

ANNÉE 2016

**IDENTIFICATION DE MUTATIONS PONCTUELLES
DANS LES
LYMPHOMES B DIFFUS À GRANDES CELLULES**

THÈSE

présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 29 Septembre 2016

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par Thomas STEIMLÉ
Né le 6 février 1986
À Strasbourg.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à la disposition de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur.

Ceci implique une obligation de citation et de référencement dans la rédaction de vos travaux.

D'autre part, toutes contrefaçons, plagiat, reproductions illicites encourt une poursuite pénale.

ANNÉE 2016

**IDENTIFICATION DE MUTATIONS PONCTUELLES
DANS LES
LYMPHOMES B DIFFUS À GRANDES CELLULES**

THÈSE

présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon
Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 29 Septembre 2016

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par Thomas STEIMLÉ
Né le 6 février 1986
À Strasbourg.

Année Universitaire 2016-2017
au 1^{er} Septembre 2016

Doyen :

1^{er} Assesseur :

Assesseurs :

M. Frédéric HUET

M. Yves ARTUR

Mme Laurence DUVILLARD

M. Pablo ORTEGA-DEBALLON

M. Marc MAYNADIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

			Discipline
M.	Marc	BARDOU	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	BASTIE	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	BAULOT	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Laurent	BEDENNE	Gastroentérologie et hépatologie
M.	Yannick	BEJOT	Neurologie
M.	Alain	BERNARD	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M.	Jean-François	BESANCENOT	Médecine interne
Mme	Christine	BINQUET	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Bernard	BONIN	Psychiatrie d'adultes
M.	Philippe	BONNIAUD	Pneumologie
M.	Alain	BONNIN	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	BONNOTTE	Immunologie
M.	Olivier	BOUCHOT	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaid	BOUHEMAD	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale
M.	Alexis	BOZORG-GRAYELI	ORL
M.	Alain	BRON	Ophtalmologie
M.	Laurent	BRONDEL	Physiologie
M.	François	BRUNOTTE	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	Patrick	CALLIER	Génétique
M.	Jean-Marie	CASILLAS-GIL	Médecine physique et réadaptation
Mme	Catherine	CHAMARD-NEUWIRTH	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	CHARLES	Réanimation
M.	Pascal	CHAVANET	Maladies infectieuses
M.	Nicolas	CHEYNEL	Anatomie
M.	Alexandre	COCHET	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	CORMIER	Urologie
M.	Yves	COTTIN	Cardiologie
M.	Charles	COUTANT	Gynécologie-obstétrique
M.	Gilles	CREHANGE	Oncologie-radiothérapie
Mme	Catherine	CREUZOT-GARCHER	Ophtalmologie
M.	Frédéric	DALLE	Parasitologie et mycologie
M.	Serge	DOUVIER	Gynécologie-obstétrique
Mme	Laurence	DUVILLARD	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Laurence	FAIVRE-OLIVIER	Génétique médicale
Mme	Patricia	FAUQUE	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	FRANCOIS-PURSSELL	Médecine légale et droit de la santé
M.	Pierre	FUMOLEAU	Cancérologie
M.	François	GHIRINGHELLI	Cancérologie
M.	Claude	GIRARD	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Vincent	GREMEAUX	Médecine physique et réadaptation
M.	Frédéric	HUET	Pédiatrie
M.	Pierre	JOUANNY	Gériatrie

M.	Denis	KRAUSÉ	Radiologie et imagerie médicale
M.	Sylvain	LADOIRE	Histologie
M.	Gabriel	LAURENT	Cardiologie
M.	Côme	LEPAGE	Hépatogastroentérologie
M.	Romaric	LOFFROY	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	LORGIS	Cardiologie
M.	Jean-François	MAILLEFERT	Rhumatologie
M.	Cyriaque Patrick	MANCKOUNDIA	Gériatrie
M.	Sylvain	MANFREDI	Hépatogastroentérologie
M.	Laurent	MARTIN	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	MASSON	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	MAYNADIE	Hématologie - transfusion
M.	Thibault	MOREAU	Neurologie
M.	Klaus Luc	MOURIER	Neurochirurgie
Mme	Christiane	MOUSSON	Néphrologie
M.	Paul	ORNETTI	Rhumatologie
M.	Pablo	ORTEGA-DEBALLON	Chirurgie Générale
M.	Jean-Michel	PETIT	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Lionel	PIROTH	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	QUANTIN	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	QUENOT	Réanimation
M.	Patrick	RAT	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	REBIBOU	Néphrologie
M.	Frédéric	RICOLFI	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	SAGOT	Gynécologie-obstétrique
M.	Emmanuel	SAPIN	Chirurgie Infantile
M.	Henri-Jacques	SMOLIK	Médecine et santé au travail
M.	Éric	STEINMETZ	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	THAUVIN	Génétique
M.	Pierre	VABRES	Dermato-vénéréologie
M.	Bruno	VERGÈS	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	ZWETYENGA	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

PROFESSEURS ASSOCIES DES DISCIPLINES MEDICALES

M.	Bruno	MANGOLA	Urgences (du 01/05/2016 au 14/11/2016)
----	-------	----------------	--

PROFESSEURS EN SURNOMBRE

M.	Roger	BRENOT	(surnombre jusqu'au 31/08/2018)
M.	Philippe	CAMUS	(surnombre jusqu'au 31/08/2019)
Mme	Monique	DUMAS-MARION	(surnombre jusqu'au 31/08/2018)
M.	Maurice	GIROUD	(surnombre jusqu'au 21/08/2018)
M.	Frédéric	MICHEL	(surnombre du 20/10/2015 au 31/12/2016)
M.	Pierre	TROUILLOUD	(surnombre du 05/02/2014 au 31/08/2017)

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES
PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES**

			Discipline Universitaire
M.	Sylvain	AUDIA	Médecine interne
Mme	Shaliha	BECHOUA	Biologie et médecine du développement
Mme	Marie-Claude	BRINDISI	Nutrition
M.	Jean-Christophe	CHAUVET-GELINIER	Psychiatrie, psychologie médicale
			(Mobilité Novembre 2016 à 2017)
M.	Alexis	DE ROUGEMONT	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Hervé	DEVILLIERS	Médecine interne
M.	Olivier	FACY	Chirurgie générale
Mme	Ségolène	GAMBERT-NICOT	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Françoise	GOIRAND	Pharmacologie fondamentale
Mme	Agnès	JACQUIN	Physiologie
M.	Alain	LALANDE	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Louis	LEGRAND	Biostatistiques, informatique médicale
Mme	Stéphanie	LEMAIRE-EWING	Biochimie et biologie moléculaire
M	Maxime	SAMSON	Médecine interne
			(Mobilité Novembre 2016 à 2017)
M.	Benoit	TROJAK	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Paul-Mickaël	WALKER	Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEURS EMERITES

M.	Jean	CUISENIER	(01/09/2014 au 31/08/2017)
M.	Jean	FAIVRE	(01/09/2012 au 31/08/2018)
M.	Marc	FREYSZ	(01/09/2016 au 28/02/2017)
M	Philippe	GAMBERT	(01/09/2014 au 31/08/2017)
M.	Patrick	HILLON	(01/09/2016 au 31/08/2019)
M.	François	MARTIN	(01/09/2015 au 31/08/2018)
M.	Pierre	POTHIER	(01/09/2015 au 31/08/2018)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jean-Noël	BEIS	Médecine Générale
----	-----------	-------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Didier	CANNET	Médecine Générale
M.	Gilles	MOREL	Médecine Générale
M.	François	MORLON	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Clément	CHARRA	Médecine Générale
M.	Rémi	DURAND	Médecine Générale
M.	Arnaud	GOUGET	Médecine Générale
Mme	Anne	WALDNER-COMBERNOUX	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

M.	Didier	CARNET	Anglais
M.	Jean-Pierre	CHARPY	Anglais
Mme	Catherine	LEJEUNE	Pôle Epidémiologie
M.	Gaëtan	JEGO	Biologie Cellulaire

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Marianne	ZELLER	Physiologie
-----	----------	---------------	-------------

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme	Marceline	EVARD	Anglais
Mme	Lucie	MAILLARD	Anglais

PROFESSEURS CERTIFIES

Mme	Anaïs	CARNET	Anglais
M.	Philippe	DE LA GRANGE	Anglais
Mme	Virginie	ROUXEL	Anglais (Pharmacie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme	Evelyne	KOHLI	Immunologie
M.	François	GIRODON	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Mathieu	BOULIN	Pharmacie clinique
M.	Philippe	FAGNONI	Pharmacie clinique
M.	Frédéric	LIRUSSI	Toxicologie
M.	Marc	SAUTOUR	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	SCHMITT	Pharmacologie

L'UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

Composition du Jury

Président :

— M. Le Pr. Marc Maynadié (PU-PH), Chef du service d'hématologie biologique et Chef du Pôle de Biologie/Pathologie du CHU de Dijon.

Membres :

— M. le Pr. Patrick Callier (PU-PH), Directeur de thèse, Chef du service du Laboratoire de génétique chromosomique et moléculaire, du CHU de Dijon.

— M. le Pr. Laurent Martin (PU-PH), Chef du service de pathologie, du CHU de Dijon.

— M. le Dr. Bernard Aral (PH), praticien hospitalier au Laboratoire de génétique chromosomique et moléculaire, du CHU de Dijon.

Remerciements

J'exprime mes sincères remerciements à mon jury de thèse.

Je remercie le Professeur Marc Maynadié (PU-PH), Chef du service d'hématologie biologique et Chef du Pôle de Biologie/Pathologie du CHU de Dijon, d'avoir accepté de présider ce jury. Je le remercie des corrections qu'il a apportées à ce travail. Je le remercie de son indulgence et de ses nombreux conseils.

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur Patrick Callier (PU-PH), Chef de service du Laboratoire de génétique chromosomique et moléculaire, pour sa clarté, ses encouragements et ses nombreux conseils.

Je remercie le Professeur Laurent Martin (PU-PH), Chef du service de pathologie, de m'avoir permis d'utiliser les résultats obtenus à partir des échantillons provenant de son service ; sans lui, cette thèse n'aurait pas été possible.

Je remercie le Dr. Bernard Aral (PH) de m'avoir suggéré cette étude. Sa passion pour la biologie moléculaire appliquée aux hémopathies a été particulièrement stimulante et a confirmé mon intérêt pour cette matière.

Je remercie Sylviane Raigot, Technicienne au Laboratoire de génétique chromosomique et moléculaire, pour son aide, son efficacité et sa précision dans l'application de la méthode développée par le Laboratoire. Elle m'a permis d'aboutir aux résultats présentés dans cette thèse.

Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire d'hématologie pour son accueil et pour les moments partagés. Je remercie notamment le Pr. Marc Maynadié (PU-PH), le Pr. François Girodon (PU-PH) et les Drs. Bernardine Favre (PH), François Bailly (PH) et Julien Guy (PH) pour leurs enseignements dans l'apprentissage de l'hématologie biologique et pour leur soutien dans sa pratique. Je les remercie pour leurs nombreux conseils et leur patience.

Je remercie mes parents pour leur soutien inconditionnel.

Je remercie mon père le Dr. Eric Steimlé, mon grand-père le Pr. Raoul Steimlé ainsi que le Pr. Michel Gillet, pour leurs exemples. Ils ont éveillé mon intérêt pour la médecine.

Enfin, je remercie l'ensemble de ma famille et tout particulièrement ma tante Geneviève.

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle
aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans
tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune
discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées
dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les
lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs
conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des
circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite
ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les
agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je
n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les
perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes
promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Table des matières

Table des matières	12
Liste des tableaux	14
Table des figures	15
Introduction générale	18
1 Revue de la littérature	19
1.1 Introduction	19
1.2 Les lymphomes B diffus à grandes cellules	19
1.2.1 Définition	19
1.2.2 Épidémiologie	19
1.2.3 Classification OMS 2008	19
1.3 Les lymphomes B diffus à grandes cellules NOS	20
1.3.1 Clinique	20
1.3.2 Examen anatomopathologique	20
1.3.3 Bilan d'extension et de retentissement	21
1.3.4 Pronostic	22
1.3.5 Génétique	22
1.4 Principaux gènes retrouvés mutés dans le LBDGC-NOS	24
1.4.1 TP53	24
1.4.1.1 Épidémiologie	24
1.4.1.2 Fonction	24
1.4.1.3 Action oncogénique	25
1.4.1.4 Intérêt thérapeutique	26
1.4.1.5 Structure	26
1.4.2 La voie de signalisation de NF- κ B	27
1.4.2.1 Une perte de fonction des inhibiteurs de NF- κ B	28
1.4.2.2 Un gain de fonction des protéines NF- κ B	28
1.4.2.3 La voie de signalisation du BCR	29
1.4.2.4 La voie de signalisation du TLR	33
1.4.3 EZH2	33
1.4.3.1 Épidémiologie	33
1.4.3.2 Fonction	33
1.4.3.3 Action oncogénique	34
1.4.3.4 Intérêts thérapeutiques	34
2 Matériel	35

3	Méthode de séquençage	46
3.1	Introduction	46
3.2	Étapes de pré-séquencage	46
3.2.1	Extraction et purification de l'ADN sur échantillons FFPE	46
3.2.2	Qualification des ADN	46
3.2.3	Enrichissement ciblé	47
3.2.4	Vérification des produits de PCR	49
3.2.5	Groupage des produits de PCR par patient	50
3.2.6	Purification du pool et dosage de la quantité d'ADN de chaque pool	50
3.2.7	Génération des bibliothèques d'ADN, selon la méthode Nextera d'Illumina	50
3.3	Séquencage massif en parallèle	52
3.3.1	Génération des clusters par amplification en pont	52
3.3.2	Séquencage	54
3.4	Analyse informatique des résultats	55
3.4.1	Génération des séquences par patient	55
3.4.2	Vérification et filtrage de la qualité	56
3.4.3	Alignement	57
3.4.4	Identification des variants	57
3.5	Limites et biais	58
3.5.1	Biais induits par l'utilisation d'ADN extrait de FFPE	58
3.5.2	Artefacts de PCR	58
3.5.3	Artefacts induits par le séquençage sur MiSeq	59
4	Résultats	61
4.1	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1602	61
4.2	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1619	64
4.3	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1622	65
4.4	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1623	65
4.5	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1625	66
4.6	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1626	68
4.7	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1630	69
4.8	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1632	71
4.9	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1634	73
4.10	Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1638	76
4.11	Synthèse	78
5	Discussion	81
	Conclusions	89
	Bibliographie	91
A	Tableaux	117
B	Programme	124

