.* 1993 avril;328(14):1002–6.
18. Vose JM, Link BK, Grossbard ML, Czuczman M, Grillo-Lopez A, Gilman P, et al. Phase II study of rituximab in combination with chop chemotherapy in patients with previously untreated, aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2001 Jan 15;19(2):389–97.
19. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(4):235–42.
20. Pfreundschuh M, Kuhnt E, Trümper L, Osterborg A, Trneny M, Shepherd L, et al. CHOP-like chemotherapy with or without rituximab in young patients with good-prognosis diffuse large-

B-cell lymphoma: 6-year results of an open-label randomised study of the MabThera International Trial (MInT) Group. *Lancet Oncol.* 2011 Oct;12(11):1013–22.

21. Fitoussi O, Belhadj K, Mounier N, Parrens M, Tilly H, Salles G, et al. Survival impact of rituximab combined with ACVBP and upfront consolidation autotransplantation in high-risk diffuse large B-cell lymphoma for GELA. *Haematologica.* 2011 Aug 1;96(8):1136–43.

22. Schmitz N, Nickelsen M, Ziepert M, Haenel M, Borchmann P, Schmidt C, et al. Conventional chemotherapy (CHOEP-14) with rituximab or high-dose chemotherapy (MegaCHOEP) with rituximab for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: an open-label, randomised, phase 3 trial (DSHNHL 2002-1). *Lancet Oncol.* 2012 Dec;13(12):1250–9.

23. Peyrade F, Jardin F, Thieblemont C, Thyss A, Emile J-F, Castaigne S, et al. Attenuated immunochemotherapy regimen (R-miniCHOP) in elderly patients older than 80 years with diffuse large B-cell lymphoma: a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2011 May;12(5):460–8.

24. Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Gill DS, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage Regimens With Autologous Transplantation for Relapsed Large B-Cell Lymphoma in the Rituximab Era. *J Clin Oncol.* 2010 Sep 20;28(27):4184–90.

25. Meignan M, Itti E, Gallamini A, Haioun C. Interim 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in diffuse large B-cell lymphoma: qualitative or quantitative interpretation – where do we stand? *Leuk Lymphoma.* 2009 Nov 1;50(11):1753–6.

26. Maurer MJ, Ghesquières H, Jais J-P, Witzig TE, Haioun C, Thompson CA, et al. Event-Free Survival at 24 Months Is a Robust End Point for Disease-Related Outcome in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Immunochemotherapy. *J Clin Oncol.* 2014 Apr 1;32(10):1066–73.

27. 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.* 2000;403(6769):503–11.

28. Scott DW. Cell-of-origin in diffuse large B-cell lymphoma: are the assays ready for the clinic? In *American Society of Clinical Oncology*; 2015

29. 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. 2002;346(25):1937–47.

30. Mareschal S, Lanic H, Ruminy P, Bastard C, Tilly H, Jardin F. The proportion of activated B-cell like subtype among de novo diffuse large B-cell lymphoma increases with age. *Haematologica.* 2011;96(12):1888–90.

31. 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.* 2003;100(17):9991–6.

32. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RCT, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 2002 Jan;8(1):68–74.

33. Williams PM, Li R, Johnson NA, Wright G, Heath J-D, Gascoyne RD. A Novel Method of Amplification of FFPET-Derived RNA Enables Accurate Disease Classification with Microarrays. *J Mol Diagn.* 2010 Sep;12(5):680–6.

34. Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2008;359(22):2313–23.

35. Hans CP. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 2004 Jan 1;103(1):275–82.

36. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A New Immunostain Algorithm Classifies Diffuse Large B-Cell Lymphoma into Molecular Subtypes with High Accuracy. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5494–502.

37. 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.* 2011 Jan 10;29(2):200–7.

38. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, Miranda RN, Green TM, Li Y, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia.* 2012 Sep;26(9):2103–13.

39. 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*. 2007 Jan 16;25(7):805–12.

