Année 2016 N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Ellen HAMMOUCHE

Née le 14/12/1987 à DREUX (28)

TITRE

Cytogénétique moléculaire : nouvelles approches dans les stratégies diagnostiques des lymphomes B diffus à grandes cellules : impacts pronostique et thérapeutique

---

Présentée et soutenue publiquement le 4 octobre 2016 devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Emmanuel GYAN, Hématologie, transfusion, Faculté de Médecine - Tours

Membres du Jury :
Professeur Jorge DOMENECH, Hématologie, Faculté de Pharmacie - Tours
Professeur Serge GUYETANT, Anatomie et Cytologie pathologiques, Faculté de Médecine - Tours
Professeur Annick TOUTAIN, Génétique, Faculté de Médecine - Tours

Directeur de thèse : ***Docteur Nora CHELLOUG, Génétique - Tours***

Année 2016 N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Ellen HAMMOUCHE

Née le 14/12/1987 à DREUX (28)

TITRE

Cytogénétique moléculaire : nouvelles approches dans les stratégies diagnostiques des lymphomes B diffus à grandes cellules : impacts pronostique et thérapeutique

Présentée et soutenue publiquement le 4 octobre 2016 devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Emmanuel GYAN, Hématologie, transfusion, Faculté de Médecine - Tours

Membres du Jury :
Professeur Jorge DOMENECH, Hématologie, Faculté de Pharmacie - Tours
Professeur Serge GUYETANT, Anatomie et Cytologie pathologiques, Faculté de Médecine - Tours
Professeur Annick TOUTAIN, Génétique, Faculté de Médecine - Tours

Directeur de thèse : ***Docteur Nora CHELLOUG, Génétique - Tours***

25/03/2016

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Patrice DIOT

VICE-DOYEN

Professeur Henri MARRET

ASSESSEURS

Professeur Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Professeur Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Professeur Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Professeur François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Professeur Philippe ROINGEARD, *Recherche*

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

****

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – *1962-1966*
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- *1966-1972*
Professeur André GOUAZE - *1972-1994*
Professeur Jean-Claude ROLLAND – *1994-2004*
Professeur Dominique PERROTIN – *2004-2014*

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Catherine BARTHELEMY
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Philippe BOUGNOUX
Professeur Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Yvon LEBRANCHU
Professeur Elisabeth LECA
Professeur Etienne LEMARIE
Professeur Gérard LORETTE
Professeur Michel ROBERT
Professeur Alain ROBIER

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – P. BAGROS – G. BALLON – P.BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – P. BEUTTER – C. BINET – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – G. GINIES – B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – G. LEROY – Y. LHUINTRE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINE – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – J.C. ROLLAND – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – J. THOUVENOT – B. TOUMIEUX – J. WEILL

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et biologie moléculaire
	ANGOULVANT Denis	Cardiologie
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	BABUTY Dominique	Cardiologie
	BALLON Nicolas	Psychiatrie ; addictologie
Mme	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; radiothérapie
MM.	BARON Christophe	Immunologie
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses et maladies tropicales
	BODY Gilles	Gynécologie et obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et imagerie médicale
	BRUYERE Franck	Urologie
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie, radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie, mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie, transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne, gériatrie
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
	DUCLUZEAU Pierre-Henri	Médecine interne, nutrition
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	EL HAGE Wissam	Psychiatrie adultes
	EHRMANN Stephan	Réanimation d'urgence
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FROMONT-HANKARD Gaëlle	Anatomie & cytologie pathologiques
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie, transfusion
	GUERIF Fabrice	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique
	HANKARD Régis	Pédiatrie
	HERAULT Olivier	Hématologie, transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, gériatrie
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LAURE Boris	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie, radiothérapie

	MAILLOT François	Médecine interne, gériatrie
	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MARRET Henri	Gynécologie-obstétrique
Mme	MARUANI Annabel	Dermatologie-vénéréologie
MM.	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
	MORINIERE Sylvain	Oto-rhino-laryngologie
Mme	MOUSSATA Driffa	Gastro-entérologie
MM.	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	ODENT Thierry	Chirurgie infantile
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médical, médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie-obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	REMERAND Francis	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et médecine nucléaire
MM.	SIRINELLI Dominique	Radiologie et imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
Mme	TOUTAIN Annick	Génétique
MM.	VAILLANT Loïc	Dermato-vénéréologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	VOURC'H Patrick	Biochimie et biologie moléculaire
	WATIER Hervé	Immunologie

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M.	LEBEAU Jean-Pierre
Mme	LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	MALLET Donatien	Soins palliatifs
	POTIER Alain	Médecine Générale
	ROBERT Jean	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme	ANGOULVANT Théodora	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
M.	BAKHOS David	Physiologie
Mme	BERNARD-BRUNET Anne	Cardiologie
M.	BERTRAND Philippe	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
Mmes	BLANCHARD Emmanuelle	Biologie cellulaire
	BLASCO Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
M.	BOISSINOT Éric	Physiologie
Mme	CAILLE Agnès	Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication
M.	DESOUBEAUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
Mmes	DOMELIER Anne-Sophie	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	GATAULT Philippe	Néphrologie
Mmes	GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	GOUILLEUX Valérie	Immunologie
	GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MM.	HOARAU Cyrille	Immunologie
	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mmes	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

MACHET	Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MM.	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
	ROUMY Jérôme	Biophysique et médecine nucléaire
	PLANTIER Laurent	Physiologie
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et droit de la santé
MM.	SAMIMI Mahtab	Dermatologie-vénéréologie
	TERNANT David	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique

MAITRES DE CONFERENCES

Mmes	AGUILLON-HERNANDEZ Nadia	Neurosciences
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mme	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire
Mme	RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M.	IVANES Fabrice	Cardiologie

CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

M.	BOUAKAZ Ayache	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	CHARBONNEAU Michel	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	GILOT Philippe	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
	GRANDIN Nathalie	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
MM.	KORKMAZ Brice	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
Mme	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM.	MAZURIER Frédéric	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
	MEUNIER Jean-Christophe	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
	RAOUL William	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
Mme	RIO Pascale	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1069
M.	SI TAHAR Mustapha	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
MM.	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier

TITRE :

Cytogénétique moléculaire : nouvelles approches dans les stratégies diagnostiques des lymphomes B diffus à grandes cellules : impacts pronostic et thérapeutique

RESUME :

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC : selon la classification OMS 2008) sont les plus fréquents des lymphomes malins non hodgkiniens de l'adulte (LMNH). Certains sont très agressifs à cause d'une prolifération clonale très rapide et l'instauration d'une thérapeutique urgente est souvent nécessaire. Le pronostic des LBDGC était jusqu'à présent basé sur l'Index Pronostic International, sur l'immuno-histochimie (IHC) pour définir le sous-groupe de LBDGC : Centre Germinatif (GC) ou non GC et sur l'expression des protéines MYC, BCL2 et BCL6. La classification OMS 2016 prend en compte désormais l'étude de réarrangement des gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6* pour codifier le pronostic (Simple, Double ou Triple Hit, en fonction du nombre de ces gènes remaniés) afin de déceler les LDBGC de très haut grade (*MYC* réarrangé avec une chaine d'Ig, les SH, DH et TH). Nous avons recherché ces événements par la technique de cytogénétique moléculaire (FISH) dans une étude rétrospective de 49 patients (issus du service d'hématologie clinique du CHRU de Tours) présentant un LBDGC afin de rechercher le statut SH, DH, et TH par FISH à partir de prélèvements congelés. Nous avons également défini l'appartenance au sous-groupe CG/non CG en IHC selon l'algorithme de Hans et étudié l'expression des protéines MYC, BCL2 et BCL6. Les deux objectifs de ce travail étaient d'explorer l'impact de ces remaniements sur la survie globale des patients et de tenter de mettre au point la technique de FISH sur coupe en paraffine. Nous présentons les résultats obtenus sur cette série de 49 patients et les comparons aux données récentes de la littérature. Du fait de la petite taille de notre cohorte, nous allons poursuivre ce travail sur un plus grand nombre de patients, afin de proposer aux hématologues la stratégie de diagnostic par FISH la mieux adaptée à partir de tous les types d'échantillons et de continuer la mise au point de la technique FISH sur coupes en paraffine.

Mots clés : réarrangement de *MYC*, réarrangement de B*CL2*, réarrangement de *BCL6,* Lymphomes B diffus à grandes cellules, FISH, simple hit, double hit.

TITLE :

Molecular cytogenetic : new approaches in DLBCL diagnostic strategies : prognostic and therapeutic impacts

ABSTRACT :

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL: according to 2008 WHO classification) is the most common non-Hodgkin's lymphoma in adults (NHL). Some types of DLBCL are very aggressive because of a very fast clonal proliferation and initiating emergency therapies is often necessary. DLBCL prognosis is based on: a) the International Prognostic Index, and b) immuno histochemistry analysis to identify the subtype of DLBCL (germinal center (GC) or non-GC), and to definite MYC, BCL2, and BCL6 protein expressions. The 2016 WHO classification, more recently, incorporated *MYC, BCL2* and *BCL6* rearrangements to identify the subset (simple, double or triple hit depending on the number of rearranged genes, respectively SH, DH, TH), in order to detect high grade DLBCL (*IG/MYC* rearrangement, SH, DH, TH).

In a retrospective study of frozen tissue samples from forty-nine patients with DLDBCL from hematology department at the University Hospital of Tours, we investigated *MYC*, *BCL2*, and *BCL6* rearrangements by a molecular cytogenetic technique (Fluorescent *In Situ* Hybridization) to determine the SH, DH or TH subset of each sample. We also characterized their subtypes (CG or non-CG) by immuno histochemistry analyses according to the Hans's algorithm, and we studied MYC, BCL2 and BCL6 protein expressions. The two aims of this work were to analyze the impact of these biological markers on survival in DLBCL patients and to develop a protocol for FISH analysis of formalin-fixed-paraffin-embedded material. We compared our results with literature data. We will continue this work to increase the number of patients and to improve the FISH protocol of formalin-fixed-paraffin-embedded samples, in order to suggest the most suitable diagnostic strategy by FISH to hematologists..

Key words : *MYC* rearrangement, *BCL2* rearrangement, *BCL6* rearrangement, Diffuse large B cell lymphoma, FISH, simple hit, double hit.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

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

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

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu ma directrice de thèse, ***Madame le Docteur Nora CHELLOUG****, Praticien hospitalier au sein du service de génétique. Merci d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail de thèse, pour votre soutien et vos conseils. C'est avec plaisir que je continuerai par la suite à apprendre à vos côtés.*

A mon président de thèse, ***Monsieur le Professeur Emmanuel GYAN****, Professeur des Universités, Praticien hospitalier et Chef du service d'hématologie et thérapie cellulaire au CHRU de Tours. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury et de juger mon travail.*

Aux membres du jury :

A Madame le Professeur Annick TOUTAIN*, Professeur des Universités, Praticien hospitalier et Chef de service de Génétique au CHRU de Tours. Votre présence me fait honneur, merci d'avoir accepté de siéger dans ce jury.*

A Monsieur le Professeur Serge GUYETANT *Professeur des Universités, Praticien hospitalier et Chef du service d'Anatomie et Cytologie Pathologique au CHRU de Tours. Merci d'avoir accepté de juger mon travail et de siéger dans le jury.*

A Monsieur le Professeur Jorge DOMENECH, *merci d'avoir accepté de juger ce travail, vous me faites l'honneur de siéger dans ce jury.*

Mes remerciements s'adressent également :

A Madame le Docteur Flavie Arbion. Merci pour ton aide, ta patience et ta disponibilité malgré un emploi du temps chargé.

A Madame le Docteur Carole Barin. Merci de m'avoir guidée tout au long de ce travail et de m'avoir consacré autant de temps pour mener à bien ce projet. J'ai beaucoup appris à tes côtés et c'est un grand plaisir de venir travailler avec toi pendant mon assistanat.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de cytogénétique (constitutionnelle et hématologique) et de biologie moléculaire. Merci pour votre accueil chaleureux et votre gentillesse au long de ces deux dernières années. Un merci particulier à Alexis et Pascale pour leur aide précieuse qui m'a fait gagner un temps considérable.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de génétique d'Orléans pour leur accueil. Merci de votre gentillesse et de m'avoir laissé le temps de travailler sur ma thèse au cours de ce dernier semestre.

A tous mes co-internes. Ces 4 années d'internat passées avec vous furent un réel plaisir. Merci particulièrement à David, avec qui les courses à pied hebdomadaires furent un échappatoire plus que bienvenu, merci de ton soutien au cours de ces 6 derniers mois.

Mes remerciements vont aussi :

A tous mes amis, en particulier Sonia, Igor, Damien, Sandy, Diane, Aurélie, Yannick et Nico. Votre amitié m'est très chère, merci pour tous les bons moments passés en votre compagnie (soirées, vacances, sorties…) ainsi que pour tous ceux à venir.

A ma famille : papa, Laura, Sébastien, merci pour votre soutien au cours de toutes ces années et pour votre patience. Sébastien, merci de ta compréhension, merci de t'occuper de tant de choses afin de me permettre de mener a bien ces longues études.

A ma maman, merci pour avoir toujours été là pour moi. Sans ton aide, ton soutien, tes conseils et ton amour je n'en serais pas là aujourd'hui. Je t'aime, tu me manques.

A Guillaume, merci pour ton aide si précieuse, surtout au cours de ces derniers mois, merci pour ton soutien sans faille et surtout merci pour ton amour à toutes épreuves.

Je dédie cette thèse à ma mère

Table des matières

Liste des abréviations 14
Liste des tableaux 17
Liste des figures 18

I.Introduction 20
I.1. Rappels : Hématopoïèse et lymphocytes B 20
I.1.1. Hématopoïèse 20
I.1.2. La lymphopoïèse B 21
I.1.2.1. Phase indépendante de l'antigène 22
I.1.2.2. Phase dépendante de l'antigène 22
I.2. Les LMNH 24
I.2.1. Historique 24
I.2.2. Epidémiologie 24
I.2.3. Généralités 25
I.2.3.1. Deux modes évolutifs 26
I.2.3.2. Facteurs de risque 27
I.2.3.3. Origine du clone lymphocytaire monoclonal 27
I.2.3.4. Evolution du lymphome de bas grade en lymphome de haut grade 28
I.2.4. Classification 28
I.3. Lymphomes B Diffus à grandes cellules (LBDGC) 30
I.3.1. Généralités 30
I.3.1.1. Epidémiologie 30
I.3.1.2. Agressivité 30
I.3.1.3. Classification 30
I.3.2. Présentation 31
I.3.2.1. Les symptômes et les signes cliniques 31
I.3.2.2. Diagnostic 31
I.3.2.2.1. Consultation initiale 31
I.3.2.2.2. Histologie et immunohistochimie 32
I.3.2.2.3. Etude cytogénétique et cytogénétique moléculaire 34

I.3.2.2.4. Biologie moléculaire 40
I.3.2.3. Pronostic 41
I.3.2.4. Diagnostic différentiel 45
I.3.3. Traitement 45
I.4. Mécanismes de dérégulation et de transformation cellulaire 46
I.4.1. Translocation chromosomique 46
I.4.2. Mutations somatiques 47
I.4.3. Rôle du microenvironnement 48
I.4.4. Activation de la voie NF-kB 49
I.5. Physiopathologie moléculaire 49
I.5.1. Apport de la cytogénétique 49
I.5.2. Définition d'un proto-oncogène et mécanismes de dérégulation 50
I.5.2.1. Définition d'un proto-oncogène 50
I.5.2.2. Dérégulation de l'expression des gènes par activation transcriptionnelle 51
I.5.3. Description des oncogènes impliqués dans le LBDGC 51
I.5.3.1. *MYC* (OMIM #190081#) 51
I.5.3.1.1. Structure du gène 51
I.5.3.1.2. Structure de la protéine 51
I.5.3.1.3. Modulation de la transcription 52
I.5.3.1.4. Les fonctions cellulaires 53
I.5.3.1.5. Réarrangement et dérégulation du gène *MYC* 56
I.5.3.2. BCL2 (B Cell leukemia/lymphoma 2) (OMIM #151430#) 59
I.5.3.2.1. Structure du gène et de la protéine 60
I.5.3.2.2. Fonctions de la protéine 60
I.5.3.2.3. Réarrangement et dérégulation du gène *BCL2* 60
I.5.3.3. BCL6 (B Cell lymphoma 6) (OMIM #109565#) 61
I.5.3.3.1. Structure du gène et de la protéine 61
I.5.3.3.2. Fonctions de la protéine 61
I.5.3.3.3. Réarrangement du gène *BCL6* 62
I.6. Objectifs 63
II. Patients et méthode 64
II.1. Patients 64
II.2. Méthode 65

II.2.1. La FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) 66
II.2.1.1. Etapes techniques..... 66
II.2.1.2. Analyse des lames 68
II.2.2. La technique de déparaffinage..... 71
II.2.3. Immunohistichimie (IHC) 73
II.2.4. Analyses statistiques..... 74
III. Résultats 75
III.1. FISH 75
III.1.1. Présentation globale des patients 75
III.1.2. Présentation détaillée des résultats 80
III.2. Données cliniques et biologiques..... 84
III.2.1. Résumé des données cliniques et biologiques de notre série..... 84
III.2.2. Comparaison des données de FISH aux données cliniques et biologiques..... 85
III.3. IHC 85
III.4. Evaluation de la survie 87
III.4.1. Index et stadification 87
III.4.2. FISH..... 88
III.4.3. IHC..... 91
III.5. Résultats de la mise au point d'une technique manuelle de déparaffinage ... 93
IV. Discussion 95
V. Conclusion..... 113

ANNEXES..... 114
Références bibliograpiques..... 122

Liste des abréviations

aaIPI	*age adjusted* International Prognostic Index
ABC	Lymphocyte B activé
AIDS	Activation induced cytidine déaminase
Ag	Antigène
ACVBP	Doxorubicine, cyclophosphamide, vindésine, bléomycine, prédnisone
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ARF1	ADP ribosylation factor 1
BAK	BCL2 antagonist killer
BAX	BCL2 associated X protein
BCL2	B-Cell Lymphoma 2
BCL6	B-Cell Lymphoma 6
BCR	Récepteur des cellules B
BH	Homo/heterodimerization domains
BOM	Biopsie ostéo-médullaire
BTB/POZ	Broad-complex/Tramtrack/Bric-a-brac/Pox virus/Zinc finger
CARD11	Caspase recruitement domain-containing protein 11
Cb	Centroblaste
Cc	Centrocyte
CD	Cluster of Differentiation
CDC25A	Cell division cycle 25A
CDK	Cyclin dependant kinase
CFU	Colony Forming Unit
CEP	Cisplatin, Endoxan, Epirubicine
CGH	Cytogenomic comparative hybridization
COP	Cyclophosphamide, Vincristine, Prédnisone
COPADM	Cyclophosphamide, Vincristine, Prédnisone, Doxorubicine, Methotrexate
CXCL	C-X-C motif chemokine ligand
CXCR4	Chemokine, C-X-C motif receptor 4
CXCR5	Chemokine, C-X-C motif receptor 5
CYVE	Cytarabine, Cytarabine, Etoposide
DISC	Death inducing signaling complex
DHAP	Dexaméthasone, Cisplatine, Cytarabine
CSH	Cellule souche hématopoïétique
DA-EPOCH	*Dose adjusted* Etoposide, Doxorubicine, Vincristine, Cyclophosphamide
DAPI	4',6-diamino-2phenylindole
dTTP	deoxythymidine triphosphate
dUTP	deoxyuridine triphosphate
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FLIP	FLICE inhibitory protein
DH	Double hit
EBV	Epstein Barr Virus
ESHAP	Etoposide, Méthylprednisolone, Cytarabine, Cisplatine
FADD	FAS associated Death Domain
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FLIP	FLICE inhibitory protein
GAS1	Growth arrest-specific 1
GC	Centre germinatif
GEMOX	Gemcitabine, Oxaliplatine
GEP	Gene expression profile
GFCH	Groupe français de cytogénétique hématologique

GR	Globule rouge
HGBL	High Grade B-cell Lymphoma
HGBL, NOS	High Grade B-cell Lymphoma, Not Otherwise Specified
HIS	Hybridation in situ
HLH	Helix-loop-helix
HMS	Hypermutation somatique
HTLV1	Human T cell leukemia/lymphoma virus type 1
ICE	Ifosfamide, Carboplatine, Etoposide
Ig	Immunoglobuline
IGH	Immunoglobulin heavy locus gene
IGK	Immunoglobulin kappa gene
IGL	Immunoglobulin lambda gene
IHC	Immunohistochimie
IkB	Inhibitor of kappa B
IPI	International Prognostic Index
LB	Lymphocyte B
LBn	Lymphocyte B naïf
LDGCB	Lymphome diffus à grandes cellules B
LDH	Lactate Déshydrogénase
LM	Lymphome du manteau
LMNH	Lymphome malin non Hodgkinien
LT	Lymphocyte T
LSI	Locus spécifique
MO	Moelle osseuse
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissu
MAX	Myc associated factor X
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MIZ1	MYC-interacting zinc finger protein 1
MUM1	Multiple Myeloma oncogen 1
MYC	Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NHEJ	Non homologous end joining
ODC1	Ornithine decarboxylase 1
OLS	Organes lymphoïdes secondaires
OMS/WHO	Organisation Mondiale de la Santé / World Health Organization
PAX5	Pair boc protein 5
POU5F1B	Pou domain, class 5, tanscription factor 1B
POU5F1P1	Pou domain, class 5, transcitpion factor 1 pseudogène 1
PS	Performans status
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine, Prédnisone
RCP	Réunion de Concertation Pluridisciplinaire
REAL	Revised European-American Lymphoma Classification
REL	Avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog
RHO/TTF	Ras homologous/transcription three four
SALT	Skin Associated Lymphoid Tissu
SNC	Système nerveux central
TdT	Terminal deoxytransferase
TkB	Bruton's Tyrosin Kinase
TEP	Tomographie par émission de positons
TH	Triple hit
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumor protein p53
TRRAP	Transformation/Transcription domain associated protein
VHB	Virus de l'hépatite B

VHC	Virus de l'hépatite C
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
VLA-4	Very late antigen 4
WCP	Whole chromosome painting
ZCCHC7	Zinc finger CHC-type containing 7

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification d'Ann Arbor 42
Tableau 2 : Index pronostic international (IPI) des LNH agressifs 43
Tableau 3 : Index pronostic international ajusté à l'âge (aaIPI) des LNH agressifs[1] 43
Tableau 4 : Performans status 44
Tableau 5 : Premiers essais de déparaffinage et FISH réalisés en anatomopathologie et en cytogénétique..... 72
Tableau 6 : Derniers essais de déparaffinage et FISH réalisés en cytogénétique 73
Tableau 7 : Résultats cytogénétiques des patients *MYC*-R 76
Tableau 8 : Caractéristiques cliniques, biologiques, cytogénétiques et immunohistochimiques des patients *MYC*-R 78
Tableau 9 : LBDGC SH, DH et TH et partenaire de *MYC* 79
Tableau 10 : Fréquence des réarrangements de *MYC* dans la littérature 96
Tableau 11 : Données de la littérature sur la survie globale chez les patients *MYC*-R..... 97

Liste des figures

Figure 1 : Hématopoïèse 21
Figure 2 : Structure d'un ganglion lymphatique 23
Figure 3 : Maturation des cellules B 23
Figure 4 : Origine des différents lymphomes en fonction du stade de maturation du LB 26
Figure 5 : Coupes anatomopathologiques des variants des LBDGC 33
Figure 6 : Schématisation de l'hybridation d'une sonde de FISH 36
Figure 7 : Principe du microscope à fluorescence 37
Figure 8 : Sondes ciblées 38
Figure 9 : Sondes break apart et double fusion 39
Figure 10 : Survie globale en fonction des groupes de risque définis par l'IPI 43
Figure 11 : Conséquence des translocations des gènes d'*IG* 47
Figure 12 : Anomalies génétiques impliquées dans la lymphomagenèse dans les LBDGC 48
Figure 13 : Schéma et caryotype de la translocation t(8;14) 50
Figure 14 : Représentation schématique du gène *MYC* et de la protéine résultante 52
Figure 15 : Molécules impliquées dans la progression du cycle cellulaire 55
Figure 16 : Rôle de *MYC* dans le contrôle et la progression du cycle cellulaire 55
Figure 17 : Représentation des différents points de cassure responsables de la dérégulation du gène *MYC* 56
Figure 18 : Représentation schématique de la translocation t(8;14) 57
Figure 19 : Représentation schématique et caryotypique d'une translocation t(8;14) 57
Figure 20 : Représentation schématique et caryotypique d'une translocation t(2;8) 58
Figure 21 : Représentation schématique et caryotypique d'une translocation t(8;22) 58
Figure 22 : Conséquences de la translocation t(8;14) juxtaposant les gènes *IGH* et *MYC* 59
Figure 23 : Logigramme décisionnel 67
Figure 24 : Représentation des sondes *MYC* break apart en fonction du fournisseur 68
Figure 25 : Noyaux en FISH observés sur un champ microscopique 69
Figure 26 : Réarrangement du gène *MYC* avec une sonde Break apart 69
Figure 27 : Inconvénients des sondes break apart 70
Figure 28 : Sonde break apart dans un cellule sans réarrangement 70
Figure 29 : Réarrangement avec une sonde double fusion 71

Figure 30 : Flow chart et résultats de FISH 75
Figure 31 : Double fusion de la sonde MYC-IGH chez le patient 26 79
Figure 32 : Réarrangement chez le patient 34 du gène *MYC* et du gène *IGL* 80
Figure 33 : Amplification du gène *BCL2* 83
Figure 34 : Survies globale et sans progression en fonction du PS 88
Figure 35 : Diagramme de survie en fonction du réarrangement de *MYC* 89
Figure 36 : Survies sans progression et globale en fonction du réarrangement de *MYC* 90
Figure 37 : Survies sans progression et survie globale en fonction du caractère SH ou DH/TH 90
Figure 38 : Courbes de survie en fonction du partenaire de *MYC* 90
Figure 39 : Survie sans progression et survie globale en fonction du type GC ou non GC ... 91
Figure 40 : Survie sans progression et survie globale en fonction de l'expression de la protéine BCL6 92
Figure 41 : Survie sans progression et survie globale en fonction de l'expression de la protéine BCL2 92
Figure 42 : Survie sans progression et survie globale en fonction de l'expression de BCL2 dans les groupes GC et non GC 93
Figure 43 : Etude des survie globale et sans progression en fonction de l'absence ou de la présence du réarrangement de *MYC* 98
Figure 44 : Courbes de survie en fonction du partenaire de *MYC* 99
Figure 45 : Analyse univariée de la survie en fonction du réarrangement de MYC DH ou SH 102
Figure 46 : Impact du partenaire de MYC sur la survie en fonction du caractère SH ou DH 102
Figure 47 : Survie globale et survie sans progression en fonction du type GC, non GC et MYC-R 104
Figure 48 : Survie sans progression et survie globale en fonction de l'expression de MYC et BCL2 106
Figure 49 : Corrélation entre la survie globale et l'expression de la protéine BCL2 dans le groupe GC et le groupe ABC 108
Figure 50 : Survie globale et survie sans progression dans les groupes GC et ABC 109

I. Introduction

I.1. Rappels : Hématopoïèse et Lymphocytes B

I.1.1. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est un mécanisme physiologique, dynamique et régulé, qui concoure à la fabrication et au renouvellement continu des cellules sanguines dont la durée de vie est limitée. Après la naissance, elle est essentiellement localisée dans la moelle osseuse (MO), véritable site anatomique (définit par Shofield en 1978) constitué de cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes et d'un microenvironnement fonctionnel spécifique appelé « niche ». Les CSH sont à l'origine des trois lignées cellulaires retrouvées dans le sang périphérique (globules rouges (GR), plaquettes, leucocytes). Le microenvironnement, composé de signaux cellulaires intrinsèques et extrinsèques (facteurs de croissance, facteurs de transcription, effecteurs des voies de transduction…), permet de promouvoir la prolifération et la différenciation des CSH. Celles-ci possèdent à leur surface des antigènes spécifiques reconnaissables par des anticorps monoclonaux (CD : Cluster of Differentiation) : CD 34+,C-kit+, Rho+, Thy1+. Elles sont en très faible proportion dans la MO (0,01 à 0,05%), pour la plupart quiescentes (stade G0 du cycle cellulaire) et ont la capacité d'auto-renouvellement. Elles acquièrent d'abord le statut de cellules souches engagées (pluripotentes), puis de progéniteurs communs (CFU pour Colony Forming Unit) qui s'orientent soit vers la lignée myéloïde (CFU-GEMM), soit vers la lignée lymphoïde (CFU-L). Les CFU se différencient pour donner les précurseurs hématopoïétiques des différents types de cellules (après multiplication et maturation cellulaire) : globules rouges, plaquettes, polynucléaires, monocytes, lymphocytes B et T (figure 1). Ces précurseurs sont les premières cellules identifiables morphologiquement mises en évidence sur le myélogramme ou sur la biopsie ostéo médullaire (BOM).

Seules les cellules mûres fonctionnelles vont passer dans le sang. Les monocytes et lymphocytes vont subir de nouvelles différenciations : monocytes en macrophages (dans les tissus), lymphocytes en lymphocytes T (LT) (après passage dans le thymus) et en lymphocytes B (LB) qui vont maturer dans les organes lymphoïdes périphériques ou secondaires (OLS) : ganglions lymphatiques, rate, tissu lymphoïde des muqueuses : MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissu*) et tissu lymphoïde de la peau : SALT (*Skin Associated*

Lymphoid Tissu). Ceux ci vont subir des modifications caractéristiques du stade de maturation et de la rencontre ou non avec un antigène (Ag).

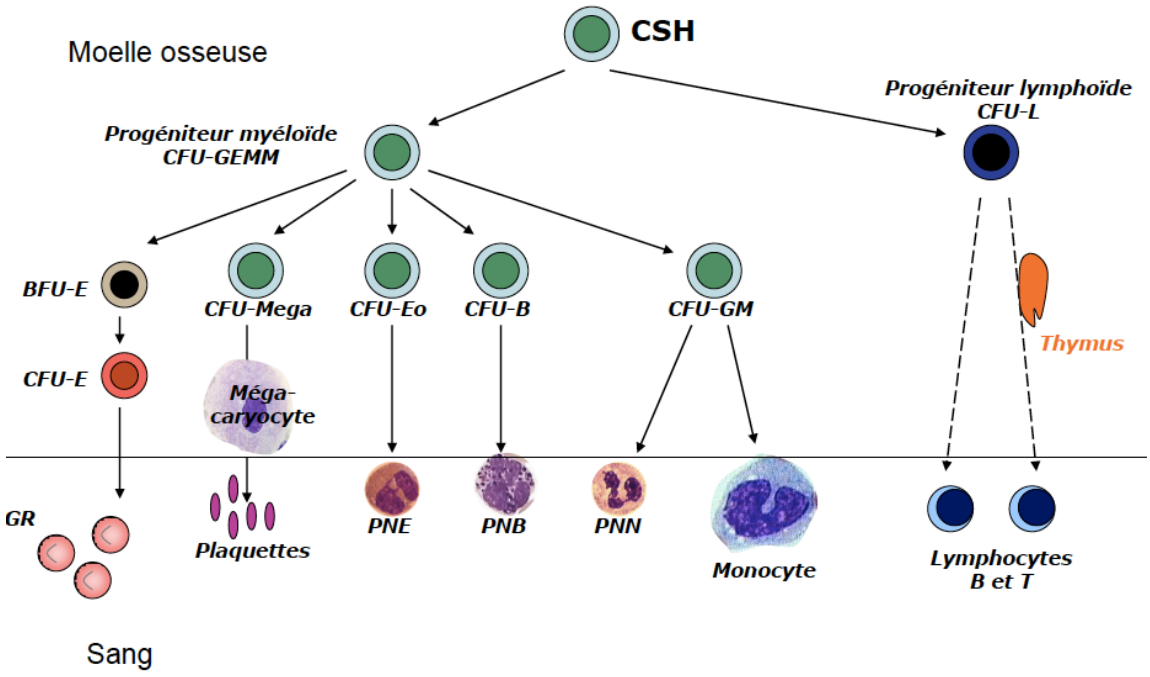


Figure 1 : Hématopoïèse

I.1.2. La lymphopoïèse B

L'évolution de la cellule précurseur B jusqu'au lymphocyte mature est liée à deux grandes phases : une phase indépendante de l'Ag, se déroulant dans la moelle osseuse et une phase dépendante de l'Ag, qui a lieu dans les OLS. Le but final de ces deux étapes est de permettre la reconnaissance du non soi pour la défense de l'organisme contre les agents étrangers, en présentant les Ag aux cellules support de l'immunité cellulaire.

I.1.2.1. Phase indépendante de l'antigène

Dans la MO, la maturation du lymphocyte pro-B, pour aboutir au lymphocyte naïf, est associée à des événements moléculaires permettant la synthèse du récepteur BCR (Immunoglobulines (Ig) de surface avec une chaine lourde H et une chaine légère κ ou λ spécifique d'un Ag). La recombinaison des séquences VDJ des chaines lourdes et VJ des chaines légères d'Ig est à l'origine d'une diversité extrêmement importante d'Ig dont les spécificités antigéniques sont différentes les unes des autres. Elle est effectuée grâce à des recombinases (RAG1, RAG2) et à deux systèmes de réparation de cassures double brin : NHEJ (non homologous end joining) et TdT (terminal déoxytransférase).

I.1.2.2. Phase dépendante de l'antigène

Dans la zone interfolliculaire du ganglion, la coopération lymphocyte B naïf (LBn) / lymphocyte T (LT) / cellules dendritiques présentant l'Ag spécifique de son IgM, va générer le follicule primaire dans le cortex avec un centre germinatif constitué d'une zone sombre et d'une zone claire (figure 2) :

- au niveau de la zone sombre, chaque LBn est transformé en Centroblaste (Cb) proliférant (qui exprime le ligand des chimiokines 13 : CXL13). Ce Cb subit soit une expansion clonale si l'hypermutation somatique (HMS) par l'enzyme AIDS (activation induced cytidine déaminase) augmente l'affinité pour l'Ag, soit une apoptose si l'HMS diminue l'affinité pour l'Ag. Ces HMS consistent essentiellement en des mutations ponctuelles des régions variables des chaines lourdes et légères des Ig. Les Cb sélectionnés deviennent des centrocytes (Cc).
- Au niveau de la zone claire, les Cc qui n'ont pas acquis de récepteur de forte affinité à l'Ag entreront en apoptose. Les autres subiront un switch, ou commutation isotypique, c'est à dire que l'IgM de surface sera remplacée par une autre Ig par modification de sa partie constante. Ces nouvelles cellules avec un BCR extrêmement spécifique d'un Ag de classe M, A, ou G sont appelées LB mémoires. Celles qui vont sécréter des Ig A, G et D sont les précurseurs des plasmocytes (immunocytes) (figure 3).