Liste des tableaux

I	Concentrations d'ADN extraits pour chacun des échantillons.	47
II	Amorces utilisées.	49
III	Liste des concentrations d'ADN extraits, pour chacun des échantillons.	50
I	Liste des mutations faux-sens non-synonymes retrouvées numéro un.	79
II	Liste des mutations faux-sens non-synonymes retrouvées tableau deux.	80
I	Tableau de synthèse.	87
I	Liste des études ayant identifié la mutation L265P dans les lymphomes B à grandes cellules.	118
II	Liste les études ayant identifié la mutation Y196S dans les hémopathies malignes. . .	119
III	Liste des études ayant identifié la mutation Y196H dans les hémopathies malignes. .	120
IV	Liste des études ayant identifié la mutation D208V dans les hémopathies malignes. .	121
V	Liste des principales études ayant identifié la mutation R248Q dans les hémopathies malignes.	122

Table des figures

1.1	L'algorithme de Hans [1]	24
1.2	Structure de p53	27
1.3	Schéma de la voie de signalisation de NF- κ B	31
3.1	Étapes de préparation de la bibliothèque selon la technique NexTera.	51
3.2	Schéma du principe de purification par billes magnétiques.	52
3.3	Représentation des différentes étapes d'amplification en pont, aboutissant à la formation d'un clone d'ADN en amas.	53
3.4	Étapes de séquençage selon la technique des oligonucléotides terminant marqués réversibles.	54
3.5	Principe de lecture de la flow cell	55
3.6	Graphique représentant en ordonnée la qualité d'identification et en abscisse le cycle (ici 75 cycles).	56
3.7	Schéma de l'alignement des fragments séquencés en rouge sur le génome de référence en bleu.	57
3.8	Schéma des différentes sources de bruit lors de la lecture du signal des clusters	60
4.1	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1602.	62
4.2	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1619.	64
4.3	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1622.	65
4.4	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1623.	66
4.5	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1625.	67
4.6	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1626.	68
4.7	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1630.	70
4.8	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1632.	72
4.9	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1634.	74
4.10	Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1638.	76

Liste des sigles ou abréviations

- 5PS : Deauville five-point scale.
- ABC : Activated B cell.
- ADN : Acide désoxyribonucléique.
- Akt : RAC-alpha serine/threonine-protein kinase.
- ARN : Acide ribonucléique.
- A, T, C, G : Adénine, Thymine, Cytosine et Guanine.
- BCL : B-cell lymphoma protein.
- BCR : Récepteur des cellules B.
- Blimp-1 : B lymphocyte-induced maturation protein 1.
- BMI1 : B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site.
- BTK : Bruton's tyrosine kinase.
- CARD11 : Caspase recruitment domain-containing protein 11.
- CBM : CARD11-BCL10-MALT1.
- CD : Cluster de différenciation.
- CDYL : Chromodomain Protein, Y-Like.
- CHOP : Cyclophosphamide, Hydroxyadriamycine, Oncovin (vincristine) et Prednisone.
- Chr : Chromosome.
- CHU : Centre hospitalier universitaire.
- cIAP : Cellular inhibitor of apoptosis.
- CMV : Cytomégalovirus.
- COSMIC : Catalogue des mutations somatiques dans les cancers.
- CTD : Extrémité C-terminale.
- DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole.
- DNMT : DNA (cytosine-5)-methyltransferase.
- EBER : Epstein-Barr encoding region.
- EBV : virus d'Epstein-Barr.
- ECOG : L'échelle de performance de l'Eastern Cooperative Oncology Group.
- EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2.
- FFPE : Tissus fixés à la formaldéhyde et enrobés de paraffine.
- FOXP1 : Forkhead box protein P1.
- FOXC1 : Forkhead box protein C1.
- GCB : Germinatif center B-cell.
- GCET1 : Germinal center B cell-expressed transcript-1.
- GLUT1 : Glucose transporter 1.
- GVGD : Grantham Variation Grantham Deviation.
- IARC : Agence internationale de recherche sur le cancer.
- Ig : Immunoglobuline.
- IKK : I B Kinase.
- INCa : Institut national du cancer.
- IPIaa : Index Pronostic International ajusté à l'âge.
- IRAK4 : interleukin-1 receptor-associated kinase 4.
- IRF4/MUM1 : Interferon regulatory factor 4 / multiple myeloma oncogen-1.
- ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif.
- JNK : c-Jun N-terminal kinase.

- LBDGC : Lymphome B diffus à grandes cellules.
- LCM : Lymphome à cellules du manteau.
- LCR : Liquide céphalo-rachidien.
- LDH : Lactate deshydrogénase.
- LF : Lymphome folliculaire.
- LH : Lymphome de Hodgkin.
- LLC : Leucémie lymphoïde chronique.
- LMO2 : LIM domain only 2.
- LPL : Lymphomes lympho-plasmocytaires.
- LUBAC : Linear ubiquitin assembly complex.
- LZM : Lymphomes de la zone marginale.
- MALT1 : Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1.
- MDM2 : Mouse double minute 2 homolog.
- MLL1 : Mixed-lineage leukemia 1.
- MOZ : Monocytic leukemia zinc-finger.
- MYD88 : Myeloid differentiation primary response gene 88.
- NF- κ B : Facteurs nucléaires κ B.
- NGS : Next generation sequencing.
- NOS : Not otherwise specified.
- NOS-2 : Nitric oxide synthase 2.
- NRF2 : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2.
- OMS : Organisation mondiale de la santé.
- PAX-5 : Paired box protein 5.
- PCR : Polymerase chain reaction. Réaction en chaîne par polymérase.
- PKC : Protein kinase C.
- PRC2 : Polycomb repressive complex 2.
- PRDM1 : PR domain containing 1.
- PRR : Région riche en proline.
- PTEN : Phosphatase and TENsin homolog.
- REG : Regenerating gene.
- RRM2B : Ribonucleotide Reductase Regulatory TP53 Inducible Subunit M2B.
- SRC-3 : Steroid receptor coactivator protein 3.
- SREBP : Sterol regulatory element-binding proteins.
- STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3.
- SUV : Standardized Uptake Value. valeur standardisée d'intégration.
- SYK : Spleen tyrosine kinase.
- TAD : Domaine de transactivation.
- TIR : Translocated intimin receptor.
- TLR : Récepteurs toll-like.
- TNFAIP : Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3.
- TP53 : Tumor protein p53.
- UCSC : Université de Californie Santa Cruz.
- UV : Ultra violet.
- VCF : variant call format.
- VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

Introduction

Le génome supporte au sein des gènes l'information codant pour les protéines nécessaires à la vie des cellules. Il est constitué par des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) bicaténaire formant les chromosomes. L'altération des séquences nucléotidiques peut survenir au cours de la vie cellulaire, il s'agit de mutations du génome. L'identification et la classification de ces mutations ont permis de mettre en évidence la responsabilité de certaines d'entre elles dans la transformation maligne des cellules. Ces mutations sont appelées des mutations conductrices. Grâce à l'identification et la caractérisation de ces mutations conductrices, la recherche a pu développer des molécules chimiques permettant d'agir sur les isoformes protéiques mutantes produits par ces gènes mutés. Ces molécules ont pour objectif de contrer l'action pathogène des mutations *driver* ou conductrices et ainsi de les rendre actionnables. L'utilisation des méthodes de séquençage de l'ADN sur les cellules néoplasiques des patients atteints de cancer a permis de détecter ces mutations actionnables et d'ouvrir la voie à une nouvelle façon de traiter ces pathologies : la médecine de précision. Cette médecine se propose de personnaliser le traitement des patients en fonction des mutations actionnables identifiées sur le génome tumoral de leurs cellules néoplasiques.

Le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) est une néoplasie du tissu hématopoïétique portant sur les lymphocytes B. En Europe, il s'agit du lymphome le plus fréquent. Son incidence se stabilise mais son pronostic reste péjoratif malgré une récente amélioration. Actuellement, son diagnostic se fait essentiellement par l'étude cytologique, histologique et immunohistochimique du tissu tumoral biopsié chez le patient. Ces dernières années, la physiopathologie de ce lymphome s'est enrichie de nouvelles découvertes réalisées au niveau moléculaire. Ces découvertes ont permis de mieux comprendre la lymphomagenèse de ce lymphome, de mieux distinguer les différents sous-types regroupés au sein du LBDGC, d'identifier des marqueurs pronostiques, et de trouver de nouvelles thérapies. Dans la première partie de cette thèse, je présenterai ces dernières études.

Afin, lors du diagnostic, de mieux caractériser ce type de cancer, et afin de faire bénéficier aux patients des meilleurs traitements, nous avons décidé de développer une méthode de séquençage adaptée aux gènes mutés dans cette pathologie. Nous avons séquencé les gènes *EZH2*, *TP53*, *MYD88*, *CARD11* et *CD79B* dans les échantillons tumoraux de dix patients. Les caractéristiques cliniques et pathologiques de ces dix patients sont étudiées dans la deuxième partie consacrée au matériel. Dans la troisième partie, je détaillerai la méthode qui nous a permis de séquencer ces gènes. Elle se base sur l'automate de *next generation sequencing* (NGS) MiSeq, un appareil de séquençage massivement parallélisé, qui permet de séquencer simultanément plusieurs gènes de plusieurs patients, avec une précision suffisante. Les résultats présentés dans la quatrième partie sont discutés et mis en perspective avec les connaissances sur le LBDGC, dans une dernière partie : la discussion.

Partie 1

Revue de la littérature

1.1 Introduction

Cette première partie se propose d'étudier la littérature concernant les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDG) et les modifications génétiques impliquées dans leurs lymphomagenèses.

1.2 Les lymphomes B diffus à grandes cellules

1.2.1 Définition

Les lymphomes B sont des proliférations clonales de lymphocytes B. Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) correspondent à un groupe très hétérogène de lymphomes B agressifs. Ils sont unifiés par l'aspect cytologique de leurs lymphocytes B qui sont de grandes tailles. L'aspect architectural de leur prolifération est quant à lui diffus.

1.2.2 Épidémiologie

L'incidence annuelle sur la population mondiale pour 100.000 habitants est de 4,5 chez l'homme et de 2,2 chez la femme. Le *sex-ratio* est proche de 2 (homme/femme).

L'âge médian d'incidence se situe aux alentours de 70 ans (69 ans chez l'homme et 74 ans chez la femme). Certaines formes comme le LBDGC primitif du médiastin peuvent néanmoins survenir plus tôt et il n'est pas rare de retrouver une incidence chez le jeune ou même chez l'enfant [2].

1.2.3 Classification OMS 2008

Des traits morphologiques, cliniques et biologiques ont permis une subdivision au sein des LBDGC. La majorité de ces processus néoplasiques n'ont cependant pas de caractère pathologique propre et sont classés en NOS (*not otherwise specified*) par la quatrième édition (2008) de la Classification des tumeurs des tissus hématopoïétique et lymphoïde de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) [3].

Néanmoins, une distinction doit être faite entre les LBDGC *de novo* et ceux issus de la transformation de lymphomes moins agressifs tels que la leucémie lymphoïde chronique/le lymphome lymphocytaire (syndrome de Richter) [4], le lymphome folliculaire (LF) [5], les lymphomes de la zone marginale (LZM) ou le lymphome de Hodgkin.

La Classification OMS 2008 distingue onze variants regroupés dans quatre groupes, qui sont :

- Les lymphomes B diffus à grandes cellules, sans autres spécificités (LBDGC-NOS), subdivisés en trois variants morphologiques : le centroblastique [6], l'immunoblastique [7] et l'anaplasique [8].
- Les LBDGC avec une localisation extra-nodulaire prédominante tels que : le LBDGC primitif du médiastin, le LBDGC intravasculaire, le LBDGC cutané de type jambe, le LBDGC primitif du système nerveux central et la granulomatose lymphoïde.
- Les LBDGC à cellules B différenciées.
- Les formes frontières.

1.3 Les lymphomes B diffus à grandes cellules NOS

Il s'agit du sous-groupe de LBDGC le plus fréquent. Beaucoup d'études lui sont consacrées.

1.3.1 Clinique

La pathologie se déclare par des adénopathies volumineuses dans environ 60 % des cas, par une atteinte de l'anneau de Waldeyer dans 10 % des cas, par une localisation extra-nodale dans environ 30 % des cas [9]. Cette dernière présentation correspond notamment à une atteinte au niveau du tractus gastro-intestinal, de la rate, de la moelle osseuse (dans 11 [10] à 27 % des cas, ce qui est de mauvais pronostic [11]), des testicules, des glandes salivaires, de la thyroïde, du foie, des reins et de la surrénale.

Les adénopathies sont le plus souvent supérieures à 2 cm. Elles sont indolores et évoluent de façon chronique.

Les symptômes généraux principalement identifiés sont une hyperthermie, des sueurs profuses, un amaigrissement (signes B) et une asthénie.

Les syndromes de masse entraînés par la prolifération néoplasique sont de symptomatologies diverses. Tous les organes peuvent être touchés. La prolifération peut provoquer leur dysfonctionnement. On peut constater, par exemple, un envahissement médullaire avec un tableau d'insuffisance médullaire [12], un syndrome de masse thoracique entraînant un syndrome cave supérieur [13], des déficits neurologiques par compression médullaire [14], des troubles du rythme cardiaque par envahissement du faisceau de His [15], des troubles endocriniens tels qu'une maladie d'Addison par envahissement des surrénales [16].