40. Gutierrez-Garcia G, Cardesa-Salzmann T, Climent F, Gonzalez-Barca E, Mercadal S, Mate JL, et al. Gene-expression profiling and not immunophenotypic algorithms predicts prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Blood*. 2011 May 5;117(18):4836–43.

41. Batlle-López A, González de Villambrosía S, Mazorra F, Malatxeberria S, Sáez A, Montalban C, et al. Stratifying diffuse large B-cell lymphoma patients treated with chemoimmunotherapy: GCB/non-GCB by immunohistochemistry is still a robust and feasible marker. *Oncotarget*. 2016 Apr 3

42. Read JA, Koff JL, Nastoupil LJ, Williams JN, Cohen JB, Flowers CR. Evaluating Cell-of-Origin Subtype Methods for Predicting Diffuse Large B-Cell Lymphoma Survival: A Meta-Analysis of Gene Expression Profiling and Immunohistochemistry Algorithms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014 Dec;14(6):460–7.e2.

43. Le Gouill S, Talmant P, Touzeau C, Moreau A, Garand R, Juge-Morineau N, et al. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica*. 2007 Oct 1;92(10):1335–42.

44. Swerdlow SH. Diagnosis of “double hit” diffuse large B-cell lymphoma and B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma: when and how, FISH versus IHC. *ASH Educ Program Book*. 2014;2014(1):90–9.

45. Tilly H, Gomes da Silva M, Vitolo U, Jack A, Meignan M, Lopez-Guillermo A, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015 Sep;26(suppl 5):v116–25.

46. Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH Analysis for the Detection of Lymphoma-Associated Chromosomal Abnormalities in Routine Paraffin-Embedded Tissue. *J Mol Diagn*. 2006 May;8(2):141–51.

47. Green TM, Young KH, Visco C, Xu-Monette ZY, Orazi A, Go RS, et al. Immunohistochemical Double-Hit Score Is a Strong Predictor of Outcome in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol*. 2012 Oct 1;30(28):3460–7.

48. Sehn LH, Gascoyne RD. Diffuse large B-cell lymphoma: optimizing outcome in the context of clinical and biologic heterogeneity. *Blood*. 2015;125(1):22–32.

49. Béguelin W, Popovic R, Teater M, Jiang Y, Bunting KL, Rosen M, et al. EZH2 Is Required for Germinal Center Formation and Somatic EZH2 Mutations Promote Lymphoid Transformation. *Cancer Cell*. 2013 May;23(5):677–92.

50. Lenz G, Staudt LM. Aggressive Lymphomas. *N Engl J Med*. 2010 Apr 15;362(15):1417–29.

51. Choi MY, Kipps TJ. Inhibitors of B-Cell Receptor Signaling for Patients With B-Cell Malignancies: *Cancer J*. 2012;18(5):404–10.

52. An Open-Label, Multicenter, Phase 1/2 Study of E7438 (EZH2 Histone Methyl Transferase [HMT] Inhibitor) as a Single Agent in Subjects With Advanced Solid Tumors or With B-cell Lymphomas - Full Text View - ClinicalTrials.gov

53. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma—treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014 Jan;11(1):12–23.

54. Kritharis A, Coyle M, Sharma J, Evens AM. Lenalidomide in non-Hodgkin lymphoma: biological perspectives and therapeutic opportunities. *Blood*. 2015 Apr 16;125(16):2471–6.

55. Nowakowski GS, Chiappella A, Witzig TE, Spina M, Gascoyne RD, Zhang L, et al. ROBUST: Lenalidomide-R-CHOP versus placebo-R-CHOP in previously untreated ABC-type diffuse large B-cell lymphoma. *Future Oncol*. 2016 Jul;12(13):1553–63.

56. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. 2015 Aug;21(8):922–6.

57. Younes A, Zinzani PL, Sehn LH, Johnson PWM, Gascoyne RD, Ahmadi T, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 study of ibrutinib in combination with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) in subjects with newly diagnosed nongerminal center B-cell subtype of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *J Clin Oncol*. 2014;32:5

58. Flinn IW, Bartlett NL, Blum KA, Ardeschna KM, LaCasce AS, Flowers CR, et al. A phase II trial to evaluate the efficacy of fostamatinib in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Eur J Cancer*. 2016 Feb;54:11–7.