C’est au cours de la réponse immunitaire secondaire que le follicule secondaire se forme avec identification de deux autres compartiments : le manteau où circulent les LBn (mais CD23-), et la zone marginale avec des immunocytes, des LBn et des immunoblastes.

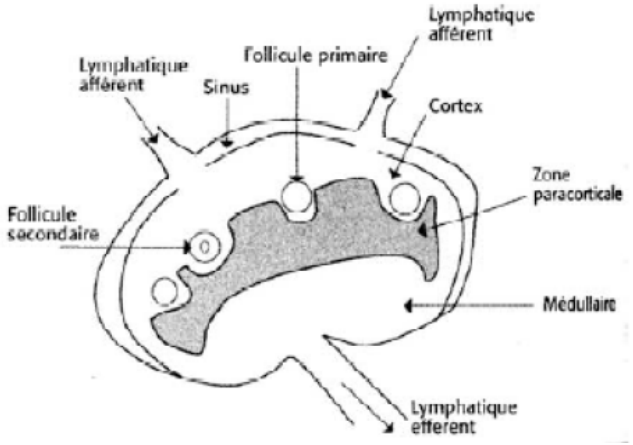


Figure 2 : Structure d’un ganglion lymphatique

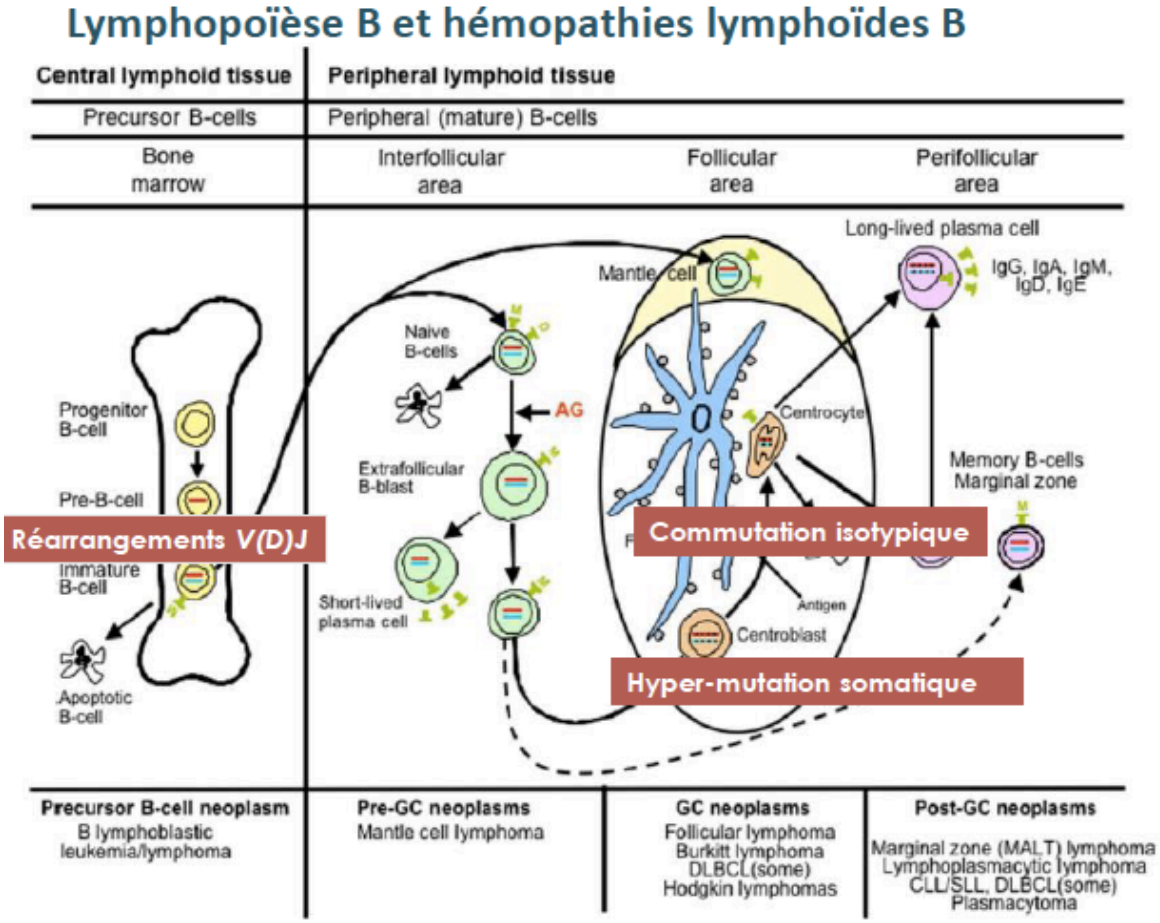


Figure 3 : Maturation des cellules B

Au cours de la maturation, une dérégulation de l'équilibre entre l'index mitotique et l'apoptose peut se produire du fait d'une accumulation d'altérations génomiques. Ceci sera à l'origine d'une hémopathie maligne développée à partir du tissu lymphoïde périphérique (plus fréquemment dans les ganglions) appelée lymphome.

I.2. Les LMNH

I.2.1. Historique

Les lymphomes (ou néoplasmes lymphoïdes) comprennent les lymphomes de Hodgkin (maladie de Hodgkin) et les lymphomes malins non Hodgkinien (LMNH) qui sont des syndromes lymphoprolifératifs matures chroniques.
Depuis la description clinique du lymphome nommé « Hodgkin » par Samuel Wilks, mais découvert 30 ans plus tôt en en 1832 par Thomas Hodgkin, de nombreux autres lymphomes, différents par leurs caractéristiques, ont été regroupés sous le terme « LMNH ».
Depuis les années 50 et devant la grande diversité de ces tumeurs, plusieurs classifications ont été utilisées (Rappaport, REAL). En 2001 elles ont fait place à celle de « l'OMS » (Organisation Mondiale de la Santé), fruit d'un véritable travail consensuel international. Celle-ci va classer les lymphomes en entités clinico-biologiques avec des critères diagnostiques très précis, prenant en compte un certain nombre de facteurs pronostiques propres à chaque entité, afin de prévoir l'évolution de la maladie, de définir un traitement adapté et de conduire des études comparatives cliniques et thérapeutiques valables. Cette classification a été régulièrement révisée en fonction des avancées technologiques et scientifiques (2008, 2016).

I.2.2. Epidémiologie

Les LMNH sont les hémopathies malignes les plus fréquentes (15/100000 habitants/an). La prévalence est de 100/100000 habitants.
L'incidence ne cesse d'augmenter, elle est estimée dans le monde à 287000 nouveaux cas par an et en France à 10000 nouveaux cas par an.

Les LMNH sont la 6e cause de cancer en terme d'incidence en France, c'est l'hémopathie la plus fréquente des pays industrialisés. Malgré de nouveaux traitements par immunothérapie la mortalité reste élevée.

L'âge médian de diagnostic pour l'ensemble des lymphomes est 67 ans. Cependant, on les détecte parfois chez l'enfant ou l'adulte jeune[2].

Il existe une prédominance masculine avec un sex ratio homme /femme de 1,2.

I.2.3. Généralités

Les LMNH de phénotype B sont définis selon le sous-type de la cellule lymphomateuse, reflet de son niveau de maturation et de sa localisation dans le ganglion. Ils sont représentés sur la figure 4.

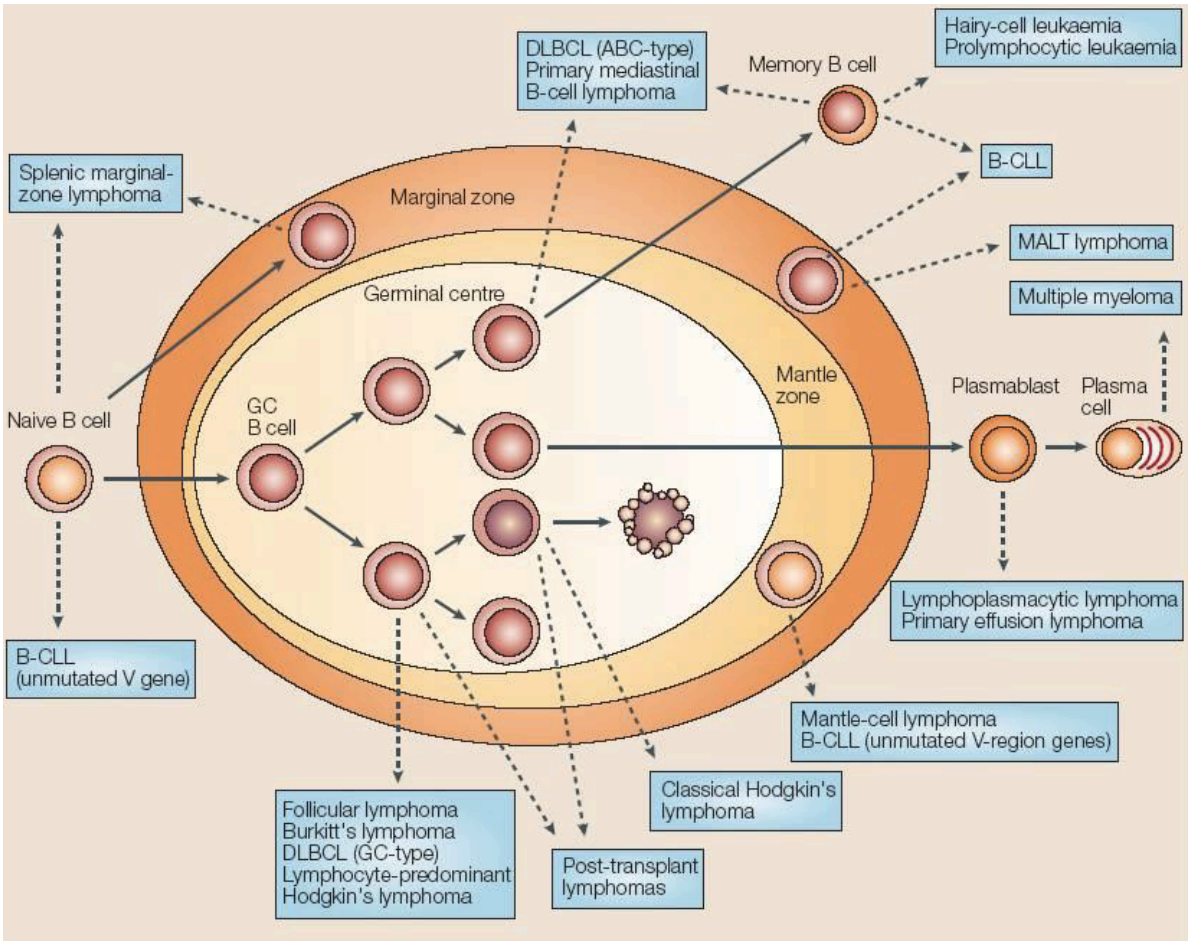


Figure 4 : Origine des différents lymphomes en fonction du stade de maturation du LB

I.2.3.1. Deux modes évolutifs

Les lymphomes évoluent selon deux modes :

- indolents : il s'agit de lymphomes de faible malignité, ou de bas grade. Ils se voient essentiellement chez l'adulte, rarement chez l'enfant. Les signes généraux sont souvent peu marqués et les localisations viscérales sont rares. Ils évoluent lentement. En général ils ne sont pas traités au diagnostic mais font l'objet d'une surveillance. En cas de pronostic péjoratif, les rémissions sont possibles, mais les rechutes sont fréquentes et il existe un risque de transformation en lymphome de haut grade. Les lymphomes suivants appartiennent à cette catégorie de lymphomes indolents : lymphome lymphocytique, lymphome de la zone marginale, lymphome du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT), lymphome du manteau et lymphome folliculaire.

- agressifs ou de haut grade : ces hémopathies peuvent s'observer chez l'adulte comme chez l'enfant. Elles peuvent être localisées ou au contraire plus étendues, les signes généraux sont plus marqués que dans les lymphomes indolents. Les examens biologiques montrent des signes d'évolutivité. Contrairement aux lymphomes de bas grade, ces lymphomes nécessitent un traitement rapide. On retrouve parmi les lymphomes agressifs les types suivants : lymphome B diffus à grandes cellules et le lymphome de Burkitt.

I.2.3.2. Facteurs de risque

Bien qu'on ne connaisse pas la cause précise à l'origine du développement des lymphomes, on sait que cette hémopathie est multifactorielle et certains facteurs de risque sont aujourd'hui reconnus :

- le déficit immunitaire : congénital ou acquis
- les maladies auto-immune, par stimulation persistante des lymphocytes responsable d'une prolifération polyclonale
- les infections virales (VIH, VHC, EBV, HTLV1)
- les infections bactériennes (Helicobacter Pylori dans les lymphomes de MALT gastrique) ou certains parasites, à l'origine d'un syndrome lymphoprolifératif polyclonal
- les toxiques environnementaux (exposition à des pesticides notamment)
- et les facteurs génétiques.

I.2.3.3. Origine du clone lymphocytaire monoclonal

Diverses hypothèses peuvent expliquer le passage de la prolifération polyclonale à la prolifération monoclonale. La plus plausible serait la stimulation antigénique persistante (infectieuse, auto-immune, toxique) générant une réponse immunitaire polyclonale. En effet, un agent infectieux est constitué de plusieurs épitopes différents. Ainsi, plusieurs LB seront stimulés, chacun secrétant son type spécifique d'anticorps.

Lors de la prolifération, le lymphocyte peut être le siège d'altérations génétiques affectant le nombre ou la structure des chromosomes. Lorsque ces remaniements confèrent un avantage sélectif à la cellule, celle-ci prolifère aux dépens des autres, s'immortalise et crée un clone monoclonal.

I.2.3.4. Évolution du lymphome de bas grade en lymphome de haut grade

Dans le lymphome, le blocage de l'apoptose et le blocage à un stade de maturation cellulaire sont à l'origine d'une accumulation de LB mutés. La survenue d'autres mutations associées, comme celles impliquant un oncogène, des chaines d'Ig ou des proto-oncogènes, aboutirait à l'accélération de la croissance cellulaire, à l'augmentation de la masse tumorale et à la transformation en lymphome de haut grade.

I.2.4. Classification

Depuis les années 50, plusieurs classifications ont été utilisées pour décrire les lymphomes[3].

Entre 1950 et 1960, Rappaport base sa classification « classification de Rappaport » sur l'aspect cytologique au microscope optique (petites ou grandes cellules) permettant de définir trois types de lymphomes : de faible malignité, de haute malignité et de malignité intermédiaire.

De 1970 à 1978, les classifications de Kiel Lennert (Europe) et de Luke Collins (Etats-Unis) s'appuient sur le développement des connaissances du système immunologique.

En 1994, l'International Lymphoma Study Group (composé d'hématopathologistes européens et américains) élabore une classification internationale : REAL (Revised European-American Lymphoma Classification) publiée par Nancy Harris. Comme la précédente, elle prend en compte les caractéristiques morphologiques des cellules, mais y associe aussi les données cliniques, phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires.

Celle-ci fait place en 2001 à la classification OMS, publiée par Elaine Jaffe, qui va intégrer les données moléculaires issues des puces ADN, en plus des caractéristiques déjà prises en compte dans la classification REAL. En effet cette nouvelle technique a permis de faire une avancée importante dans la connaissance du LBDGC, en différenciant le LBDGC de type GC (centrogerminatif) du type ABC (lymphocyte B activé), en fonction du profil d'expression génique (GEP : Gene expression profile). L'objectif majeur est la définition de paramètres permettant un diagnostic reproductible des différentes entités cliniques par les pathologistes du monde entier.

La classification utilisée aujourd'hui est celle de l'OMS 2008 (cf annexe 1), publiée par Swerdlow, où chaque entité inclut outre le phénotype lymphocytaire, l'histologie, le type de prolifération (folliculaire ou diffus), la cytologie, la cytogénétique et la biologie moléculaire.

Très récemment (début 2016), au regard d'autres avancées technologiques et de la recherche sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques des tumeurs, un consensus multidisciplinaire a donné lieu à la révision de cette classification. Celle ci prend dorénavant en compte de nouveaux biomarqueurs validés. Ainsi, l'OMS 2016 comprend de nouvelles entités et / ou des sous-types d'une entité déjà décrite, le corolaire étant une meilleure information sur les caractéristiques et l'évolutivité de ces lymphomes. Concernant les LBDGC, plusieurs modifications sont notées (cf annexe 2) :

- ajout de nouvelles catégories:
    - les lymphomes B de haut grade avec réarrangement de *MYC* et de *BCL2* et/ou *BCL6* (High Grade B-cell Lymphoma : HGBL)
    - les HGBL, NOS (High Grade B-cell Lymphoma, Not Otherwise Specified), si le lymphome possède des caractéristiques intermédiaires entre les LBDGC et le lymphome de Burkitt, sans réarrangement de *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6.*
    - LBDGC avec réarrangement de *IRF4*
    - Les LBDGC, NOS lié à l'EBV
- Modification d'une entité préexistante :
    - Les LBDGC, NOS sont subdivisés en deux sous-groupes moléculaires par le profil d'expression génique : le type centrogerminatif et le type lymphocyte B activé **(**ou en deux sous-groupes définis par l'immunohistochimie (IHC) : CG et non CG)

I.3. Lymphomes B Diffus à grandes cellules (LBDGC)

I.3.1. Généralités

I.3.1.1. Epidémiologie

Ce sont les plus fréquents des LMNH puisqu'ils représentent 30 à 40% des cas[2,4].
L'incidence de cette hémopathie est de 8,3 cas pour 100000 habitants par an (avec 3000 à 4000 nouveaux cas par an en France) et la prévalence est de 43,3/100000 habitants sur 10 ans[2].
L'âge médian de diagnostic des LBDGC est de 70 ans mais ils peuvent également toucher les adultes jeunes ou les enfants[4]. Ils sont plus fréquents chez les hommes que chez les femmes (sex ratio : 1,3)[4].

I.3.1.2. Agressivité

Les LBDGC sont des lymphomes agressifs, c'est-à-dire qu'ils sont caractérisés par l'existence de symptômes et d'une évolution brutale en quelques semaines. Leur pronostic défavorable nécessite d'instituer un traitement rapide qui ne doit pas être différé.

I.3.1.3. Classification

Les LBDGC appartiennent à un groupe hétérogène sur le plan clinique et sont séparés en différents sous types en fonction de la localisation :

- LBDGC not Otherwise Specified (LBDGC NOS), qui est le plus fréquent[5].
- LBDGC médiastinal (apparaît dans le thymus ou les ganglions médiastinaux)
- Lymphome primitif du SNC (système nerveux central)
- Lymphome primitif des séreuses (liquide pleural, péritonéal ou péricardique)
- Lymphome intravasculaire : très rare

I.3.2. Présentation

I.3.2.1. Les symptômes et les signes cliniques

Généralement la maladie débute par l'apparition d'adénopathies palpables, le plus fréquemment au niveau axillaire et cervical et/ou profondes, qui, lorsqu'elles sont volumineuses, sont responsables de troubles indirects en fonction de leur localisation : troubles respiratoires et syndrome cave supérieur pour les adénopathies médiastinales, gêne abdominale, ballonnements, occlusion intestinale, insuffisance rénale aigue ou douleurs dorsales pour les adénopathies abdominales. Des atteintes extra-ganglionnaires sont également possibles (rate, tube digestif, sphère ORL…).
D'autres types de symptômes peuvent être révélateurs de la maladie : fièvre prolongée, perte de poids inexpliquée, sueurs nocturnes, altération de l'état général, asthénie.

I.3.2.2. Diagnostic

I.3.2.2.1. Consultation initiale

Au cours de la première consultation, après un interrogatoire poussé, un examen clinique approfondi est entrepris : les aires ganglionnaires, le foie et la rate sont palpés, les organes atteints étant retranscrits sur un schéma détaillé. La ponction lombaire n'est faite qu'en cas de signe d'appel neurologique. Puis une batterie d'examens complémentaires et un bilan d'extension à visée diagnostique et pronostique sont conduits, l'inventaire des sites atteints servant de cible pour juger la réponse au traitement.
Le bilan biologique est standard, il associe les sérologies virales VIH, VHB et VHC (à la recherche de lymphome viro-induit et en raison des risques de réactivation sous traitement), le dosage des LDH (reflet de la masse tumorale) pour le score pronostic IPI et le bilan pré thérapeutique.
La biopsie ganglionnaire (ou autre tissu atteint) va permettre d'affirmer le diagnostic. Elle fait appel à une expertise multidisciplinaire et comprend généralement une étude anatomopathologique (Histologie et IHC), une étude cytogénétique et une étude moléculaire (GEP). L'immunophénotypage (CD20, CD19, CD22, CD79a, CD45 positifs et CD10 positif

dans 30% à 60% des cas) n'est plus effectué car la présence d'une population circulante est très rare.

La biopsie ostéo médullaire n'est plus réalisée de façon systématique depuis la réalisation du TEP scan et le myélogramme n'est prélevé qu'en cas de cytopénies (pour la détection d'infiltrations minimes). Il s'agit d'un choix fait par les hématologues du CHRU de Tours, mais la conduite tenue vis-à-vis de l'intérêt de la BOM et du myélogramme varie selon les centres.

L'imagerie est une étape importante car elle permet l'évaluation comparative à la fin du traitement : le scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien à la recherche de localisations profondes et le TEP scan (tomographie d'émission de positons), qui a une très bonne valeur prédictive positive pour dépister les infiltrats médullaires.

I.3.2.2.2. Histologie et immunohistochimie

Le diagnostic de certitude de LBDGC se fait sur biopsie tissulaire en anatomopathologie devant la présence d'une destruction de l'architecture normale du tissu avec prolifération diffuse de grandes cellules lymphoïdes de phénotype B CD20+ visibles en immunohistochimie.

La macroscopie montre un aspect en « chair de poisson ».

Au niveau microscopique il existe 3 variants parmi les LBDGC NOS : centroblastique (le plus fréquent), immunoblastique et anaplasique (figure 5).

Le variant centroblastique présente des cellules moyennes ou grandes, avec un cytoplasme basophile de taille réduite et un noyau à chromatine fine pouvant comporter 2 à 4 nucléoles.

Le variant immunoblastique est composé d'un cytoplasme plus grand avec un noyau central.

Le variant anaplasique possède des cellules plus grandes que les deux autres sous-variants. Le noyau peut avoir une forme variable.

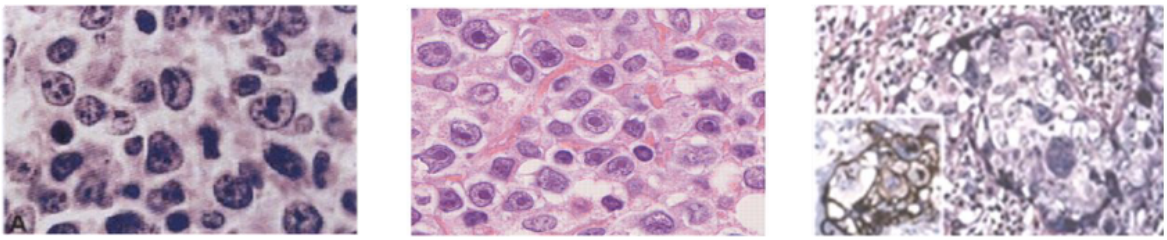


Figure 5 : Coupes anatomopathologiques des variants des LBDGC[6]

Selon la classification OMS 2008, il y a 2 sous types moléculaires de LBDGC définis par le GEP : GCB (Centre Germinatif B) et ABC (Cellules B Actives). Il existe un troisième groupe minoritaire pour les lymphomes n'appartenant à aucune de ces deux classes, appelé « inclassifiable ». Dans la majorité des établissements l'étude du profil d'expression génique par microarray des LBDGC n'est pas accessible. C'est pourquoi, l'étude en IHC, qui est plus facilement réalisable en routine, est plus largement utilisée. L'IHC s'appuie sur l'algorithme de Hans, qui permet de distinguer 2 sous types immunohistochimiques : type GC (germinal center / centre germinatif) et non GC (no germinal center), grâce à la détection des marqueurs CD10, BCL6 et MUM1.

Cet algorithme a été instauré car l'appartenance aux groupes GC et aux non GC en IHC correspond à peu près aux groupes GC et ABC étudiés en microarray. En 2008, la différenciation des deux sous groupes n'était pas obligatoire. Toutefois, depuis huit ans, l'évolution des connaissances sur les différents mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse des types GC et ABC ont conduit à l'investigation de nombreux essais thérapeutiques ayant pour but d'améliorer le pronostic défavorable dans le groupe ABC. De ce fait, la révision OMS 2016 recommande de différencier les groupes GC et ABC. Bien que les LBDGC « inclassifiables » échappent à l'IHC et que la corrélation entre l'IHC et le GEP ne soit pas parfaite[7,8], l'OMS 2016 accepte « raisonnablement » l'utilisation de cette technique pour orienter la prise en charge thérapeutique.

Par ailleurs, outre la différence de stratégie thérapeutique en fonction des groupes GC et ABC, ces deux types de lymphomes doivent aussi être différenciés car l'impact pronostic sur la survie n'est pas le même. En effet, d'après plusieurs études, le type GC serait de meilleur pronostic que le type non GC[9,10]. En outre, il semble démontré (par certains auteurs come *Klapper et al.* (2008) *ou Copie Bergman et al.* (2015)) que des facteurs connus de mauvais

pronostic ont en réalité un impact péjoratif uniquement dans un des deux groupes. L'impact pronostic de certains facteurs prédictifs de survie varierait donc en fonction du type GC ou non GC.

Les biomarqueurs suivants sont également étudiés :

- en IHC : l'hyperexpression des protéines BCL2 et BCL6
- en étude moléculaire : les réarrangements des gènes : *MYC* +/- *BCL2* +/- *BCL6.*

Ceci fera l'objet d'une grande partie de notre travail de recherche.

I.3.2.2.3. Étude cytogénétique et cytogénétique moléculaire

Caryotype :

Le caryotype est un examen permettant l'analyse morphologique des chromosomes.
Il est obtenu après plusieurs étapes dont la première est la culture cellulaire (de 24 à 96h sur la MO, mais beaucoup plus longue sur tissu). La culture est suivie par un blocage du cycle cellulaire par un poison du fuseau (la colchicine), le gonflement du noyau par un choc hypotonique, puis la fixation des chromosomes par un mélange alcool/acide acétique. Les dernières étapes consistent en l'étalement sur lames à température et hygrométrie contrôlées, puis technique d'obtention de bandes (bandes R par une dénaturation à la chaleur dans une solution de Earle, bandes G par une enzyme protéolytique : la trypsine) et enfin coloration au giemsa. Les mitoses sont capturées au microscope optique en lumière blanche et les chromosomes classés à l'aide de logiciels d'analyses d'images.

Dans les LBDGC, le caryotype est hétérogène et très complexe. On peut observer diverses anomalies cytogénétiques dont aucune n'est spécifique. Les anomalies retrouvées le plus fréquemment sont des gains chromosomiques (3q ;18q21-q22) ou des pertes chromosomiques (6q21-q22)[4]. Les anomalies sont différentes en fonction du groupe GC ou non GC.
D'après l'étude de Jonhson *et al.* (2009), la complexité du caryotype associée aux réarrangements des gène *MYC* et *BCL2* ne semble pas être la cause du mauvais pronostic[11]. Cependant, le caryotype reste un examen important car sa complexité est en faveur d'un LBDGC ou d'un lymphome B inclassable, avec caractéristiques intermédiaires entre le LBDGC et le lymphome de Burkitt (BCLU), permettant ainsi le diagnostic différentiel avec le

lymphome de Burkitt. Devant la lourdeur technique du caryotype, certaines équipes remplacent cet examen par la CGH array.

FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

- Généralités :

La FISH est l'examen de choix pour la recherche d'anomalies chromosomiques dans les LBDGC. En effet, cet examen, ciblé sur des réarrangements géniques spécifiques grâce à l'utilisation de sondes d'oligonucléotides complémentaires à une séquence d'ADN spécifique, permet de visualiser des réarrangements géniques.

Du fait de son impact pronostic, le réarrangement de l'oncogène *MYC* (*MYC*-R) doit être recherché par cette technique. En effet, malgré de nombreuses controverses[8,9,12] au sujet du mauvais pronostic du remaniement de ce gène (certains auteurs ne retrouvent pas de corrélation entre le réarrangement de *MYC* et la diminution de la survie, alors que d'autres établissent un lien entre le remaniement et l'évolution défavorable de l'hémopathie), il est aujourd'hui admis qu'il joue un rôle défavorable sur la survie.

D'après l'étude récente de Johnson *et al.* (2009), ce serait en fait le partenaire impliqué dans le remaniement du gène *MYC* qui serait à l'origine de l'agressivité du LBDGC. Le réarrangement avec un gène d'*IG* (*MYC-IG*), comparé à un gène différent des *IG* (*MYC-non IG*), prédirait l'évolution défavorable de la maladie[11]. Ce résultat a également été rapporté par l'équipe de Copie Bergman *el al.* en 2015. Dans son étude, *MYC-IG* était associé à une survie globale plus courte que *MYC-non IG* ($p = 0,0002$). Les auteurs observaient également que le réarrangement entre *MYC* et un gène non *IG* n'avait pas un plus mauvais pronostic que l'absence de réarrangement de *MYC*[13]. En pratique, lorsque *MYC* est réarrangé, il est souhaitable de définir si son partenaire est un gène d'*IG*.

En outre, le caractère double hit (DH), c'est-à-dire l'association du réarrangement de *MYC*, de *BCL2* (*BCL2*-R) et/ou de *BCL6* (*BCL6*-R) (*BCL2* et *BCL6* pouvant être réarrangés avec n'importe quel gène) doit également être recherché (révision OMS 2016), ainsi que le triple hit (TH), c'est à dire le remaniement des trois oncogènes dans la même cellule. En effet, les lymphomes DH et TH sont maintenant une entité bien définie qui classe ces lymphomes en haut grade, c'est-à-dire plus agressifs, responsables d'une diminution de la survie des patients[14,13,15–17]. Dans l'étude de *Green et al*. En 2012, la survie médiane était 13 mois pour

les DH versus 95 mois pour les lymphomes non DH et la survie à 3 ans était significativement diminuée en cas de DH (46% versus 75% ; p = 0,002).

- **Principe :**

La FISH, est une technique de cytogénétique moléculaire basée sur l'hybridation spécifique d'une sonde simple brin marquée avec un fluorochrome à un ADN double brin dénaturé. La capacité de l'ADN à se dénaturer et se renaturer permet l'hybridation de la sonde et de l'ADN par complémentarité (figure 6).

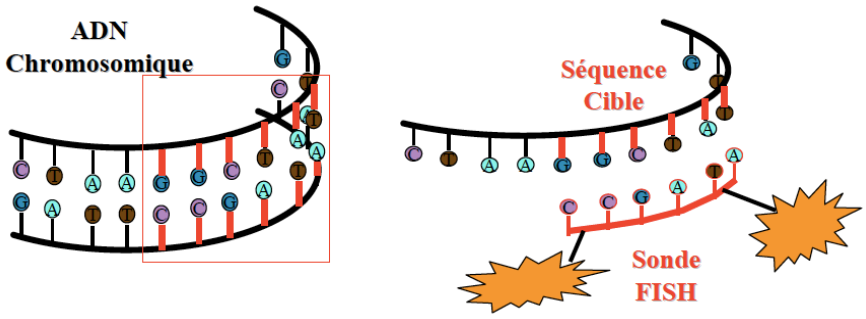


Figure 6 : Schématisation de l'hybridation d'une sonde de FISH

Il s'agit d'une technique manuelle qui peut être effectuée à partir de divers prélèvements : sang, moelle osseuse, appositions, etc. Elle peut être réalisée sur tissu frais, congelé ou conservé en paraffine. L'analyse peut se faire sur cellules interphasiques, permettant de s'affranchir de la culture, ou sur cellules métaphasiques.

- **Historique :**

La première technique d'hybridation in situ (HIS) a été publiée en 1969 par Gall et Pardue sur des chromosomes de crapaud[56]. Cette technique utilisait de l'ADN marqué par un radio-isotope et le signal était révélé par autoradiographie. Tout au long des années 70, l'HIS a

reposé sur le marquage radioactif des sondes (mise au point par Saunders en 1972 sur chromosomes humains puis par Jones en 1973 avec des sondes hybridant sur l'ADN satellite au niveau des régions centromériques des chromosomes). Au début des années 80, les sondes radioactives (sondes chaudes) furent remplacées par des sondes non radioactives (sondes froides) en incorporant un nucléotide analogue au dTTP, le dUTP, lié de façon covalente à un haptène (biotine ou digoxigénine). La révélation de la sonde était réalisée par l'intermédiaire d'un anticorps anti digoxigénine (Langer et Ward, 1981)[57] ou d'un anticorps anti biotine lié à la streptavidine (forte affinité pour la biotine), ou couplé à un fluorochrome (d'où le terme de FISH). Le signal était alors visualisé à l'aide d'un microscope à fluorescence[57], équipé d'une caméra refroidie. Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides. Ils sont excités par une longueur d'onde d'excitation différente en fonction de la molécule utilisée. Ils restituent ensuite une partie de cette énergie sous forme de longueur d'onde d'émission, grâce à des filtres dont les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont choisies en fonction des fluorochromes utilisés (figure 7). Ceux-ci sont de différents types :

- Le DAPI (4',6-diamino-2phenylindole) : se fixe sur les région riches en AT, il contre colore les chromosomes qui fluorescent bleu.
- Le FITC (fluorescein isothiocyanate) émet dans le vert.
- La cyanine 3 pour l'orange.
- La cyanine 5, la cyanine 5.5 et le texas red qui fluorescent dans le rouge mais ont des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission différentes.