Les LBDGC peuvent également induire des syndromes paranéoplasiques tels que des syndromes inflammatoires [17], des syndromes neurologiques centraux [18] et périphériques [19], des érythrodermies [20] et des lésions ostéolytiques [21].

1.3.2 Examen anatomopathologique

Après avoir éliminé un diagnostic différentiel, notamment infectieux dans le cadre d'une adénopathie, il convient si possible de réaliser une biopsie de la masse et un examen anatomopathologique afin de caractériser le type de néoplasie.

Examen histologique

Quelque soit le site atteint par la prolifération néoplasique, les caractéristiques morphologiques demeurent identiques.

Les lymphocytes B néoplasiques sont de grandes tailles et envahissent de façon diffuse en effaçant l'architecture normale des tissus sous-jacents. Des macrophages, des corps apoptotiques, des mitoses et des zones de nécrose ou de fibrose peuvent accompagner le processus tumoral.

La Classification OMS 2008 subdivise en trois variants morphologiques les LBDGC-NOS : le centroblastique, l'immunoblastique et l'anaplasique.

- Le variant centroblastique est caractérisé par un aspect cytologique composé par un noyau rond à ovale, une chromatine lâche, des petits nucléoles multiples fréquemment en périphérie du noyau et un cytoplasme basophile d'abondance moyenne. Ces cellules ressemblent aux centroblastes normaux de la zone sombre du centre germinatif. La prolifération peut comporter un nombre variable d'immunoblastes, mais ce nombre doit être inférieur à 90%.
- Le variant immunoblastique est défini par la présence de plus de 90 % d'immunoblastes qui sont décrits comme composés par un noyau rond, une chromatine lâche ou marginée, un nucléole unique proéminent et central et un cytoplasme abondant le plus souvent excentré par rapport au noyau. Ces lymphocytes peuvent parfois présenter une différenciation plasmocytoïde. Ce variant s'est révélé être de mauvais pronostic [22].
- Le variant anaplasique est composé par des cellules de grandes à très grandes tailles avec des noyaux pléiomorphes qui peuvent parfois ressembler aux cellules de Reed-Sternberg [23]. L'architecture de l'envahissement peut être sinusoïdale. Attention, cette forme n'est pas liée au lymphome anaplasique à grandes cellules qui est un lymphome T.

Immunophénotype

L'immunophénotype des LBDGC-NOS est très hétérogène. Ces cellules expriment le CD45 et un certain nombre d'antigènes pan-B tels que, le CD19, le CD20, le CD22, le CD79a et le PAX-5. Ils sont présents dans presque tous les cas, mais il se peut qu'un de ces antigènes soit absent. Il a également été observé la perte de l'immunoglobuline de surface (Igs) [24]. La présence du CD20 est d'intérêt diagnostique, car c'est la cible des anticorps monoclonaux humanisés Rituximab.

Les marqueurs de différenciation plasmocytaire peuvent également être retrouvés, notamment le CD38 et le CD138.

L'expression du CD30 est rare. Elle est fréquemment associée à la forme anaplasique.

Dans 10 % des cas, on retrouve l'expression de CD5 [25].

CD10, BCL6, IRF4/MUM-, LMO2, GCET1 et FOXP1 sont d'expression variable et sont pris en compte dans des scores diagnostiques et pronostiques présentés plus loin.

1.3.3 Bilan d'extension et de retentissement

Une fois le diagnostic réalisé grâce à l'examen anatomopathologique, il convient de réaliser un bilan d'extension. Celui-ci permet d'éviter de méconnaître une autre localisation, de servir de référence lors du bilan d'évaluation de la réponse au traitement, d'évaluer le pronostic du lymphome et de choisir la thérapie adaptée.

Ce bilan d'extension est constitué :

- D'un bilan d'extension topographique comprenant un scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien avec mesure des masses et une tomoscintigraphie par émission de positons qui permet de mesurer l'absorption par la ou les masses du [18]F-fluorodeoxyglucose (SUV).
- D'une évaluation de l'état général et plus particulièrement de la recherche de signes B (fièvre supérieure à 38 °C pendant plus de 8 jours, sueurs nocturnes et perte de poids supérieure à 10 % durant les six derniers mois).
- D'exams biologiques : une numération combinée à une formule sanguine, la mesure de la clairance de la créatinine, l'uricémie, le taux sériques de LDH et de β -2-microglobuline, la mesure de la calcémie, les sérologies des hépatites B et C, VIH, EBV, CMV et toxoplasmose et un examen immunophénotypique des lymphocytes circulants.
- D'un myélogramme et d'une biopsie ostéo-médullaire.

— D'un examen cytologique du liquide céphalo-rachidien (LCR).

Les résultats de ces examens permettent de calculer le stade Ann-Arbor tel que :

Stade I

Atteinte d'une seule aire ganglionnaire.

IE : atteinte localisée d'un seul territoire Extra-ganglionnaire.

Stade II

Atteinte de deux ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme.

IIIE : atteinte Extra-ganglionnaire unique avec une ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme.

Stade III

atteinte ganglionnaire des deux 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 une atteinte médullaire.

Auxquels, une des lettres suivantes peut être ajoutée :

E : s'il y a une atteinte viscérale contiguë.

A : s'il n'y a pas de signe B.

B : s'il y a des signes B.

X : si la masse tumorale est volumineuse (Bulky > 10cm).

S : s'il y a une atteinte splénique.

Ces résultats permettent également de calculer l'*Index Pronostic International* ajusté à l'âge (IPIaa) en attribuant un point pour des LDH supérieures à la normale, un point si le score ECOG (test de performance) est supérieur à 1, et un point si le stade de Ann-Arbor est à III ou IV.

1.3.4 Pronostic

La dernière avancée thérapeutique majeure ayant modifié le pronostic du LBDGC a été réalisée par l'administration du Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre le CD20. Ce traitement administré conjointement à la chimiothérapie conventionnelle associant la cyclophosphamide, l'adriamycine, la vincristine et la prednisone (CHOP) a permis une augmentation de la survie des patients. La survie globale à 3 ans est passée de 42 % à 77 % [26]. En France, la survie nette à 5 ans est de 58 % chez les hommes et de 61 % chez les femmes. Elle a gagné 18 points entre les périodes 1995–1998 et 2005–2010 [2]. Malgré cette avancée, le pronostic de ce lymphome reste sombre [27] [28], la survie à 10 ans est seulement de 43,5 % [29].

1.3.5 Génétique

L'étude des profils de survie des patients atteints de LBDGC-NOS a révélé un petit groupe homogène de patients bons répondeurs à la chimiothérapie (CHOP environ 40 %). Par la suite, une étude a mis en évidence deux sous-groupes dans les LBDGC-NOS qui n'ont pas les mêmes profils d'expression génique. Au moyen du *clustering* hiérarchique des profils d'expression génique, il s'est avéré qu'une population de lymphocytes néoplasiques est associée au profil des lymphocytes

B activés. Ces lymphocytes sont aussi appelés plasmoblastes et correspondent aux lymphocytes sortant du centre germinatif en voie de différenciation vers le plasmocyte. Cette population a été nommée ABC pour *activated B cell*. Une autre population s'est retrouvée séparée de la première en se groupant au profil d'expression des lymphocytes de la zone claire du centre germinatif, ce sous-type de LBDGC a donc été nommé GCB pour *germinatif center B-cell* [30]. Cette étude a permis de conclure que ces deux sous-types de LBDGC sont originaires de lymphocytes B à différents stades de maturation et qu'ils ont des mécanismes oncogéniques différents.

Ils ont également une évolution clinique différente; ainsi, on retrouve une survie globale à 5 ans de 60 % pour les sous-types GCB et de 35 % pour les sous-types ABC traités par une chimiothérapie CHOP [31] (cette différence reste observée dans les chimiothérapie de type R-CHOP ajoutant le Rituximab à la thérapie standard [32]). La concordance avec le pronostic cytologique a été vérifiée. Les LBDGC-NOS immunoblastiques sont plus fréquemment des sous-types ABC et ont un pronostic plus sévère alors que les centroblastiques pures sont plus souvent de type GCB [31].

Des anomalies cytogénétiques ont été mises en évidence pour chacun de ces sous-types. Pour l'ABC, les anomalies cytogénétiques les plus fréquentes sont : le réarrangement du 3q27 avec implication de *BCL6* (avec une incidence de 57 % [33]), la trisomie 3 (26 %) avec implication de *FOXP1*, la délétion 6q impliquant *PRDM1* (dans 24 [34] à 40 % des cas [35]), la délétion 17p impliquant *TP53* (dans 18 % des cas [35]), l'amplification d'une région de 18q (18q21-q22 impliquant *BCL2* dans 34 % des cas [35] et 18q11.2-23 impliquant *BCL2* et *NFATC1* dans 54 % des cas de cette étude [36]), la délétion du locus du gène suppresseur de tumeur *INK4a/ARF* sur le chromosome 9 et l'amplification d'une région du chromosome 19. Les anomalies cytogénétiques plus fréquentes dans les GCB sont la t(14;18) avec réarrangement de *BCL-2* (dans 46 % des sous-types GC [35]), l'amplification du micro ARN mir-17-92 dans le locus de *MIHG1* sur le chromosome 13, l'amplification d'une région du chromosome 12, la délétion de *PTEN* sur le chromosome 10 (dans 11 % des cas) et l'amplification de *REL* sur le chromosome 2 (dans 17 % des cas [37]) [38].

Des algorithmes permettant de lier les données immunophénotypiques aux sous-types génétiques existent. Ils permettent d'identifier les sous-types lors du diagnostic de routine anatomopathologique. L'algorithme de Hans (figure 1.1) propose de classer en sous-type GCB, les cas de LBDGC exprimant à plus de 10 % le CD10, ainsi que les cas n'exprimant pas le CD10 mais exprimant le *BCL6* et le *IRF4/MUM1*; tous les autres cas sont considérés comme non-GCB [39] (figure 1.1). La comparaison de ces algorithmes avec la méthode d'identification de profil d'expression génique donne des concordances allant d'environ 70 % pour l'algorithme de Hans [1] à environ 85 % pour celui de Choi. Ce dernier utilise cinq antigènes : GCET1, CD10, *BCL6*, *MUM1* et *FOXP1* [40].

Lors de la publication de la Classification OMS 2008 des néoplasies lymphoïdes, il n'a pas été requis d'appliquer ces algorithmes en routine du fait de leur faible concordance avec les résultats de profil d'expression [3] [41].

Au cours des dix dernières années, l'apparition de nouvelles méthodes de séquençage haut-débit massivement parallélisé a permis de mieux caractériser les altérations génétiques de ces sous-types en identifiant, avec une grande sensibilité, des mutations récurrentes du génome tumoral touchant un seul nucléotide. Certains de ces variants ont par la suite été confirmés comme pathogènes et éventuellement actionnables par l'administration d'une molécule empêchant l'action oncogène de la protéine mutante [42].

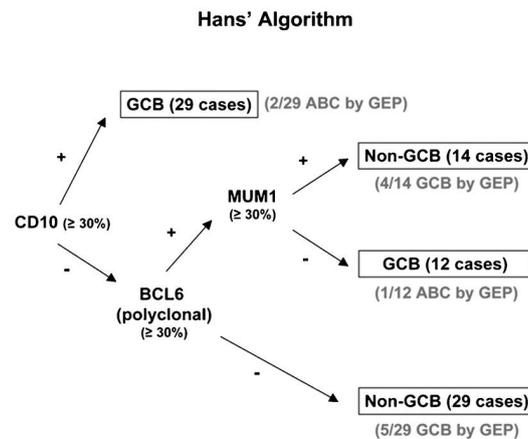


Figure 1.1 – L’algorithme de Hans [1]

1.4 Principaux gènes retrouvés mutés dans le LBDGC-NOS

1.4.1 TP53

P53 est reconnu pour être une protéine suppressive-de-tumeur, l’absence d’expression de cette protéine notamment en cas d’inactivation ou de délétion de *TP53* (17p-) est péjorative sur la survie dans les pathologies tumorales [43].

1.4.1.1 Épidémiologie

TP53 est muté dans plus de la moitié des cancers [44] et plus de 75 % de ces mutations sont des mutations faux-sens [45].

Des mutations non-synonymes de *TP53* ont été identifiées chez 21 % des patients atteints de LBDGC. Ces mutations portent principalement sur les codons 248, 273, et 175. La survie des patients ayant un p53 non muté, a été mesuré en moyenne à 94 mois, celles des patients ayant un p53 mutés, à 53 mois [46]. La délétion de 17p a été identifiée dans 18 % des sous-types ABC mais pas dans les sous-types GCB [35].

1.4.1.2 Fonction

TP53 code pour p53, un facteur de transcription qui orchestre la réponse cellulaire, en particulier lorsque la molécule d’ADN est endommagée [47]. Il prévient la réplication en empêchant le passage de la phase G1 à S (verrou du cycle cellulaire, « gardien du génome » [48]). Les différents autres signaux qui entraînent une réponse de p53 sont l’hypoxie, le stress oxydatif, les signaux d’hyperproliférations, la déplétion en ribonucléotide, le stress réplicatif et l’attrition des télomères.