59. Jin Z, Qing K, Ouyang Y, Liu Z, Wang W,

- Li X, et al. Low dose of lenalidomide and PI3K/mTOR inhibitor trigger synergistic cytotoxicity in activated B cell-like subtype of diffuse large B cell lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016 Dec;35(1).
60. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2375–90.
61. Roberts RA, Sabalos CM, LeBlanc ML, Martel RR, Frutiger YM, Unger JM, et al. Quantitative nuclease protection assay in paraffin-embedded tissue replicates prognostic microarray gene expression in diffuse large-B-cell lymphoma. *Lab Invest*. 2007;87(10):979–97.
62. qNPA Chemistry [Internet]. [cited 2016 Aug 29]. Available from: <https://www.htgmolecular.com/science/qnpa-chemistry>
63. Rimsza LM, Wright G, Schwartz M, Chan WC, Jaffe ES, Gascoyne RD, et al. Accurate Classification of Diffuse Large B-Cell Lymphoma into Germinal Center and Activated B-Cell Subtypes Using a Nuclease Protection Assay on Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 1;17(11):3727–32.
64. Digital Color-coded Barcode Technology | NanoString Technologies [Internet]. [cited 2016 Aug 29]. Available from: <http://www.nanosttring.com/applications/technology>
65. Veldman-Jones MH, Lai Z, Wappett M, Harbron CG, Barrett JC, Harrington EA, et al. Reproducible, Quantitative, and Flexible Molecular Subtyping of Clinical DLBCL Samples Using the NanoString nCounter System. *Clin Cancer Res*. 2015 May 15;21(10):2367–78.
66. 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*. 2014;123(8):1214–7.
67. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002 Jun 15;30(12):e57.
68. Eldering E. Expression profiling via novel multiplex assay allows rapid assessment of gene regulation in defined signalling pathways. *Nucleic Acids Res*. 2003 Dec 1;31(23):153e – 153.
69. 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*. 2015;17(3):273–83.
70. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
71. Martin Bland J, Altman D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*. 1986 Feb;327(8476):307–10.
72. Flandrin-Gresta P, Cornillet P, Hayette S, Gachard N, Tondeur S, Mauté C, et al. Recommendations for accreditation of laboratories in molecular biology of hematologic malignancies. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2015 Oct;73(5):595–630.
73. The Prosigna gene expression profiling assay for assessing long-term risk of breast cancer recurrence | technology-overview | Advice | NICE. Available from: <https://www.nice.org.uk/advice/mib27/chapter/technology-overview#costs-and-use-of-the-technology>
74. NanoString Technologies Enters into Biomarker Companion Diagnostic Collaboration with Celgene Corporation to Support Development of REVLIMID as Treatment for Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma - Press Release | NanoString Technologies. Available from: http://www.nanosttring.com/company/corp_press_release?id=116
75. Test de signature moléculaire pour le pronostic du cancer du sein - Test PROSIGNA | Référentiel des examens Biomnis. Available from: <http://www.biomnis.com/en/english-news/>
76. 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*. 2016 Jun 15;22(12):2919–28.
77. Mareschal S. Caractérisation multi-omique des Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules Rouen, 2015. Available from: <http://www.theses.fr/2015ROUES046>
78. Jardin F. Next Generation Sequencing and the Management of Diffuse Large B-cell Lymphoma: From Whole Exome Analysis to Targeted Therapy. *Discov Med*. 18(97):51–65.
79. McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, et al. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*. 2012 Dec 6;492(7427):108–12.

80. Bohers E, Vially PJ, Dubois S, Bertrand P, Maingonnat C, Mareschal S, et al. Somatic mutations of cell-free circulating DNA detected by next-generation sequencing reflect the genetic changes in both germinal center B-cell-like and

activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphomas at the time of diagnosis. *Haematologica*. 2015 Jul 1;100(7):e280–4.