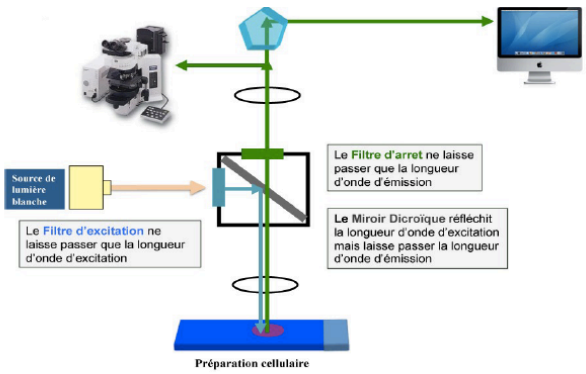


Figure 7 : Principe du microscope à fluorescence (une lumière blanche (contenant toutes les longueurs d'ondes) est émise puis est filtrée par le filtre d'excitation qui sélectionne la longueur d'onde adaptée au fluorochrome utilisée. Le miroir dichroïque laisse passer la longueur d'onde d'excitation, qui excite le fluorochrome. Celui-ci émet une longueur d'onde d'excitation qui passe par un filtre d'arrêt ne laissant passer que cette dernière. La sonde peut alors être visualisée au microscope à l'aide d'une caméra qui numérise le signal.)

- **Les sondes :**

Il existe différentes sondes :

- Locus spécifique (LSI)
- Centromérique (Satellite DNA probe) ou Télomérique (Sub-Telomere DNA probe) (figure 8),
- Peinture totale (WCP) ou Bras spécifique (Arm Specific)

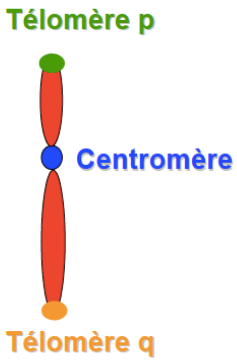


Figure 8 : Sondes ciblées

Les sondes centromériques s'hybrident sur les centromères des chromosomes au niveau des séquences non codantes répétées de type alpha satellites. Elles sont principalement utilisées pour dénombrer les chromosomes.

Les sondes locus spécifique sont de petite taille (250 à 600 Kb) et permettent de mettre en évidence des remaniements impliquant des bandes (ou des sous-bandes) du chromosome comme des microdélétions, des translocations ou encore des inversions.
Plusieurs types de sondes locus spécifique peuvent être utilisées : les sondes break apart, double fusion (figure 9), extra signal et de délétion (avec témoin). Pour notre étude nous avons utilisé les sondes break apart et double fusion que nous détaillons ci-dessous.

Les sondes break apart sont composées de deux (ou trois) fluorochromes (souvent vert et rouge), émettant dans des longueurs d'ondes différentes. Elles sont situées de part et d'autre du point de cassure (ou le chevauche). Quand une cellule est normale on observe deux spots jaunes car la distance entre les sondes est trop petite pour que le filtre puisse distinguer les deux couleurs (deux spots jaunes par cellule pour les 2 chromosomes normaux). En revanche, lorsque le gène est réarrangé, les deux fluorochromes sont séparés et on observe alors un spot vert et un spot rouge distincts, plus un spot jaune pour le gène non réarrangé sur le deuxième chromosome (figure 9).

Les sondes « double fusion » ciblent deux gènes différents (sur deux paires de chromosomes différents). L'un sera marqué en rouge, l'autre en vert. En l'absence de réarrangement, on observe deux spots rouges et deux verts. En cas de translocation, un signal rouge se superpose à un signal vert et l'on visualise alors deux spots jaunes (deux chromosomes remaniés), un spot rouge et un spot vert (correspondant aux deux chromosomes normaux) (Figure 9).

Il existe différents fournisseurs de sondes de FISH (MetaSystems®, Cytocell®, Kreatech®, Dako® et Abbott®), qui délivrent avec chaque sonde un certificat de qualification du produit mentionnant la spécificité de la sonde, c'est-à-dire que l'absence de cross-hybridation (qui peut gêner la lecture) est vérifiée. De plus, il est vérifié que la sonde est bien localisée sur le chromosome attendu. L'intensité du signal fluorescent est également contrôlée.

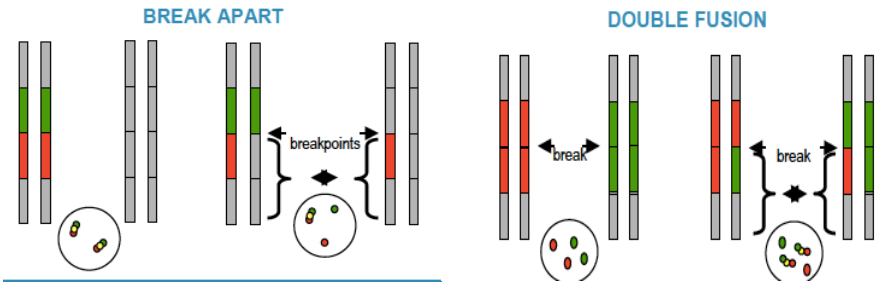


Figure 9 : Sondes break apart et double fusion

- **Avantages de la FISH :**

Le caryotype constitutionnel correspond au dénombrement, à l'identification et à l'étude morphologique des chromosomes. Il s'agit d'une étude globale des chromosomes obtenus après des techniques de culture plus ou moins longues en fonction du tissu. La résolution (seuil de visibilité d'une anomalie) est de l'ordre de 10 à 15 Mb. A Tours, le laboratoire de cytogénétique onco-hématologique dirigé par Mme Carole Barin a fait le choix de ne pas effectuer de caryotype à partir de biopsie ganglionnaire car les anomalies non spécifiques ont peu d'impact sur le pronostic des LBDGC *MYC*-R.

La FISH est devenue un outil de référence pour le diagnostic des remaniements chromosomiques complexes ou cryptiques (200 Kb) difficiles à caractériser par les techniques conventionnelles. Elle permet une étude ciblée du génome c'est-à-dire qu'elle utilise en pratique des sondes nucléotidiques fluorescentes qui vont venir s'apparier à leur séquence complémentaire (hybridation) soit sur des noyaux (FISH interphasique) soit sur des chromosomes (FISH métaphasique).

Cette technique de cytogénétique moléculaire présente plusieurs intérêts :

- Elle est adaptée au tissu dont nous disposons (lames d'apposition), le résultat est rapide (48h), une grande quantité de cellules peuvent-être observées (100 à 500)
- Les échecs sont rares
- La sensibilité est excellente (technique validée) et elle permet de détecter un clone anormal non proliférant.

Cependant elle reste une technique manuelle longue (il existe actuellement des automates mais qui sont trop coûteux si le volume d'activité n'est pas conséquent).

I.3.2.2.4. Biologie moléculaire

Le GEP (ou l'étude transcriptome), à l'aide de puces à ADN (microarray) contenant un très grand nombre de transcrits de gènes impliqués dans le processus tumoral, permet de définir deux groupes majoritaires de LBDGC : le type « GC », issu de cellules du centre germinal et le type « lymphocytes activés » (ABC). Certains LBDGC ne peuvent être classés dans aucun de ces deux groupes et appartiennent à un sous-groupe minoritaire dit « inclassifiable ». Les

types GC et ABC diffèrent par leurs altérations chromosomiques, les anomalies des différentes voies de signalisation et par leur pronostic : le profil GC étant de meilleur pronostic que le profil ABC[19,20]. Cette étude moléculaire n'est pas facilement réalisable en routine et est donc généralement remplacée par l'étude en IHC.

I.3.2.3. Pronostic

Il existe différents scores pronostiques permettant de classer les patients en groupes de risques homogènes. Ces groupes de risques vont permettre d'évaluer le pronostic de la maladie et d'orienter le traitement (éviter le sur-traitement des patients à faible risque et optimiser le traitement avec des thérapeutiques innovantes pour les patients appartenant à un groupe à haut risque).

Facteurs pronostiques cliniques, biologiques et radiologiques :

- la classification clinico-radiologique d'Ann Arbor permet d'évaluer le stade de la maladie et classe le lymphome en 4 stades selon les données cliniques et radiologiques. Cette classification permet d'orienter la thérapeutique en fonction du stade, d'évaluer le pronostic et a un intérêt prospectif (par comparaison de la réponse à différents traitements pour un stade donné, permettant de ne garder que le plus efficace) (Tableau 2). Un stade supérieur à 2 est de mauvais pronostic. La classification d'Ann Arbor est insuffisante pour évaluer correctement le pronostic de la maladie, c'est pourquoi un score plus prédictif de l'évolution des LMNH a été créé : l'international prognostic index (IPI).

Tableau 1 : Classification d'Ann Arbor

stade I	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire IE : atteinte localisée d'un seul territoire extraganglionnaire
stade II	Atteinte de 2 ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme IIE : atteinte extra ganglionnaire unique avec une ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme
stade III	Atteinte ganglionnaire des 2 côtés du diaphragme IIIS : avec atteinte splénique IIIE : avec atteinte extra ganglionnaire localisée
stade IV	Atteinte viscérale (foie, poumon, moelle, os) avec au moins une atteinte ganglionnaire, ou atteinte médullaire

***E** : ajouté aux stades I, II et III en cas d'atteinte viscérale contiguë, **A** : aucun symptôme, **B** : symptômes B (amaigrissement inexpliqué de plus de 10% du poids du corps en moins de 6 mois ou fièvre inexpliquée > 38°C pendant plus de 8 jours, ou sueurs nocturnes profuses, **S** : atteinte splénique*

- L'international prognostic index (IPI) est un score clinico-biologique. Il s'agit du meilleur outil pour évaluer le risque de la maladie (4 groupes pronostiques avec des survies globales différentes)[11,21]. L'IPI est un index qui combine diverses caractéristiques cliniques liées au patient (âge et performans status), l'extension de la maladie et la croissance tumorale (stade de la maladie, niveau de LDH sérique, envahissement extra ganglionnaire)[22]. Il permet d'obtenir un score qui va classer les patients dans un sous-groupe afin de prévoir l'évolution de la maladie et de déterminer la meilleure stratégie thérapeutique. Un IPI supérieur ou égal à 3 est associé à une moins bonne survie (survie globale à 3 ans : 45% pour un IPI supérieur ou égal à 3 versus 89% pour un IPI inferieur à 3 dans l'étude de *Green et al.* en 2012)[15].

  Les différentes études comparatives de ces sous-groupes ont montré des différences de survie globale et de survie sans récidive à 5 ans[32], laissant penser que d'autres facteurs pronostiques non intégrés dans l'IPI existent (tableau 3 et figure 10).

Tableau 2 : Index pronostic international (IPI) des LNH agressifs[1]

Groupes de risque	Nombre de facteurs	Survie sans récidive à 5 ans (%)	Survie globale à 5 ans (%)
Faible	0 ou 1	70	73
Faible intermédiaire	2	50	51
Intermédiaire haut	3	49	43
Haut	4 ou 5	40	26

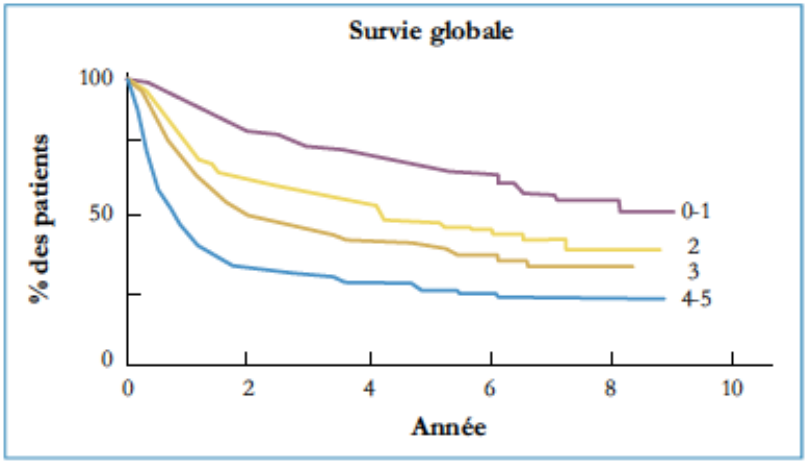


Figure 10 : Survie globale en fonction des groupes de risque définis par l'IPI [1]

Un IPI lié à l'âge (aaIPI pour *age adjusted* IPI) a été instauré devant l'observation d'une différence de survie chez les patients de plus ou de moins de 60 ans. Chez les patients de moins de 60 ans, 3 paramètres parmi les 5 gardent une valeur prédictive (stade Ann Arbor, PS, LDH). Ce nouvel index permet, tout comme l'IPI classique, de définir 4 sous-groupes pronostiques dont les survies à 5 ans sont différentes (tableau 4).

Tableau 3 : Index pronostic international ajusté à l'âge (aaIPI) des LNH agressifs[1]

Groupes de risque	Nombre de facteurs	Survie sans récidive à 5 ans (%)	Survie globale à 5 ans (%)
Faible	0	86	83
Faible intermédiaire	1	66	69
Intermédiaire haut	2	53	46
Haut	3	58	32

Afin de mieux déterminer le groupe de patients à haut risque, *Wang et al.* (2016) ont proposé un nouveau modèle clinico-pathologique distinguant 4 groupes ayant des survies significativement différentes : l'IPI ajusté à l'expression des protéines MYC et BCL2. Ce modèle permet de mieux prédire la survie des LBDGC traités par R-CHOP (la survie globale à 4 ans du groupe à haut risque était 33,3% avec l'IPI ajusté à l'expression des protéines MYC et BCL2 versus 48% avec l'IPI classique)[23].

- Le Performans status (PS) est une échelle évaluant l'état général du patient. Elle est cotée de 0 à 4 (tableau 5). Il ne s'agit pas d'un score pronostique à proprement parler mais d'une évaluation de l'état général du patient, permettant d'évaluer le retentissement de la maladie et d'appréhender la tolérance à la chimiothérapie. Lorsqu'il est supérieur ou égal à 2, le pronostic est moins bon.

Tableau 4 : **Performans Status**

PS	Activités du patient
0	Asymptomatique
1	Symptomatique mais pas de diminution des activités
2	Alitement < 50% de la journée
3	Alitement > 50% de la journée
4	Alitement permanent

Facteurs pronostiques immunohistochimiques, moléculaires et cytogénétiques :

- Le GEP diagnostique le type centre germinal GC ou lymphocytes activé ABC qui est de plus mauvais pronostic[24,25].

- L'algorithme de Hans définit le type GC ou non GC, le type non GC étant de moins bon pronostic.

- La cytogénétique moléculaire et l'IHC[26,24,27,28] pour l'étude :
    - Des réarrangements des gènes (*BCL2, BCL6, MYC*) responsables du caractère agressif du LBDGC
    - De l'expression protéique (MYC, BCL2 et BCL6)

I.3.2.4. diagnostic différentiel

Le principal diagnostic différentiel du LBDGC est le BCLU (cette entité est modifiée dans la révision OMS 2016 et appartient à de nouvelles catégories : « High-grade B-cell lymphoma » (HGBL), NOS (en l'absence de réarrangement de *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6),* ou « HGBL, avec réarrangements de *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6 »*). Ces lymphomes sont très agressifs et présentent des caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires intermédiaires entre le lymphome de Burkitt et le LBDGC, rendant le diagnostic délicat. Comme les deux autres lymphopathies, les BCLU peuvent être porteurs d'un réarrangement du gène *MYC* (dans 30 à 50% des cas) avec un gène d'*IG* (*IGH* ou chaine légère d'Ig) ou avec un gène non *IG* (comme dans le LBDGC). Cette classe de lymphomes peut également présenter des réarrangements des gènes *BCL2* et *BCL6* associés à celui de *MYC* (DH ou TH).
Les BCLU doivent être diagnostiqués en urgence, la prise en charge thérapeutique est différente des LBDGC car une intensification du traitement est nécessaire.

I.3.3. Traitement

Le choix du traitement dépend de l'âge du patient, du stade d'extension et du score IPI. Le traitement repose sur la chimiothérapie, l'immuno-chimiothérapie (l'association du rituximab dans les années 2000 a permis d'améliorer le pronostic), la radiothérapie dans certaines formes (compression médullaire par exemple) et une éventuelle greffe de cellules souches.
Pour les stades localisés et sans facteur de mauvais pronostic, le traitement de référence est le R-CHOP (association du rituximab à une polychimiothérapie : cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prédnisone). Il est également possible de traiter le patient avec une chimiothérapie plus intensive de type R-ACVBP (doxorubicine, cyclophosphamide, vindésine, bléomycine, prédnisone) mais la toxicité hématologique est plus importante.

Dans les stades avancés, deux traitements peuvent être administrés : R-CHOP ou R-ACVBP, associés à une prophylaxie méningée par méthotrexate. Une autogreffe de cellules souches peut être nécessaire en cas de positivité du TEP scan après 4 cures de chimiothérapie.

I.4. Mécanismes de dérégulation et de transformation cellulaire

I.4.1. Translocation chromosomique

Bien que nécessaires à la maturation des LB, la recombinaison VDJ, l'HMS et le switch peuvent être des évènements transformants impliqués dans la lymphomagenèse[29]. En effet, ces trois mécanismes sont à l'origine de cassures double brin[29,30], responsables de remaniements entre chromosomes.

C'est en étudiant la localisation des points de cassure dans les différentes translocations qu'il a été possible de déterminer à quel moment surviennent les anomalies au cours de la maturation du LB [29]:

- un premier point de cassure se trouvant tout proche de la région JH (séquence J du gène de la chaîne lourde d'immunoglobuline) a fait supposer que la translocation à lieu au cours du réarrangement des séquences D et J lors de la recombinaison VDJ.
- Un deuxième point de cassure se trouvant dans les régions VDJ réarrangées alors que de nombreuses mutations ont déjà eu lieu, a fait suggérer que la translocation s'est produite pendant l'HMS.
- Le troisième point de cassure se trouve dans la région du switch, laissant penser que la translocation se produit à ce moment là.

Ces trois étapes « de fragilité » sont à l'origine des translocations chromosomiques réciproques responsables du remaniement entre un gène d'*IG* et un gène impliqué dans le développement du LB, à l'origine d'une dérégulation transcriptionnelle de ce dernier. Cette dérégulation entraîne une hyperexpression de la protéine résultante ou une expression ectopique, c'est à dire que la protéine s'exprime à un endroit où elle ne s'exprime pas habituellement (figure 11).

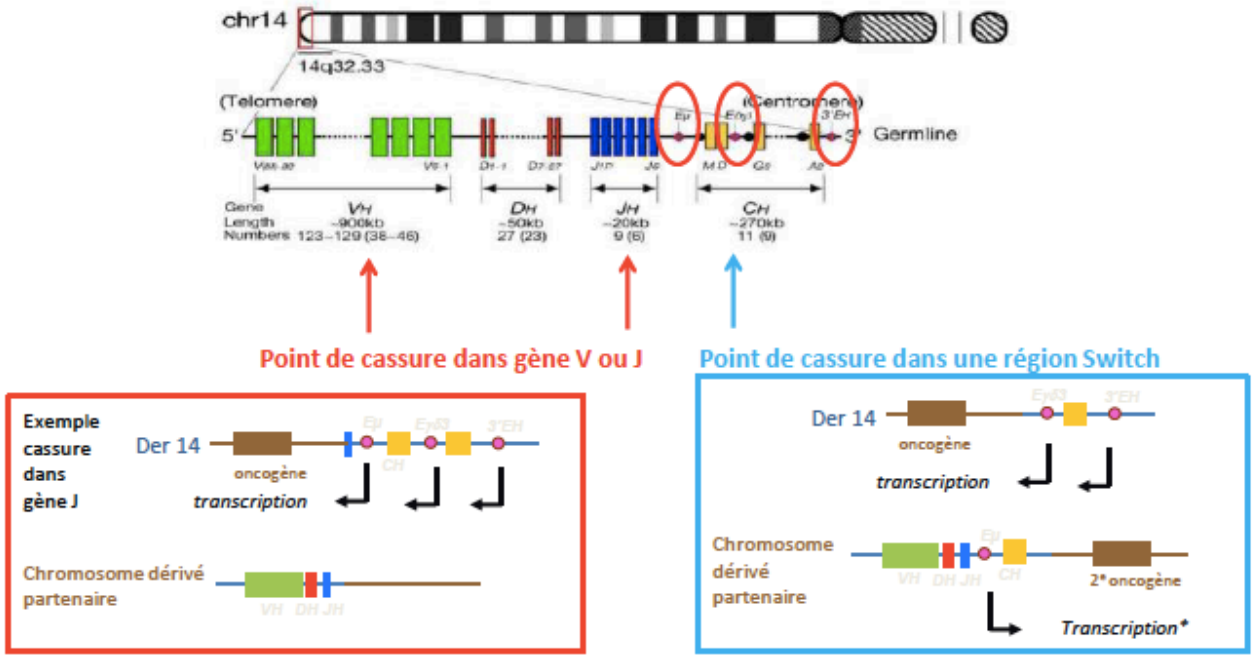


Figure 11 **: Conséquences des translocations des gènes d'*IG*** (la juxtaposition des éléments de régulation de l'expression des gènes *d'IG* (enhancers) à un oncogène est responsable d'une forte activité transcriptionnelle entraînant une hyper expression ou une expression ectopique)

I.4.2. Mutations somatiques

L'HMS dans les cellules B ne concerne pas uniquement les gènes *d'IG* mais également les gènes *BCL6* et *FAS*, entraînant une dérégulation de *BCL6* et une perte d'expression du gène suppresseur de tumeur *FAS* (dont le rôle est d'induire l'apoptose).
Dans les LBDGC, on peut observer une dysfonction de l'HMS, appelée hypermutation somatique aberrante, responsable de mutations dans d'autres gènes que les *IG* tels que *PAX5, BCL6, MYC, Rho/TTF* et *PIM-1*.

Des mutations somatiques simples peuvent également être responsables de la transformation lymphomateuse. C'est le cas des mutations touchant des gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*), des gènes initiant la réparation cellulaire (*ATM*) ou encore des amplifications géniques (*REL, BCL2, MYC*).

Les différents mécanismes de lymphomagenèse sont représentés sur la figure 12.

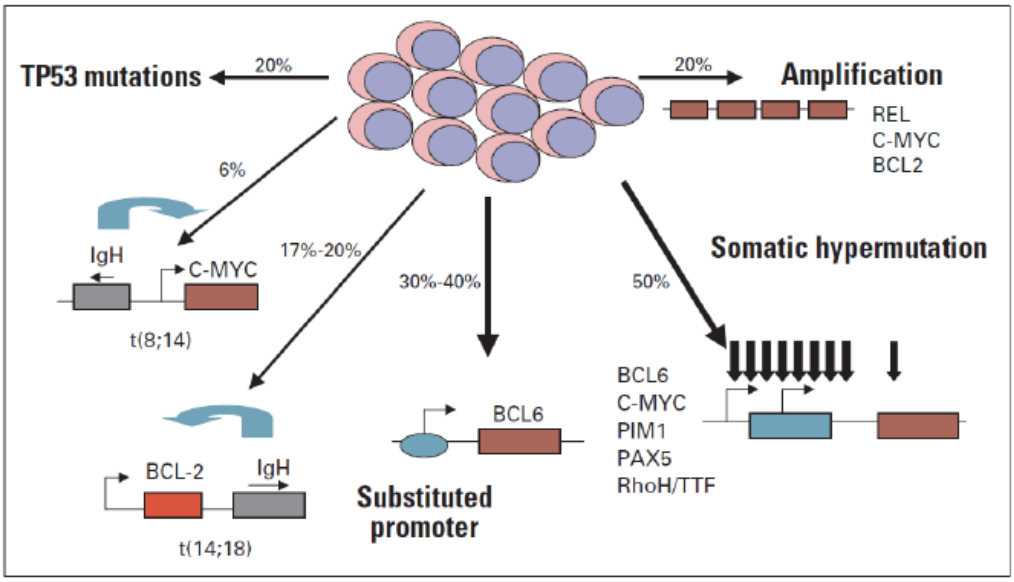


Figure 12 : Anomalies génétiques impliquées dans la lymphomagenèse dans les LBDGC

I.4.3. Rôle du microenvironnement

Tout comme pour les cellules B normales, le microenvironnement joue un rôle dans le développement des cellules B tumorales. En effet, les interactions avec les signaux venant du microenvironnement (Ag, cytokines, interaction cellule-cellule) permettent la prolifération de la cellule B, le phénomène de homing, l'adhésion et la migration cellulaire [31].

La cellule B tumorale exprime à sa surface des récepteurs aux chimiokines (tels que CXCR4 (activé par CXCL12) et CXCR5 (activé par CXCL13) par exemple) et des molécules d'adhésion (VLA-4). Ces molécules sont capitales pour l'adhésion aux cellules stromales et pour le retour vers le tissu de soutien du microenvironnement, lieu propice à la prolifération[32].
Lorsque CXCL12 se fixe sur son récepteur CXCR4, une cascade de signaux intracellulaires impliquant plusieurs kinases s'active. Parmi ces kinases, la tyrosine kinase de Bruton (Bruton's tyrosin Kinase : TkB) et IkB (Inhibitor of kappa B) sont activées.
La BtK joue un rôle dans l'activation des voies nécessaires à la migration et à l'adhésion cellulaire par médiation des chimiokines, facilitant ainsi le homing[33].
La IkB est une molécule permettant l'activation de la voie NF-kB (par inhibition de la IkBα qui séquestre NF-kB)[34].

I.4.4. Activation de la voie NF-kB

Dans les cellules B normales, la voie NF-kB est plus ou mois activée selon le stade de la maturation cellulaire. Lorsque le LB a fini sa maturation, NF-kB s'éteint quasiment. En revanche, lorsque le BCR est activé, la voie NF-kB est activée également et contrôle la prolifération (accentuation) et l'apoptose (diminution).
Dans de nombreux cancers, la voie NF-kB est constitutivement activée, contribuant ainsi probablement à la transformation cellulaire et à la progression de la maladie.
Dans les LBDGC, cette voie est activée dans le type ABC mais pas dans le type GC[34]. La mutation des gènes *CARD11, CD79A/B, A20 ou MYD88* entraîne l'activation de protéines kinases liées au BCR activant la voie NF-kB. Une fois activé, NF-kB est responsable de la surexpression de gènes anti-apoptotique (tel que *BCL-XL*) qui vont secréter des cytokines favorisant la prolifération.

I.5. Physiopathologie moléculaire

Plusieurs gènes peuvent être impliqués dans la lymphomagenèse du LBDGC mais trois d'entre eux sont d'un intérêt particulier : *MYC, BCL2,* et *BCL6*. Ces remaniements peuvent être mis en évidence sur le plan morphologique par le caryotype et sur le plan génique par la FISH.

I.5.1. Apport de la cytogénétique

Le caryotype permet d'observer les translocations chromosomiques par visualisation d'anomalies du banding.
C'est dans le lymphome de Burkitt que la translocation t(8;14), impliquant le gène *MYC*, a été mise en évidence la première fois. En effet, dans les années 70, une bande supplémentaire est observée sur le chromosome 14. C'est en 1976 que la translocation entre les chromosomes 8 et 14 est décrite (figure 13).

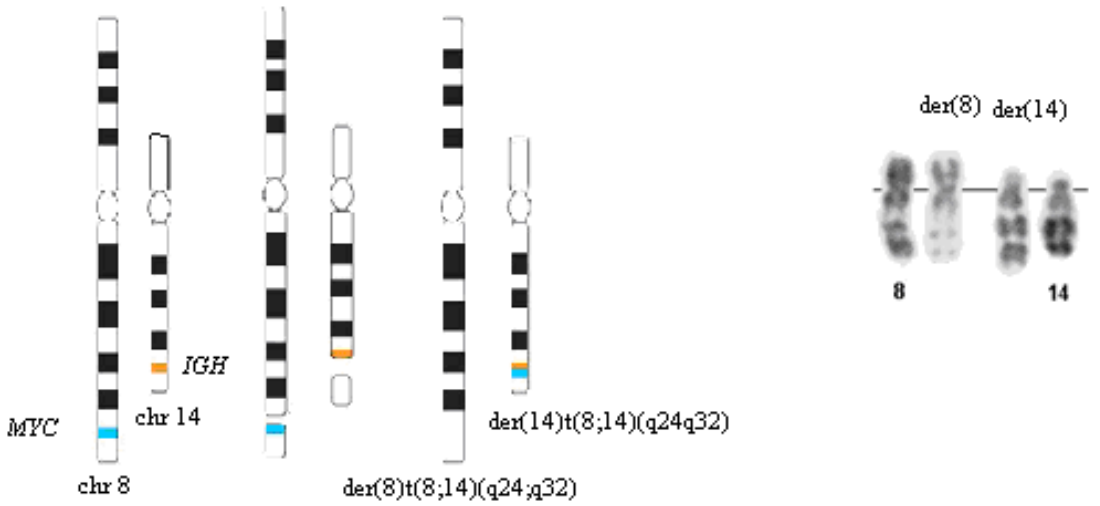


Figure 13 : Schéma et caryotype de la translocation t(8;14)

Cependant, les anomalies morphologiques liées aux réarrangements des chromosomes sur caryotype ne permettent pas de prouver que la translocation réarrange les gènes sur le plan moléculaire. Ceci explique pourquoi, de la cytogénétique classique, les cytogénéticiens se sont orientés vers la cytogénétique moléculaire (FISH). En effet, la FISH est une méthode plus résolutive (5-10Mb, versus 200kb), plus sensible et plus spécifique que le caryotype. Cette technique permet de cibler un gène précisément.

I.5.2. Définition d'un proto-oncogène et mécanismes de dérégulation

I.5.2.1. Définition d'un proto-oncogène

Un proto-oncogène est un gène susceptible d'entraîner la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse du fait de sa modification (mutation, réarrangement, délétion…). Une fois muté le proto-oncogène est appelé oncogène.

I.5.2.2. Dérégulation de l'expression des gènes par activation transcriptionnelle

Les translocations chromosomiques peuvent être responsables de la création de gènes de fusion ou de dérégulation d'un gène par juxtaposition de celui-ci avec un nouvel élément régulateur (enhancer). La dérégulation génique est le cas le plus fréquemment observé dans les pathologies lymphoïdes et donc dans les LBDGC. Ainsi, dans les LBDGC, les proto-oncogènes *MYC, BCL2* et *BCL6* se retrouvent sous le contrôle de l'enhancer d'un autre gène (bien souvent une *IG*) et deviennent ainsi des oncogènes. Ces remaniements sont à l'origine d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène, résultant en la formation d'une protéine normale mais hyper exprimée (figure 11).

I.5.3. Description des oncogènes impliqués dans le LBDGC

I.5.3.1. *MYC* (OMIM #190081#)

I.5.3.1.1. Structure du gène

Le gène *MYC* est localisé sur le chromosome 8 en position 8q24.
Il est composé de 3 exons. L'exon 1 est non codant et les exons 2 et 3 codent pour la protéine MYC. Ce gène a 4 promoteurs dont le promoteur principal P2 se trouve dans l'exon 1[35,36] (Figure 14).

I.5.3.1.2. Structure de la protéine

La protéine MYC est organisée en différents domaines[35,36] :
Un premier domaine, constitué des MYC box I, II, III et IV, se trouve au niveau de la partie N-terminale.
La MYC box I est nécessaire à la stabilité de la protéine.
La MYC box II permet l'activation et la répression de la transcription.

La MYC box III est impliquée dans la transformation cellulaire (par diminution de la capacité de MYC à induire l'apoptose). Elle contribue également à la répression transcriptionnelle des gènes cibles de MYC[37].
Enfin, la MYC box IV a une rôle dans la liaison à l'ADN, l'apoptose, la transformation cellulaire et également dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2[38].

Le deuxième domaine, dans la partie C-terminale de la protéine, est constitué d'un motif hélice-boucle-hélice (helix-loop-helix : HLH) et d'un motif leucine zipper permettant les interactions protéine-protéine. Ce domaine comporte également une région basique, permettant la reconnaissance et la liaison à des séquences spécifiques d'ADN.

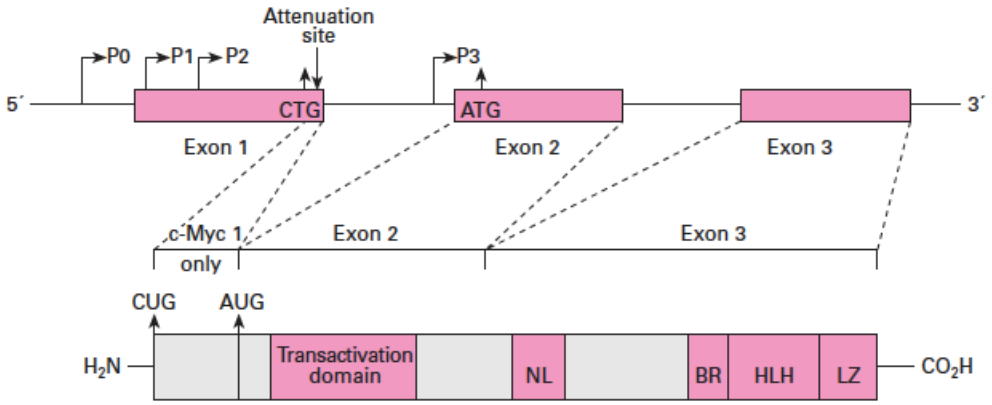


Figure 14 : Représentation schématique du gène *MYC* et de la protéine résultante[35].
(P0,P1,P2,P3 : promoteurs ; NL : localisation nucléaire ; BR : région basique, HLH : motif hélice-boucle-hélice ; LZ : motif leucine zipper)

I.5.3.1.3. Modulation de la transcription

La protéine MYC est un facteur de transcription capable d'activer ou de réprimer la transcription de ses gènes cibles.

L'activation de la transcription se fait en diverses étapes[39]. Tout d'abord, le complexe MYC-MAX se forme par dimérisation de ces deux protéines. Cette hétérodomérisation est rendue possible grâce aux domaines HLH et leucine zipper.

Le complexe MYC-MAX se fixe sur les régions promotrices de ses gènes cibles au niveau de séquences d'ADN spécifiques appelées E-box (CACGTG). L'hétérodimère recrute des co-activateurs de la transcription tel que TRAAP (Transformation / Transcription domain associated protein), qui recrute à son tour une acétyltransférase[37,40,41]. Cette enzyme permet le remodelage de la chromatine en diminuant la compaction de l'ADN, permettant ainsi la transcription.