P53 a une activité de facteur de transcription en se liant sous forme tétramérique à des séquences spécifiques de l’ADN. Il entraîne la trans-activation de gènes impliqués dans la promotion de l’apoptose, de l’arrêt du cycle cellulaire (voie de *PTEN* [49] et de *PLK2* [50]), de la réparation de l’ADN (voie de *RRM2b*), de la sénescence et de l’autophagie. Il inhibe la transcription des gènes impliqués dans la re-programmation métabolique, la dé-différenciation et l’invasion cellu-

laire [51] [52]. Un des gènes promu par p53 est *p21* qui relaye son action de blocage du cycle cellulaire [53]. Un autre gène promu par p53 est le gène de l'E3 ubiquitin ligase (*MDM2*). La protéine MDM2 participe par ubiquitination au rétrocontrôle négatif de p53 [54] (à noter que l'augmentation de l'expression de *MDM2* est retrouvée dans les néoplasies malignes hématologiques [55]). Cette ubiquitination peut être bloquée par l'acétylation des résidus lysines pouvant également être ubiquitinés [56]. La liaison entre MDM2 et p53 est nécessaire à l'ubiquitination de cette dernière [57]. Cependant, certaines études ont montré que l'ubiquitination de p53 peut ne pas être délétère à son activité. Elle pourrait notamment permettre sa translocation cytosolique [58], facilitant son action pro-apoptotique par l'intermédiaire de son action sur la mitochondrie [59]. Une étude a par ailleurs prouvé que MDM2 ubiquitine la protéine Snail [60], une protéine favorisant l'invasion tumorale [61]. Snail serait en outre dégradée directement par p53 [62].

1.4.1.3 Action oncogénique

TP53 est un gène suppresseur de tumeur. Son action oncogénique résulte de la perte de ses fonctions normales. Son rôle de suppresseur de tumeur a été prouvé par l'induction, avec une pénétrance complète, de cancer chez des souris ayant *TP53* délété de façon homozygote [63]. La fonction de p53 peut être perdue à cause de différents mécanismes tels que des mutations au sein du gène *TP53* et également des lésions empêchant l'activation de p53 (par exemple des mutations sur son propre facteur de transcription [64] ou encore des mutations sur les effecteurs de p53 [65]).

Selon une hypothèse, certaines mutations de *TP53* entraîneraient un gain-de-fonction de p53 rendant les p53 mutants oncogéniques. Ces mutants ont une action oncogénique plus forte que si cette action avait été entraînée par le simple fait de la perte de leur fonction suppressive de tumeur. Pour confirmer cette hypothèse, il a été prouvé que l'inhibition de la traduction des p53 mutés (ARN interférant les ARN de *TP53* muté de façon homozygote) ralentit la prolifération et augmente la survie de ces cellules [66].

Ces mutants ont été classés en deux groupes :

- Les contacts (R273H, R248Q et R248W) mutés au niveau de leur site d'interaction avec l'ADN.
- Les structuraux (R175H, G245S, R249S et R282H) mutés au niveau d'un acide aminé important pour leur structure.

Ces mutants ont plusieurs actions :

- Ils accélèrent le cycle cellulaire en rendant *PTEN* [67] et *PLM* oncogéniques [68] (gènes normalement suppresseurs de tumeur ayant fonction de stabilisateur et d'activateur de p53 [69]). Les p53 mutants sont phosphorylés sur des sites qui leur sont spécifiques, ce qui leur permet d'interagir avec p300 et ainsi d'accélérer le cycle cellulaire en formant une boucle d'autorégulation positive [70].
- Ils augmentent le stress oxydatif en inhibant Nrf2, le principal facteur de transcription impliqué dans l'expression d'enzymes anti-oxydantes [71].
- Ils entraînent une dérégulation des voies métaboliques, notamment celle du glucose, vers l'effet Warburg, en favorisant la translocation du récepteur GLUT1 sur la membrane cellulaire [72] [73] (l'intérêt thérapeutique de la metformine et des inhibiteurs de GLUT1 est en cours d'investigation [74]). Ils activent de façon constitutive *RRM2b*, un gène normalement activé de façon temporaire pour produire des nucléotides servant à la réparation de l'ADN. Cela permet une synthèse nucléotidique suffisante pour soutenir la réplication cellulaire tumorale [75]. Ils dérégulent également la voie du métabolisme des lipides par la transcription de *SREBP-1* et -2 et favorisent ainsi, l'augmentation de ce métabolisme [73].

- Ils facilitent l’envahissement métastatique [76] [77].
- Ils augmentent la résistance à l’étoposide [78].
- Ils entraînent l’expression de gènes impliqués dans le remodelage épigénétique de la chromatine (*MLL1*, *MLL2* et *MOZ*) qui sont eux aussi responsable de l’expression d’autres oncogènes [79].
- Ils renforcent l’expression de REG- γ en se liant à son promoteur et concourt à l’activation de l’axe miR-130b–ZEB1, un mécanisme entraînant la transition épithélio-mésenchymateuse dans les cancers de l’endomètre [80]. REG- γ est surexprimé dans les cancers du colon, du sein [81] et de l’endomètre [82]. Cette protéine est également impliquée dans la protéolyse d’enzymes ralentissant le cycle cellulaire [83] et de SRC-3 (un facteur de transcription). Elle a également été identifiée sur plusieurs autres voies oncogéniques [84].
- Ils se lient au promoteur de miR-130b et inhibent sa transcription. Cela aboutit à l’activation du gène suppresseur des E-cadherin *BMI-1* et du gène *Snail* [80] permettant le transfert épithélio-mésenchymateux et l’envahissement.
- Ils augmentent l’activité du protéasome [85]. Les cellules néoplasiques augmentent leur production en protéine et donc, elles ont une augmentation de leur besoin en acides aminés. L’augmentation de l’activité du protéasome permet de survenir à ce besoin par la protéolyse, et ainsi de maintenir une homéostasie protéique. Il semble que les mutations gain-de-fonction de p53 permettent par l’augmentation de l’activité du protéasome d’éviter à la cellule le stress protéique [86].
- L’isoforme mutant R248Q promeut en particulier la voie de signalisation Akt [87].

1.4.1.4 Intérêt thérapeutique

Les mutants gain-de-fonction de *TP53* entraînent une résistance à l’étoposide en activant l’expression de *TDP2*, un gène impliqué dans la réparation des lésions de type double brin induites par l’étoposide [78].

Ils induisent également une résistance aux inhibiteurs du protéasome, tel le bortezomib (Velcade) [85].

L’analogue méthylé de PRIMA-1, APR-246 permettrait de restaurer la conformation de p53 muté (sur les codons 175 et 273) par fixation covalente sur le domaine central de p53 et ainsi de réactiver sa fonction suppressive de tumeur sauvage [88]. Un essai clinique de phase I dans les hémopathies malignes s’est terminé en concluant en une bonne tolérance [89].

1.4.1.5 Structure

P53 est composé des régions suivantes :

- Une région allant des acides aminés 1 à 60 contenant un domaine de transactivation (TAD) subdivisé en deux sous-domaines TAD1 et TAD2 qui ne sont pas repliés et qui permettent à p53 de lier des protéines co-régulatrices.
- Une région riche en proline (PRR) allant de l’acide aminé 61 à l’acide aminé 93.
- Une région allant de l’acide aminé 94 à l’acide aminé 290, constituée par le domaine de liaison à l’ADN. Cette dernière région est liée au domaine permettant la tétramérisation (OD) par un lien d’acide aminé flexible allant de l’acide aminé 292 à l’acide aminé 324.
- Et en fin, d’un domaine de tétramérisation qui va de l’acide aminé 325 à l’acide aminé 356.
- Au niveau de l’extrémité C-terminale, à partir de l’acide aminé 357, se trouve un domaine de régulation (CTD).

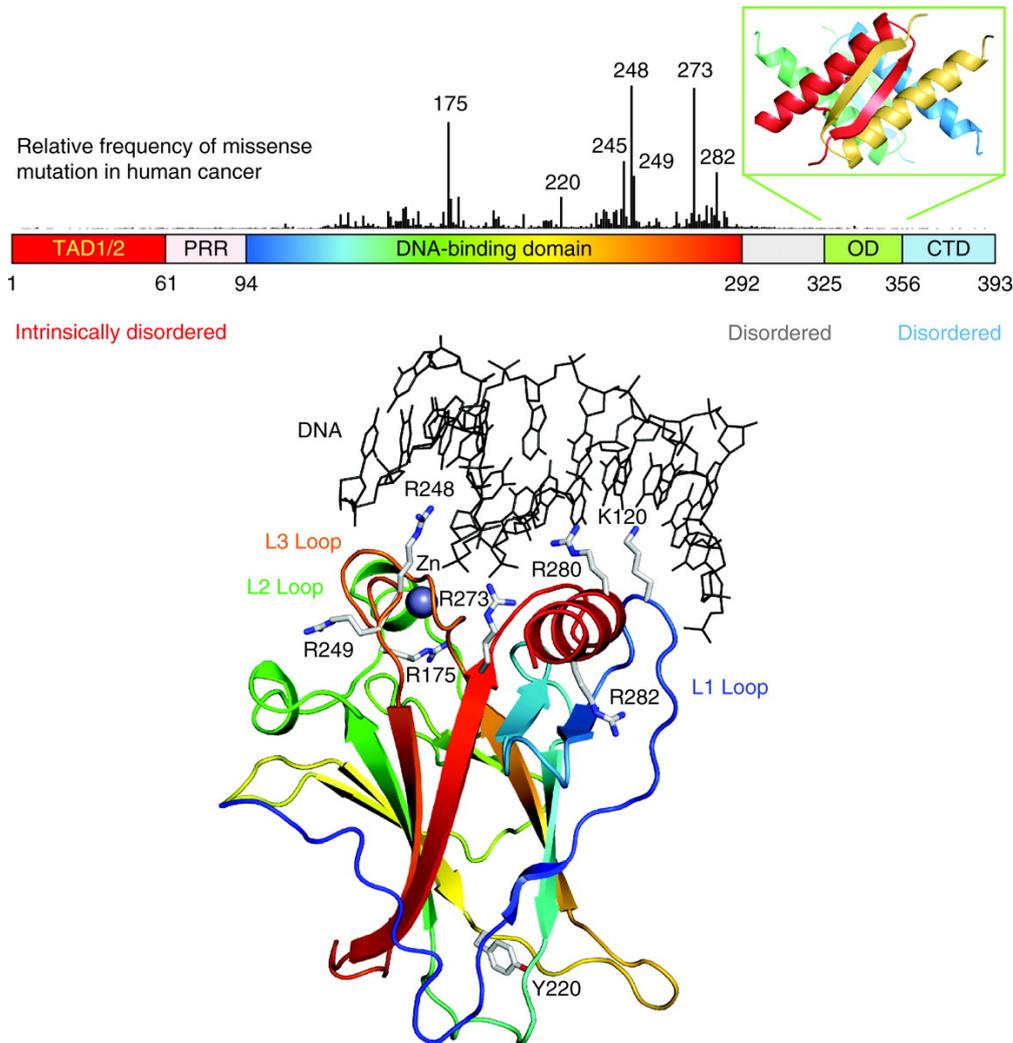


Figure 1.2 – Structure de p53 : en haut, l’histogramme noir représente les fréquences de mutations pour chaque base ; elles sont extraites de la base de données de l’Agence internationale de recherche sur le cancer (IARC) [45]. Au centre se trouve la représentation du gène avec les domaines structuraux de la protéine. En bas, la structure tridimensionnelle de p53 est coloriée selon un gradient allant de l’acide aminé N-terminal (bleu) à l’acide aminé C-terminal (rouge) [90] [91] (copyright © Cold Spring Harbor Laboratory Press 2010).

1.4.2 La voie de signalisation de NF- κ B

Les facteurs nucléaires κ B (NF- κ B) sont une famille de complexes protéiques qui ont une action de facteur de transcription [92]. NF- κ B contrôle la transcription de gènes impliqués dans la survie, la prolifération, la maturation et l’invasion cellulaire, la réponse au stress, la sécrétion de cytokines, l’angiogenèse et l’inflammation [93]. La voie principale d’activation de NF- κ B (voie canonique) découle de la reconnaissance d’un antigène soit par les récepteurs toll-like (TLR) dans le cadre de l’immunité innée, soit par les immunoglobulines de surface constituant le récepteur des

cellules B (BCR) dans le cadre de l'immunité adaptative [94]. Le CD40 participe également à la co-stimulation de cette voie. La reconnaissance de l'antigène par les récepteurs de surface conduit dans les lymphocytes B normaux au déclenchement d'une cascade d'activation enzymatique qui *in fine* aboutit à la levée de l'inhibition de NF- κ B.

NF- κ B initie l'expansion clonale du lymphocyte B ayant reconnu un antigène immunisant à sa surface [95]. Il entraîne sa migration vers le centre germinatif. Une fois que le lymphocyte atteint la zone sombre du centre germinatif, l'activité de NF- κ B s'arrête, probablement en raison de l'absence de co-stimulation par le CD40 [96]. Dans la zone sombre du centre germinatif, ce lymphocyte (centroblaste) va proliférer et remanier les gènes du BCR par hypermutation somatique dans le but d'augmenter la sensibilité de son immunoglobuline à l'antigène immunisant [97]. Lorsque ces lymphocytes sortent de la zone sombre, la stimulation du BCR et du CD40 par les cellules dendritiques et par les lymphocytes T helper permet la reprise de l'activité de NF- κ B. Cette reprise d'activité est d'autant plus forte et soutenue que l'affinité pour l'antigène présenté est grande. Les lymphocytes ayant une affinité suffisante pour l'antigène [98] se différencient par la suite, soit en lymphocyte B mémoire, soit en plasmocyte (par l'expression de Blimp-1).

Historiquement, la première mise en évidence du caractère oncogénique de NF- κ B vient de son homologie avec v-Rel, une protéine rétro-virale aviaire connue pour induire une transformation maligne [99]. Par la suite, sa sur-expression a été mise en évidence dans de nombreuses hémopathies malignes [100].

Dans les lymphomes B diffus à grandes cellules de sous-type activé (LBDGC-ABC), la différenciation plasmocytaire va être bloquée. En effet, la protéine Blimp-1 nécessaire à cette différenciation n'est pas fortement exprimée par les cellules néoplasiques en raison de multiples mécanismes [101] [102] [103]. Ces cellules vont rester bloquées à un stade comparable à celui du plasmoblaste [104]. Pour affirmer cette explication des mécanismes oncogéniques, des souris ont été modifiées génétiquement pour avoir une activité constitutive de NF- κ B favorisant la prolifération. De plus, *PRDM1* a également été inactivé, pour entraîner la sous-expression de Blimp-1 ce qui permet d'empêcher la différenciation. Il a été observé, chez ces souris, le développement de lymphomes ayant un phénotype comparable à celui du LBDGC-ABC [105]. Il a également été prouvé que les cellules néoplasiques du LBDGC-ABC ont leur voie de signalisation NF- κ B activée de façon constitutive, ce qui n'est pas le cas pour le sous-type GCB [106].

Cette activation constitutive résulte de plusieurs altérations génétiques différentes qui ne sont pas nécessairement toutes retrouvées dans les LBDGC-ABC.

1.4.2.1 Une perte de fonction des inhibiteurs de NF- κ B

Dans environ 4 % des LBDGC, il a été identifié des mutations perte-de-fonction de NFKBIA/ $I\kappa$ B α , une protéine qui fait partie des inhibiteurs de NF- κ B [107].

Un autre inhibiteur de NF- κ B, BCL3 est fréquemment impliqué dans des aberrations chromosomiques de cellules lymphomateuses [108].

1.4.2.2 Un gain de fonction des protéines NF- κ B

Dans environ 15 % des LBDGC, il a été mis en évidence des amplifications de *c-REL*, un des membres de la famille NF- κ B [109]. Il a également été démontré que l'expression de REL mutant transforme un sous-type GCB en un sous-type ABC [110].

Dans environ 10 % des sous-types ABC, des amplifications de l'oncogène NFKBIZ/ $I\kappa$ B ζ ont été retrouvées [111].

1.4.2.3 La voie de signalisation du BCR

Dans les sous-types ABC, cette voie de signalisation du récepteur des cellules B (BCR) est activée de façon constitutive du fait de la présence de mutation portant principalement sur les gènes du BCR de CD79 et sur *CARD11* [112] (figure 1.3).

BCR : Le BCR est un complexe protéique trans-membranaire constitué par une immunoglobuline (Ig) en surface, exposant ses paratopes vers l'extérieur, et par une protéine hétérodimérique Ig- α /Ig- β (CD79A/B). Le BCR est situé en amont de la voie de signalisation qui conduit entre autre à l'activation de NF- κ B.

Les cellules néoplasiques des sous-types ABC (tout comme dans les LLC) ont l'IgM de leur BCR stéréotypé. En effet, dans 39 % de ces lymphomes, la partie variable de la chaîne lourde est seulement constituée par les deux mêmes paires d'exons (VH4-34 et VH3-7) [113]. Il a été démontré que ces phénotypes de BCR sont sélectionnés car ils entraînent la reconnaissance d'antigène du soi, favorisent ainsi, la stimulation du BCR donnant un avantage sélectif à ces lymphocytes néoplasiques.

CD79 : Il s'agit d'une protéine transmembranaire hétérodimérique (Ig- α et Ig β) qui forme un complexe avec l'Ig lorsque celle-ci reconnaît un épitope [114]. Dans la partie cytoplasmique de ces protéines se trouve un « motif de signalement des immunorécepteurs » (ITAM). La complexification de CD79 avec l'Ig va entraîner un changement conformationnel de CD79 et induire la phosphorylation des tyrosines du motif ITAM. Ces phosphorylations signalent en intracellulaire la reconnaissance d'un épitope par l'Ig [115] et activent la tyrosine kinase SYK qui va à son tour activer BTK. BTK active par la suite PKC- β .

Les mutations retrouvées dans les sous-types ABC portent sur *CD79* dans 21 % des cas. Plus particulièrement, dans 18 % des cas, ces sous-types, sont mutés sur la première tyrosine (Y196) du motif ITAM, un acide aminé critique pour la fonction de CD79 [116].

Le mécanisme donnant un avantage sélectif aux cellules néoplasiques mutées sur Y196 n'est pas entièrement élucidé. Il a cependant été prouvé que cette mutation participe à l'activation constitutive du BCR, probablement du fait de l'inhibition de l'internalisation de ces récepteurs [117]. Il a également été formulé l'hypothèse que cette mutation permettrait d'échapper à une autorégulation négative par l'enzyme LYN [116].

CARD11 : CAR11 (*Caspase recruitment protein 11*) est la protéine codée par le gène *CARD11*. Elle est aussi nommée CARMA1.

Cette protéine a un rôle essentiel de co-stimulation du BCR qui aboutit à l'activation de NF- κ B. Il s'agit d'une protéine de soutien qui se complexifie une fois phosphorylée avec BCL10, une protéine adaptatrice, et avec MALT1, une protéase. Elles forment ainsi le complexe CBM. La phosphorylation de CAR11 est une étape en aval de BTK et de PKC- β dans la cascade d'activation déclenchée par le BCR. Par la suite, le complexe CBM induit l'activation de l'inhibiteur de la κ -B kinase (IKK) en recrutant le complexe LUBAC qui ubiquitine IKK. Ce mécanisme d'ubiquitination est facilité par les protéines E3 ubiquitine ligases cIAP1 et cIAP2. En aval, IKK phosphoryle à son tour, les inhibiteurs de NF- κ B et entraîne ainsi la levée de l'inhibition de l'activité de NF- κ B [118]. Le complexe CBM active également le facteur de transcription AP-1, ainsi que des gènes impliqués dans la stabilité des transcrits, l'adhésion cellulaire et le métabolisme [119].

Une étude a identifié la présence de mutation faux-sens sur les exons 5 à 9 de *CARD11* dans environ 10 % des sous-types ABC. Ces exons encodent pour le domaine superhélice de

CARD11 [37] [120]. La présence de mutations sur ce gène n'est cependant pas limitée aux sous-types ABC. Elles sont également retrouvées dans les sous-types GCB [121].

À l'origine en cytogénétique, des translocations chromosomiques impliquant *BCL10* ou *MALT1* avaient été mises en évidence dans les lymphomes de MALT [122].

L'inhibition de CARD11 par l'induction de l'expression d'ARN interférant au sein des cellules néoplasiques s'est révélée toxique pour les cellules des sous-types ABC, mais pas pour celles des GCB [123]. L'expression forcée de mutants faux-sens sur le domaine super-hélice de *CARD11* entraîne une augmentation de l'activité de la voie de NF- κ B. Ces mutations sont donc des mutations gain-de-fonction [37]. L'hypothèse serait que ces mutations entraîneraient l'activation constitutive de CAR11 et donc de MALT1 sans nécessiter sa phosphorylation par la PKC- β , rendant ainsi la voie du BCR active de façon constitutive sans nécessité de stimulation antigénique [124]. Il a été observé également que ces mutations entraînent une lymphocytose, mais ne sont pas suffisantes pour induire un lymphome [125] [126]. Cependant, la transformation maligne a été réalisée chez des souris délétées pour p53 de façon homozygote sur-exprimant la protéine MALT1 [127]. Il a été aussi remarqué que cette activation constitutive entraîne la formation de structures fibrillaires dans le cytoplasme des cellules néoplasiques qui sont visibles en microscopie électronique [128]. Enfin, les mutants oncogènes de CAR11 activent également l'oncogène *JNK* [129].

1.4.2.3.1 Implications Thérapeutiques

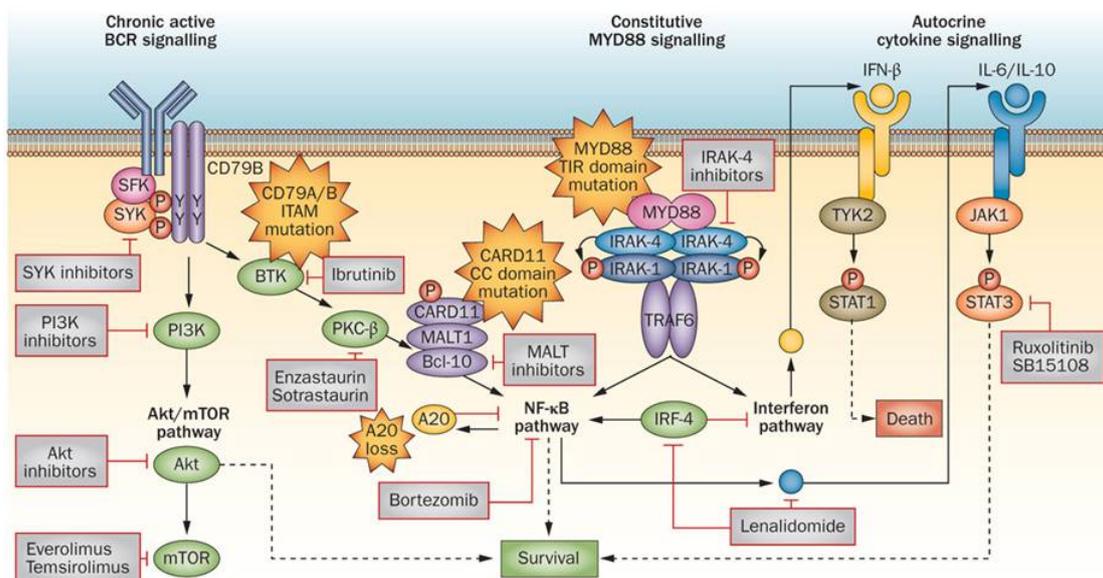


Figure 1.3 – Schéma de la voie de signalisation de NF- κ B, des principales enzymes mutées et de leurs implications thérapeutiques. (Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd : Nature Reviews Clinical Oncology [130] copyright © 2013).

1.4.2.3.1.1 Inhibition de BTK ou de SYK

L'ibrutinib est un inhibiteur sélectif et irréversible de BTK [131]. Il a une action anti-néoplasique dans les sous-types ABC [132]. Un essai clinique de phase II pour l'Ibrutinib dans les LBDGC a montré un taux de réponses complètes de 16 % et un taux de réponses partielles de 21 % pour les sous-types ABC. Dans les sous-types GCB, les taux de réponses complètes et partielles se sont révélés être de 5 % [133]. Cet essai clinique a également mis en évidence l'inefficacité de l'Ibrutinib sur les sous-types ABC mutés *MYD88* ou *CARD11*, qui sont des protéines agissant en aval de BTK sur la voie de signalisation de NF- κ B. Cependant, des mutations combinées sur *MYD88* et *CD79B* semblent permettre l'action de l'Ibrutinib. Les meilleures réponses se retrouvent chez les patients n'ayant pas de mutation sur la voie du BCR. Les mutations de *TNFAIP3* induisent également l'inefficacité de l'Ibrutinib [134]. Il a également été prouvé que l'Ibrutinib peut entraîner la sélection de sous-clones tumoraux rendus résistants par l'acquisition de mutations sur les gènes de ces protéines [135]. Un essai clinique de phase III a commencé en 2013 et les premiers résultats sont attendus pour juin 2018 [136].

Concernant les effets indésirables de l'Ibrutinib, l'étude de phase II dans le lymphome à cellules du manteau (LCM) rapporte des effets indésirables chez 60,4 % des patients. Les effets indésirables graves survenus chez plus de 2 % des patients ont été la fibrillation auriculaire (6,3 %), la pneumonie (5,4 %), les infections des voies urinaires (3,6 %), les douleurs abdominales (2,7 %), l'hématome sous-dural (2,7 %), la neutropénie fébrile (2,7 %), l'insuffisance rénale aiguë (2,7 %), l'œdème périphérique (2,7 %) et la pyrexie (2,7 %). Des cas isolés de leucostase ont été également observés [137].

Le Fostamatinib est d'un inhibiteur oral sélectif de SYK, qui a montré une activité significative contre les LBDGC réfractaires ou en rechute lors d'un essai clinique de phase I/II [138].

1.4.2.3.1.2 Inhibition de PKC- β

Le Sotrastaurin est un inhibiteur des protéines PKC dont PKC- β , la protéine activatrice de *MYD88* (aussi nommé AEB071 ou STN) [139]. La prolifération des lymphocytes de LBDGC mutés sur *CD79* et non mutés sur *CARD11* est inhibée par le Sotrastaurin [140] [141]. Un essai clinique de phase I/II a été réalisé et est terminé, les résultats sont actuellement en attente de publication [142] [130].

Pour l'enzastaurin, un essai clinique de phase III n'a pas montré l'efficacité de ce traitement [143].

1.4.2.3.1.3 Inhibiteurs du protéasome

Le protéasome entraîne la dégradation des régulateurs négatifs de la progression du cycle cellulaire (molécule pro-apoptotique), ainsi que de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α . Il a été prouvé qu'un des inhibiteurs du protéasome, le Bortezomib, peut sensibiliser à la chimiothérapie les cellules néoplasiques des sous-types ABC, mais pas celles des sous-types GCB [144]. Cependant, cette molécule ne possède pas d'activité significative en monothérapie [145].

Allant contre cette classe d'inhibiteur, il a été montré que l'inhibition du protéasome peut aussi favoriser des protéines anti-apoptotiques en particulier MCL1 [146] et HSP90 [147] qui sont également impliquées dans les mécanismes de résistance au Bortezomib [148].

1.4.2.3.1.4 Autres inhibiteurs

CIAP1/2 participe à l'activation de NF- κ B en aval du complexe CBM. Une étude a montré que le Birinapant, un inhibiteur de cIAP1/2, limite la prolifération des lymphocytes néoplasiques dans les ABC-DLBCL, mais pas dans les GCB-DLBCL [149].

MALT1, une protéine du complexe CBM, participe à l'activation de NF- κ B. La molécule MI-2 a montré une action inhibitrice irréversible de MALT1 permettant ainsi de diminuer l'activation constitutive de NF- κ B dans des lignées cellulaires de sous-type ABC et dans un modèle murin [150].

La sur-expression d'IRF4 augmente l'activation de NF- κ B [151]. Grâce à sa liaison avec le complexe cereblon (CRBM), les analogues de la thalidomide [152] dont le chef de file est le Lenalidomide entraînent la répression d'IRF4 (par l'intermédiaire de la dégradation des protéines ikaros [153]). C'est en partie aussi, le mécanisme d'action du CC-122 [154], dont l'action spécifique se situe sur la voie des interférons de type I et qui semble également lui permettre d'agir dans les sous-types GCB [155].