La répression de la transcription fait également intervenir le complexe MYC-MAX. En effet, celui-ci se fixe sur des activateurs de la transcription tel que MIZ-1 (MYC-interacting zinc finger protein 1) par exemple et les inhibe[39]. De plus, il permet aussi de recruter une ADN méthyltransférase qui empêche la transcription par méthylation de l'ADN (la méthylation entraîne une compaction de l'ADN, empêchant le passage des enzymes).

I.5.3.1.4. Les fonctions cellulaires

La protéine MYC est impliquée dans diverses fonctions cellulaires : la croissance cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la progression du cycle cellulaire et le métabolisme de la cellule.

- Apoptose : MYC régule différentes voies de l'apoptose[41] :
    - La voie P53 : la protéine P53 est un suppresseur de tumeur. Elle est régulée par les protéines MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) et ARF1 (ADP ribosylation factor 1). MDM2 est un inhibiteur de P53, alors que ARF1 est un inhibiteur de MDM2. L'activation de MYC entraîne une augmentation de la protéine ARF1. Celle-ci inhibe alors MDM2, qui ne peut donc plus inhiber la protéine P53. Il en résulte une augmentation de P53 avec augmentation de l'apoptose.
    - La voie mitochondriale par régulation de BAX (BCL2 associated X protein) et BCL2 : *MYC* permet l'activation des protéines pro-apoptotiques telle que BAX et inhibe les protéines anti-apoptotiques telle que BCL2.
    - La voie des récepteurs de mort : Les récepteurs de mort, tel que FAS (CD95) par exemple, appartiennent à la famille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNF). La stimulation du récepteur TNF est responsable de l'activation et de l'inhibition de plusieurs protéines de la signalisation, aboutissant à

l'ubiquitination et à la dégradation par le protéasome de IkB, qui est un inhibiteur de la voie NF-κB. Une fois l'inhibiteur dégradé, NF-κB est libre dans le cytoplasme et peut être transloqué dans le noyau pour assurer une de ses fonctions : la protection de la cellule contre l'apoptose induite par les récepteurs de mort. Lorsque MYC est dérégulé, il réprime l'activation de la voie NF-κB[42] qui ne peut alors plus réguler négativement l'apoptose.

Par ailleurs, lorsque le FAS ligand active son récepteur, le facteur FADD (FAS associated Death Domain) est recruté et attire la procaspase 8. L'association de FAS ligand, FADD et la procaspase forme le complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex), permettant l'activation et la libération de la caspase 8 par clivage de la procaspase. Elle est ensuite libérée et active d'autres caspases, responsables de l'apoptose. La protéine FLICE inhibitory protéin (FLIP), qui est un isoforme de la caspase 8, entre en compétition pour son recrutement dans le complexe DISC et bloque ainsi le signal de mort induit par le récepteur FAS. En réprimant la transcription de FLIP, MYC permet l'augmentation de l'activité de la caspase 8[43] et promeut ainsi l'apoptose induite par les récepteurs de mort.

- Régulation du cycle cellulaire et croissance cellulaire : La protéine MYC permet la progression du cycle cellulaire en favorisant le passage de la phase G1 à la phase S (sur la figure 15 sont représentées les cyclines et cyclines dépendantes kinases (CDK) intervenant dans le cycle cellulaire). MYC active les cyclines permettant le passage en phase S et inhibe les inhibiteurs des CDK (figure 16). En activant le complexe cycline D/CDK4, il permet la libération du facteur E2F impliqué dans la progression du cycle cellulaire[44] (ce facteur permet d'activer la transcription de la cycline A nécessaire au passage en phase S). Le facteur de transcription MYC permet aussi d'activer les gènes de croissance cellulaire tels que *ODC1 (*BCL2 associated X protein) et *CDC25A* (cell division cycle 25A) et réprime les gènes d'arrêt du cycle cellulaire tel que *GAS1 (*Growth arrest-specific 1).

- Immortalisation cellulaire par activation de la télomérase. Cette enzyme permet de maintenir l'intégrité des extrémités télomériques au cours des divisions cellulaires.

- Régulation des micro RNA : miR-17-92, ayant un rôle dans l'apoptose, miR-26a, qui a un rôle dans la progression du cycle cellulaire et miR23a et 23b, ayant un rôle dans le métabolisme cellulaire[39].

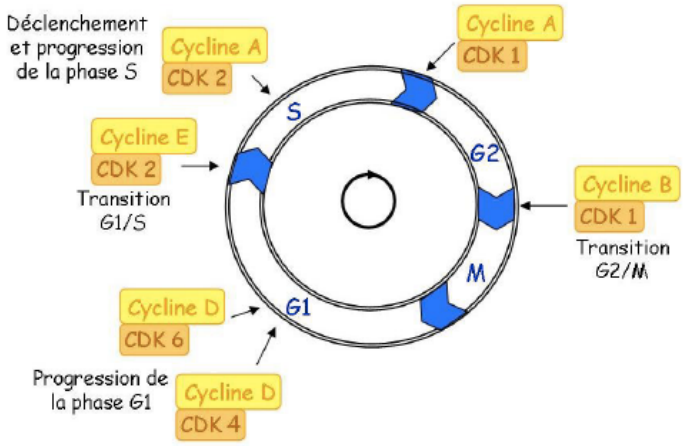


Figure 15 : Molécules impliquées dans la progression du cycle cellulaire

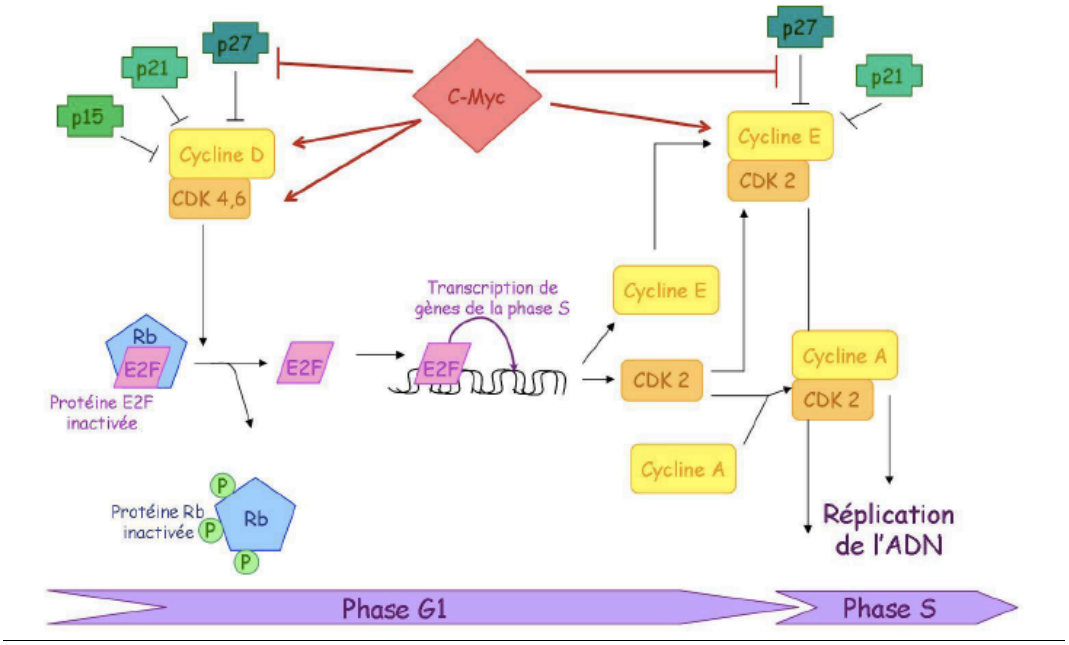


Figure 16 : Rôle de *MYC* dans le contrôle et la progression du cycle cellulaire

I.5.3.1.5. Réarrangement et dérégulation du gène *MYC*

Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de la dérégulation du gène *MYC*, comme les translocations ou les amplifications du gène. Nous nous intéresserons ici à la dérégulation par translocation chromosomique.

Le gène *MYC* est réarrangé dans 7 à 14% des cas de LBDGC[8–11,45–47]. Les points de cassure impliqués dans la dérégulation du gène peuvent être très variables, comme l'indique la figure 17.

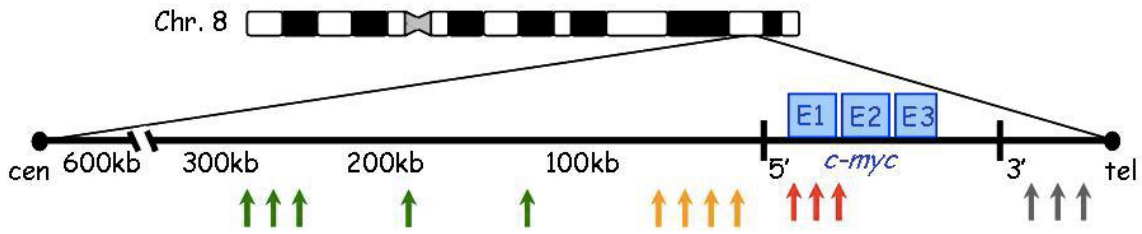


Figure 17 : Représentation des différents points de cassure responsables de la dérégulation du gène *MYC* (Les flèches représentent les différents points de cassure ; E : exon ; cen : centromère ; tel : télomère)

Dans 40% des cas, le réarrangement de *MYC* est dû à un réarrangement avec un gène différent des immunoglobulines tels que *BCL6, BCL11A, PAX5* ou encore *IKAROS*[11,48]. La région la plus souvent impliquée dans la translocation entre le gène *MYC* et un gène *non IG* est la région 9p13. Cette région contient le gène *ZCCHC7* (Zinc finger CHC-type containing 7), qui est un facteur de transcription jouant un rôle dans le développement des cellules B. Il serait potentiellement impliqué dans la dérégulation de *MYC* lors d'une translocation[11].

Dans 60% des cas, *MYC* est réarrangé avec une chaîne d'*IG*. Le plus souvent, il s'agit d'une translocation t(8;14)(q24;q32), c'est à dire entre la chaîne lourde *d'IG* (*IGH*), qui se situe sur le chromosome 14 en position 14q32 et le gène *MYC* (figures 18 et 19). Cependant, il existe des variants de la translocation t(8;14), puisque le réarrangement peut impliquer les gènes des

chaînes légères lambda, en position 22q11 (t(8;22)(q24;q11)), ou plus rarement kappa, en position 2p11 (t(2;8)(p12;q24)) (Figures 20 et 21).

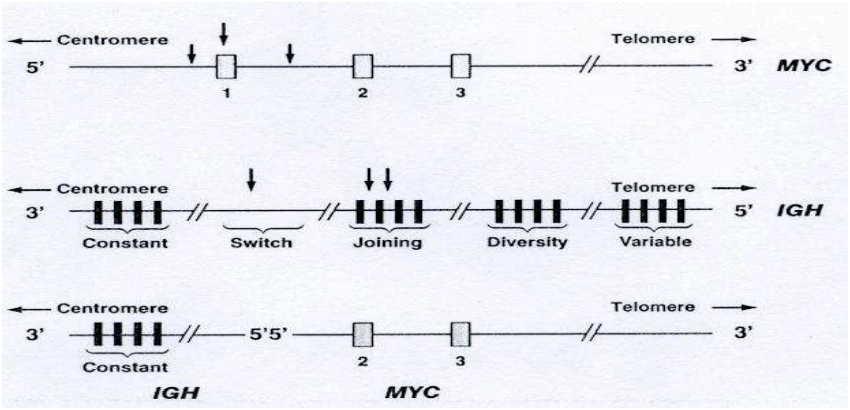


Figure 18 : représentation schématique de la translocation t(8;14)

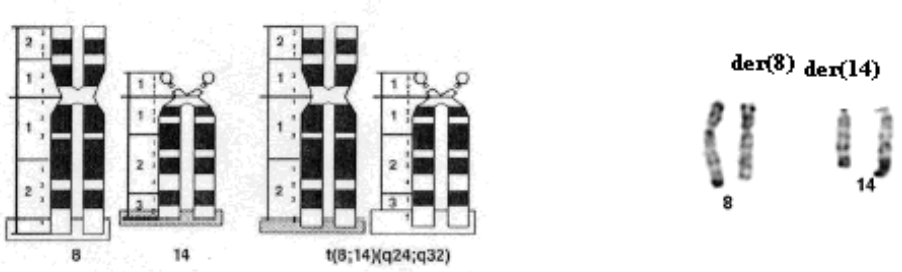


Figure 19 : Représentations schématique et caryotypique d'une translocation t(8;14)

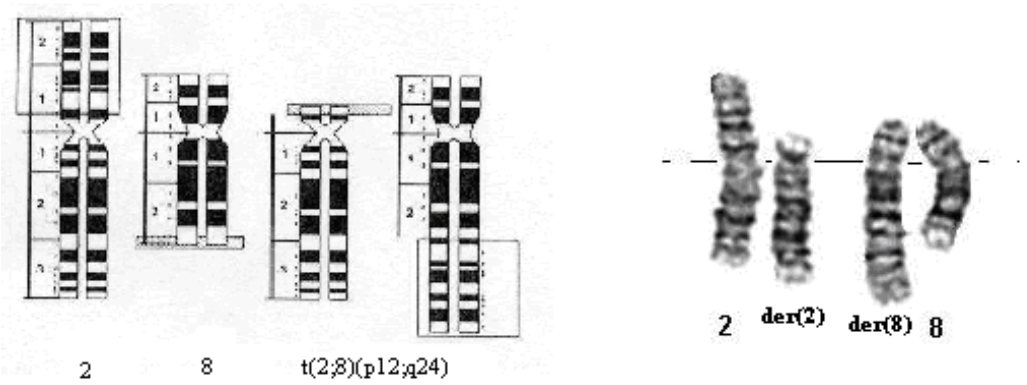


Figure 20 : Représentations schématique et caryotypique d'une translocation t(2;8)

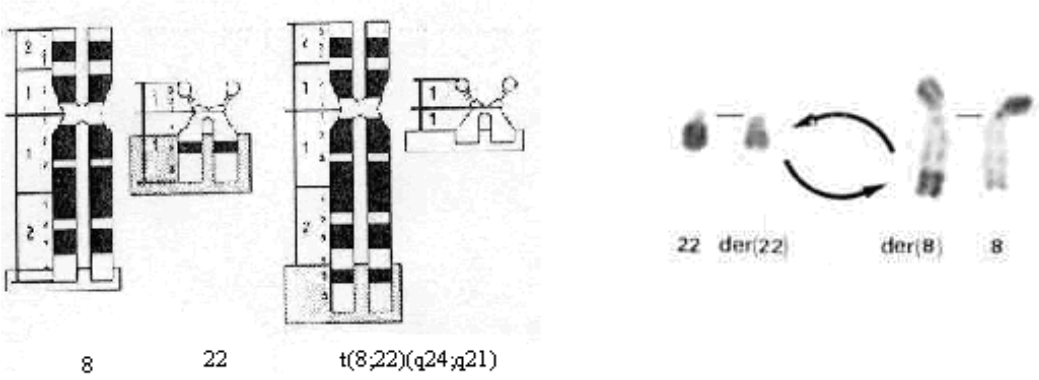


Figure 21 : Représentations schématique et caryotypique d'une translocation t(8;22)

Dans les translocations t(8;14), t(2;8) et t(8;22), l'oncogène *MYC*, juxtaposé au locus codant pour une chaîne d'*IG*, se retrouve sous le contrôle de l'enhancer de *l'IG*. Comme expliqué précédemment, il en résulte une surexpression de *MYC* par augmentation de son activité transcriptionnelle et donc une dérégulation de ses gènes cibles.

La dérégulation de ces gènes peut être à l'origine de diverses conséquences[49] (figure 22) :

- augmentation de l'apoptose,
- prolifération cellulaire incontrôlée,
- blocage de la différenciation cellulaire,

- dérégulation de mi-ARN responsable d'une augmentation de l'apoptose (mir-17-92), de modifications de la progression du cycle cellulaire (miR-26a) et de modifications du métabolisme cellulaire (miR-23a et miR-23b)[39]
- et/ou immortalisation cellulaire par activation de la télomérase.

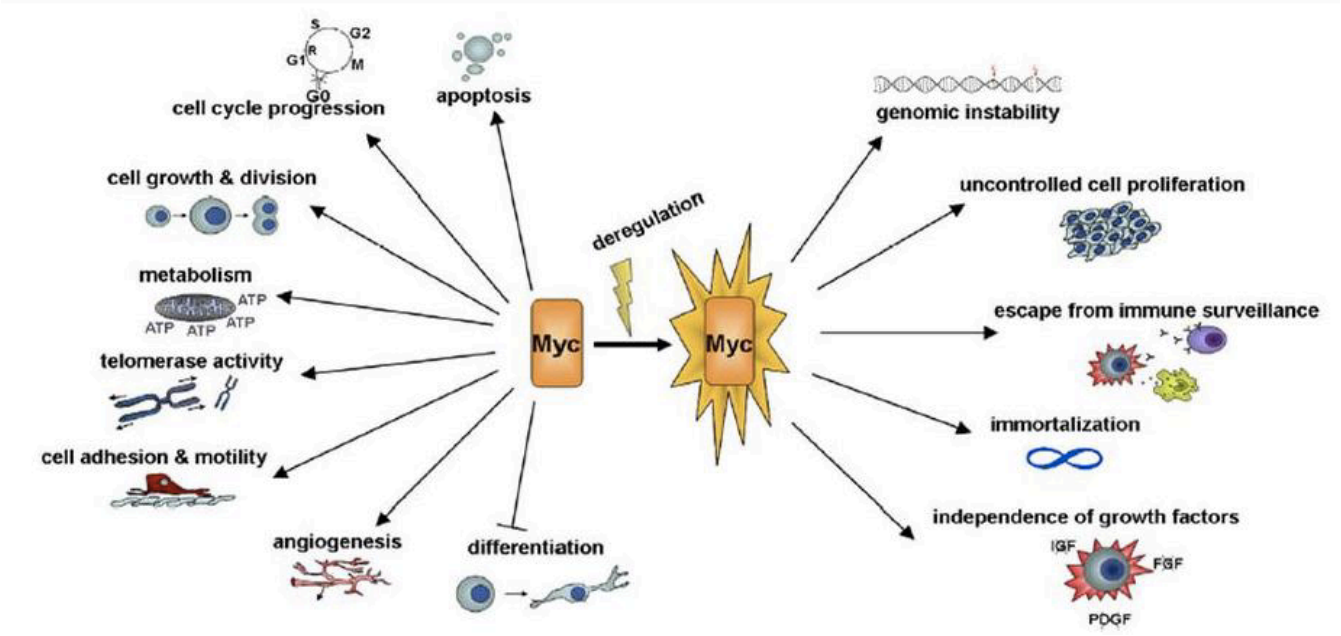


Figure 22 : Conséquences de la translocation t(8;14) juxtaposant les gènes *IGH* et *MYC*

I.5.3.2. BCL2 (B Cell leukemia/lymphoma 2) (OMIM #151430#)

Le gène *BCL2* est localisé sur le chromosome 18, en position q21 (18q21). Il code pour la protéine BCL2.

I.5.3.2.1. Structures du gène et de la protéine

Le gène *BCL2* est composé de 3 exons dont seuls le deuxième et une partie du troisième exon sont codants.
La protéine est constituée de 4 domaines BH (homo/heterodimerization domains) permettant la dimérisation avec d'autres protéines, en particulier avec la protéine BAX (BCL2 associated X protein).

I.5.3.2.2. Fonctions de la protéine

La protéine BCL2 a une fonction anti-apoptotique. Grâce à son domaine C-terminal, elle s'insère dans la membrane de la mitochondrie et préserve son intégrité en bloquant la dimérisation de protéines pro-apoptotiques (telles que BAX et BAK). BCL2 empêche ainsi le relargage du cytochrome c par la mitochondrie et de cette façon, inhibe la voie des caspases responsables de l'apoptose[50].
La surexpression de ce gène confère également un avantage de croissance cellulaire et permet la coopération avec *MYC* pour promouvoir la prolifération des cellules précurseurs B.

I.5.3.2.3. Réarrangement et dérégulation du gène BCL2

La translocation t(14;18) est bien connue dans le lymphome folliculaire, mais on la retrouve également dans 13 à 25% des LBDGC[9,51,12,15].

Le plus souvent, le réarrangement de *BCL2* se fait avec le gène de la chaine lourde d'Ig. Mais, tout comme *MYC*, il peut également se faire avec les gènes des chaines légères d'Ig. Plus rarement, il s'agit d'autres gènes.
La translocation du gène *BCL2* est plus volontiers retrouvée dans les LBDGC de type GC, alors que dans le type ABC, on retrouve plus communément une amplification du locus 18q21[14].

En cas de translocation entre les bras longs des chromosomes 14 et 18 (t(14;18)), *BCL2* est dérégulé car il se retrouve sous le contrôle de l'enhancer de *IGH*. Sa transcription est alors augmentée, conférant ainsi un avantage de survie à la cellule[52,53].

Parfois, dans le cadre des LBDGC, le réarrangement de *BCL2* est associé au réarrangement de *MYC,* on parle de lymphome double hit (DH).
Les LBDGC DH *MYC+/BCL2+* représentent 6% des patients atteints de LBDGC[15]. Dans ce cas, le réarrangement de *BCL2* est le premier événement lors du développement de l'hémopathie, c'est à dire qu'il survient en amont du réarrangement du gène *MYC*[52].

I.5.3.3. BCL6 (B Cell lymphoma 6) (OMIM #109565#)

Le gène *BCL6* est localisé sur le chromosome 3, en 3q27.

I.5.3.3.1. Structure du gène et de la protéine

Le gène *BCL6* est constitué de 11 exons et le premier codon ATG se situe dans l'exon 3.
Il code pour un facteur de transcription contenant dans sa partie N-terminale, un domaine BTB/POZ (Broad-complex/Tramtrack/Bric-a-brac/Pox virus/Zinc finger) et dans sa partie C-terminale, six domaines à doigts de Zinc. Entre les deux, on retrouve un domaine de répression de la transcription.
Le domaine BTB/POZ permet les interactions entre la protéine BCL6 et d'autres protéines ayant un rôle de répresseur de la transcription, tout comme BCL6.
Les domaines à doigts de Zinc permettent la liaison de BCL6 à des séquences d'ADN spécifiques.

I.5.3.3.2. Fonctions de la protéine

La protéine BCL6 est un répresseur transcriptionnel et agit en se fixant aux séquences d'ADN de ses gènes cibles et en recrutant des corépresseurs pour les réprimer.

Par son action sur de nombreux gènes, BCL6 joue un rôle sur plusieurs fonctions cellulaires citées ci-après[27,54]:

- Participe au développement normal des cellules B et du centre germinatif. En effet, en permettant la répression de l'apoptose dans les centres germinatifs par répression de la transcription du gène *TP53,* elle permet le déroulement de l'étape d'HSM
- Action dans le contrôle du cycle cellulaire
- Action sur la prolifération cellulaire
- Action sur la différenciation lymphocytaire
- Rôle dans l'apoptose
- Rôle dans l'inflammation et la réponse immunitaire

I.5.3.3.3. Réarrangement du gène BCL6

Le gène *BCL6* est réarrangé dans 30 à 40% des LBDGC[9,12]. Il s'agit du gène le plus fréquemment réarrangé dans les LBDGC.[55] Cependant, les anomalies de fonction de *BCL6* ne sont pas toujours dues à un remaniement du gène. En effet, dans 70% des cas, une mutation somatique est retrouvée[12].

Les gènes impliqués dans le réarrangement sont nombreux. Dans la moitié des cas il s'agit d'une immunoglobuline. Le réarrangement de *BCL6*, qui juxtapose le domaine codant de BCL6 avec une séquence d'un autre gène, est responsable d'une modification de son expression par substitution du promoteur de *BCL6*[27,54].
Cette dérégulation est à l'origine d'une augmentation de la survie des cellules, permettant ainsi le développement d'un clone tumoral.
Comme pour *BCL2*, le réarrangement de *BCL6* peut être associé à celui de *MYC,* à l'origine d'un LBDGC DH.

I.6. Objectifs de notre étude :

Notre travail a été réalisé en collaboration avec le Professeur Gyan, le Docteur Monjanel du service d'Hématologie et thérapie cellulaire au CHRU de Tours et le Docteur Arbion, anatomopathologiste du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique de l'hôpital Bretonneau. Il avait 2 objectifs :

1) le premier faisait suite aux diverses publications rapportant l'impact des différents réarrangements impliquant *MYC*.

La plupart des observations rapportées dans la littérature valident le fait que l'effet de ces altérations est péjoratif sur l'évolution de la maladie. Cet effet est d'autant plus important lorsque des événements comme le double ou triple hit sont associés. En effet, le réarrangement des gènes *BCL2* et/ou *BCL6* serait à l'origine d'une diminution de la survie globale et de la survie sans progression[9].

Outre ce fait établi, depuis quelques années, des travaux ont démontré le rôle prépondérant du partenaire de *MYC* et particulièrement lorsque celui-ci fusionne ou se juxtapose à un gène d'*IG*, alors que pour les autres partenaires, le pronostic est identique aux lymphomes sans réarrangement de *MYC*.

Afin de valider ces conclusions, nous avons mené une étude rétrospective incluant 49 patients avec un diagnostic de LBDGC entre fin 2012 et fin 2015, dans le but de rechercher la fréquence du réarrangement de *MYC,* de définir le partenaire impliqué et de préciser si cet événement était associé au réarrangement des gènes *BCL2* et *BCL6.* Nous avons ensuite évaluer l'impact sur la survie des patients afin d'évaluer ce critère pronostique dans l'évolution du LBDGC.

Notre étude a été réalisée à partir d'appositions provenant de tissus congelés (prélevés au moment du diagnostic). Nous n'avons pas pu utiliser le matériel conservé en paraffine du fait de l'absence de technique de déparaffinage.

2) le deuxième objectif était la mise au point d'une technique de déparaffinage. Les laboratoires d'anatomopathologie qui ne sont pas en mesure de conserver du matériel congelé (très coûteux en équipement et en logistique) ou de réaliser eux-mêmes les techniques de FISH (c'est le cas pour la majorité d'entres eux), optent pour le paraffinage des prélèvements qui peuvent rester très longtemps à température ambiante. Cependant, la FISH sur coupes en paraffine nécessite une mise au point technique qui peut-être fastidieuse. Nous avons donc tenté, au cours de ce travail, de mettre au point une technique de déparaffinage efficace afin d'être en mesure de prendre en charge les prélèvements issus de l'extérieur.

II. Patients et méthode

II.1. Patients

Nous avons répertorié 123 patients présentant un diagnostic de LBDGC établi par le laboratoire d'anatomopathologie à Tours, entre fin 2012 et fin 2015. Parmi ces patients, 103 avaient un LBDGC, NOS, 14 avaient un lymphome de localisation cérébrale, 5 avaient une forme médiastinale et un patient était atteint d'un LBDGC intravasculaire.
Pour 42 des 123 patients nous ne disposions que de prélèvements conservés en paraffine.

Nous avons en premier lieu établi les critères d'inclusions et d'exclusions suivants :

Critères d'inclusion :

- Patients atteints de LBDGC de novo (pas d'antécédent de lymphome connu) ou transformé (c'est à dire que le LBDGC est issu de la progression d'un lymphome de bas grade) selon la classification OMS 2008, diagnostiqués au CHU de Tours entre fin 2012 et fin 2015.
- Patients pour lesquels nous avions des échantillons congelés prélevés lors du diagnostic.

Critères de non-inclusion :

- LBDGC de localisation cérébrale, médiastinale et intravasculaire.
- Patients pour lesquels nous ne possédions pas de matériel exploitable (absence de prélèvement congelé ou présence de matériel en quantité trop faible pour pouvoir être utilisé ultérieurement).

Au total 74 patients ont été exclus :

- 42 prélèvements en paraffine
- 5 lymphomes médiastinaux
- 1 lymphome intravasculaire
- 14 lymphomes cérébraux
- 12 prélèvements non exploitables (prélèvement trop petit, absent ou nécrosé)

Après exclusion des patients ne remplissant pas les critères d'inclusion ou possédant des critères d'exclusion, notre étude rétrospective monocentrique a permis d'inclure une cohorte de 49 patients adultes atteints de LBDGC sur une période de 3 ans (de fin 2012 à octobre 2015).

Puis nous avons réalisé un long travail de recherche clinique et biologique afin d'extraire les données qui suivent : âge au diagnostic, le stade Ann Arbor, l'IPI, le performans status, le caractère de novo ou transformé, le devenir, le taux de LDH et le traitement.

II.2. Méthodes

Après avoir sélectionné notre série de 49 patients selon les critères ci-dessus, pour chacun d'entre eux nous avons recherché dans leur dossier les résultats des études IHC et cytogénétiques.
Pour tous les patients pour lesquels celles-ci n'étaient pas effectuées, nous avons réalisé à partir de nouvelles lames d'apposition de prélèvements congelés (étalement par tapotement du matériel congelé sur une lame) les analyses suivantes :

- une technique de FISH, selon le mode opératoire du laboratoire. Notre démarche a consisté à définir systématiquement le statut de *MYC* puis, en cas de positivité, les statuts de *BCL2, BCL6, IGH* et si besoin *IGK* et *IGL*.
- une technique d'IHC, afin de mesurer l'expression des protéines BCL6, BCL2 et MYC et de déterminer le sous-type GC ou non GC.

Enfin, nous avons utilisé des outils statistiques pour l'évaluation des critères pronostiques et nous avons tenté de mettre au point le déparaffinage.

II.2.1. La FISH

II.2.1.1. Etapes techniques

Nous avons travaillé sur des lames d'apposition faites à partir de tissu congelé. Pour un seul patient, nous n'avions pas de biopsie disponible mais nous avons pu utiliser un culot de moelle congelé (la moelle étant envahie).
La FISH a été réalisée selon le mode opératoire du CHRU de Tours (mode opératoire en annexe III).
Dans le cas ou l'analyse se fait sur lame paraffinée, il faut tout d'abord effectuer un déparaffinage afin de pouvoir réaliser la technique de FISH. Si cette étape n'est pas réalisée, la sonde ne pénètre pas dans le noyau.

Pour les 49 patients de notre cohorte, nous avons utilisé en systématique la sonde break apart MYC (en 8q24) (MetaSystems®). En cas de positivité, les sondes suivantes ont été utilisées (détails des sondes en annexe IV) :

- La sonde double fusion MYC/IGH (en 8q24 et14q32) (Cytocell®) pour rechercher le réarrangement du proto-oncogène avec le gène *IGH*,
- Les sondes break apart IGL (en 22q11) et IGK (en 2p11) (Cytocell®) si *IGH* n'était pas remanié,
- La sonde break apart BCL6 (en 3q27.3) (Cytocell®) et la sonde break apart BCL2 (en 18q21) (Cytocell®) ou la sonde double fusion BCL2/IGH (en 18q21 et 14q32) (Cytocell®) (les deux sondes ont été utilisées sans préférence pour l'une ou pour l'autre), pour rechercher un lymphome SH, DH ou TH.

La conduite à tenir en cas de positivité du remaniement de *MYC* est représentée ci-dessous sur le logigramme décisionnel de la figure 23.

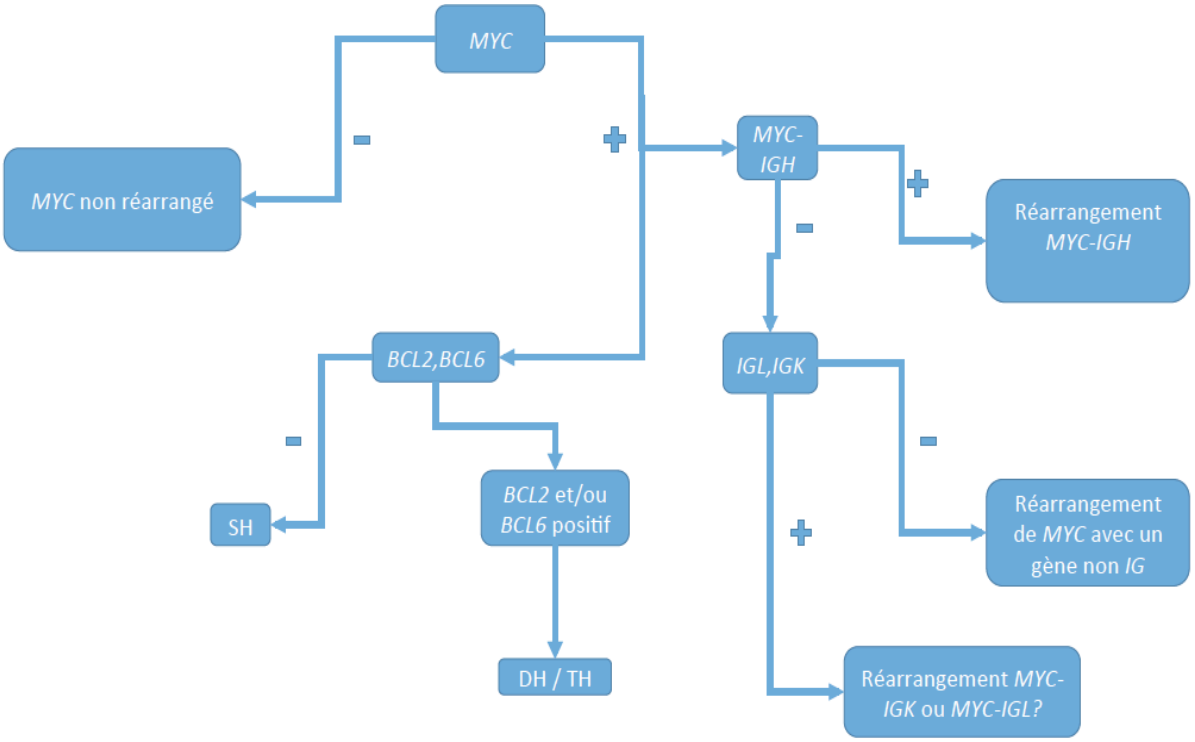


Figure 23 : Logigramme décisionnel

Au total, nous avons réalisé 67 techniques de FISH :

- 36 avec la sonde break apart MYC (13 avaient déjà été effectuées au diagnostic)
- 7 avec la sonde break apart BCL2 (3 avaient déjà été demandées lors du diagnostic)
- 6 avec la sonde break apart BCL6 (nous avions déjà les résultats pour 4 patients)
- 8 avec la sonde double fusion MYC-IGH (analyse non réalisée pour 2 patients car *IGH* n'était pas remanié)
- 5 avec la sonde break apart IGK
- 5 avec la sonde break apart IGL

Pour la majorité des sondes, le laboratoire travaille avec Cytocell®. Cependant, pour le gène *MYC,* nous nous sommes tournés vers MetaSystems®. En effet, une étude effectuée sous l'égide du groupe français de cytogénétique hématologique (GFCH) a montré une sensibilité différente des sondes en fonction du fournisseur pour la détection du réarrangement du proto-oncogène. Ceci est lié à la variabilité du point de cassure au locus *MYC* en 8q24 (figure 13) et à la surface de la région couverte par la sonde. On peut voir sur les schémas ci-dessous que

celle du fournisseur MetaSystems à une meilleure couverture de la région par rapport à celle de chez Cytocell (figure 24). En effet, il peut arriver (pour des variants très rares) que le point de cassure se situe en amont de *MYC* (au dessus de *POU5F1B*), la sonde Cytocell® rendrait alors un faux négatif.