Plusieurs essais cliniques de phase I/II ont rapporté une activité du Lenalidomide contre les cellules néoplasiques des sous-types ABC en rechute ou réfractaire. Un essai clinique a mesuré une réponse complète de 23 % en monothérapie [156]. Un autre essai a montré que l'association à la thérapie standard (R-CHOP) est sûre et efficace [157]. Des essais cliniques de traitement par Lenalidomide en première intention sont en cours [158]. L'action du Lenalidomide semble nécessiter la présence d'une protéine CAR11 non mutée [159].

CC-122 est actuellement en essai clinique de phase I. Il a déjà montré une activité contre les LBDGC [160]. Notre patient 1638 est dans cet essai après six lignes de chimiothérapies (cf. page 44).

1.4.2.4 La voie de signalisation du TLR

La voie de signalisation de l'immunité innée participe également à l'activation de NF- κ B dans les lymphocytes B notamment à partir du récepteur TLR-4 impliqué dans la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) [161].

MYD88 est muté dans environ 40 % des sous-types ABC. La mutation la plus fréquente est L265P. Elle est retrouvée dans 14 à 31 % des ABC et dans 6 à 10 % des GCB [162] [121]. Son identification est un facteur pronostic péjoratif indépendant (*hazard ratio* à 2,4) [163]. Il a également été reporté une co-occurrence de la mutation L265P et de mutations sur *CD79B* [164].

Elle est par ailleurs retrouvée dans environ 90 % des lymphomes lympho-plasmocytaires (LPL), dans 3 à 10 % des leucémies lymphoïdes chroniques, dans 5 % des lymphomes de la zone marginale (LZM) muqueux, dans 5 % des LZM nodulaires et dans 5 à 7 % des LZM spléniques [165].

MYD88 est une protéine adaptatrice impliquée dans la cascade de signalisation des voies de signalisation du récepteur Toll-like (TLR), ainsi que du récepteur à l'interleukine 1 (IL-1) et à l'interleukine 8 (IL-8). MYD88 active IRAK4. *In fine* ces voies entraînent l'activation de NF- κ B, la sécrétion de cytokines et la réponse inflammatoire.

L'action de MYD88 est nécessaire à la survie des ABC. Son inhibition s'est révélée toxique *in vitro* pour les cellules de ce lymphome, mais pas pour celles du sous-type GCB. L'expression du mutant L265P s'est montrée favorable à la prolifération des cellules des LBDGC-ABC [162]. Cette prolifération a ainsi prouvé son action oncogénique gain-de-fonction en conférant un avantage sélectif aux cellules qui expriment cette mutation. Cette mutation, lorsqu'elle est exprimée par un modèle murin, suffit à induire une transformation maligne mimant le sous-type ABC [166].

La mutation L265P occupe un résidu très conservé phylogénétiquement qui contribue à la formation d'un feuillet β au sein du domaine TIR de MYD88.

Implications thérapeutiques : Deux inhibiteurs spécifiques de IRAK4 sont en cours de développement au stade pré-clinique. Ils ont montré leur toxicité sur des lignées cellulaires et sur des modèles murins de LBDGC-ABC [167].

Dans un essai clinique de phase I, il a été montré que IMO-8400 inhibe l'activation de la voie du TLR dans les LBDGC-ABC ayant une mutation L265P et diminue la survie et la prolifération de ces cellules [168].

1.4.3 EZH2

1.4.3.1 Épidémiologie

L'implication d'*EZH2* dans les cancers a été suggérée à l'origine, du fait de sa sur-expression dans les cancers de la prostate [169]. Il a été montré, par la suite, que cette sur-expression est présente dans d'autres pathologies néoplasiques, notamment dans les néoplasies hématologiques [170].

Des mutations de la tyrosine 641 (Y641) surviennent dans 22 % des sous-types GCB [171], en particulier ceux portant une translocation de *BCL2* [172]. Ces mutations sont également retrouvées dans 7 à 12 % des lymphomes folliculaires [173]. En revanche, on ne les retrouve presque jamais, dans les sous-types ABC.

1.4.3.2 Fonction

Enhancer de zeste homologue 2 (EZH2) est la sous-unité catalytique de *Polycomb repressive complex 2* (PRC2). Ce complexe protéique a une action méthyltransférase et entraîne la di- ou

tri-méthylation de la lysine 27 (H3K27me_{2/3}) des histones H3. Cette méthylation maintient la chromatine condensée (hétérochromatine) et réprime la transcription des gènes dont les histones ont été méthylés [174]. L'expression de *EZH2* se fait principalement dans les cellules en division.

1.4.3.3 Action oncogénique

Il a été prouvé que l'expression forcée d'*EZH2* entraîne une prolifération plus importante [175] et induit un syndrome myéloprolifératif chez la souris [176].

Les mutants Y641 (Y641F, Y641N, Y641S, Y641C et Y641H) touchent une protéine du domaine SET d'*EZH2*, ce qui induit une activité de tri-méthylation des H3k27 di-méthylés plus forte que la protéine sauvage [177]. Ils induisent également les gènes ciblés par PRC2 [178]. Ces mutants ne peuvent pas méthyler les H3K27 non-méthylés. Une coopération est donc nécessaire avec la protéine sauvage. Les mutants sur les résidus A677 et A687 identifiés dans les lymphomes non hodgkinien ont le même mécanisme d'action oncogène [179] [180].

L'hypothèse principale permettant d'expliquer l'oncogénèse est que les gènes réprimés par PRC2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la différenciation cellulaire. Le blocage de ces suppresseurs de tumeurs permettrait de favoriser la transformation maligne [181] [182]. Cependant, il a aussi été mis en évidence l'hypothèse inverse, selon laquelle *EZH2* favoriserait la différenciation [183] [184]. D'autres gènes réprimés par *EZH2* ont été identifiés comme des facteurs importants dans l'oncogénèse, tels que les gènes suppresseurs de tumeur *Ink4a/Arf*, *E-cadherin*, *FOXC1*, *CDKN1A* [185] et les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN [186].

Il a aussi été décrit une action de *EZH2* indépendante de PRC2, comme facteur de transcription notamment de NF- κ B [187] (mais aussi du récepteur aux androgènes et de NOTCH1). *EZH2* peut également se lier et méthyler STAT3, ce qui promeut la prolifération dans des modèles de glioblastome et de cancer de la prostate.

1.4.3.4 Intérêts thérapeutiques

Différents inhibiteurs sélectifs d'*EZH2* sont en cours de développement [186] :

- Le Tazemetostat (EPZ-6438) est en cours d'essai clinique de phase II [188]. Dans cette étude, un patient porteur de la mutation Y646H a atteint une réponse partielle après 16 semaines de traitement. 9 patients sur 15 ont atteint une réponse objective à l'administration de ce traitement.
- GSK126 et E11 diminuent la prolifération. Ils ralentissent le cycle cellulaire et induisent l'apoptose des cellules néoplasiques dans des modèles murins [189] [190]. GSK126 inhibe spécifiquement les mutants gain-de-fonction d'*EZH2*. Il est actuellement en phase I d'essai clinique [191] [189].
- CPI-1205 est également un inhibiteur d'*EZH2*. Il est en essai clinique de phase I [192].
- GSK343 a montré une bonne activité inhibitrice dans des études enzymatiques et sur des lignées cellulaires de cancer du sein [193].

Partie 2

Matériel

Dix patients, diagnostiqués anatomopathologiquement d'un lymphome B à grandes cellules, ont été sélectionnés. Je détaillerai, ci-dessous, les caractéristiques cliniques et pathologiques de ces patients.

Patient 1602

Résumé clinique

Ce patient est une femme de 80 ans. Le diagnostic de LBDGC a été porté à la suite d'un scanner thoraco-abdomino-pelvien réalisé dans le cadre d'un bilan pour altération général et de dyspnée causée par une embolie pulmonaire.

Les localisations initiales sont :

- Un nodule du lobe inférieur droit mesuré à 8 mm.
- Des multiples adénomégalies médiastinales, axillaires, sus et sous claviculaires bilatérales.
- Un volumineux amas ganglionnaires péri-aortique engainant l'aorte, les artères rénales et la veine cave inférieure.

Examen anatomopathologique

À l'examen macroscopique, la pièce adressée à l'état frais est composée d'un fragment mesurant 5 x 2 x 0,7 cm, de consistance ferme et de couleur brun-rougeâtre. L'examen histologique extemporané révèle une prolifération maligne pouvant correspondre à un lymphome ou à une autre tumeur.

L'examen histologique révèle que le prélèvement correspond à un ganglion dont l'architecture apparaît totalement remaniée par une prolifération de cellules de taille moyenne à grande, d'architecture diffuse, dépassant la capsule ganglionnaire pour infiltrer le tissu adipeux environnant. Les cellules ont un noyau irrégulier, augmenté de volume, parfois nucléolé, entouré d'un cytoplasme éosinophile abondant. De nombreuses images de mitoses parfois atypiques sont observées, mais pas de plage de nécrose. Les cellules tumorales sont diffusément reconnues par les anticorps anti-CD20 et anti-BCL2. Elles sont également marquées de manière plus focale par les anticorps anti-BCL6 et anti-MUM 1. Absence de marquage des cellules tumorales par les anticorps anti-CKAE1/AE3, anti-CD5, anti-CD30 et anti-CD10. Les anticorps anti-CD3 et anti-CD5 marquent de petits lymphocytes T matures épars. L'index de prolifération évalué par l'anticorps anti-Ki67 apparaît élevé (environ 90 %). Aucune cellule n'est marquée par la sonde EBER. L'examen ana-

tomopathologique conclut en un aspect morphologique et immunohistochimique, de lymphome B diffus à grandes cellules de phénotype non centre germinatif.

Bilan d'extension

Le bilan biologique retrouve :

- Une hypercalcémie au maximum à 3,42 mmol/L de calcium ionisé et 3,76 mmol/L de calcémie corrigée.
- Une concentration sérique en 2-microglobuline de 7,03 mg/L.
- Une concentration sérique en LDH de 547 UI/L.

Le myélogramme ne retrouve pas d'infiltration lymphocytaire suspecte.

L'immunophénotypage de ces lymphocytes circulant ne retrouve pas de population clonale.

Le bilan d'imagerie est complété par une tomographie par émission de positrons qui montre une volumineuse masse abdominale hypermétabolique correspondant au manchon tumoral décrit au scanner. Il existe également des hypermétabolismes diffus au niveau du cadre colique, de la plèvre et du cavum. La valeur standardisée d'intégration maximum (SUVmax) est estimée à 17,5.

Le score de Ann Arbor résultant est à IV B *Bulky* avec un score IPIaa à 3.

Résumé de la prise en charge

La patiente a été traitée par 6 cures de chimiothérapie R-CHOP du 18 janvier au 9 mai 2016.

La première réponse complète a été mise en évidence le 18 avril sur un scanner thoraco-abdomino-pelvien ne révélant aucune anomalie et par une tomographie par émission de positrons mesurant 5PS à 1.

Patient 1619

Résumé clinique

Ce patient est une femme de 69 ans. Le diagnostic de LBDGC a été porté en mars 2014 à la suite de la biopsie d'une adénopathie cervicale gauche d'évolution chronique hors contexte infectieux.

Examen anatomopathologique

L'examen histologique révèle une architecture ganglionnaire effacée par une prolifération de cellules lymphoïdes de taille moyenne disposée en nappe ponctuée de macrophages qui donnent un aspect de « ciel étoilé » et cloisonnée par des septa fibreux. Ces éléments ont un cytoplasme basophile et un noyau ovoïde avec une chromatine mottée et des nucléoles parfois proéminents. On observe de nombreuses mitoses et des corps de nécrose monocellulaire. Il existe par ailleurs, de larges plages de nécrose acidophile focalement hémorragique. À l'étude immunohistochimique, les éléments lymphomateux expriment CD20, CD10, Bcl-2, Bcl-6 et Ki67 (proche de 100 %). Ils n'expriment pas CD30, MUM1 et EBER (EBV). Le microenvironnement est constitué de petits lymphocytes T CD3+ CD5+, épars. L'examen conclut en un lymphome B agressif inclassable (forme intermédiaire entre lymphome à grandes cellules B et lymphome de Burkitt).

Examen cytogénétique

Le bilan cytogénétique réalisé ne révèle pas de réarrangement de MYC et fait donc pencher le diagnostic vers le lymphome B diffus à grandes cellules de type centre germinatif.

Bilan d'extension

Le bilan biologique est sans particularité.

Le myélogramme est d'interprétation impossible, ne retrouvant qu'un sang médullaire très pauvre et dilué.

L'immunophénotypage des cellules médullaires ne détecte pas de population B monoclonale.

La biopsie ostéo-médullaire est indemne d'infiltration lymphoïde suspecte.

Le scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien révèle : une formation tissulaire homogène plaquée sur le bord latéral du paquet jugulo-carotidien droit, compatible avec une adénopathie et une adénopathie mésentérique rétro-péritonéale.

Le bilan d'imagerie est complété par une tomographie par émission de positrons. Cette dernière montre une hyperfixation métabolique sus et sous-diaphragmatique avec une image jugulo-carotidienne avec SUV max à 16 et une image ganglionnaire rétro-péritonéale avec SUV max à 8.

Ce bilan d'extension correspond à un stade III d'Ann Arbor avec un IPIaa à 1.

Résumé de la prise en charge

La patiente a été traitée par 6 cures de chimiothérapie R-CHOP du 31 mars au 16 juillet 2014.

La première réponse complète a été mise en évidence le 25 juin 2014 par une tomographie par émission de positrons confirmant l'obtention d'une réponse complète avec un 5PS à 1.

Patient 1622

Résumé clinique

Ce patient est un homme de 27 ans.