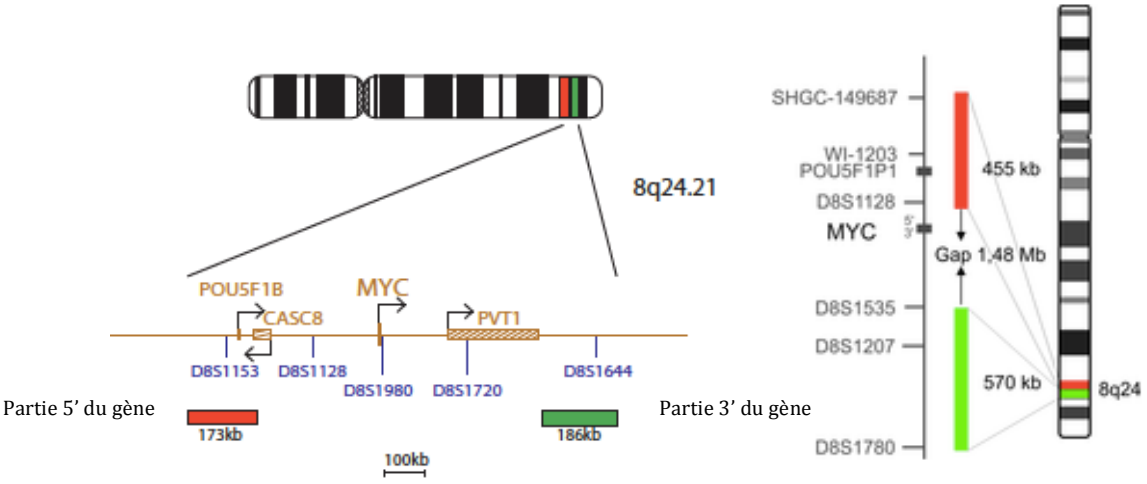


Figure 24 : **Représentation des sondes *MYC* break apart en fonction du fournisseur** (Cytocell à gauche et MetaSystems à droite ; en rouge : la partie 5' du gène et en vert : la partie 3' du gène ; POU5F1B (Pou domain, class 5, transcitpion factor 1B) = POU5F1P1 (Pou domain, class 5, transcitpion factor 1 pseudogène 1))

II.2.1.2. Analyse des lames

Une fois les techniques de FISH terminées, les lames doivent être lues puis interprétées.
Chaque champ microscopique permet de visualiser de nombreux noyaux à analyser (figure 25).

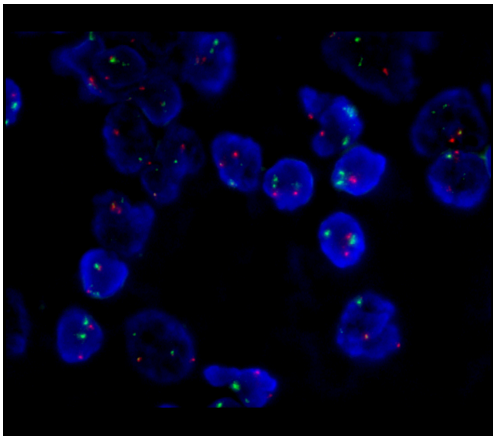


Figure 25 : Noyaux en FISH observés sur un champ microscopique

Pour les sondes break apart, le signal vert doit être bien distinct du rouge pour que les résultats soient considérés positifs et pour conclure à un réarrangement du gène (figure 26). Le seuil de positivité fixé par le laboratoire est de de 3% afin d'éviter de rendre un faux négatif (par superposition d'un spot vert et d'un spot rouge en réalité séparés du fait d'une translocation) (Figure 27).

La présence de 2 spots jaunes (ou d'un spot rouge et d'un spot vert très proches l'un de l'autre) représente une cellule normale sans réarrangement génique (figure 28).

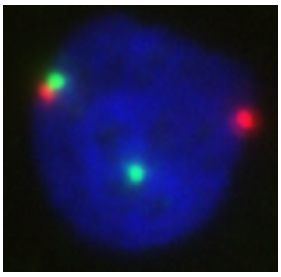


Figure 26 : Réarrangement du gène *MYC* avec une sonde Break apart
(partie centromérique du gène *MYC* (spot rouge) et partie télomérique du gène (spot vert)

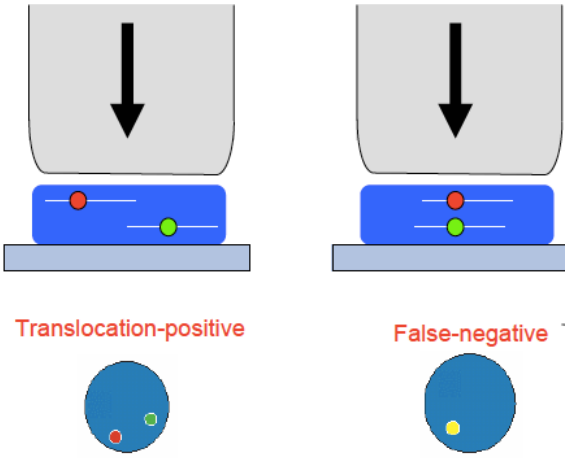


Figure 27 : Inconvénients des sondes break apart (à gauche : visualisation d'un réarrangement génique ; à droite : faux négatif par superposition des sondes)

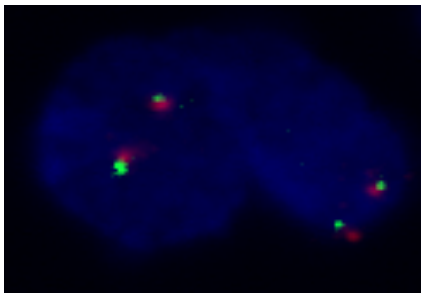


Figure 28 : Sonde break apart dans un cellule sans réarrangement

Les sondes double fusion sont positives lorsqu'on observe la présence de deux spots jaunes, témoignant de la fusion entre les 2 gènes, d'un spot rouge et d'un spot vert pour les gènes non réarrangés (figure 29). Le seuil de positivité pour ces sondes est de 1% des noyaux. En effet, le risque de faux positif lié à la visualisation de deux spots jaunes par superposition des deux spots rouges avec les deux spots verts est quasiment nul.

Une cellule est normale si on retrouve deux spots rouges et deux spots verts.

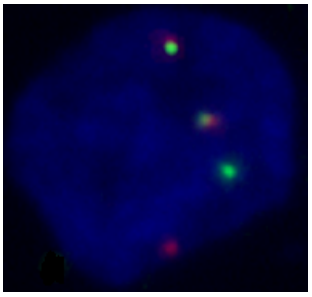


Figure 29 : Réarrangement avec une sonde double fusion
(*IGH* en vert, *MYC* en rouge, réarrangement *MYC /IGH* en jaune)

II.2.2. La technique de déparaffinage

La paraffine, qui permet de conserver le tissu dans un état le plus proche possible de son état in vivo, est le moyen le plus courant de conservation des biopsies.
Dans notre étude, de nombreux prélèvements de LBDGC conservés uniquement en paraffine n'ont pas pu être inclus du fait de l'absence de technique de déparaffinage au point.
Au total, nous avons effectué 10 essais de déparaffinage, dont les 6 premiers ont été en partie réalisés au laboratoire d'anatomopathologie (déparaffinage) et en partie au laboratoire de cytogénétique (de la digestion à l'hybridation). Les 4 derniers essais ont été réalisés dans leur totalité au laboratoire de cytogénétique. Nous nous sommes inspirés de plusieurs protocoles utilisés par divers laboratoires :

- adaptation à partir du protocole mis en œuvre au CHU de Bordeaux (6 premiers essais, faits avec le laboratoire d'anatomopathologie)
- celui du CHR d'Orléans pour 3 essais (utilisé pour la recherche de *ALK* dans les cancers du poumon).
- et pour un essai, un mixe adapté du protocole d'Orléans avec celui du laboratoire BIOMNIS (pour l'étude de *HER2*)

Les tableaux 6 et 7 résument les différences entre ces protocoles étapes par étapes.

Seul le protocole du CHR d'Orléans est détaillé ci-dessous (il s'agit du seul protocole ayant été réalisé en suivant exactement le mode opératoire dans sa totalité).

Protocole de déparaffinage du CHR d'Orléans :

- Faire fondre la paraffine dans une étuve à 37°C pendant 24h, puis dans une étude à 60°C pendant 1h.
- Plonger les lames dans des bains de méthylcyclohexane (3 bains : 10 minutes et 2 fois 5 minutes) pour éliminer la paraffine.
- Réhydrater le tissu fixé sur les lames par de l'éthanol à 100% puis à 95% (le tissu ayant été déshydraté pour l'inclusion en paraffine car celle-ci est hydrophobe).
- Pré-traitement dans des bains de thiocyanate de sodium chaud (80°C). Celui-ci permet de rompre les liaisons covalentes liées à la fixation. Cette étape est appelée étape de démasquage.
- Étapes de FISH (déjà décrites plus haut) : digestion protéolytique plus intense, déshydratation, dénaturation et hybridation, lavages stringents, nouvelle déshydratation et montage en DAPI. Il existe une différence avec le protocole de FISH standard : la dénaturation sur une coupe en paraffine se fait à température plus élevée (82-85°C au lieu de 72-75°C).

Tableau 5 : Premiers essais de déparaffinage et FISH réalisés en anatomopathologie et en cytogénétique

	1er essai	2e, 3e, 4e essais	5e et 6e essais
Incubation	/	/	1 nuit à 65°C
Méthylcyclohexane	Effectué au laboratoire d'anatomo-pathologie, automatisé	Effectué au laboratoire d'anatomopathologie 3 bains	Effectué au laboratoire d'anatomo-pathologie 3 bains
Pré traitement	Non	Effectué au laboratoire d'anatomo-pathologie, automatisé	Effectué au laboratoire d'anatomo-pathologie, automatisé
2SSC 37°C	1h	Non	Non
Sonde	MetaSystems	2e essai : Cytocell 3e et 4e : MetaSystems	MetaSystems
Pepsine	30 minutes	20 à 30 minutes	30 minutes
Dénaturation	5 minutes 75°C	5 minutes 75°C	5 minutes 82°C
Hybridation	16-24h à 37°C	16-24h à 37°C	16-24h à 37°C

Tableau 6 : derniers essais de déparaffinage et FISH réalisés en cytogénétique

	7e essai	8e essai	9e essai	10e essai
Incubation	60°C 24h puis 37°C 1h	60°C 24h puis 37°C 1h	60°C 24h puis 37°C 1h	60°C 24h puis 37°C 1h
Méthylcyclohexane	1 bain de 10 minutes puis 2 bains de 5 minutes	1 bain de 10 minutes puis 2 bains de 5 minutes	1 bain de 10 minutes puis 2 bains de 5 minutes	2 bains de 15 minutes
Pré-traitement (thyocyanate)	30 minutes à 80°C	30 minutes à 80°C	30 minutes à 80°C	10 minutes à 99°C
Sonde	MetaSystems	MetaSystems	MetaSystems	MetaSystems
Pepsine	Bain 15 minutes	Bain 25 minutes	Bain 40 minutes	Appliquée directement sur la lame 10 minutes
Dénaturation	5 minutes à 82°C	5 minutes à 82°C	5 minutes à 82°C	5 minutes à 82°C
Hybridation	16-24h à 37°C	16-24h à 37°C	16-24h à 37°C	16-24h à 37°C

II.2.3. Immunohistochimie (IHC)

Pour tous les patients de notre cohorte, nous avons réalisé une analyse immunohistochimique utilisant des anticorps ciblant CD10, BCL6, MUM1, BCL2 et MYC.

Pour le laboratoire d'anatomopathologie de Tours, le seuil positif d'expression des protéines BCL6 et MUM1 est supérieur ou égal à 30% et celui de BCL2 est fixé à 40%. Pour MYC, nous avons utilisé le seuil d'expression de 40% recommandé dans l'article de *Cheah et al.* (2014)[58].

Les marqueurs CD10, BCL6 et MUM1 nous ont permis de classer chaque LBDGC en lymphome de type GC ou non GC selon l'algorithme de Hans.

Puis nous avons étudié la corrélation entre le réarrangement du gène *MYC* en FISH et l'expression de la protéine MYC en IHC en tenant compte d'un seuil de la protéine à 40%. Dans l'article de *Cheah et al.* (2014), il est recommandé de rechercher cette corrélation en tenant compte d'un seuil de 30% afin de limiter le nombre de faux négatifs. C'est pourquoi nous avons aussi étudié le lien entre l'expression protéique et le remaniement génique en fixant le seuil d'expression à 30%.

La technique d'IHC a été effectuée sur un automate Benchmark XT (ROCHE) avec le kit de détection Ultraview sur des coupes paraffinées de 4 µm.
L'IHC est une méthode permettant de détecter les épitopes d'une protéine à l'aide d'anticorps spécifiques. Cette technique nécessite l'utilisation de deux anticorps : le premier se lie de façon spécifique à son antigène, tandis que le deuxième, biotynilé, est dirigé contre le premier. L'anticorps secondaire couplé à la biotine fixe un complexe streptavidine-peroxydase (grande affinité de la streptavidine pour la biotine). La peroxydase catalyse ensuite un substrat et convertit un chromogène non coloré (diaminibenzidine) en produit final coloré brun.

II.2.4. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel R version 3.3.1.
La comparaison des variables qualitatives entre les groupes a été réalisée avec les tests du Chi-2. Les variables quantitatives, quant à elles, ont été comparées par un test de Mann Whitney. Pour les courbes de survie, nous avons utilisé la méthode de Kaplan Meier et la comparaison des survies entre les groupes a été réalisée à l'aide du test log-rank.
La survie globale a été mesurée à partir de la date du diagnostic jusqu'au décès et la survie sans progression de la date de diagnostic jusqu'au premier événement (rechute ou décès).
Les résultats étaient considérés comme étant significatifs lorsque la p-value était inférieure ou égale à 0,05.

III. Résultats

III.1. FISH

Pour 48 des 49 patients de notre série passés en FISH, les techniques ont dans l'ensemble été très satisfaisantes, les images capturées étaient toutes interprétables et de bonne qualité. Pour 1 patient sur 49, nous n'avons pas obtenu de résultat, lié à l'absence de cellule sur la lame (prélèvement pauvre), mais cela n'a eu que peu d'incidence puisque les réarrangements de *MYC, BCL2* et *BCL6* avaient déjà été recherchés lors du diagnostic sur le peu de matériel disponible (seul le partenaire de *MYC* n'a pas pu être recherché).

III.1.1. Présentation globale des patients

Dans notre cohorte de 49 patients, 10 (20%) étaient porteurs d'un réarrangement du gène *MYC*. Les résultats de ces 10 patients sont présentés ci dessous et dans les tableaux 8, 9 et 10.

Parmi ces 10 patients, 6 LBDGC étaient double hit (3 *MYC/BCL2* et 3 *MYC/BCL6*), 2 étaient triple hit (*MYC/BCL2/BCL6*) et 2 étaient simple hit (*MYC*) (tableau 10 et figure 30).

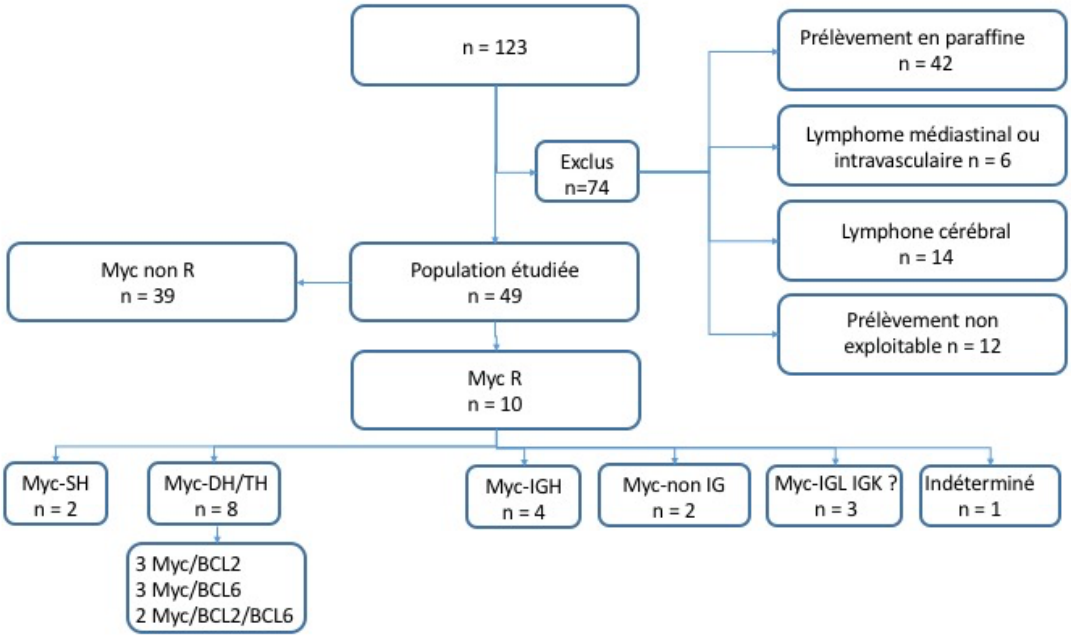


Figure 30 : Flow chart et résultats de FISH

Tableau 7 : résultats cytogénétiques des patients *MYC*-R (M : masculin ; F = féminin)

N° patient	Sexe	Age	Formule caryotype/FISH	Conclusion
17	M	59	Caryotype : 78-81<4n>,XX,-X,-X,-1,-1,add(1)(q22),del(1)(q32),-2,-3,-4,-4, add(5)(q31),-6,-8,-8,i(8)(q10),del(9)(q23q34),-10,-10,+11,+12,-13, -13,t(14;18)(q32;q21)x2,-15,-16,-16,-17,-17,-22, +1 à 11 mar[cp,inc15]/46,XX[5] FISH : nuc ish(5'IGKx3-4,3'IGKx2)(5'IGK con 3'IGKx2)[25/170]/(IGKx3)[14/170], (BCL6x3)[18/105],(5'MYCx4-6,3'MYCx0-1)(5'MYC con 3'MYCx0-1)[17/119], (MYCx3-6,IGHx3-4)[24/146], (IGH,BCL2)x6(IGH con BCL2x4)[15/112], (IGLx3)[23/166]	Caryotype : -complexe à 78-81 chromosomes FISH : - DH - Anomalie primitive : *BCL2-IGH*-R sous forme tétraploïde - Anomalies secondaires : - *MYC*-R triploïde, - *IGK*-R triploïde, - trisomies de *BCL6* et *IGL* - Possible réarrangement de *MYC-IGK*
19	F	63	nuc ish(BCL6x2),(MYCx2)(5'MYC sep 3'MYCx1), (MYCx3,IGHx4)(MYC con IGHx2)[52/92], (IGH,BCL2)x4,(BCL2x3)(5'BCL2 sep 3'BCL2x1)[13/31]	- DH - *MYC-IGH*-R - *BCL2*-R - trisomies de *BCL2* et *IGH*
20	M	59	nuc ish(BCL6x2)(5'BCL6 sep 3'BCL6x1),(MYCx2)(5'MYC sep 3'MYCx1), (MYC,IGH)x3(MYC con IGHx2)[101/172],(IGHx3,BCL2x2)[159/214]	- DH - *MYC*-R - *BCL6*-R - *MYC-IGH*-R
26	F	77	nuc ish(BCL6x2)[174],(MYCx2)(5'MYC sep 3'MYCx1)[139/188], (MYC,IGH)x3(MYC con IGHx2)[150/194],(BCL2x2)[213]	- SH - *MYC-IGH*-R
29	M	73	nuc ish(IGKx2)[253],(BCL6x2)(5'BCL6 sep 3'BCL6x1)[86/168], (5'MYCx2,3'MYCx3)(5'MYC con 3'MYCx2), (MYCx3,IGHx2-3)[135/211],(MYCx2-3,IGHx3)[129/211], (BCL2x2)[225],(IGLx2)[10/212]	- DH - *MYC*-R - *BCL6*-R - *MYC-non IG*
34	M	74	nuc ish(IGKx2)[90],(BCL6x2) (5'BCL6 sep 3'BCL6x1)[101/173],(BCL6x3) (5'BCL6 sep 3'BCL6x1)[8/173],(MYCx2)(5'MYC sep 3'MYCx1), (IGH,BCL2)x3(IGH con BCL2x2),(IGLx2)(5'IGL sep 3'IGLx1)[111/213]	- TH - réarrangements de MYC, *BCL2* et *BCL6* - *MYC-IGL ?*ou *IGL-BCL2 ?* ou *IGL-BCL6 ?*
35	F	55	nuc ish(BCL6x2)[500],(MYCx2)(5'MYC sep 3'MYCx1)[5/101], (MYC,IGH)x3(MYC con IGHx2)[2/211], (BCL2x2)(5'BCL2 sep 3'BCL2x1)[3/204]	- DH - *MYC*-R - *BCL2*-R - *MYC-IGH*-R

Tableau 7 (suite) : résultats cytogénétiques des patients *MYC*-R (M : masculin ; F = féminin)

N° patient	Sexe	Age	Formule caryotype/FISH	Conclusion
39	F	67	nuc ish(IGKx2)[192],(BCL6x2)(5'BCL6 sep 3'BCL6x1)[33/53], (MYCx2) (5'MYC sep 3'MYCx1)[11/52],(MYCx3,IGHx2)[16/86],(MYCx2,IGHx3)[21/86], (IGHx3,BCL2x2)[85/130],(IGLx2)[27/27]	- DH - *MYC*-R -*MYC-non IG* - *BCL6*-R - *IGH*-R
46	F	75	nuc ish(BCL6x2)(5'BCL6 sep 3'BCL6x1)/(5'BCL6x3,3'BCL6x5) (5'BCL6 con 3'BCL6x2), (MYCx2)(5'MYC sep 3'MYCx1)/(5'MYCx3-4,3'MYCx2-3) (5'MYC con 3'MYCx1), (IGHx3,BCL2x2)/(IGHx6-12,BCL2x6-8)(IGH con BCL2x4-6)	- *MYC*-R et *BCL6*-R sous forme diploïde puis tétraploïde - *BCL2-IGH*-R sous forme tétraploïde (anomalie secondaire) - probable réarrangement de *IGH* sous forme diploïde - *BCL6-MYC*-R ?
47	F	68	nuc ish(IGKx2)[500],(BCL6x3)[500],(MYCx2)(5'MYC sep 3'MYCx1)[163/204], (IGHx2,BCL2amp)[70/100],(IGLx2)(5'IGL sep 3'IGLx1)[149/195]	- SH - Amplification de *BCL2* - trisomie *BCL6* - possible réarrangement de *MYC-IGL*

Tableau 8 : caractéristique cliniques, bioblogiques, cytogénétiques et immunohistochimiques des patients *MYC*-R

(>N : supérieur à la normale ; >2N : supérieur à 2 fois la normale ; M = masculin ; F= féminin ; abs : absence de données ; R : réarrangé)

N° patient	17	19	20	26	29	34	35	39	46	47
Sexe	M	F	M	F	M	M	F	F	F	F
Age	59	63	59	77	73	74	55	67	75	68
IPI	3	5	4	abs	abs	3	1	4	3	2
Ann Arbor	IV	IV	IV	abs	IV	IV	II	III	III	I
LDH	>2N	>2N	>N	abs	N	>N	>N	>N	>2N	>N
IHC	MYC + BCL2+ BCL6+ GC	MYC + BCL2+ BCL6+ GC	MYC + BCL2+ BCL6+ Non GC	MYC - BCL2- BCL6+ GC	MYC - BCL2+ BCL6+ GC	MYC + BCL2+ BCL6+ GC	MYC - BCL2- BCL6+ GC	MYC - BCL2+ BCL6+ GC	MYC - BCL2+ BCL6+ GC	MYC + BCL2+ BCL6+ GC
Cytogénétique	FISH : DH *MYC*-R *BCL2-IGH*-R *IGK*-R Trisomie *BCL6* Trisomie *IGL* *MYC-IGK ?* Caryotype : complexe 78-81 chromosomes	DH *MYC*-R *MYC-IGH*-R *BCL2*-R Trisomie *BCL2* Trisomie *IGH*	DH *MYC*-R *MYC-IGH*-R *BCL6*-R	SH *MYC*-R *MYC-IGH*-R	DH *MYC*-R *BCL6*-R *MYC-non IG*	TH *MYC*-R, *BCL2-R* *BCL-R6* *MYC-IGL ?* ou *IGL-BCL2 ?* ou *IGL-* *BCL6*	DH *MYC*-R *BCL2*-R *MYC-IGH*-R	DH *MYC*-R *MYC-non IG* *BCL6*-R *IGH*-R	*MYC*-R *BCL6*-R *BCL2-IGH*-R *BCL6-MYC*-R ?	SH Amplification de *BCL2* Trisomie *BCL6* *MYC-IGL ?*
Traitement	COP, R-COPADM, R-CYVE, R-COP, puis R-CHOP	R-CHOP, METHOTREXATE, R-DHAP, R-ICE, R-GEMOX, autogreffe	COP, puis R-CHOP, METHOTREXATE, REVLIMID	abs	Aucun	COP puis 6 R-DA-EPOCH	R-CHOP	R-CHOP	R-DAEPOCH	R-CHOP, RT, R-DHAP, CEP
Statut	Décédé à 11 mois	Décédé à 20 mois	Vivant	Abs	Décédé à 1 mois	Vivant	Vivant	Décédé à 9 mois	Vivante	Décédé à 23 mois

Tableau 9 : LBDGC SH, DH et TH et partenaire de *MYC* (R : réarrangé ; NR : Non Réarrangé ; Abs : absence de données disponible ; ? : incertitude)

	MYC	*MYC-IGH*	*IGL ou IGK* ?	Non *IG*	*SH/DH/TH*
patient 17	R	non	*IGK* ?	non ?	DH (*MYC/BCL2)*
patient 19	R	oui	non	non	DH (*MYC/BCL2)*
patient 20	R	oui	non	non	DH (*MYC/BCL6)*
patient 26	R	oui	non	non	SH
patient 29	R	non	non	oui	DH (*MYC/BCL6)*
patient 34	R	non	*IGL* ?	non ?	TH
patient 35	R	oui	non	non	DH (*MYC/BCL2)*
patient 39	R	non	non	oui	DH (*MYC/BCL6)*
patient 46	R	abs	abs	abs	TH
patient 47	R	non	*IGL* ?	non ?	SH

Pour 4 patients (patients 19, 20, 26 et 35) *MYC* et *IGH* étaient bien partenaires (sonde double fusion *MYC/IGH*) (figure 31).

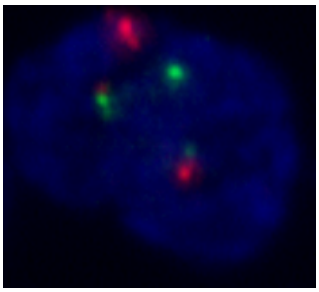


Figure 31 : Double fusion de la sonde MYC-IGH chez le patient 26 (deux spots jaunes, un spot rouge et un spot vert)

Pour 3 patients (patients 17, 34 et 47), un réarrangement du gène *IGL* (patients 34 et 47) ou *IGK* (patient 17) étaient notés (figure 32). Cependant, il n'a pas été possible de conclure à un remaniement entre *MYC* et le gène de la chaîne légère d'*IG* qui nécessiterait l'utilisation de sondes double fusion *MYC/IGL* et *MYC/IGK* (non disponibles commercialement), mais nous n'avons pas pu pour autant l'exclure.

A B

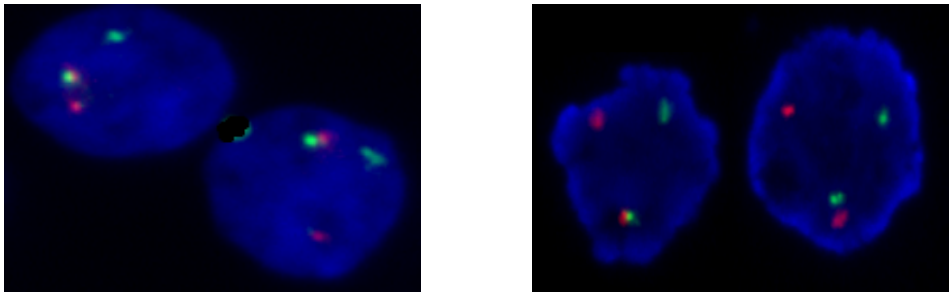


Figure 32 : Réarrangement chez le patient 34 du gène *MYC* et du gène *IGL* (A : *MYC* et B : *IGL*)

Pour 2 patients (patients 29 et 39), les analyses de FISH montraient un remaniement de *MYC* sans réarrangement des gènes des chaines d'Ig, permettant d'exclure un remaniement *MYC/IG*.

A noter que l'absence de matériel en quantité suffisante ne nous a pas permis de rechercher le partenaire du proto-oncogène pour la dernière patiente (patiente 46).

Au total, 10 LBDGC étaient *MYC*-R, dont (figure 30) :

- 4 *MYC-IGH,*
- 2 *MYC*-non *IG*
- 3 dont le partenaire n'était pas une *IGH* (*IGK, IGL* ou non *IG*?)
- 1 dont le partenaire n'a pas pu être défini.

III.1.2. Présentation détaillée des résultats

Patient 17 :

- Caryotype complexe sur MO (formule chromosomique détaillée dans le tableau 8) composé d'un clone tétraploïde avec une translocation t(14;18) dupliquée arrivant comme anomalie primitive, puis anomalies secondaires sous formes triploïdes avec un doute pour une t(2;8).

- La FISH :
    - LBDGC DH : *MYC*-R ; *BCL2*-R ; *BCL6* non réarrangé
    - *IGH et MYC* n'étaient pas partenaires
    - Réarrangement entre *IGH* et *BCL2* sous forme tétraploïde arrivant comme anomalie primitive (probable reflet de la t(14;18))
    - Réarrangements de *MYC* et *IGK* (anomalies secondaires) sous formes triploïdes avec amplification de leur partie centromérique et délétion de leur partie télomérique
    - Concernant le partenaire de *MYC,* il s'agissait probablement de *IGK* mais sans pour autant l'affirmer, comme expliqué dans le paragraphe précédent.
    - Trisomies *BCL6, IGK* et *IGL* liées à l'hypertriploïdie.

Patient 19 :

- LBDGC DH : *MYC*-R ; *BCL2*-R ; *BCL6* n'était pas réarrangé
- *MYC* et *IGH* étaient partenaires
- *BCL2* et *IGH* n'étaient pas partenaires et BCL2 était réarrangé avec un gène non identifié
- La présence de 3 exemplaires de *IGH* et de *BCL2* permettait de suspecter une trisomie 14 et une trisomie 18

Patient 20 :

- LBDGC DH : *MYC*-R ; *BCL6*-R ; *BCL2* non réarrangé
- *MYC* était réarrangé avec *IGH*

Patiente 26 :

- LBDGC SH
- Remaniement entre *MYC* et *IGH*

Patient 29 :

- LBDGC DH : *MYC*-R *; BCL6*-R ; *BCL2* non réarrangé
- *MYC* était réarrangé avec un gène non *IG* (*MYC-IGH, IGK* et *IGL* non réarrangés).
- L'observation de 3 spots de la partie 3'de *MYC* suggérait un réarrangement dans sa partie télomérique

Patient 34 :

- LBDGC TH
- *IGH* non réarrangé
- *IGL* était réarrangé
- Suspicion de remaniement entre *IGL* et *MYC* ou entre *IGL* et *BCL2* ou *IGL* et *BCL6*
- On notait sur 5% des cellules un clone avec 3 exemplaires du gène *BCL6*

Patiente 35 :

- LBDGC DH : *MYC-R* ; *BCL2*-R (petit clone anormal sur 5% des noyaux comportant un réarrangement du gène *MYC*, clone sur 2% des noyaux avec un réarrangement de *BCL2)*
- Réarrangement *MYC-IGH* visible sur 1% des noyaux considéré comme significatif compte tenu du faible pourcentage de cellules *MYC* réarrangées et de l'utilisation d'une sonde double fusion marquant les 4 dérivés et dont le seuil de positivité est 1%)

Patiente 39 :

- LBDGC DH : *MYC*-R ; *BCL6*-R
- Réarrangement de *MYC* avec un gène non *IG*
- Réarrangement de *IGH* avec un autre gène que *BCL2* ou *MYC (MYC-IGH* non réarrangé)

Patiente 46 :

- LBDGC TH
- Complexe avec :
    - remaniement de *MYC* et *BCL6* sur le mode diploïde, évoluant en un clone tétraploïde
    - apparition secondaire d'un remaniement de *IGH-BCL2* sous forme tétraploïde
    - le gène *IGH* était également réarrangé sous forme diploïde mais l'insuffisance de matériel ne nous a pas permis de pousser les investigations. Ainsi, nous n'avons pas pu conclure sur le partenaire de *IGH* (*MYC*, *BCL6 ?)*

- possible réarrangement entre *MYC* et *BCL6*

Le patient 47 :

- LBDGC SH
- Réarrangement de *MYC* et de *IGL* (probable réarrangement *MYC-IGL* mais non prouvé)
- *IGH* et *IGK* n'étaient pas réarrangés
- Trisomie de *BCL6*
- Amplification de *BCL2* (présence de plus de 5 à 7 spots) (Figure 33)

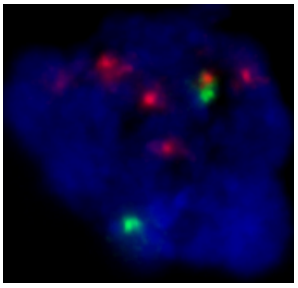


Figure 33 : Amplification du gène *BCL2* (en vert : *IGH* (non réarrangé) et en rouge : plusieurs spots de *BCL2*

Devant l'impossibilité d'affirmer le réarrangement de *MYC* avec *IGK* ou *IGL* pour les 3 patients porteurs d'un réarrangement de *MYC* et d'une des chaînes légères d'Ig (17, 34 et 47), nous les avons exclus pour les analyses de survie.

III.2. Données cliniques et biologiques

III.2.1. résumé des données cliniques et biologiques de notre série

Au total, 49 patients atteints de LBDGC et diagnostiqués au CHU de Tours entre 2012 et 2015 ont été inclus dans notre étude. Nous avons obtenu des résultats de FISH informatifs avec la sonde MYC break apart pour tous les patients étudiés (6 patients avaient déjà eu une recherche de réarrangement pour le gène *MYC* tandis que les autres ont été analysés au cours de notre étude).

Parmi ces LBDGC, 33 étaient de novo et 15 étaient issus de la transformation d'un lymphome de bas grade pré-existant. Cette donnée était manquante pour un des patients. Sur les 10 patients avec le réarrangement du gène *MYC* (20%), presque la moitié (40%) correspondait à des lymphomes transformés.

L'âge médian au diagnostic était 67 ans, avec un âge minimum de 26 ans et un âge maximum de 91 ans. Il existait une légère prédominance féminine dans notre cohorte, avec un sex ratio à 1,04.

Le suivi médian de la maladie était 21,5 mois, avec un minimum de un mois et un maximum de 37 mois.

La survie globale et la survie sans progression des 49 patients allait de 1 mois à 37 mois (avec une médiane à 19 mois pour la survie globale et 14 mois pour la survie sans progression).

6 patients parmi les 49 ont rechuté (12%) :

- 4 sont par la suite décédés
    - 2 étaient porteurs d'un réarrangement de *MYC*
    - 2 n'étaient pas porteurs d'un réarrangement de *MYC*
- 2 sont encore vivants
    - non porteurs d'un réarrangement de *MYC*

Au total, 13 patients (27%) sont décédés (les 4 patients qui avaient fait une rechute, plus 9 autres qui n'avaient pas rechuté). Parmi ces 13 patients, 5 avaient un LBDGC avec réarrangement de *MYC* (38%).

Le recueil des données cliniques au diagnostic mettait en évidence la fréquence des facteurs de mauvais pronostic dans les LBDGC :

- 60 % étaient diagnostiqués à un stade Ann Arbor supérieur à 2,
- 49 % avaient un IPI supérieur ou égal à 3,
- le PS était supérieur ou égal à 2 dans 27 % des cas
- 37 % des patients avaient des LDH supérieures à 2 fois la normale.

Les traitements administrés étaient assez hétérogènes. Certains patients ont été traités uniquement avec du R-CHOP alors que d'autres ont bénéficié d'autres types de chimiothérapies (CHOP sans rituximab, ESHAP, CEP, R-DHAP, R-CYVE, R-COPADM, ICE, parfois associées au R-CHOP). Pour 5 patients, nous n'avions aucune information quant

au traitement reçu (ces patients n'ayant pas été traités à Tours). Un patient, décédé un mois après le diagnostic n'avait pas été traité. Un deuxième patient, lui aussi décédé après seulement un mois n'avait pu recevoir qu'une seule ligne de chimiothérapie (COP).

III.2.2. Comparaison des données de FISH aux données cliniques et biologiques

Une comparaison des LDH et des données cliniques (stade Ann Arbor, score IPI, PS) a été effectuée entre les groupes *MYC* réarrangés versus *MYC* non réarrangés, SH versus DH/TH et *MYC-IG* versus *MYC-non IG* (annexe V).

MYC-R versus *MYC*-non R

Aucune différence significative n'a été mise en évidence pour le stade de Ann Arbor (p = 1), l'IPI (p = 0,9), le PS (p = 0,46) ou les LDH entre les deux groupes.

SH versus DH/TH

Il n'y avait pas non plus de corrélation entre le lymphome DH et le score IPI, le stade Ann Arbor, le PS et les LDH.

MYC-IG versus MYC-non IG

Les données cliniques et biologiques de mauvais pronostic ne semblaient pas être corrélées au partenaire de *MYC* (gène d'*IG* ou autre gène).

III.3. IHC

Expression de la protéine MYC (seuil d'expression : 40%) :

La protéine MYC était surexprimée dans 27% (13/49) des LBDGC, dans 40% (4/10) des LBDGC avec réarrangement de *MYC* et dans 23% (9/39) des LBDGC sans réarrangement de *MYC*. Chez une patiente parmi les 49 (*MYC-IGH,* SH) l'expression n'a pas pu être mesurée faute de matériel.

Nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'expression de MYC et le réarrangement du gène (p = 0,42 pour un seuil d'expression de MYC à 40% et p = 0,14 pour un seuil à 30%).
Parmi les patients *MYC*-non *IG*, aucun ne surexprimait la protéine MYC. Lorsque l'on abaissait le seuil à 30%, un patient sur deux l'exprimait.
Concernant les 4 LBDGC M*YC-IGH :*

- Nous n'avons pas l'expression pour une patiente (absence de matériel)
- Avec un seuil d'expression à 30% : 2 sur 3 surexprimaient la protéine MYC
- Avec un seuil d'expression à 40% : 1 sur 3 surexprimait la protéine MYC.

La protéine MYC était exprimée dans seulement 30% (3/10) des LBDGC DH et TH (et dans un LBDGC SH, le deuxième n'ayant pas été mesuré du fait de l'absence de matériel).

Expression de la protéine BCL2 (seuil d'expression : 40%) :

La protéine BCL2 était surexprimée dans 76% (37/49) des LBDGC totaux, dans 80% (8/10) des LBDGC avec réarrangement de *MYC* et dans 74% (29/39) des LBDGC sans réarrangement de *MYC*. Il n'existait pas de différence significative d'expression de la protéine entre les groupes *MYC*-R et *MYC*-non R.
La protéine BCL2 était exprimée dans 69% (20/29) des GC et dans 85% (17/20) des non GC (la protéine n'était donc pas significativement plus exprimée dans un type immunohistochimique ou dans l'autre, p = 0,49).
Elle était surexprimée dans 50% (1/2) des LBDGC simple hit et dans 88% (7/8) des lymphomes DH ou TH.

Expression de la protéine BCL6 (seuil d'expression : 30%) :

La protéine BCL6 était exprimée dans 84% (41/49) des LBDGC et tous ceux avec un réarrangement de *MYC* l'exprimait (SH et DH). Les 16% de patients n'exprimant pas cette protéine étaient donc uniquement retrouvés parmi les *MYC* non réarrangés. Cependant, l'hyperexpression de la protéine BCL6 n'était pas liée aux LBDGC *MYC*-R (p = 0,32).
Les LBDGC de type GC exprimaient BCL6 dans 97% des cas (28/29), alors qu'elle était exprimée dans 70% des cas (14/20) de LBDGC de type non GC (p = 0,047).

Type GC et non GC :

Au total, 59% des LBDGC étaient de type GC (29/49).
La majorité (90%) des LBDGC avec réarrangement de *MYC* étaient également GC.
La moitié (51% (20/39)) des LBDGC sans réarrangement de *MYC* étaient de type GC.
Parmi les GC, 24% (7/29) exprimaient la protéine MYC en IHC.
Les MYC-R GC exprimaient la protéine dans 33% des cas (3/9).

III.4. Évaluation de la survie

Les effets des critères pronostiques sur l'évolution de la maladie dans notre cohorte ont été évalués statistiquement.

III.4.1. Index et stadification

Survie globale :
Le PS était le seul paramètre que l'on retrouvait significativement lié à une diminution de la survie globale lorsqu'il était supérieur ou égal à 2 (p=0,008) (figure 34).
Un IPI ≥ 3 (de mauvais pronostic) comparé à un score IPI < 3 et un stade Ann Arbor > 2 n'ont pas montré de différence significative de survie globale (p=0,08 et p=0,24 respectivement).

Survie sans rechute :
Concernant la survie sans rechute, il n'y avait pas de corrélation avec le stade Ann Arbor et le score IPI (p = 0,2 et p = 0,06 respectivement). En revanche un PS supérieur ou égal à 2 était significativement lié à une diminution de la survie sans rechute (p = 0,009) (figure 34).

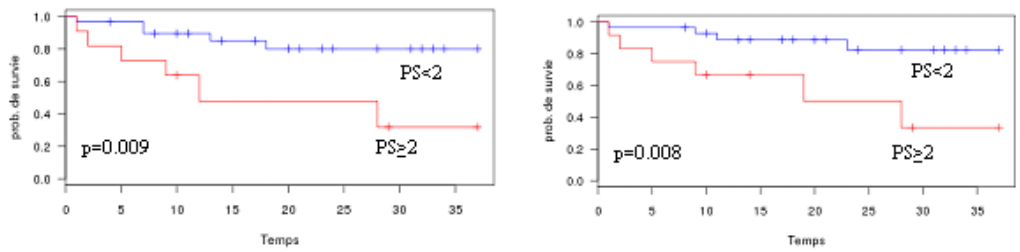


Figure 34 : Survies globale et sans progression en fonction du PS (à gauche : survie sans progression; à droite : survie globale)

III.4.2. FISH

La médiane de survie sans progression chez les patients porteurs d'un réarrangement de *MYC* était 11 mois (avec un minimum de 7 mois et un maximum de 20 mois), alors qu'elle était de 19,5 mois pour les *MYC* non réarrangés (avec un minimum de 1 mois et un maximum de 37 mois).

Pour les patients atteints de LBDGC avec réarrangement de *MYC* la médiane de survie globale était 11 mois (avec un minimum de 1 mois et un maximum de 23 mois), alors qu'elle était de 23,5 mois pour les *MYC* non réarrangés (avec un minimum de 1 mois et un maximum de 37 mois).

La survie globale à 10 mois était significativement moins bonne pour les patients atteints de LBDGC avec *MYC*-R que pour les patients sans réarrangement du gène. En effet, à 10 mois du diagnostic, seulement 77,7% des patients *MYC*-R étaient encore vivants alors que 83,3% des patients sans réarrangement de *MYC* étaient toujours en vie (p = 0,002) (Figure 35).

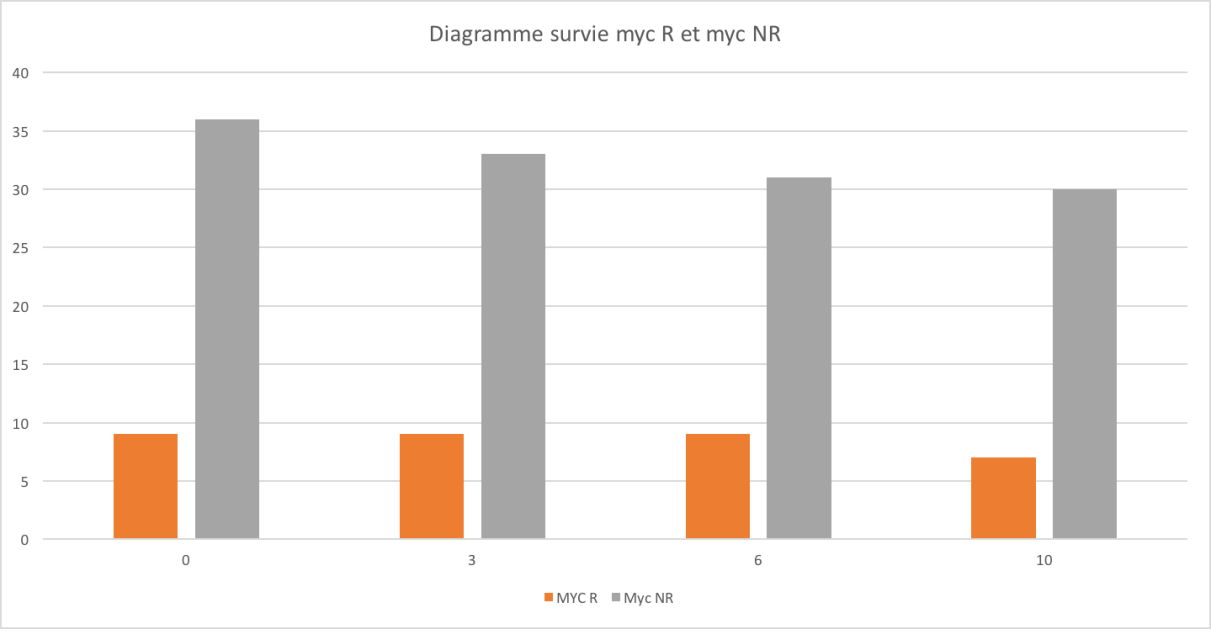


Figure 35 : Diagramme de survie en fonction du réarrangement de *MYC*

Notre étude montrait que la survie globale et la survie sans progression étaient significativement plus diminuées en présence du réarrangement du gène *MYC* (p = 0,021 et p = 0,03 respectivement) (figure 36). Ces résultats se vérifiaient dans le groupe GC (survie globale : p=0,006 et survie sans progression : p = 0,009). En revanche, cette analyse n'a pas été effectuée dans le groupe non GC du fait d'un trop petit nombre de LBDGC *MYC*-R non GC.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative sur la survie globale ni sur la survie sans progression entre les groupes de lymphome SH et DH/TH (p = 0,31 et p = 0,72 respectivement) (figure 37). De même, lorsque les DH *MYC/BCL2* et les DH *MYC/BCL6* étaient analysés séparément (comme dans l'étude de *Copie Bergman*), la différence sur les survies entre les LBDGC SH et DH n'était pas significative.

Dans notre étude, le réarrangement de *MYC* avec un gène *IG* était significativement associé à une meilleure survie (globale et sans progression) par rapport au réarrangement avec un gène différent des *IG* (p = 0,039) (figure 38) (cette différence n'est cependant pas mise en évidence dans le groupe GC (p = 0,09) et n'a pas pu être recherchée dans le groupe non GC du fait d'un faible nombre de LBDGC non GC avec un réarrangement de *MYC*). Aucune différence

significative sur la survie n'a été mise en évidence entre les groupes *MYC*-nonR et *MYC-IG* (p = 0,57), ni entre les groupes *MYC-nonR* et *MYC-non-IG* (p = 0,072).

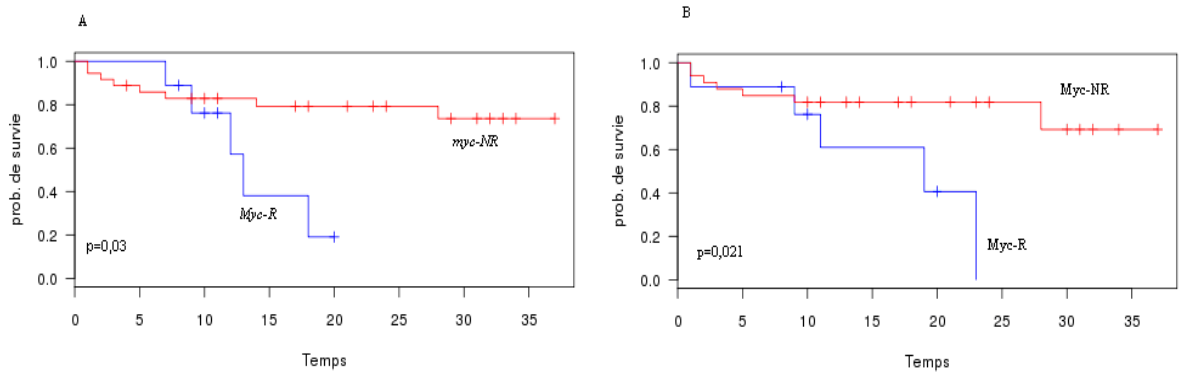


Figure 36 : Survie sans progression et globale en fonction du réarrangement de *MYC* (A : survie sans progression et B : survie globale)

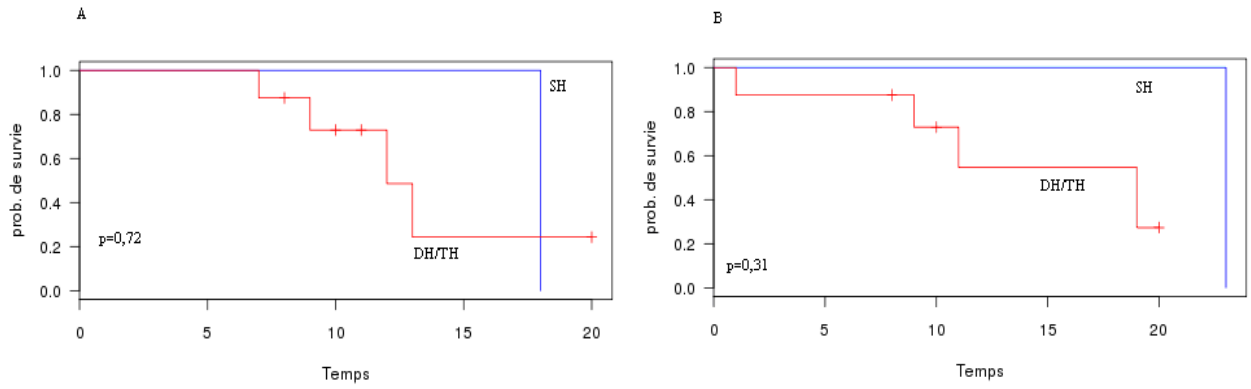


Figure 37 : Survies sans progression et survie globale en fonction du caractère SH ou DH/TH (A : survie sans progression ; B : survie globale)

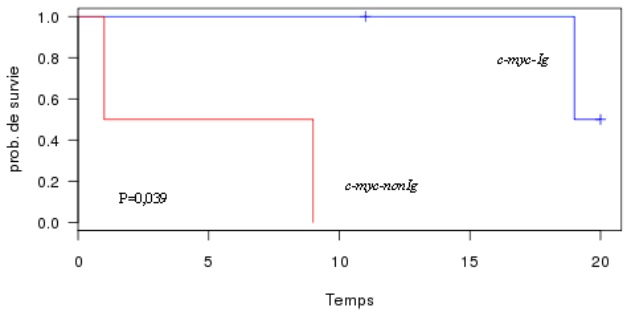


Figure 38 : Courbes de survie en fonction du partenaire de *MYC*

III.4.3. IHC

Dans notre étude la survie n'était pas différente quand on distinguait les types GC et non GC (p = 0,92 pour la survie globale et p = 0,93 pour la survie sans progression) (Figure 39).

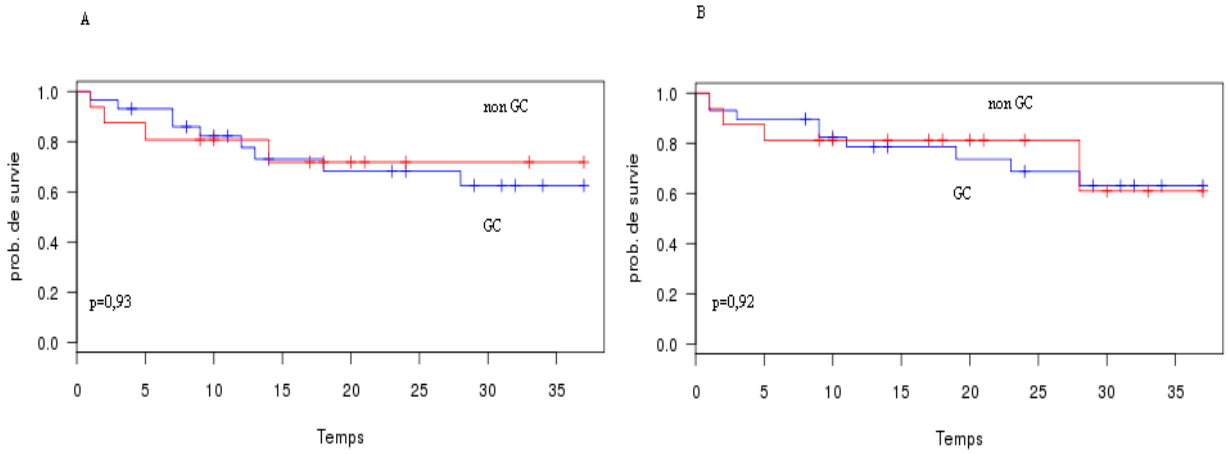


Figure 39 : Survie sans progression et survie globale en fonction du type GC ou non GC (A : survie sans progression ; B : survie globale)

Les survies (globale et sans progression) n'étaient pas corrélées à l'expression de la protéine MYC dans notre cohorte (p = 0,55 et p = 0,7 respectivement).

De même, l'association de l'hyperexpression de MYC ou du réarrangement de *MYC* avec l'hyperexpression de la protéine BCL2 n'était pas corrélée à un plus mauvais pronostic (p = 0,19).

Concernant l'expression de la protéine BCL6, la survie sans progression était significativement diminuée lorsqu'elle était négative (p = 0,046) (Figure 40). Cependant, en séparant les groupes GC et non GC, la survie sans progression était affectée uniquement dans le groupe non GC (P = 0,00053), mais n'était pas impactée de façon significative dans le groupe GC (p = 0,4).

La survie globale, quant à elle, n'était pas liée à l'expression de BCL6 (p = 0,067) (Figure 40).

Les analyses en IHC sur l'expression de la protéine BCL2 ont montré un impact sur la survie globale ainsi que sur la survie sans progression lorsque la protéine était surexprimée (p = 0,043 et p = 0,03 respectivement) (figure 41). Dans le groupe non GC, BCL2 n'avait pas d'impact. En revanche, dans le groupe GC, l'hyperexpression entraînait une diminution significative sur la survie sans progression et sur la survie globale (p = 0,046 et p = 0,049 respectivement) (figure 42).

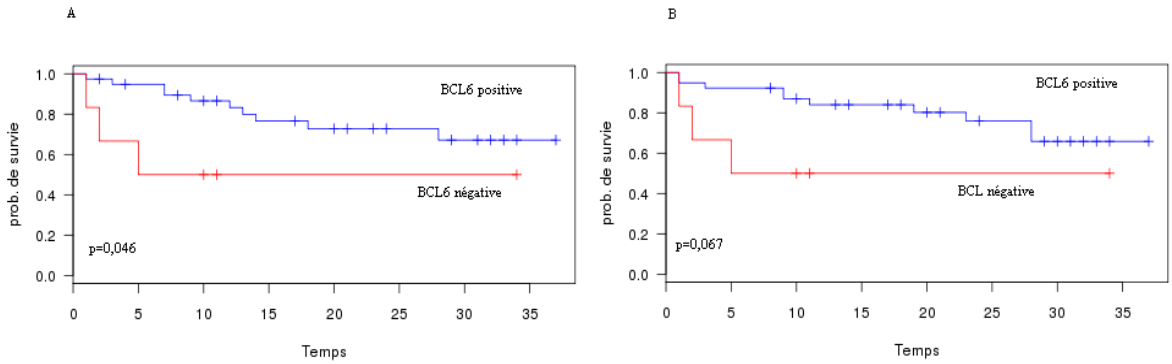


Figure 40: Survie sans progression et survie globale en fonction de l'expression de la protéine BCL6 (A : survie sans progression ; B : survie globale)

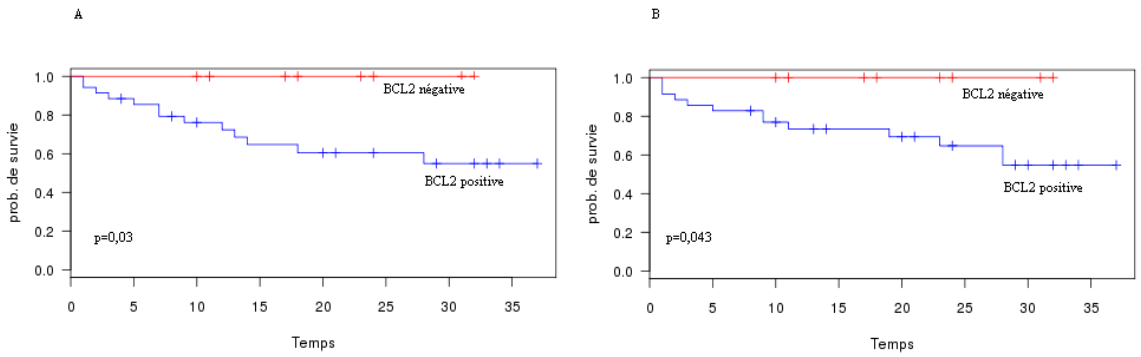


Figure 41: Survie sans progression et survie globale en fonction de l'expression de la protéine BCL2 (A : survie sans progression ; B : survie globale)

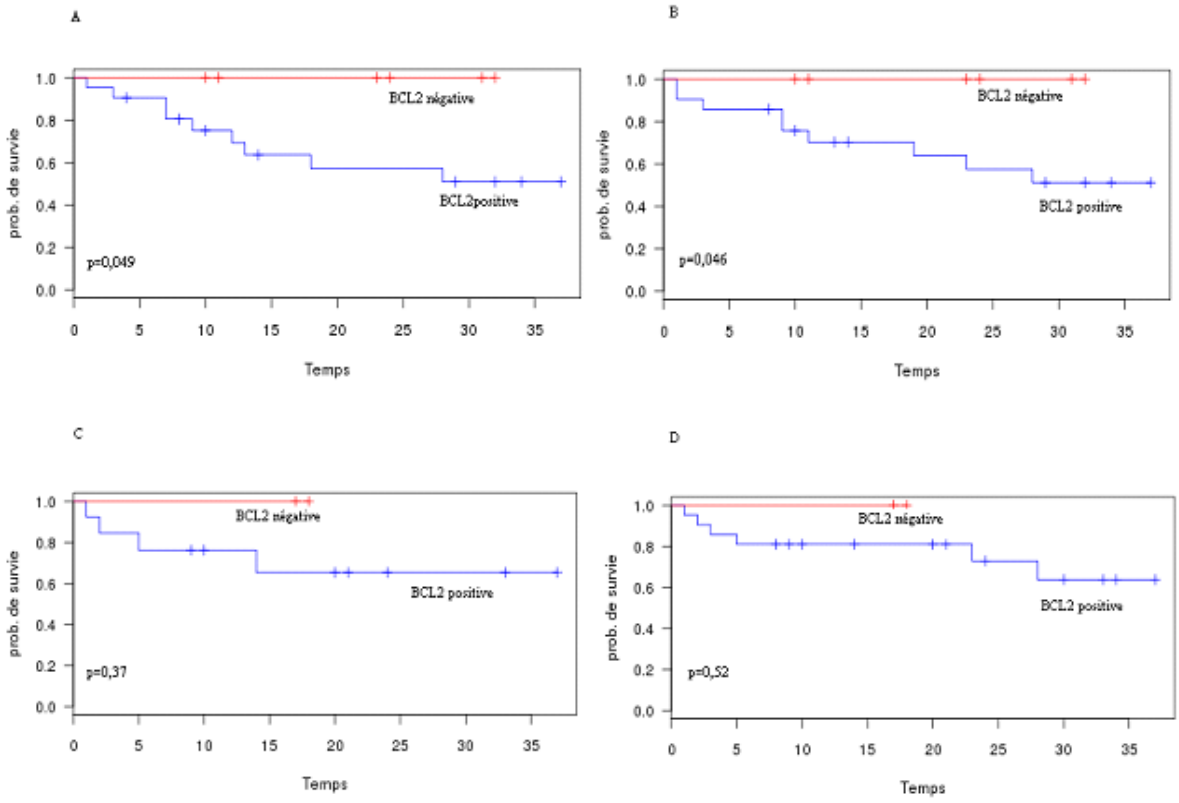


Figure 42 : Survie sans progression et survie globale en fonction de l'expression de BCL2 dans les groupes GC et non GC (A : survie sans progression dans le groupe GC; B : survie globale dans le groupe GC ; C : survie sans progression dans le groupe non GC ; D : survie globale dans le groupe non GC)

III.5. Résultats de la mise au point d'une technique manuelle de déparaffinage :

Les 6 premiers essais de déparaffinage, réalisés en collaboration avec le laboratoire d'anatomopathologie à partir du mode opératoire utilisé à Bordeaux, n'ont pas permis d'obtenir des images de FISH satisfaisantes :

- Les deux premiers essais n'ont pas été concluants, les lames étant illisibles.
- Les 3^{e} et 4^{e} essais étaient plus encourageants : quelques noyaux hybridaient en bordure de la lame mais pas à l'intérieur des amas cellulaires.
- Pour les 5^{e} et 6^{e} essais, la lame était à peu près lisible mais la lecture restait tout de même très délicate.

Malgré ces constatations, l'absence de résultats concluants nous a incité à changer de protocole. Nous nous sommes donc inspirés du mode opératoire utilisé au CHR d'Orléans pour les 7^{e}, 8^{e} et 9^{e} essais. Les résultats obtenus montraient des noyaux hybridés seulement en bordure de lame mais pas dans les amas (comme pour les 3^{e} et 4^{e} essais).

Enfin, le dernier essai effectué à partir des protocole d'Orléans et de BIOMNIS nous a permis d'obtenir de meilleurs résultats, mais la technique demande encore à être améliorée, les noyaux n'étant pas tous hybridés.

IV. Discussion

Notre étude rétrospective portant sur une série de patients présentant un LBDGC suivis par les hématologues cliniciens du CHRU de Tours (entre 2012 et 2015), a consisté à l'évaluation de critères pronostiques sur la survie (globale et sans progression). Ce travail fait suite aux publications récentes et à la révision 2016 de la classification OMS 2008 des lymphomes. Nous nous sommes principalement intéressés à la recherche (par technique de FISH) de réarrangements de certains gènes impliqués dans le processus tumoral (*MYC, BCL2* et *BCL6*). En effet, grâce aux avancées technologiques et la recherche fondamentale, certains mécanismes moléculaires à l'origine de la transformation et de l'évolution de la maladie sont mieux compris. Certains événements sont aujourd'hui bien identifiés et ont permis de définir de nouvelles catégories de lymphomes (comme les HGBL avec réarrangement de *MYC* et de *BCL2* et/ou *BCL6*), ou d'affiner des entités préexistantes (différenciation des sous-groupes moléculaires GC et ABC des LBDGC par GEP ou GC et non GC en IHC). Cette révision, issue d'un réel consensus international multidisciplinaire, a pour objectif une meilleure prise en charge thérapeutique. Cependant certains résultats publiés, concernant notamment l'implication du partenaire de *MYC,* sont discordants et doivent encore faire l'objet d'études supplémentaires. Nous avons de plus réalisé des études de l'expression des protéines BCL2, BCL6 et MYC, ainsi que du type GC/non GC du lymphome en IHC. Enfin, nous avons colligé les données clinico-biologique de notre cohorte. L'effet de ces différents biomarqueurs a fait l'objet d'une analyse statistique dont le résultat sera comparé aux données de la littérature.

Réarrangement de MYC :

Dans notre étude la fréquence du réarrangement de *MYC* était estimée à 20%. Ce résultat était plus élevé que celui rapporté dans la littérature où la fréquence variait de 7% (pour *Valera et al.* 2013) à 14% (pour *Barrans et al.* 2010) (tableau 11) [8–11,45–47]. Cependant, il faut noter que ces différentes études incluaient uniquement des patients atteints de LBDGC de novo alors que notre cohorte contenait à la fois des LBDGC de novo et des LBDGC issus d'une transformation d'un lymphome de bas grade, ceci pouvant expliquer la discordance (40% de nos lymphomes transformés avaient un LBDGC avec réarrangement de *MYC*).

Tableau 10 : Fréquence des réarrangements de *MYC* dans la littérature (R : réarrangé)

Auteur	Fréquence des LBDGC *MYC*-R
Savage et al. 2009[8]	8,8 %
Copie Bergman et al. 2015[9]	8,9 %
Klapper et al. 2008[10]	7,9 %
Valera et al. 2013[45]	7 %
Barrans et al. 2010[47]	14 %

De nombreux travaux ont démontré que ce remaniement a un effet péjoratif sur l'évolution du LBDGC en altérant fortement la survie à 2 ans ou à 5 ans (tableau 12) (fait validé dans la révision 2016) [8–10,45,47,59]. Le constat inverse a été publié par d'autres auteurs, comme *Kramer et al.* (1998) sur leur cohorte composée de 156 lymphomes à grandes cellules de novo. Dans cette étude, la présence isolée de la t(8;14) n'avait pas d'incidence sur la survie des lymphomes à grandes cellules[12] (figure 43). Ce résultat peut s'expliquer d'une part, par l'absence de critères diagnostiques validés avant le premier consensus international 2001 (les critères diagnostiques du LBDGC variant d'un pays à l'autre) et d'autre part par l'utilisation d'une technique de southern blot, moins sensible que la FISH.

Plus récemment, P*edersen et al.*[60] (2014) observaient l'absence de corrélation entre la survie globale et le réarrangement génique, sur une cohorte composée de LBDGC DH transformés, où *MYC* était le plus souvent réarrangé avec un gène non *IG*. Ils concluaient que l'effet sur la survie était lié au partenaire du proto-oncogène.

Tableau 11 : Données de la littérature sur la survie globale chez les patients *MYC*-R (R : réarrangé ; NR : non réarrangé ; RT : Radiothérapie ; * survie à 5 ans ; ** : survie à 2 ans ; S : significatif ; NS : non significatif)

Etude	Traitement	Survie globale MYC-R vs MYC-NR	S / NS
Savage et al. [8] 2009	R-CHOP	33% * 72%*	S
Copie Bergman et al. [13] 2012	R-CHOP R-ACVBP	57,7* 73,7%*	S
Klapper et al. [10] 2008	CHOP CHOEP	abs abs	S
Barrans et al. [47] 2010	R-CHOP	35%** 61%**	S
Kramer et al. [12] 1998	Polychimiothérapie +/- RT	abs abs	NS
Pedersen et al. [60] 2013	abs	abs abs	NS
Johnson et al. [21] 2012	R-CHOP +/- RT	abs abs	NS

Il est aujourd'hui admis que le réarrangement de *MYC* est un facteur de mauvais pronostic. Notre résultat le confirme puisque nous avons retrouvé dans notre cohorte une diminution significative de la survie sans progression (p = 0,03) et de la survie globale (p = 0,021) en présence du réarrangement de *MYC* (figure 36).