Le diagnostic de LBDGC a été porté à la suite de la découverte d'une tuméfaction cervicale gauche. En l'absence d'argument pour l'étiologie infectieuse, le patient a bénéficié le 25 mars, d'une biopsie de l'amygdale gauche et d'un examen anatomopathologique révélant un lymphome B diffus à grandes cellules, de phénotype centre germinatif avec expression aberrante du CD5.

Examen anatomopathologique

À l'analyse histologique, le parenchyme amygdalien apparaît totalement effacé par une prolifération lymphoïde tumorale. Cette prolifération est faite de cellules de grande taille, de morphologie centroblastique. Ces éléments s'agencent en plages nodulaires sans structure folliculaire identifiable.

Après étude immunohistochimique, les cellules lymphomateuses expriment nettement CD20, BCL6, BCL2 et CD10. À noter la présence d'une expression aberrante de CD5 alors que la cycline D1 est négative. Les anticorps anti-CD21 et CD23 ne retrouvent pas de réseau de cellules folliculaires dendritiques. L'anticorps anti-CD30 est négatif. L'anticorps anti-MUM1 montre environ 10 % de cellules positives.

L'étude en hybridation *in situ* avec la sonde EBER ne retrouve pas d'expression du virus EBV.

Bilan d'extension

À l'examen clinique, on retrouve une adénopathie jugulo-carotidienne gauche de 5 x 6 cm de diamètre, non sensible à la palpation.

Un scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien révèle une hypertrophie amygdalienne gauche suspecte avec des adénopathies jugulo-carotidiennes.

Le bilan biologique montre :

— Un dosage des LDH légèrement augmenté à 233 UI/L.

— Un dosage des phosphatases alcalines légèrement augmenté à 118 UI/L.

Le myélogramme est sans infiltration lymphoïde suspecte.

L'immunophénotypage des cellules sanguines et médullaires ne détecte pas de population B monoclonale.

Ce bilan d'extension correspond à un stade IV d'Ann Arbor avec un IPIaa à 2.

Résumé de la prise en charge

Le patient a été traité et a été inclus dans l'essai thérapeutique GAINED bras GA101. Son traitement a commencé par 4 cures de chimiothérapie ACVBP+GA101, suivies de deux cures de Methotrexate et d'une auto-greffe. Son traitement a duré du 6 mai au 12 septembre 2014.

La première réponse complète a été mise en évidence le 22 juillet par une tomographie par émission de positrons confirmant l'obtention d'une réponse complète avec un 5PS à 1.

Au 30 juin 2016, le patient était toujours en réponse complète.

Patient 1623

Résumé clinique

Ce patient est une femme de 38 ans. Le diagnostic de LBDGC a été porté à la suite d'un bilan de recherche d'étiologie de thrombose. Le scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien a montré une masse médiastinale. L'examen anatomopathologique réalisé sur la biopsie de cette masse diagnostique le 5 mai 2014 un lymphome B sclérosant du médiastin.

Examen anatomopathologique

L'analyse après fixation, formol et inclusion en paraffine montre une prolifération de cellules lymphoïdes de taille moyenne, cloisonnée par de nombreux septa fibreux pénicillés. Ces cellules ont un cytoplasme d'abondance variable souvent rétracté qui donne un aspect de halo clair péri-nucléaire. Les noyaux sont ovoïdes, parfois nucléolés ou mitotiques. Ces cellules forment des nappes et des cordons ponctués par endroit de petits lymphocytes. Les cellules lymphomateuses expriment CD20, CD30, MUM1 et Ki67 (60 à 70 % environ) mais n'expriment pas CD5, CD10, Bcl-2 et Bcl-6. L'examen conclut en un lymphome B sclérosant du médiastin.

Bilan d'extension

À l'examen clinique, on retrouve une masse pariétale antérieure gauche para-sternale correspondant à une infiltration de la paroi thoracique par le lymphome.

Le bilan biologique montre :

— Un dosage des LDH légèrement augmenté à 284 UI/L.

— Une lymphopénie à 0,81 G/L.

La biopsie ostéo-médullaire est indemne d'infiltration. L'immunophénotypage des cellules médullaires ne détecte pas de population B monoclonale.

La ponction lombaire révèle un liquide céphalo-rachidien stérile sans élément cellulaire.

L'échographie trans-thoracique cardiaque révèle un épanchement péricardique, localisé en regard du haut du ventricule gauche, de 1 cm, non compressif.

Ce bilan d'extension correspond à un stade IV d'Ann Arbor avec un IPIaa à 2.

Résumé de la prise en charge

La patiente traitée a été incluse dans l'essai thérapeutique GAINED bras GA101. Son traitement a commencé par 4 cures de chimiothérapie ACVBP+GA101, suivies de deux cures de Methotrexate et d'une auto-greffe. Son traitement a duré du 12 mai au 26 août 2014.

La première réponse complète, a été mise en évidence le 18 décembre 2014, par une tomographie par émission de positrons.

Au 7 juillet 2016, la patiente était toujours en réponse complète.

Patient 1625

Résumé clinique

Ce patient est une femme de 79 ans. Le diagnostic de LBDGC a été porté à la suite de l'apparition d'une adénopathie cervicale gauche, sans étiologie infectieuse. L'examen anatomopathologique réalisé sur la biopsie de cette masse, diagnostique le 19 juin 2014, un LBDGC non GC.

Examen anatomopathologique

L'analyse histologique après fixation dans le formol montre une large infiltration des fragments de biopsie examinés par des nappes de cellules lymphoïdes de taille moyenne à grande, cloisonnées par endroit par des fins septa fibreux. Ces éléments ont un cytoplasme d'abondance variable qui entoure un volumineux noyau ovoïde pourvu de plusieurs nucléoles proéminants. Les mitoses sont assez nombreuses. Les éléments lymphomateux expriment CD20, Bcl2, MUM1 (30 % environ) et Ki67 (60 % dans les zones denses). Ils n'expriment pas CD5, CD10, Bcl-6 (rares cellules éparses marquées), CD30 et EBER (EBV). L'examen conclut en une localisation au niveau de l'amygdale gauche, d'un lymphome à grandes cellules B non GC.

Bilan d'extension

Le bilan biologique révèle :

— Un dosage normal des LDH.

— La numération globulaire est sans particularité.

La biopsie ostéo-médullaire est indemne d'infiltration.

L'immunophénotypage des cellules médullaires ne détecte pas de population B monoclonale.

Le scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien met en évidence de volumineuses adénopathies jugulo-carotidiennes gauche, ainsi qu'au niveau du segment V, et de plus petit axe non nécrotique d'environ 2 cm. Il révèle l'existence d'adénopathie de taille centimétrique en sus-claviculaire gauche et au niveau médiastinal. Il retrouve des lésions tissulaires de la fosse périmandibulaire droite qui pourraient être en rapport avec sa localisation lymphomateuse, ainsi que la présence de lésions tissulaires au niveau de l'amygdale gauche biopsiée antérieurement.

Le bilan d'imagerie est complété par une tomographie par émission de positrons qui révèle une maladie sus-diaphragmatique avec hypermétabolisme de l'amygdale, des adénopathies cervicales et médiastinales.

Ce bilan d'extension permet de classer ce lymphome à grandes cellules B non GC à un stade IV de Ann Arbor avec un IPIaa à 1.

Résumé de la prise en charge

La patiente a été traitée par 6 cures de chimiothérapie R-CHOP du 28 juillet au 12 novembre 2014.

La première réponse complète a été mise en évidence le 8 septembre (après la deuxième cure, lors du premier bilan d'évaluation) par une tomographie par émission de positrons.

Patient 1626

Résumé clinique

Ce patient est un homme de 19 ans. Le diagnostic a été porté à la suite de la découverte d'un processus tumoral suspect au niveau de l'amygdale et du pilier amygdalien gauche. L'examen anatomopathologique de la biopsie de l'amygdale gauche conclut provisoirement en un lymphome B inclassable, intermédiaire entre le lymphome de Burkitt et le lymphome à grande cellules B ; des analyses cytogénétiques devront trancher entre les deux hypothèses. Par la suite, le 18 juillet 2014, l'examen cytogénétique retrouve une double fusion IGH/MYC, qui fait pencher le diagnostic en faveur du lymphome de Burkitt.

Examen anatomopathologique

Histologiquement, les différents fragments de biopsie révèlent un tissu amygdalien diffusément infiltré par un processus lymphomateux. La tumeur est constituée d'une prolifération monomorphe de cellules de taille moyenne, de morphologie centroblastique avec des noyaux arrondis ou ovalaires parfois légèrement irréguliers, à chromatine claire, dotés de petits nucléoles. Les cytoplasmes sont peu visibles. On note la présence de mitoses. Après étude immunohistochimique, ces éléments lymphoïdes expriment nettement CD20 et CD10. Bcl2 et Bcl6 ne sont pas contributifs (plutôt négatifs ou faibles). CD3 et CD5 sont négatifs mais marquent un fond de petits lymphocytes T réactionnels. MUM1 est positif sur environ 30 % des cellules. CD30 est négatif. Ki67 montre près de 100 % de cellules en cycle. L'hybridation *in situ* avec la sonde EBER ne montre pas d'expression du virus EBV. L'examen conclut en un aspect histologique s'accordant avec une forme inclassable de lymphome intermédiaire, entre le lymphome de Burkitt et le lymphome à grandes cellules B.

Bilan d'extension

L'examen clinique ne révèle ni adénopathie ni hépato-splénomégalie.

Le bilan biologique montre :

- Une concentration sérique en LDH normale.
- Une concentration sérique en IgG et en IgA, légèrement augmentée à 18,9 et 3,38 g/L respectivement.

Le myélogramme ne montre pas d'infiltration lymphomateuse suspecte. La biopsie ostéo-médullaire est également indemne d'infiltration lymphomateuse.

Les ponctions lombaires sont indemnes d'infiltration lymphomateuse.

Le bilan d'imagerie est complété par une tomographie par émission de positrons qui révèle l'atteinte amygdalienne bilatérale à franche prédominance gauche, avec une lésion intensément hypermétabolique dont la SUV est mesurée à 20,2 ; sans lésion par ailleurs.

Ce bilan d'extension permet de classer ce lymphome en un stade IV de Ann Arbor avec un IPIaa à 1.

Résumé de la prise en charge

Après une première cure de chimiothérapie probabiliste, réalisée dans l'attente du diagnostic final le 16 juillet 2014, puis une chimiothérapie de type R²COPADEM s'est déroulée jusqu'au 3 novembre 2014.

La première réponse complète a été mise en évidence le 2 octobre 2014 par une tomographie par émission de positrons confirmant l'obtention d'une réponse complète avec un 5PS à 1.

Patient 1630

Résumé clinique

Ce patient est un homme de 86 ans. Le diagnostic de LBDGC a été porté à la suite d'un scanner thoraco-abdomino-pelvien réalisé dans le cadre d'un bilan pour altération général et de dyspnée d'étiologie cardiaque. L'examen anatomopathologique réalisé sur la biopsie de l'amygdale gauche du patient conclut, le 24 novembre 2015, en un LBDGC non GC.

Examen anatomopathologique

À l'examen macroscopique, la pièce de biopsie observée est constituée d'un tissu beige de consistance ferme. À l'analyse microscopique, le tissu lymphoïde amygdalien est homogénéisé par une prolifération de cellules lymphoïdes de taille moyenne à grande, disposées en nappes cloisonnées par de fins septa fibreux. Ces éléments sont munis d'un cytoplasme d'abondance variable et d'un noyau ovoïde pourvu d'un ou de plusieurs nucléoles proéminents. On observe des corps de nécrose monocellulaire et des images de mitose. Ces éléments expriment CD20, MUM1, Bcl-2, Bcl-6 (50 %) et Ki67 (> 95 %), mais n'expriment pas CD5, CD10, CD30 et EBER (EBV).

L'examen conclut en une localisation amygdalienne gauche d'un lymphome diffus à grandes cellules B non GC.

Bilan d'extension

Le bilan biologique révèle :

- Une lymphopénie à 0,67 G/L.
- Une concentration sérique en LDH de 374 UI/L.
- Une électrophorèse des protéines sériques montre une discrète immunoglobuline M monoclonale λ avec un dosage des IgM sériques normal.

Le scanner thoraco-abdomino-pelvien révèle une adénopathie de 2 cm dans le médiastin antérosupérieur gauche. Il montre également une lésion solide, infiltrante, mal limitée de 4 centimètres présentant une base d'implantation sur le péricarde et s'étendant sur l'oreillette droite, ainsi qu'une hypertrophie amygdalienne gauche.

Ce bilan d'extension permet de classer ce lymphome en un stade IV de Ann Arbor avec un IPIaa à 3.

Résumé de la prise en charge

Le patient est décédé le 26 novembre 2015, avant tout traitement par chimiothérapie.

Patient 1632

Résumé clinique

Ce patient est un homme de 19 ans. Le diagnostic de LBDGC a été porté à la suite d'une consultation pour une masse cervicale droite. Le 27 novembre 2015, un examen anatomopathologique réalisé sur un curage ganglionnaire conclut en un LBDGC non-GC.

Examen anatomopathologique

L'examen macroscopique du curage jugulo-carotidien trouve 9 ganglions. Le plus volumineux mesure 7 x 3 cm ; il est entouré d'une épaisse capsule blanchâtre. À la coupe, il est de couleur beige, remanié par des foyers hémorragiques et nécrotiques. L'examen histologique montre une infiltration du tissu lymphoïde ganglionnaire par des cordons qui injectent volontiers les sinus et des nappes peu cohésives, qui sont constituées de cellules lymphoïdes de grande taille. Il s'agit de cellules très atypiques, parfois monstrueuses, munies d'un abondant cytoplasme et d'un volumineux nucléole aux contours parfois très irréguliers. Ces éléments expriment CD20, CD30, MUM1, Bcl-2 (rares cellules) et Ki67. Ils n'expriment pas EMA, ALK1, CD10, CD23, Bcl-6, CD5 et EBER. Les petits lymphocytes T sont marqués par les anticorps anti-CD2, anti-CD3, anti-CD5 et anti-CD7. L'étude immunohistochimique complémentaire montre un marquage intense des cellules lymphomateuses par l'anticorps anti-PAX5 et focale avec l'anticorps anti-CD15 (cellules isolées éparées). L'examen anatomopathologique conclut en un lymphome B diffus à grandes cellules B (variante anaplasique).