Concernant la durée de survie, nous n'avons pas pu prendre la survie à 5 ans ni à 2 ans. En effet, tous nos patients porteurs d'un réarrangement de *MYC* ont été diagnostiqués entre 2014 et mai 2016 (excepté pour l'un d'entre eux), ainsi le suivi moyen (insuffisamment long pour certains des patients) nous a contraint de travailler sur une survie moyenne à 10 mois.

Nous avons donc comparé les survies à 10 mois : dans le groupe *MYC*-R la survie globale était 77,7% alors qu'elle était de 83,3% dans le groupe *MYC* non réarrangé. Nos résultats montraient donc une diminution significative de la survie globale en cas de réarrangement du

gène *MYC* (p = 0,002), ce qui est cohérent avec les données de la littérature. La recherche précoce à 10 mois de la diminution de la survie globale met en évidence la rapidité de l'effet néfaste du réarrangement du proto-oncogène.

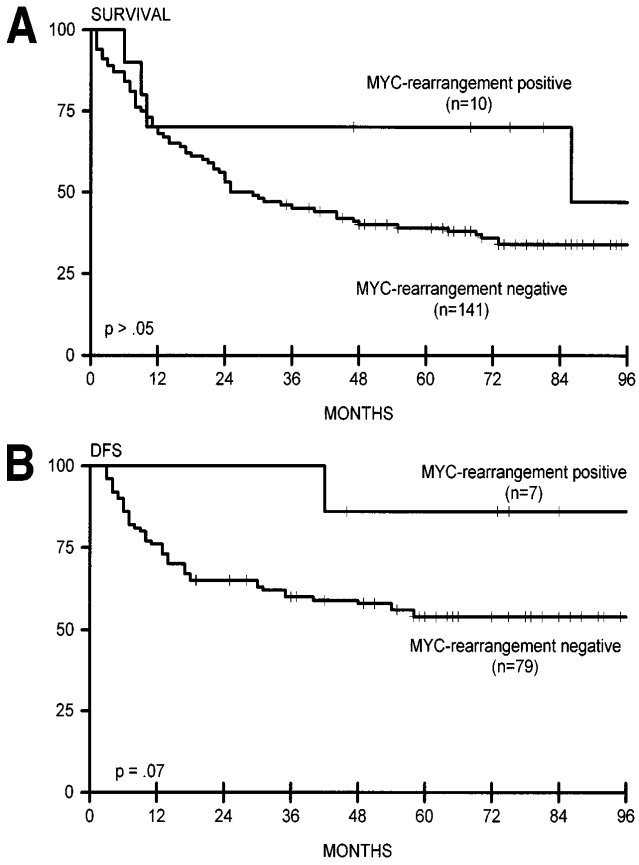


Figure 43 : Etude des survies globale et sans progression en fonction de l'absence ou de la présence du réarrangement de *MYC (Kramer et al.* 1998*)*[12](A : survie sans progression ; B : survie globale).

Partenaire de MYC :

Contrairement aux nombreux travaux effectués concernant le réarrangement de *MYC* et son rôle défavorable dans les LBDGC, le rôle du partenaire du proto-oncogène n'a été que peu publié.

Johnson et al. dans leurs travaux en 2009, ont étudié l'impact du réarrangement de *MYC* avec un gène *IG* sur une série de 54 patients (LBDGC, BCLU et LF). Pour cela, ils s'appuyaient

sur les translocations chromosomiques visualisées sur le caryotype et confirmaient les réarrangements géniques par l'utilisation de sondes break apart MYC et double fusion MYC/IGH. Ils observaient un pronostic plus favorable en cas de remaniement avec un gène non *IG* plutôt qu'avec un gène *IG*[11] (Figure 44).

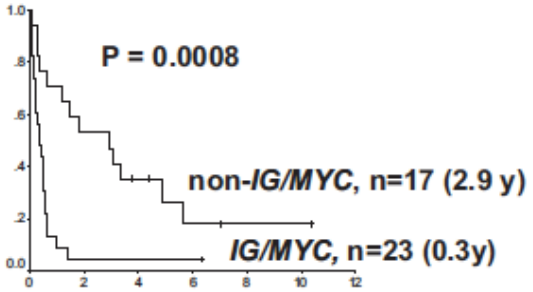


Figure 44 : Courbes de survie en fonction du partenaire de MYC (*Jonhson et al. 2009*)[11]

Dans l'étude en 2012 de *Pedersen et al.* portant sur 165 LBDGC ou BCLU, les réarrangements géniques ont été recherchés par FISH sur lame déparaffinée, avec des sondes break apart pour *MYC, IGK* et *IGL* et avec une sonde double fusion pour rechercher le réarrangement *MYC-IGH.* Les auteurs observaient que tous les décès dans leur cohorte étaient survenus chez des patients porteurs d'un réarrangement *MYC-IG.* Parmi les patients porteurs d'un réarrangement *MYC-non IG,* aucun n'était décédé. Ils suggéraient ainsi l'existence d'un impact pronostic lié au partenaire de *MYC*[61].

Les mêmes auteurs, (*Pedersen et al.),* en 2014, sur une série plus grande englobant 237 LBDGC et BCLU de novo transformés ou en rechute, ont conforté leur hypothèse. Les réarrangements des différents gènes ont été étudiés de la même façon que dans leur précédente étude. Leurs résultats montraient une survie globale significativement plus courte lorsque *MYC* était réarrangé avec un gène *IG* par rapport à un gène non *IG (p = 0,02)* ou par rapport à l'absence de réarrangement de *MYC.*

A notre connaissance, la dernière publication traitant de ce sujet est celle de l'équipe de *Copie Bergman*[9], datant de fin 2015. Leur étude prospective qui portait sur 774 LBDGC de novo, étudiait les réarrangements géniques par FISH avec des sondes break apart MYC et des

sondes double fusion MYC/IGH, MYC/IGL et MYC/IGK. L'intérêt des sondes double fusion était de confirmer le réarrangement de *MYC* avec la chaîne lourde d'Ig ou avec une des chaînes légères. Les auteurs démontraient ainsi l'impact pronostic péjoratif du réarrangement en FISH de *MYC* avec un gène *IG* (survie sans progression et survie globale significativement plus courtes que les LBDGC *MYC/non IG* ou *MYC* non réarrangé : p = 0,0023 et p = 0,0002 respectivement). En revanche, le remaniement avec un gène non *IG* avait un pronostic similaire à celui des LBDGC non réarrangés[9]. Cette étude concorde avec les résultats des autres auteurs (*Jonhson* (2009) et *Pedersen* (2014))[11,13,60].

Cependant, l'étude d'*Aukema et al* (2014) ne corrobore pas ces résultats : l'exploration en FISH de 80 lymphomes B (de sous-types histologiques divers mais excluant les lymphomes de Burkitt) porteurs d'un réarrangement de *MYC* n'a pas permis de mettre en évidence une différence de pronostic en fonction de son partenaire[62]. On peut l'expliquer par le choix de la population étudiée qui est difficilement comparable à celle des autres études puisque les types histologiques des lymphomes inclus étaient très variés.

En définitif, le rôle du partenaire de *MYC* semble avoir un impact prédictif majeur.
D'autres études seraient nécessaires pour pouvoir affirmer avec plus de certitude l'impact pronostic plus péjoratif du remaniement *MYC-IG*.

Notre étude, quant à elle, montrait que pour 40% des cas, le gène *MYC* était réarrangé avec une chaîne d'*IGH* et pour 20% des cas, le partenaire de *MYC* était un gène *non IG*. Dans 10% des cas, l'analyse n'a pas été informative du fait d'un échec technique lié à une quantité de matériel insuffisante. Dans les 30% des cas restants, il n'a pas été possible de conclure puisque nous ne disposions pas de sondes double fusion adéquates et nous pouvions uniquement montrer que *IGL* et IGK étaient remaniés. Ainsi, il n'est pas exclus que le pourcentage sur le nombre de réarrangements avec un gène différent *des IG* ait été sous-estimé, ce qui expliquerait les différences retrouvées avec l'équipe de *Johnson* (20% versus 40%).

Concernant l'effet de *MYC/IG* ou *MYC*/non *IG* sur la survie, contrairement aux données actuelles de la littérature, notre étude montrait un pronostic significativement meilleur en cas de réarrangement avec un gène d'*IG* plutôt qu'avec un gène non *IG*. Cette discordance peut être liée à divers facteurs :

- Faible effectif (responsable d'un résultat statistique probablement non fiable)
- Biais de sélection par l'exclusion des patients porteurs d'un remaniement des chaines légères représentant 30% de notre effectif de *MYC-R*
- Origine du lymphome : contrairement à *Copie Bergman* qui avait inclus uniquement des LBDGC de novo, nos patients étaient porteurs de LBDGC de novo et transformés. Dans les études de *Pedersen* et de *Johnson*, seuls des LBDGC et des BCLU étaient concernés.

Afin de confirmer ou infirmer nos résultats, il est donc indispensable d'élargir notre cohorte et d'utiliser des sondes de FISH double fusion *MYC/IGL* et *MYC/IGK*.

Lymphomes SH, DH/TH :

Dans la majorité des études, les LBDGC double hit (*MYC/BCL2*) sont responsables d'une diminution de la survie (*Visco et al.* 2013 ; *Green et al.* 2012 ; *Snuderl et al.* 2010 ; *Li et al.* 2012)[14–17].

Dans leur étude, *Johnson et a.l* (2008) étudiaient une cohorte de 193 patients atteints de LBDGC de novo traités par R-CHOP. La recherche de lymphomes DH (*MYC/BCL2*) effectuée à l'aide de sondes break apart MYC et BCL2 sur coupes anatomopathologiques déparaffinées retrouvait 6% de DH. La survie médiane des LBDGC *MYC/BCL2* était 13 mois versus 95 mois pour les LBDGC non DH. De plus, la survie globale à 3 ans était significativement plus basse chez les DH (46% versus 75%, p = 0,002).

Dans la publication de *Copie Bergman et al* (2015)[9], le caractère péjoratif des LBDGC SH et DH (recherché par des sondes de FISH break apart MYC, BCL2 et BCL6) n'était mis en évidence que dans les analyses univariées : survie globale plus courte par rapport aux LBDGC sans réarrangement de *MYC*, p=0,0339 pour les SH et p=0,0457 pour les DH (figure 45). En revanche, dans les analyses multivariées, seul le LBDGC SH avait un mauvais pronostic sur les survies globales et sans progression (p = 0,0139 et p = 0,0482 respectivement). Copie Bergman expliquait ce résultat par le fait que dans son étude, les lymphomes DH englobaient à la fois les *MYC-BCL2* et les *MYC-BCL6,* ce qui n'est pas le cas dans beaucoup d'autres études où seuls *MYC et BCL2* sont recherchés. De plus, en excluant les tumeurs *MYC/BCL6* et

en ne prenant que les lymphomes *MYC/BCL2,* la survie globale et la survie sans progression étaient altérées, en accord avec les autres publications. Ainsi, le mauvais pronostic lié aux LBDGC DH serait plutôt en lien avec le réarrangement de *BCL2* qu'avec celui de *BCL6.*

Par ailleurs, les lymphomes SH et DH avaient tous les deux un plus mauvais pronostic quand le réarrangement de *MYC* s'effectuait avec un gène d'*IG*[9] (figure 46).

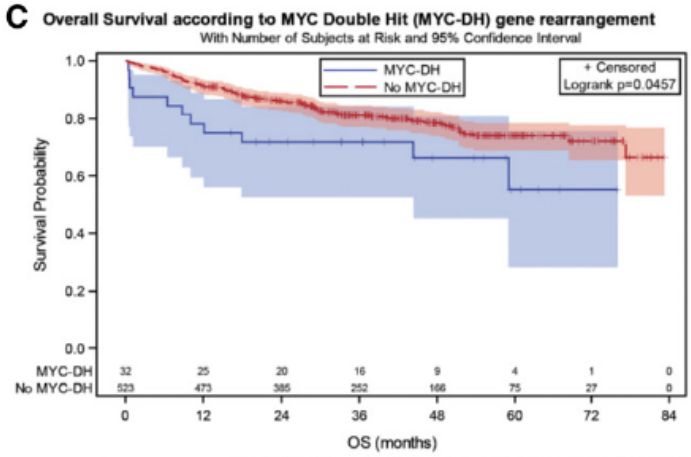


Figure 45 : Analyse univariée de la survie en fonction du réarrangement de MYC DH ou SH (*Copie Bergman et al.* 2015)[9]

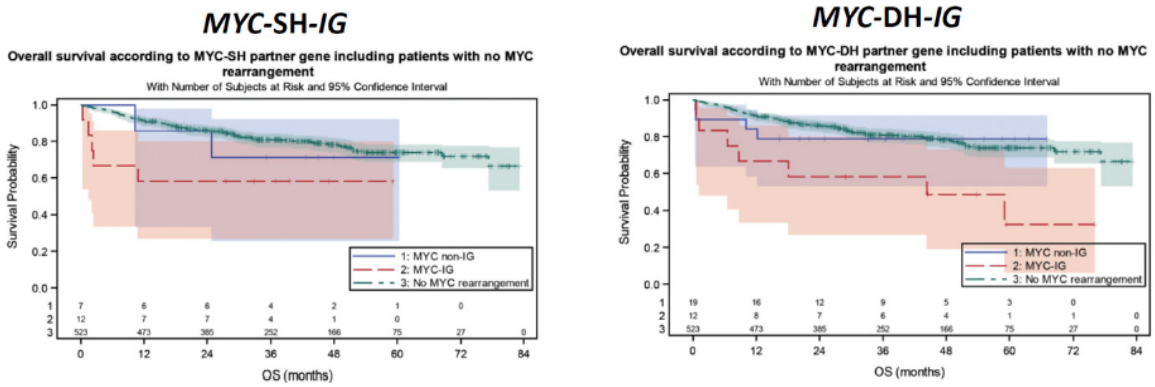


Figure 46 : Impact du partenaire de MYC sur la survie en fonction du caractère SH ou DH (*Copie Bergman et al.* 2015)[9]

Nous pouvons en déduire que les LBDGC DH seraient de manière générale de mauvais pronostic et que l'évolution serait plus défavorable en cas de LBDGC porteur d'un réarrangement *MYC-IG* et en cas de remaniement de *MYC/BCL2* plutôt que *MYC/BCL6.*

La fréquence des lymphomes simple hit dans notre étude était de 4% et celle des LBDGC double et triple hit était de 16%. Nous n'avons pas trouvé de différence significative sur la survie entre les LBDGC SH et DH, ni lors de la séparation des DH impliquant *BCL2* et des DH impliquant *BCL6*, contrairement à l'équipe de Copie Bergman. Les facteurs explicatifs sont les mêmes que ceux évoqués plus haut (faible échantillonnage, lymphome transformé ou de novo).
A l'inverse de ces mêmes auteurs, notre étude montrait que le réarrangement *MYC-non IG* semblait être plus péjoratif que le réarrangement *MYC-IG* dans le groupe des lymphomes DH (p=0,04) (pour la survie globale, mais non significatif pour la survie sans rechute). Une fois encore, ce résultat est à prendre avec prudence du fait du faible effectif. Ceci explique également pourquoi la comparaison n'a pas pu être effectuée pour les lymphomes SH.

Lymphomes GC et non GC :

D'après les données bibliographiques, les LBDGC de type non GC auraient un pronostic moins bon que le type GC (*Copie Bergman et al.* 2015 ; *Klapper et al.* 2008)[9,10]. Par ailleurs, il est admis que le réarrangement de *MYC* confère un mauvais pronostic indépendamment du type GC et non GC.

L'étude de *Klapper et al* (2008), portant sur une cohorte de 177 patients atteints de LBDGC de novo traités par CHOP ou CHOEP, rapportait effectivement que le réarrangement du proto-oncogène était lié à une évolution défavorable de la survie, aussi bien dans le type GC que non GC[10] (figure 47) (Le type de LBDGC avait été déterminé par IHC selon l'algorithme de Hans).

Savage et al. (2009) réalisaient une étude similaire sur le pronostic lié au réarrangement de *MYC* sur une série de 137 patients avec un LBDGC de novo traités par R-CHOP. La recherche du remaniement a été effectuée par FISH avec la sonde MYC break apart et le type GC ou non GC a été défini par GEP lorsque c'était possible, sinon par IHC. Leurs résultats concordaient avec ceux retrouvés par *Klapper et al.* pour la survie sans progression qui était affectée dans les deux sous-groupes. En revanche, la survie globale n'était diminuée que dans le groupe GC avec réarrangement de *MYC*[8]. L'absence de concordance avec l'étude de

Klapper et al. concernant la survie globale peut être liée d'une part à la stratégie thérapeutique différente dans les deux groupes et d'autre part à la technique utilisée pour rechercher la cellule d'origine (GEP versus IHC).

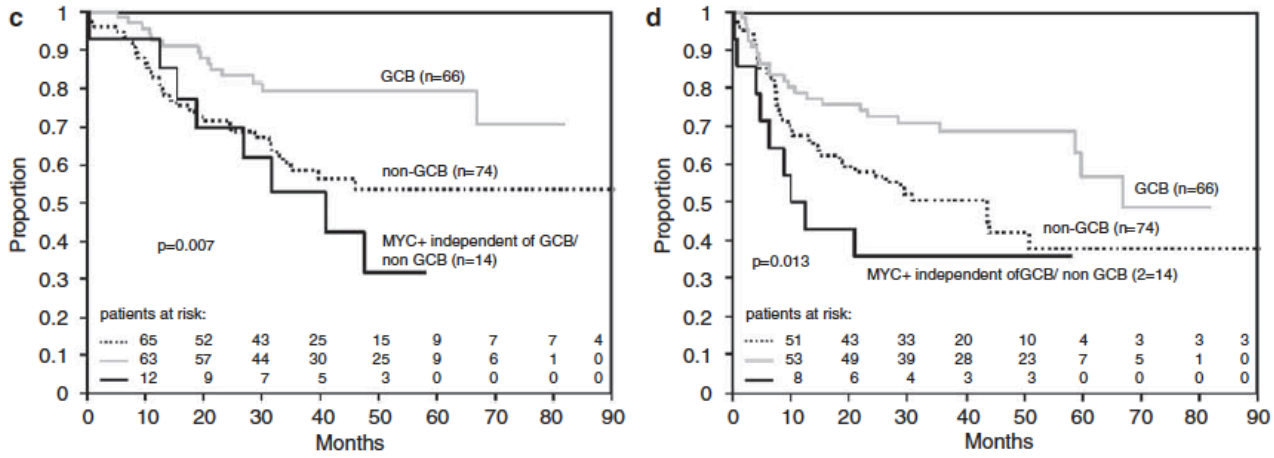


Figure 47 : Survie globale (à droite) et survie sans progression (à gauche) en fonction du type GC, non GC et MYC-R[10]

D'après l'étude de *Copie Bergman et al*. dans le groupe GC, le réarrangement de *MYC-IG* avait un plus mauvais pronostic que le réarrangement *MYC*-non *IG*. En revanche, il n'y avait pas de différence de pronostic dans le groupe non GC.[9]

Il est donc primordial de constater que la recherche du réarrangement de *MYC* et de son partenaire est d'une importance majeure, particulièrement dans le groupe GC où le pronostic est impacté négativement.

De façon similaire à la littérature (*Copie Bergman et al.* 2014, *Barrans et al.* 2010, *Klapper et al* ,2008)[9,10,47], la majorité des LBDGC de notre cohorte avec un réarrangement de *MYC* était de type GC (90%).

Nous avons montré qu'il n'y avait pas de différence sur la survie globale entre les deux types immunohistochimique (p = 0,9). En revanche, dans le groupe GC, le pronostic était moins bon

en présence du réarrangement du proto-oncogène (p = 0,006), ce qui est en accord avec l'étude de *Savage et al*.
Nos travaux ne nous ont pas permis de mettre en évidence une différence significative de pronostic concernant le groupe GC en fonction du partenaire de *MYC* (p = 0,09).
L'étude dans le groupe non GC n'a pas pu être réalisée du fait d'un trop petit nombre de LBDGC non GC *MYC*-R.

L'IHC :

Protéine MYC :

De nombreuses observations au cours des dernières années ont étudié la relation entre l'expression de la protéine MYC et le réarrangement du gène, ainsi que l'impact pronostic de son hyperexpression dans les LBDGC.

Celle de *Johnson et al.* (2012), portant sur 167 LBDGC de novo traités par R-CHOP (+/- radiothérapie), montrait que la positivité isolée de la protéine MYC recherchée par IHC (seuil d'expression à 40%) ne semblait pas être de mauvais pronostic[21].

A l'inverse, d'autres équipes rapportaient que la surexpression de la protéine MYC diminuait significativement la survie globale et la survie sans progression (*Valera et al.* 2013 ; *Rimsza et al.* 2008)[45,63].
Dans l'étude de *Valera*, qui portait sur 219 LBDGC de novo, le pronostic était significativement altéré lorsque MYC était surexprimée (seuil d'expression en IHC à 10%) : la survie sans progression à 5 ans était 49% (expression de MYC) versus 65% (absence d'expression de la protéine) (p = 0,003)[45]. Cette discordance peut s'expliquer par la différence de seuil utilisé en IHC.

En revanche, tous s'accordent pour conclure que lorsque MYC est positif (par expression élevée de la protéine ou par réarrangement du gène), associé à l'expression de la protéine BCL2, le pronostic est toujours mauvais (figure 48).

Dans notre travail, nous avons utilisé un seuil d'expression de MYC à 40%. En accord avec l'étude de *Johnson et al.* l'expression de MYC n'altérait pas la survie globale (p = 0,55). Cependant, contrairement à ce qui est publié, la positivité de la protéine MYC associée à l'hyperexpression de BCL2 n'avait pas d'influence sur le pronostic.

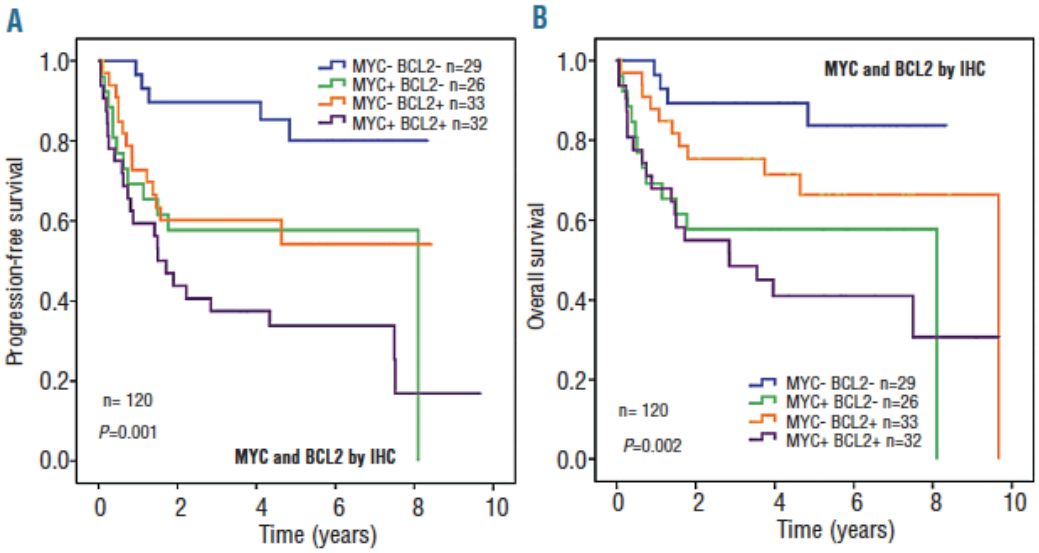


Figure 48 : Survie sans progression et survie globale en fonction de l'expression de MYC et BCL2 (*Valera et al.* 2013)[45]

La concordance entre l'hyperexpression de MYC et le réarrangement génique est discutée.

L'étude de *Horn et al ;* publiée en 2013 portant sur 442 LBDGC de novo, étudiait la corrélation entre l'expression de la protéine MYC (avec un seuil d'expression en IHC fixé à 40%) et le réarrangement du gène (recherché par une sonde break apart en FISH). Seulement 69% des patients porteurs d'une translocation de *MYC* surexprimaient la protéine [64].

Dans l'étude de *Copie Bergman et al.* (2015), 66% des patients porteurs d'un réarrangement de *MYC* exprimaient la protéine MYC (seuil d'expression à 70% en IHC)[13].

D'après la méta analyse de *Cheah et al.* (2014)[58] l'IHC pourrait être un bon moyen de sélectionner les LBDGC avant de rechercher le réarrangement par FISH, cependant le seuil d'expression de la protéine MYC reste encore à définir.

Dans notre étude, la concordance entre l'expression de la protéine (seuil à 40% en IHC) et le réarrangement en FISH n'était que de 40% (4 patients sur 10). Lorsque l'on baissait le seuil d'expression à 30%, il n'existait pas non plus de corrélation entre l'expression de la protéine et le réarrangement du gène.
En revanche, avec un seuil à 30%, la protéine était surexprimée chez 2 patients sur 3 porteurs d'un réarrangement *MYC-IGH.* Il pourrait être intéressant de rechercher un lien entre l'expression de la protéine MYC et le réarrangement du gène avec la chaîne lourde d'*IG* dans une étude ultérieure comportant un nombre de patients plus conséquent. L'expression de la protéine pourrait être une façon de sélectionner les LBDGC porteurs d'un remaniement *MYC-IGH.*

Protéine BCL2 :

Les diverses études explorant l'expression de la protéine BCL2 ne s'accordent pas quant à son impact pronostique.
En effet, d'après *Fu et al.* (2008), qui ont travaillé sur une série de 243 LBDGC de novo traités par R-CHOP ou par une autre chimiothérapie, l'hyperexpression de BCL2 ne serait pas associée à un mauvais pronostic [65].
Au contraire, d'après d'autres études, il s'agirait d'un facteur prédictif de survie. Certaines études mettraient en évidence un impact négatif de l'hyper expression de BCL2 sur la survie globale et sur la survie sans progression (*Kramer et al.* 1998 ; *Gascoyne et al.* (1997)[24,12]). *Hill et al.* (1996) quant à eux, ne retrouvaient un impact pronostic négatif que sur la survie sans progression[26]. Toutefois, ces 3 dernières études ont été réalisées sur des patients traités par diverses chimiothérapies mais n'associant jamais le rituximab. Cette molécule pourrait être liée à la disparition de l'impact péjoratif associé à l'expression de BCL2.

Il a été mis en évidence par certaines équipes l'importance de rechercher le type GC ou non GC pour évaluer l'impact de l'expression de BCL2. Cependant, alors que certains auteurs montraient une altération de la survie en cas de surexpression de BCL2 dans le groupe non

GC (*Iqbal et al.* 2006 *; Barrans et al.* 2003), d'autres auteurs retrouvaient une survie significativement plus courte uniquement dans le groupe GC (*Visco et al.* 2013; *Iqbal et al.* 2011).

Dans son observation de 2006 portant sur 240 patients traités sans rituximab, Iqbal démontrait que le pronostic n'était altéré que dans le groupe ABC (p = 0,002) et que la surexpression de BCL2 n'avait pas d'impact dans le groupe GC (avec un seuil d'expression à 30% en IHC)[66] (p=0,69) (figure 49).

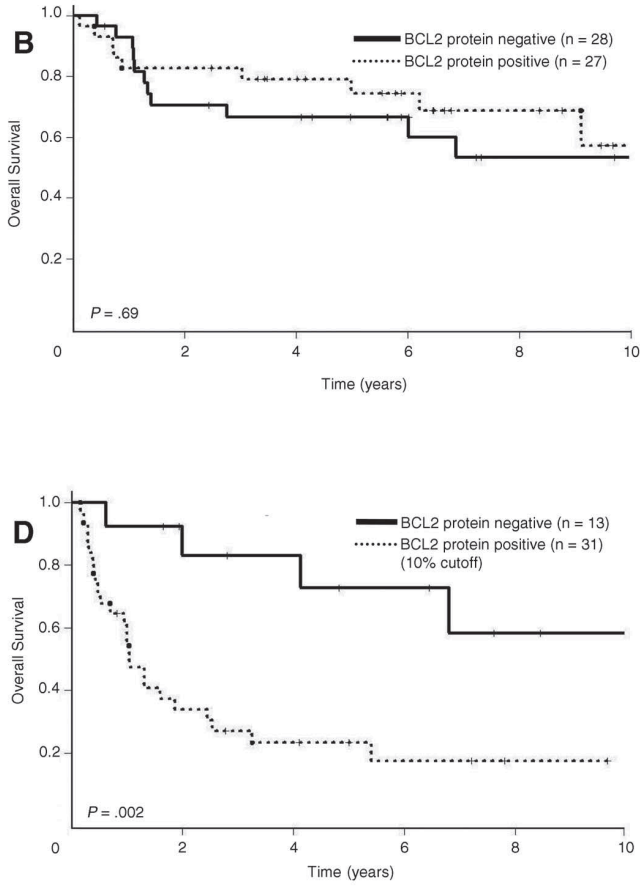


Figure 49 : Corrélation entre la survie globale et l'expression de la protéine BCL2 dans le groupe GC (en haut) et le groupe ABC (en bas) (Iqbal *et al.* 2016)[66]

Ces résultats étaient en concordance avec ceux de *Barrans et al* (2003)[51], qui retrouvaient dans leur cohorte de 137 LBDGC de novo, une diminution significative de la survie globale à 2 ans dans le groupe non GC (38% lorsque la protéine était exprimée en IHC (seuil à 50%) versus 64% lorsqu'elle n'était pas exprimée) (p = 0,02).

A l'inverse, dans l'étude de *Visco et al* (2013) portant sur 327 LBDGC de novo traités par R-CHOP, la survie était moins bonne uniquement dans le groupe GC (p = 0,04) mais n'était pas modifiée dans le groupe ABC (p = 0,57)[14] (Figure 50).

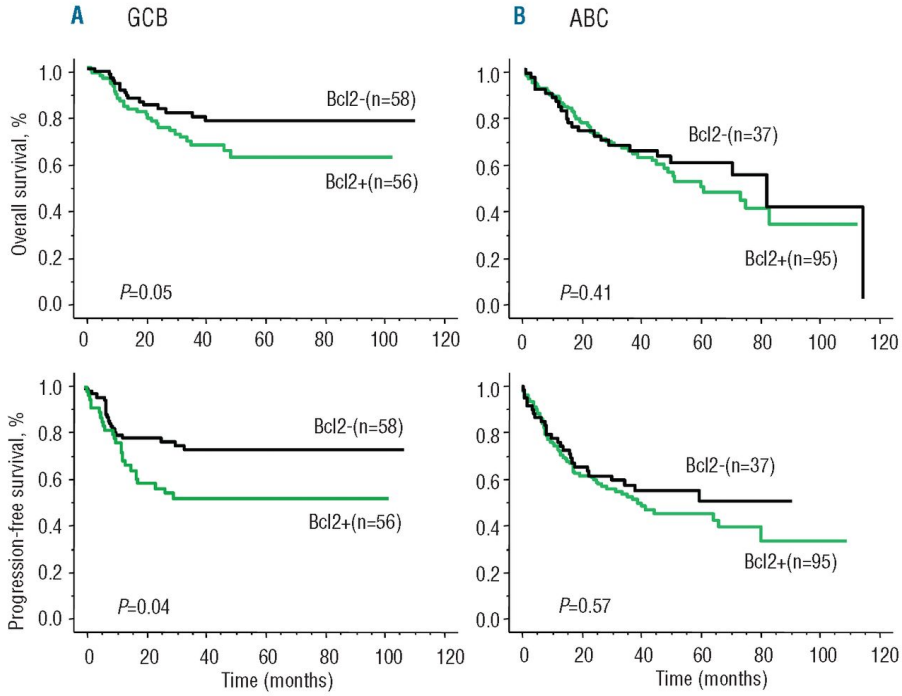


Figure 50 : **Survie globale et survie sans progression dans les groupes GC et ABC (*Visco et al.* 2013)[14]**

A noter que les résultats de *Visco et al.* concordaient avec la nouvelle étude de 2011 de *Iqbal et al.*[67], effectuée sur 221 LBDGC de novo traités également par R-CHOP, qui retrouvait aussi une diminution de la survie dans le groupe GC.

Ces deux dernières études ont été réalisées chez des patients traités par R-CHOP (contrairement aux deux premières citées) et l'ajout du rituximab est probablement à l'origine de la différence de pronostic en fonction du type moléculaire/immunohistochimique.
Au vu de toutes ces observations, il semblerait que l'impact pronostic de l'hyperexpression de BCL2 varie en fonction du type moléculaire du lymphome.

Dans notre cohorte, l'hyperexpression de la protéine BCL2 diminuait de façon significative la survie globale (p = 0,043) (figure 42). En séparant les groupes GC et non GC, on retrouvait un

impact significatif sur la diminution de la survie dans le groupe GC (p = 0,046) (figure 42), tandis qu'il n'y avait pas de corrélation dans le groupe non GC (p = 0,52). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par *Visco* et par *Iqbal*[67,14].
L'hyper expression était plus fréquente dans les LBDGC DH ou TH que SH (88% versus 50%). La fiabilité de notre analyse est discutable de part le faible effectif de notre étude, mais il pourrait être intéressant de rechercher si les LBDGC SH sont effectivement associés à une absence d'hyperexpression de BCL2, ce qui permettrait de sélectionner les LBDGC SH des autres.
A noter également l'absence de corrélation entre l'expression de la protéine et le groupe GC/ non GC (p = 0,49) et l'absence de corrélation entre l'expression de la protéine et le réarrangement de *MYC* (p = 0,66).

Protéine BCL6 :

L'expression élevée de la protéine BCL6 semble être de meilleur pronostic que la faible expression (*Lossos et al.*2001 ; *Winter et al.* 2006)[68,69].
Cependant, d'après *Winter et al* (2006), l'impact pronostic de l'expression de BCL6 serait dépendant du traitement administré. En effet, dans sa cohorte de 211 patients, l'auteur comparait l'impact de l'expression de la protéine sur la survie selon le type de traitement reçu (CHOP ou R-CHOP) et retrouvait chez les patients traités par CHOP sans rituximab, une survie significativement moins bonne en cas d'absence d'expression de BCL6 (survie globale : 73% si BCL6 était exprimée, versus 42% lorsqu'elle n'était pas exprimée ; p = 0,001). Par contre, pour les patients traités par R-CHOP, il n'était pas observé de différence de survie entre les patients exprimant BCL6 et ceux ne l'exprimant pas (74% versus 75% ; p = 0,7)[68].

Dans notre cohorte, les patients (traités par des traitements hétérogènes incluant ou non le R-CHOP) avaient une survie sans progression significativement diminuée lorsque la protéine BCL6 n'était pas exprimée, en accord avec la littérature. Nous retrouvons ce même résultat dans le groupe non GC (p = 0,00053). En revanche, aucune différence de pronostic n'était mise en évidence dans le groupe GC (p = 0,4).
Par ailleurs, la protéine BCL6 était significativement plus exprimée dans les LBDGC de type GC que dans les types non GC (p = 0,047).

Enfin, bien que tous les LBDGC *MYC*-R exprimaient la protéine BCL6, son expression ne permettait pas de prédire la présence ou non du réarrangement de *MYC* (p = 0,32).

Données clinico-biologiques :

Contrairement à l'équipe de *Le Gouille et al.*[22], bien que les facteurs clinico-biologiques de mauvais pronostic étaient fréquents dans notre cohorte (stade Ann Arbor > II, IPI >2 et LDH élevées), nous n'avons pas mis en évidence de lien avec le réarrangement de *MYC*. Les résultats n'étaient pas concluants non plus pour les LBDGC DH, ni lorsque le remaniement impliquait un gène d'*IG*.
Contrairement aux autres paramètres clinico-biologiques, le PS était le seul à avoir un impact péjoratif sur la survie lorsqu'il était élevé.

Déparaffinage :

L'absence de résultats interprétables en FISH après les techniques de déparaffinage peut être expliquée par divers paramètres.
Au cours du premier essai, l'absence de prétraitement par le thiocyanate de sodium chaud a probablement joué un rôle dans l'échec de la technique.
L'échec du deuxième essai peut être lié à plusieurs facteurs : temps de pepsine insuffisant (20 minutes) responsable d'une digestion incomplète, température de dénaturation trop faible (75°C), utilisation d'une sonde Cytocell® (ne sont pas les plus performantes pour l'hybridation sur coupe paraffinée).

Les 3^{e} et 4^{e} essais, bien que plus encourageants n'étaient pas pour autant satisfaisants. La température de dénaturation, identique au deux premiers tests n'était pas assez élevée et la sonde utilisée était Cytocell® également. En revanche les bains de pepsine étaient plus longs, expliquant probablement l'amélioration du résultat.

Les résultats des 5^{e} et 6^{e} essais étaient meilleurs que les précédents. Cela peut s'expliquer par divers facteurs : utilisation d'une sonde de chez MetaSystems® (plus efficace sur coupe paraffinée que Cytocell®), la fonte de la paraffine en début de technique par incubation à 65°C et une température de dénaturation plus élevée (82° au lieu de 75°C).

Les 7e, 8e et 9e techniques ne nous ont pas donné des résultats plus acceptables que les 3e et 4 essais. Nous expliquons ceci probablement par un temps de contact de la pepsine insuffisant car le tissu ne semblait pas être suffisamment digéré.

Enfin, le dernier essai montrait une hybridation des noyaux un peu plus intense que les précédents. Cette amélioration pouvait être liée d'une part à l'augmentation de la température du bain de prétraitement (rupture des liaisons covalentes liées à la fixation plus efficace ?) et d'autre part à l'utilisation de la pepsine directement au contact de la lame. Le temps de prétraitement dans ce dernier test était plus court que dans les autres essais.

Malgré de nombreux essais appuyés sur divers mode opératoires, nous n'avons pas réussi à obtenir des images interprétables et utilisables en routine, les noyaux n'étant pas bien individualisés et les signaux étant de faible intensité. Le dernier essai était cependant plus encourageant que les précédents, laissant voir une hybridation plus intense avec des noyaux un peu plus beaux. Des essais supplémentaires seront réalisés : augmentation du temps de pepsine et allongement du temps de pré traitement dans les bains de thiocyanate.

Limites de l'étude :

La principale limite de notre étude était vraisemblablement le faible effectif de notre échantillon de patients. De ce fait, certaines études statistiques n'ont pas pu être réalisées. Les résultats significatifs et particulièrement ceux discordants avec les données qui font l'unanimité dans la littérature, doivent être interprétés prudemment.
La deuxième limite de notre travail était liée au biais de sélection : seuls les patients pour lesquels nous avions du tissu congelé ont été inclus. Tous les prélèvements conservés en paraffine ont été exclus.
La troisième était due au fait que nous ne disposions pas de sondes double fusion *MYC-IGK* et *MYC-IGL.* En effet, nous avons été contraint d'exclure 3 patients pour les analyses de survie (représentant donc 30% des patients réarrangés *MYC*), ce qui a fortement impacté la taille de l'effectif de nos patients réarrangés.

V. Conclusion

Nous avons étudié rétrospectivement les impacts de certains facteurs pronostiques identifiés et validés récemment (réarrangement du gène *MYC,* partenaire *IG* ou non *IG* de *MYC,* groupe GC et non GC, expression protéique de MYC, BCL2 et BCL6) sur la survie de 49 patients atteints de LBDGC, suivis par le service d'hématologie clinique du CHRU de Tours.

Ce travail a nécessité l'utilisation de la technique de FISH et de la technique d'IHC à partir d'échantillons congelés et des essais de mise au point de la FISH sur coupe en paraffine (qui correspondent à la majorité des prélèvements conservés).

Cette étude a montré que le réarrangement de *MYC,* le partenaire de *MYC* (*IG* ou non *IG*) et l'expression des protéines BCL2 et BCL6 ont un impact sur la survie. En revanche, cela n'a pas été prouvé pour le caractère DH, l'expression de la protéine MYC, ni pour le type GC ou non GC en IHC, bien qu'en cas de réarrangement génique de *MYC* ou d'expression de la protéine BCL2 la survie variait en fonction du type GC ou non GC. Nos résultats sont en corrélation avec les données de la littérature pour les résultats obtenus concernant le réarrangement de *MYC,* l'expression des protéines BCL2 et BCL6 mais pas pour le rôle joué par le partenaire de *MYC,* ni pour l'impact pronostique du type GC/non GC, ou encore pour l'impact des LBDGC DH ou TH. Ceci peut s'expliquer par la trop petite taille de notre cohorte, par la différence de population étudiée et par l'absence de sondes double fusion *MYC/IGK* et *MYC/IGL* disponibles dans le commerce.

Nous envisageons donc de poursuivre ce travail en y associant une étude prospective et des échantillons en paraffine afin d'augmenter la taille de notre série pour affiner notre évaluation statistique. Nous finirons également la mise au point de la technique de « FISH sur prélèvement en paraffine » afin qu'elle soit utilisée en routine. De plus, nous utiliserons, selon un logigramme décisionnel, avec l'accord des hématologues et des anatomopathologistes, les sondes de FISH suivantes : tout d'abord les sondes break apart *MYC, BCL2, BCL6* puis les sondes double fusion *MYC/IGH* (ainsi que *MYC/IGL* et *MYC/IGK* : à ce propos les fournisseurs de sondes commerciales ont été sensibilisés pour que nous puissions les avoir à disposition). Enfin nous essaierons de démontrer si certains de ces facteurs peuvent être indexés dans un sous-groupe pronostique associé à une stratégie thérapeutique. Cette étude sera menée au cours de mon assistanat au laboratoire de cytogénétique onco-hématologique du CHRU de Tours et nous espérons qu'elle fera l'objet d'une publication.

ANNEXE 1 : Classification de WHO ou OMS 2008

Les Lymphomes développés à partir des précurseurs

Leucémies -lymphomes lymphoblastiques :
Lymphomes développés à partir des précurseurs B.
Lymphomes développés à partir des précurseurs T.

Les lymphomes développés à partir des lymphocytes B périphériques

Leucémie lymphoïde chronique B/ lymphome lymphocytique.
Leucémie prolymphocytaire.
Lymphomes spléniques de la zone marginale.
Leucémie à tricholeucocyte (LT).
Leucémie/ lymphome B splénique inclassable.
Lymphome lymphoplasmocytaire.
Maladie des chaînes lourdes.
Prolifération lymphocytaire/ myélome.
Lymphomes de la zone marginale développés à partir des cellules
lymphoïdes
associées aux muqueuses (lymphome de type MALT).
Lymphomes de la zone marginale ganglionnaires.
Lymphome folliculaire.
Lymphome folliculaire cutané primitif.
Lymphome développé à partir des cellules du manteau.
Lymphome B diffus à grandes cellules sans spécification.
Lymphome B diffus à grandes cellules riche en cellules
T/histiocytes.
Lymphome B à grandes cellules cérébral primitif.
Lymphome B à grandes cellules des jambes.
Lymphomes B diffus à grandes cellules des personnes âgées (sénile).
Lymphome B à grandes cellules sur inflammation chronique.
Granulomatose lymphomatoïde.
Lymphome médiastinal (thymique) à grandes cellules B.
Lymphome B à grandes cellules intravasculaire.
Lymphome B à grandes cellules ALK-positif.
Lymphome plasmoblastique.
Lymphome B à grandes cellules sur lésions de maladie de Castelman HHV-8+.
Lymphome primitif des séreuses.
Lymphome de Burkitt.
Lymphome B intermédiaire entre LBDGC et lymphome de Burkitt.
Lymphome B intermédiaire entre LBDGC et lymphome de hodgkin clasique.

Les lymphomes T matures et cellules natural Killer (NK)

Leucémie prolymphocytaire T (LPL).
Leucémie à grands lymphocytes T granuleux (LGL).
Désordres lymphoprolifératifs chroniques à cellules NK.
Leucémie agressive à celles NK.
Désordres lymphoprolifératifs T EBV- positifs de l'enfance.
Lymphomes/ leucémies T de l'adulte associés au virus HTLV-1.
Lymphomes NK / T extra-ganglionnaires de « type nasal ».
Lymphome T associé à une entéropathie.
Lymphome T gamma/delta hépatosplénique.
Lymphome T sous cutané simulant une panniculite.
Lymphoprolifération T cutanées CD30 positives.
Rares sous types de lymphomes cutanés primitifs.
Lymphome T périphérique (sans spécification).
Lymphome T angio-immunoblastique (T-LAI).
Lymphome anaplasique à grandes cellules ALK-positif.
Lymphome anaplasique à grandes cellules ALK-négatif.

Les lymphomes des patients immunodéprimés :

Lymphoprolifération associées à un déficit immunitaire primitif.
Lymphomes associés à l'infection par le VIH.
Lymphomes des sujets transplantés.
Syndromes lymphoprolifératifs d'origine iatrogène.

ANNEXE 2 : Classification de WHO ou OMS 2016

Table 1. 2016 WHO classification of mature lymphoid, histiocytic, and dendritic neoplasms

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

Table 1. (continued)

Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*
*Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract**
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD30$^+$ T-cell lymphoproliferative disorders
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous γδ T-cell lymphoma
Primary cutaneous CD8$^+$ aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma
*Primary cutaneous acral CD8$^+$ T-cell lymphoma**
*Primary cutaneous CD4$^+$ small/medium T-cell lymphoproliferative disorder**
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
*Follicular T-cell lymphoma**
*Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype**
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK$^+$
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK$^-$*
*Breast implant–associated anaplastic large-cell lymphoma**
Hodgkin lymphoma
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)
Plasmacytic hyperplasia PTLD
Infectious mononucleosis PTLD
Florid follicular hyperplasia PTLD*
Polymorphic PTLD
Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)
Classical Hodgkin lymphoma PTLD
Histiocytic and dendritic cell neoplasms
Histiocytic sarcoma
Langerhans cell histiocytosis
Langerhans cell sarcoma
Indeterminate dendritic cell tumor
Interdigitating dendritic cell sarcoma
Follicular dendritic cell sarcoma
Fibroblastic reticular cell tumor
Disseminated juvenile xanthogranuloma
Erdheim-Chester disease*

Provisional entities are listed in italics.
*Changes from the 2008 classification.

ANNEXE 3 : Mode opératoire FISH

Pré traitement des lames :

- graver l'emplacement du spot sur la lame après observation des noyaux au microscope
- fixation méthanol / acide acétique (volume à volume) 2 fois 2 minutes à température ambiante
- tremper la lame pendant 1h dans du 2SSC à 37°C (+/- 2°C) (préchauffé pendant 1h)
- bain de HCL / pepsine à 37°C (+/- 2°C) : 100 µl de pepsine ajouté extemporanément pendant 20 à 30 minutes
- rinçage dans du PBS pendant 5 minutes à température ambiante sur un agitateur magnétique
- déshydratation 2 minutes dans chaque bain d'alcool à 70°, 85°, puis 100°

Co-dénaturation des ADN :

- préchauffer les lames égouttées, les lamelles et les mix de sondes 10 minutes à l'étuve à 37°C (+/- 2°C)
- déposer 5 µl de sonde sur la lame (au niveau du spot gravé) et recouvrir d'une lamelle 18x18
- sceller au rubber cement
- placer la lame sur la platine du Thermobrite pour la co-dénaturation : dénaturer 5 minutes à 75°C, puis pour l'hybridation toute la nuit à 37°C.

Lavages et révélation :

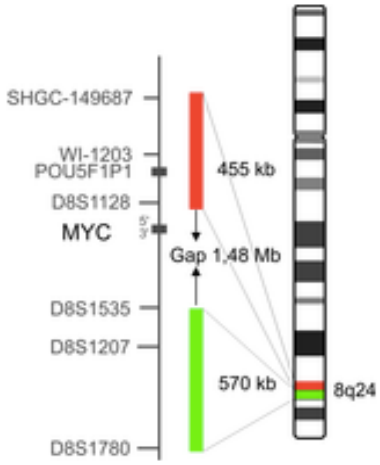
- préchauffer les bacs à température adéquate pendant au moins 45 minutes
- récupérer les lames et enlever le rubber cement et la lamelle à l'aide d'une pince
- 1er lavage : 0,4SSC-0,3%Tween 20 à 72°C (+/- 1°C) pendant 2 minutes
- 2^{e} lavage : 2 SSC à 37°C (+/- 2°C) pendant 30 secondes
- égoutter les lames et les sécher à l'abri de la lumière
- Déposer 10 à 15 µl de ***DAPI–anti-Fade*** sur la goutte d'étalement
- Disposer une lamelle de longueur différente selon le nombre de sonde sur la lame et appuyer fermement entre 2 feuilles de sopalin.
- Laisser reposer au moins 10 min à 4°C à l'abri de la lumière

Lecture :

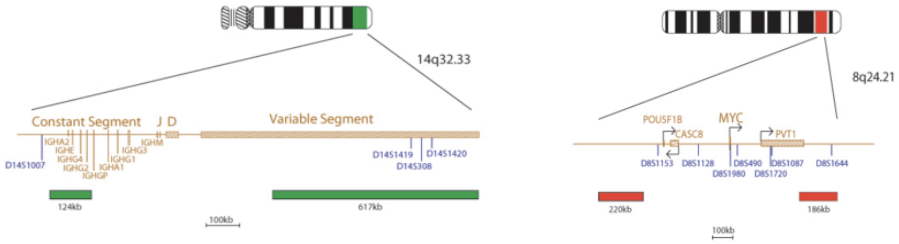
Observer les noyaux interphasiques au microscope à fluorescence sous les filtres adaptés aux sondes utilisées. Une double lecture des lames au microscope est recommandée en cas de difficulté d'interprétation.

ANNEXE 4 : Références et cartographie des sondes utilisées

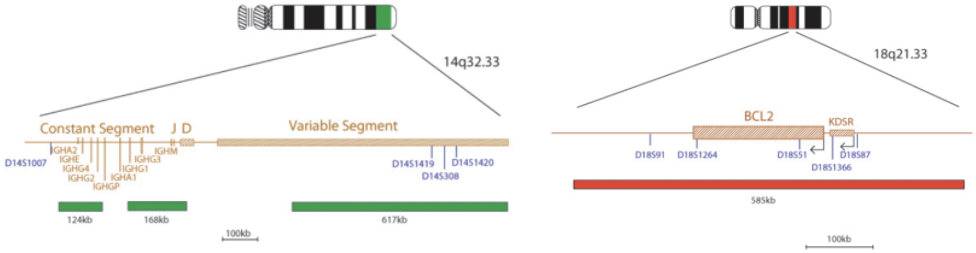
Sonde break apart MYC (MetaSystems ®)



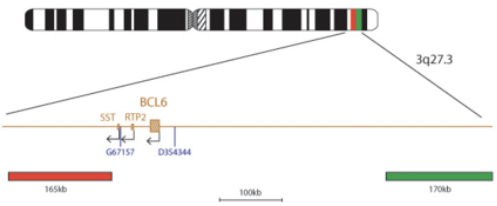
*Sonde double fusion MYC/IGH (*Cytocell ®)



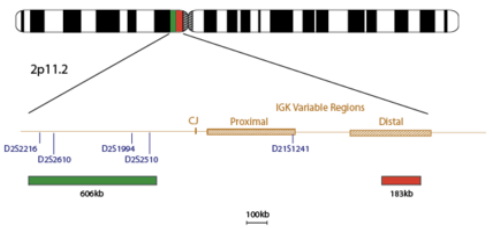
*Sonde double fusion IGH/BCL2 (*Cytocell ®)



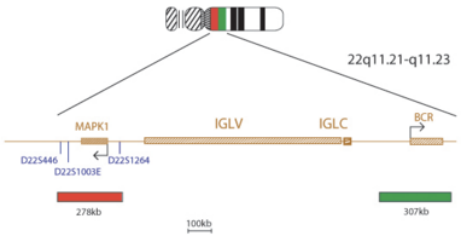
*Sonde break apart BCL6 (*Cytocell ®*)*



*Sonde break apart IGK (*Cytocell ®*)*



*Sonde break apart IGL (*Cytocell ®



ANNEXE 5 : Comparaison des caractéristiques cliniques, biologiques et immunophénotypiques des LBDGC (NR : non réarrangé ; R : réarrangé)

	LDGCB totaux (n=49)	MYC-NR (n=39)	MYC-R (n=10)	p	MYC SH (n=2)	MYC DH/TH (n=8)	p	MYC-IG	MYC-non IG (n=2)	p
Age médian	67	67	67		72,5	63		61	70	
Sexe (H/F)	24/25	20/19	04/06		0/2	04 /04		01/03	01/01	
Score IPI				p=0,93			p=0,375			p=1
0	1	1	0		0	0		0	0	
1	9	7	1		0	1		1	0	
2	5	4	1		1	0		0	0	
3	15	12	3		0	3		0	0	
4	7	5	2		0	2		1	1	
5	3	2	1		0	1		1	0	
inconnu	10	8	2		1	1		1	1	
Stade				P=1			p=0,2			p=1
I-II	11	9	2		1	1		1	0	
III-IV	30	24	7		0	7		2	2	
inconnu	8	6	1		1	0		1	0	

ANNEXE 5 (suite) : Comparaison des caractéristiques cliniques, biologiques et immunophénotypiques des LBDGC (NR : non réarrangé ; R : réarrangé)

	LDGCB totaux (n=49)	MYC-NR (n=39)	MYC-R (n=10)	p	MYC SH (n=2)	MYC DH/TH (n=8)	p	MYC-IG	MYC-non IG (n=2)	p
PS				p=0,46			p=0,33			p=1
0	9	8	1		1	0		0	0	
1	21	15	6		0	6		2	1	
2	10	9	1		0	1		1	0	
3	3	2	1		0	1		0	1	
4	0	0	0		0	0		0	0	
inconnu	6	5	1		1	0		1	0	
LDH				p=0,45			p=1			p=1
N	10	9	1		0	0		0	1	
>N	16	11	5		1	5		2	1	
>2N	18 (37%)	15 (38%)	3 (30%)		0	3 (37%)		1 (25%)	0	
inconnu	5	4	1		1	0		1	0	
IHC				p=0,07			p=1			p=1
GC	28	18	9		1	4		2	1	
Non GC	21	21	1		1	3		2	1	

Références bibliographiques

1. Cuenca, X., Xhaard, A. & Mounier, N. [Prognostic factors in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas]. *Bull. Cancer (Paris)* **96,** 461–473 (2009).
2. Smith, A. *et al.* Lymphoma incidence, survival and prevalence 2004–2014: sub-type analyses from the UK's Haematological Malignancy Research Network. *Br. J. Cancer* **112,** 1575–1584 (2015).
3. Bruch, J.-F., Duprez-Paumier, R., Sizaret, D., Kervarrec, T. & Maître, F. Étude historique des lymphomes et de leurs classifications. *Rev. Francoph. Lab.* **2014,** 59–65 (2014).
4. Swerdlow, S.H. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition - WHO - OMS -. Available at: http://apps.who.int/bookorders/anglais/detart1.jsp?codlan=1&codcol=70&codcch=4002#. (Accessed: 22nd February 2016)
5. Xie, Y., Pittaluga, S. & Jaffe, E. S. The Histological Classification of Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Semin. Hematol.* **52,** 57–66 (2015).
6. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127,** 2375–2390 (2016).
7. Hans, C. P. *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103,** 275–282 (2004).
8. Savage, K. J. *et al.* MYC gene rearrangements are associated with a poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP chemotherapy. *Blood* **114,** 3533–3537 (2009).
9. Copie-Bergman, C. *et al.* MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood* **126,** 2466–2474 (2015).
10. Klapper, W. *et al.* Structural aberrations affecting the MYC locus indicate a poor prognosis independent of clinical risk factors in diffuse large B-cell lymphomas treated within randomized trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group (DSHNHL). *Leukemia* **22,** 2226–2229 (2008).
11. Johnson, N. A. *et al.* Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. *Blood* **114,** 2273–2279 (2009).
12. Kramer, M. H. H. *et al.* Clinical Relevance of BCL2, BCL6, and MYC Rearrangements in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* **92,** 3152–3162 (1998).
13. Copie-Bergman, C. *et al.* MYC Gene Simple Hit Is a Strong Independent Predictive Factor of Survival in Diffuse Large B-Cell Lymphomas in Contrast to MYC Double-Hit Gene Alterations: A Study by the Groupe d'Etude Des Lymphomes De l'Adulte. *Blood* **120,** 541–541 (2012).
14. Visco, C. *et al.* Patients with diffuse large B-cell lymphoma of germinal center origin with BCL2 translocations have poor outcome, irrespective of MYC status: a report from an International DLBCL rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Haematologica* **98,** 255–263 (2013).
15. Green, T. M. *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.* **30,** 3460–3467 (2012).

16. Snuderl, M. *et al.* B-cell Lymphomas with Concurrent IGH-BCL2 and MYC Rearrangements Are Aggressive Neoplasms with Clinical and Pathologic Features Distinct from Burkitt Lymphoma and Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **34,** 327–340 (2010).
17. Li, S. *et al.* B-cell lymphomas with MYC/8q24 rearrangements and IGH@BCL2/t(14;18)(q32;q21): an aggressive disease with heterogeneous histology, germinal center B-cell immunophenotype and poor outcome. *Mod. Pathol.* **25,** 145–156 (2012).
18. Young, R. M., Shaffer, A. L., Phelan, J. D. & Staudt, L. M. B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Semin. Hematol.* **52,** 77–85 (2015).
19. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403,** 503–511 (2000).
20. Rosenwald, A. *et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **346,** 1937–1947 (2002).
21. Johnson, N. A. *et al.* Concurrent Expression of MYC and BCL2 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J. Clin. Oncol.* **30,** 3452–3459 (2012).
22. Le Gouill, S. *et al.* The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica* **92,** 1335–1342 (2007).
23. Wang, J. *et al.* MYC and BCL-2 adjusted-International Prognostic Index (A-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Histol. Histopathol.* **31,** 285–292 (2016).
24. Gascoyne, R. D. *et al.* Prognostic Significance of Bcl-2 Protein Expression and Bcl-2 Gene Rearrangement in Diffuse Aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. *Blood* **90,** 244–251 (1997).
25. Offit, K., Wong, G., Filippa, D. A., Tao, Y. & Chaganti, R. S. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non- Hodgkin's lymphoma: clinical correlations. *Blood* **77,** 1508–1515 (1991).
26. Hill, M. E. *et al.* Prognostic significance of BCL-2 expression and bcl-2 major breakpoint region rearrangement in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma: a British National Lymphoma Investigation Study. *Blood* **88,** 1046–1051 (1996).
27. Cattoretti, G. *et al.* Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell* **7,** 445–455 (2005).
28. Niitsu, N., Okamoto, M., Miura, I. & Hirano, M. Clinical significance of 8q24/c-MYC translocation in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci.* **100,** 233–237 (2009).
29. Küppers, R. & Dalla-Favera, R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20,** 5580–5594 (2001).
30. Bross, L. *et al.* DNA Double-Strand Breaks in Immunoglobulin Genes Undergoing Somatic Hypermutation. *Immunity* **13,** 589–597 (2000).
31. Burger, J. A., Ghia, P., Rosenwald, A. & Caligaris-Cappio, F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood* **114,** 3367–3375 (2009).
32. Kurtova, A. V., Tamayo, A. T., Ford, R. J. & Burger, J. A. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood* **113,** 4604–4613 (2009).
33. Gorter, D. J. J. de *et al.* Bruton's Tyrosine Kinase and Phospholipase C γ 2

Mediate Chemokine-Controlled B Cell Migration and Homing. *Immunity* **26,** 93–104 (2007).
34. Davis, R. E., Brown, K. D., Siebenlist, U. & Staudt, L. M. Constitutive Nuclear Factor κ B Activity Is Required for Survival of Activated B Cell–like Diffuse Large B Cell Lymphoma Cells. *J. Exp. Med.* **194,** 1861–1874 (2001).
35. Ryan, K. M. & Birnie, G. D. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem. J.* **314,** 713–721 (1996).
36. Facchini, L. M., Chen, S., Marhin, W. W., Lear, J. N. & Penn, L. Z. The Myc negative autoregulation mechanism requires Myc-Max association and involves the c-myc P2 minimal promoter. *Mol. Cell. Biol.* **17,** 100–114 (1997).
37. Herbst, A. *et al.* A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep.* **6,** 177–183 (2005).
38. Cowling, V. H., Chandriani, S., Whitfield, M. L. & Cole, M. D. A Conserved Myc Protein Domain, MBIV, Regulates DNA Binding, Apoptosis, Transformation, and G2 Arrest. *Mol. Cell. Biol.* **26,** 4226–4239 (2006).
39. Klapproth, K. & Wirth, T. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br. J. Haematol.* **149,** 484–497 (2010).
40. McMahon, S. B., Buskirk, H. A. V., Dugan, K. A., Copeland, T. D. & Cole, M. D. The Novel ATM-Related Protein TRRAP Is an Essential Cofactor for the c-Myc and E2F Oncoproteins. *Cell* **94,** 363–374 (1998).
41. Hoffman, B. & Liebermann, D. A. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* **27,** 6462–6472 (2008).
42. Klefstrom, J. *et al.* Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF-kappaB activation. *EMBO J.* **16,** 7382–7392 (1997).
43. Ricci, M. S. *et al.* Direct Repression of FLIP Expression by c-myc Is a Major Determinant of TRAIL Sensitivity. *Mol. Cell. Biol.* **24,** 8541–8555 (2004).
44. Leone, G. *et al.* Myc Requires Distinct E2F Activities to Induce S Phase and Apoptosis. *Mol. Cell* **8,** 105–113 (2001).
45. Valera, A. *et al.* MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica* **98,** 1554–1562 (2013).
46. Hummel, M. *et al.* A Biologic Definition of Burkitt's Lymphoma from Transcriptional and Genomic Profiling. *N. Engl. J. Med.* **354,** 2419–2430 (2006).
47. Barrans, S. *et al.* Rearrangement of MYC Is Associated With Poor Prognosis in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated in the Era of Rituximab. *J. Clin. Oncol.* **28,** 3360–3365 (2010).
48. Bertrand, P. *et al.* Mapping of MYC breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas. *Leukemia* **21,** 515–523 (2007).
49. Sánchez-Beato, M., Sánchez-Aguilera, A. & Piris, M. A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood* **101,** 1220–1235 (2003).
50. Reed, J. C. Bcl-2–family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* **111,** 3322–3330 (2008).
51. Barrans, S. L. *et al.* The t(14;18) Is Associated with Germinal Center-derived Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Is a Strong Predictor of Outcome. *Clin. Cancer Res.* **9,** 2133–2139 (2003).
52. Aukema, S. M. *et al.* Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* **117,** 2319–2331 (2011).
53. Seto, M. *et al.* Alternative promoters and exons, somatic mutation and deregulation of the Bcl-2-Ig fusion gene in lymphoma. *EMBO J.* **7,** 123–131 (1988).

54. Shaffer, A. L. *et al.* BCL-6 Represses Genes that Function in Lymphocyte Differentiation, Inflammation, and Cell Cycle Control. *Immunity* **13,** 199–212 (2000).
55. Offit, K. *et al.* Rearrangement of the bcl-6 Gene as a Prognostic Marker in Diffuse Large-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **331,** 74–80 (1994).
56. Pardue, M. L. & Gall, J. G. MOLECULAR HYBRIDIZATION OF RADIOACTIVE DNA TO THE DNA OF CYTOLOGICAL PREPARATIONS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **64,** 600–604 (1969).
57. Langer, P. R., Waldrop, A. A. & Ward, D. C. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78,** 6633–6637 (1981).
58. Cheah, C. Y., Oki, Y., Westin, J. R. & Turturro, F. A clinician's guide to double hit lymphomas. *Br. J. Haematol.* **168,** 784–795 (2015).
59. Dave, S. S. *et al.* Molecular Diagnosis of Burkitt's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **354,** 2431–2442 (2006).
60. Pedersen, M. Ø. *et al.* MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations. *Eur. J. Haematol.* **92,** 42–48 (2014).
61. Pedersen, M. Ø. *et al.* Double-hit BCL2/MYC translocations in a consecutive cohort of patients with large B-cell lymphoma - a single centre's experience. *Eur. J. Haematol.* **89,** 63–71 (2012).
62. Aukema, S. M. *et al.* Biological characterization of adult MYC-translocation-positive mature B-cell lymphomas other than molecular Burkitt lymphoma. *Haematologica* **99,** 726–735 (2014).
63. Rimsza, L. M. *et al.* Gene expression predicts overall survival in paraffin-embedded tissues of diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood* **112,** 3425–3433 (2008).
64. Horn, H. *et al.* MYC status in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **121,** 2253–2263 (2013).
65. Fu, K. *et al.* Addition of Rituximab to Standard Chemotherapy Improves the Survival of Both the Germinal Center B-Cell–Like and Non–Germinal Center B-Cell–Like Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **26,** 4587–4594 (2008).
66. Iqbal, J. *et al.* BCL2 Expression Is a Prognostic Marker for the Activated B-Cell–Like Type of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **24,** 961–968 (2006).
67. Iqbal, J. *et al.* BCL2 Predicts Survival in Germinal Center B-cell–like Diffuse Large B-cell Lymphoma Treated with CHOP-like Therapy and Rituximab. *Clin. Cancer Res.* **17,** 7785–7795 (2011).
68. Winter, J. N. *et al.* Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood* **107,** 4207–4213 (2006).
69. Lossos, I. S. *et al.* Expression of a single gene, BCL-6, strongly predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **98,** 945–951 (2001).

Vu, le Directeur de Thèse

Vu, le Doyen
de la Faculté de médecine de TOURS
Tours, le

Hammouche Ellen

121 pages – 12 tableaux – 50 figures

Résumé :

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC : selon la classification OMS 2008) sont les plus fréquents des lymphomes malins non hodgkiniens de l'adulte (LMNH). Certains sont très agressifs à cause d'une prolifération clonale très rapide et l'instauration d'une thérapeutique urgente est souvent nécessaire. Le pronostic des LBDGC était jusqu'à présent basé sur l'Index Pronostic international, sur l'immuno-histochimie (IHC) pour définir le sous-groupe de LBDGC : Centre Germinatif (GC) ou non GC et sur l'expression des protéines MYC, BCL2 et BCL6. La classification OMS 2016 prend en compte désormais l'étude de réarrangement des gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6* pour codifier le pronostic (Simple, Double ou Triple Hit, en fonction du nombre de ces gènes remaniés) afin de déceler les LDBGC de très haut grade (*MYC* réarrangé avec une chaine d'Ig, les SH, DH et TH). Nous avons recherché ces événements par la technique de cytogénétique moléculaire (FISH) dans une étude rétrospective de 49 patients (issus du service d'hématologie clinique du CHRU de Tours) présentant un LBDGC afin de rechercher le statut SH, DH, et TH par FISH à partir de prélèvements congelés. Nous avons également défini l'appartenance au sous-groupe CG/ non CG en IHC selon l'algorithme de Hans et étudié l'expression des protéines MYC, BCL2 et BCL6. Les deux objectifs de ce travail étaient d'explorer l'impact de ces remaniements sur la survie globale des patients et de tenter de mettre au point la technique de FISH sur coupe en paraffine. Nous présentons les résultats obtenus sur cette série de 49 patients et les comparons aux données récentes de la littérature. Du fait de la petite taille de notre cohorte, nous allons poursuivre ce travail sur un plus grand nombre de patients, afin de proposer aux hématologues la stratégie de diagnostic par FISH la mieux adaptée à partir de tous les types d'échantillons et de continuer la mise au point de la technique FISH sur coupes en paraffine.

Mots clés : réarrangement de *MYC*, réarrangement de B*CL2*, réarrangement de *BCL6,* Lymphomes B diffus à grandes cellules, FISH.

Jury :

Président du Jury :	Professeur Emmanuel GYAN
Directeur de thèse :	Docteur Nora CHELLOUG
Membres du Jury :	Professeur Serge GUYETANT
	Professeur Annick TOUTAIN
	Professeur Jorge DOMENECH