Bilan d'extension

Un scanner cervico-thoracique révèle une masse ganglionnaire du creux sus claviculaire droit mesurant 52 x 38 x 36 mm, sans envahissement des vaisseaux.

Une tomographie par émission de positrons montre un volumineux conglomérat d'adénopathies cervicales droites mesurant 50 x 49 mm dont la SUV max est à 23, sans autre foyer hyper-métabolique.

L'examen biologique quantifie une lymphopénie à 0,9 G/L avec des LDH normaux.

L'immunophénotypage des lymphocytes circulants ne détecte pas de population clonale.

La biopsie ostéo-médullaire est indemne d'infiltration.

Un scanner cervico-thoraco-abdomino-pelvien réalisé le 16 décembre 2015 montre la disparition de la masse cervicale. Il révèle notamment la présence de deux nodules demi-centimétriques du lobe pulmonaire inférieur droit ; l'un partiellement calcifié et nécessite une surveillance rapprochée mais reste stable par rapport au précédent examen. Le scanner révèle également une panculite mésentérique minime avec présence de quelques ganglions lomboaortiques infracentimétriques et des petits nodules hypodenses au sein du parenchyme hépatique, probablement bénin, mais nécessitant une surveillance également dans le contexte.

Le score de Ann-Arbor résultant est à I A et l'IPIaa à 0.

Résumé de la prise en charge

Le patient a été traité par 6 cures de chimiothérapie R-CHOP du 23 décembre 2015 au 6 avril 2016.

La première réponse complète a été mise en évidence le 3 février 2016 par une tomographie par émission de positrons confirmant l'obtention d'une réponse complète avec un 5PS à 1.

Patient 1634

Résumé clinique

Ce patient est un homme de 60 ans. Le diagnostic de LBDGC a été porté à la suite de la consultation pour une masse cervicale droite évoluant en volume. L'examen anatomopathologique réalisé sur la biopsie de cette masse conclut le 7 septembre 2015 en un LBDGC de sous-type GC.

Examen anatomopathologique

En tout, six fragments sont analysés en macroscopie. Ils mesurent de 0,1 à 1,5 cm. L'analyse après fixation dans le formol montre une prolifération néoplasique maligne qui dissocie et détruit le muscle strié. Il s'agit de cellules de taille moyenne, largement apoptotiques, disposées en cordons et en thèques ébranlées. Ces éléments ont un cytoplasme d'abondance variable qui entoure un noyau ovoïde, pourvu d'une chromatine dense et parfois de petits nucléoles. Ces éléments expriment CD20, CD10, Bcl-6 (30 %) et Ki67 (100 %). Ils n'expriment pas MUM1, Bcl-2, CD30, TdT, cytokeratine (AE1/AE3) et EBER (EBV).

L'examen conclut dans un premier temps, en la présence d'un lymphome B agressif inclassable qui se révélera être un lymphome B diffus à grande cellule de type GC, sans autre spécificité après analyse cytogénétique.

Bilan d'extension

Le bilan biologique mesure des LDH à 638 UI/L.

Le myélogramme ne révèle pas d'infiltration lymphocytaire suspecte.

Un immunophénotypage des lymphocytes B sanguins et médullaires n'identifie pas de population clonale.

La biopsie ostéo-médullaire est indemne d'infiltration lymphomateuse.

L'examen du scanner thoraco-abdomino-pelvien révèle :

- Une masse cervicale droite hétérogène avec une partie nécrotique sous angulo-maxillaire probablement développée aux dépens de la région parotidienne profonde.
- Une hypertrophie de la sous maxillaire droite avec des formations ganglionnaires multiples jugulo-carotidiennes droites associées.
- Une absence d'autre anomalie, notamment d'adénopathie thoraco-abdo-pelvienne.

La tomographie par émission de positrons montre :

- Un volumineux conglomérat ganglionnaire cervical droit, hyper-métabolique refoulant la sphère laryngo-pharyngée, sans l'envahir.
- Une absence d'hyper-métabolisme suspect au niveau de la sphère ORL, notamment au niveau de la base de la langue.
- Aucun autre foyer hyper-métabolique.

Ce lymphome est donc de stade Ann-Arbor I avec un IPIaa à 1.

Résumé de la prise en charge

Le patient a été traité par 6 cures de chimiothérapie R-CHOP du 2 septembre au 2 décembre 2015.

La première réponse complète a été mise en évidence le 30 septembre par une tomographie par émission de positrons.

Patient 1638

Résumé clinique

Ce patient est une femme de 46 ans. Le diagnostic de LBDGC a été porté à la suite d'un scanner thoraco-abdomino-pelvien réalisé dans le cadre d'un bilan pour symptomatologie pulmonaire. L'examen anatomopathologique réalisé sur la biopsie d'un nodule pulmonaire conclut le 8 octobre 2014, en un lymphome B, probablement de la zone marginale, reclassé par la suite en LBDGC.

Examen anatomopathologique

L'examen histologique révèle que le parenchyme pulmonaire est totalement remanié par une fibrose associée à des nodules ou des plages très cellulaires riches en cellules de taille moyenne à grande au cytoplasme souvent rétracté. L'examen immunohistochimique révèle que ces nodules ou plages très cellulaires comportent de nombreux lymphocytes B (CD20+) de taille moyenne à grande, qui sont CD5-, CD10- et CD30-. BCL2 et BCL6 marquent quelques cellules isolées. L'index de prolifération cellulaire étudié avec le Ki67 (MIB1) est élevé, avec un marquage focalement dense. La recherche des ARN de latence EBER d'EBV est négative. Ces nodules ou plages sont parsemés de petits lymphocytes T (CD3+), de macrophages (CD68+), de rares et éparses cellules dendritiques (PS100+) et de rares cellules broncho-pulmonaires résiduelles (KL1+). L'examen conclut en un aspect évocateur d'un lymphome B, probablement de la zone marginale.

Bilan d'extension

Le bilan biologique révèle :

- À l'électrophorèse des protéines sériques, une IgM monoclonale κ dosée à 2,44 g/L.
- Une calcémie corrigée, discrètement augmentée à 2,57 mmol/L.
- Des LDH à 346 UI/L.
- Une β 2-microglobuline à 3,39 mg/L.
- Une lymphopénie quantifiée à 0,72 G/L, ainsi qu'une anémie normocytaire à 10,8 g/dL.

Un immunophénotypage des lymphocytes B sanguins ne révèle pas de population clonale.

La biopsie ostéo-médullaire est indemne d'infiltration lymphomateuse.

L'examen du scanner thoraco-abdomino-pelvien révèle en :

- Une augmentation de la taille des masses pulmonaires intra-parenchymateuses.
- Une splénomégalie à 15,3 cm.
- Une adénomégalie hilare droite de 14 mm.

Le 8 octobre 2014, le bilan d'imagerie est complété par une tomographie par émission de positrons. Cette dernière révèle trois nodules pulmonaires positifs avec des SUV importantes à 21, 23,6 et 19,5 accompagnés d'une petite adénopathie sous-carénaire avec un SUV max à 7,6. Devant ces résultats, il est affirmé une transformation de ce lymphome de la zone marginale, en un lymphome B diffus à grandes cellules.

Ce lymphome est donc de stade Ann-Arbor IV avec un IPIaa à 2.

Résumé de la prise en charge

La patiente est en traitement depuis le 31 octobre 2014 et n'a toujours pas atteint la rémission complète. Elle a bénéficié de plus de six lignes de chimiothérapies.

Partie 3

Méthode de séquençage massif en parallèle des gènes EZH2, TP53, CD79B, CARD11 et MYD88

3.1 Introduction

La première partie de notre étude a permis de connaître les principales mutations conductrices et actionnables retrouvées dans les lymphomes B diffus à grandes cellules. En accord avec les recommandations de l'Institut national du cancer (INCa), nous avons décidé de mettre en place au sein du Laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Dijon, une méthode de séquençage massivement parallélisé d'un panel de gènes dont l'identification des mutations ponctuelles se sont révélées utiles à la prise en charge des patients atteints de LBDGC.

Cette méthode se déroule en trois phases. La première permet de préparer les échantillons en vue de leur séquençage. Cette phase de pré-séquençage part d'un bloc de paraffine comprenant les cellules néoplasiques et aboutit à une suspension de fragments d'ADN qui sont les amplicons des gènes d'intérêt sélectionnés par l'enrichissement ciblé. Cette solution est appelée bibliothèque. La deuxième phase est constituée par le séquençage, elle est entièrement réalisée par l'automate NGS MiSeq d'Illumina et dure plus de 24 heures. La troisième étape est l'analyse informatique des données issues du séquençage et aboutit à la production d'un fichier listant les mutations.

3.2 Étapes de pré-séquençage

3.2.1 Extraction et purification de l'ADN sur échantillons FFPE

L'extraction et la purification de l'ADN total à partir de tissus fixés à la formaline et enrobés de paraffine (FFPE) a été réalisée sur l'automate QIASymphony selon la méthode du fabricant QIAGEN en utilisant le protocole pour faible teneur en ADN [194].

Cette méthode se fait en quatre étapes entièrement automatisées. Elle enchaîne une étape de lyse, une étape de fixation des ADN à des billes magnétiques, une étape de lavage et une dernière étape d'élution.

Les ADN sont ainsi transférés entre les différentes solutions de réactif par des billes magnétiques aimantées. Cette méthode permet un grand rendement par rapport aux autres techniques.

3.2.2 Qualification des ADN

La méthode de qualification des ADN est celle de la quantification basée sur la mesure de la fluorescence d'un réactif, le PicoGreen. Il va se fixer sur l'ADNdb avec une sensibilité de

250 pg/mL sans sélectivité pour les liaisons A-T ou G-C (contrairement au DAPI) [195]. La fluorescence est ensuite lue par un fluoromètre de paillasse. Cette méthode est plus sensible et plus spécifique que la méthode par spectrophotométrie d'absorbance à 260 nm qui ne distingue pas l'ADN de l'ARN (tel le Nanodrop) des protéines [196] ou que d'autres méthodes de fluorométrie basées par exemple sur le DAPI [197].

Tableau I – Concentrations d'ADN extraits pour chacun des échantillons.

Échantillon	ADN en ng/ μ L
1602	257
1619	456
1622	226
1623	38,8
1625	227
1626	167
1630	55,6
1632	550
1634	26,1
1638	550

Les ADN sont ensuite dilués dans une quantité d'eau en fonction de leur concentration initiale afin d'arriver à une concentration de 10 ng/ μ L dans 100 μ L d'eau.

3.2.3 Enrichissement ciblé

Nous avons réalisé un enrichissement ciblé afin de choisir les régions du génome qui seront séquencées.

Amplification en chaîne par polymérase des échantillons d'ADN (PCR) sur les gènes à séquencer

Principe : La technique d'amplification par PCR permet de dupliquer en grand nombre, des séquences d'ADN comprises entre deux amorces (*primers*). Cette technique a été découverte en 1986, par Kerry Mullis. Elle lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993.

Dans la PCR, la réaction d'amplification se fait par cycle au sein d'un appareil appelé un thermocycleur. L'étape initiale est toujours identique. Elle consiste à dénaturer l'ADN source aussi appelé matrice, c'est-à-dire de transformer cette molécule d'ADN de la forme bicaténaire à deux molécules monocaténaires. Cette étape est réalisée par le chauffage de la solution comprenant l'ADN à 95 °C, pendant 15 minutes.

Par la suite, des cycles identiques vont s'enchaîner. Chacun des cycles est composé de plusieurs phases, la première est une phase d'hybridation des amorces sur l'ADN matrice, qui se réalise par le refroidissement du milieu. La température et la durée du plateau de température à atteindre sont fonction de la longueur des amorces, de leur proportion en base guanine et cytosine, de la position de ces bases entre elles, de leur concentration, de la concentration en ADN source et en nucléotide, ainsi que des conditions ioniques du milieu [198].

Après cette phase d'hybridation, la température est remontée pour permettre l'action de la Taq polymérase ; c'est la phase d'élongation. Cette enzyme thermophile polymérise l'ADN. Elle est utilisée dans cette technique car son activité *optimum* se fait entre 75 et 80 °C ; à cette température, elle est capable de polymériser l'ADN à une vitesse de 1.000 bases par minute. Elle utilise comme substrat les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dCTP et dGTP) et a besoin également de magnésium et de potassium pour mener sa réaction enzymatique.

La dernière phase est une phase de dénaturation à 95 °C qui permet d'arrêter la synthèse de l'ADN et de déshybrider le brin d'ADN matrice de celui synthétisé (amplicon). Ces cycles se reproduisent un nombre de fois prédéterminé pour obtenir une quantité voulue d'ADN amplifié. Ainsi n cycles de PCR permettent en théorie de produire 2^n copies de la séquence ciblée.

Si on connaît une séquence nucléotidique encadrant les régions de l'ADN source à amplifier, il est possible de concevoir des amorces ayant des séquences complémentaires, leur permettant de s'hybrider à ces régions ; ce qui permet de choisir la localisation de début d'amplification. Sur l'ADN source, l'élongation va s'arrêter lors du changement de température, et la taille va être plus ou moins variable (durée d'élongation d'au moins une minute par kilo base). Lors du cycle suivant, l'amorce se fixant sur le nouveau brin (anti-sens) va le polymériser dans le sens inverse. La taille des amplicons correspond ainsi, à la distance entre les deux amorces. Au fur et à mesure des cycles, la population majoritaire d'amplicons sera celle choisie sur le génome source, d'une taille comprise entre les deux amorces.

Amorces : Le génome humain est composé d'environ 3,4 milliards de paires de bases. Pour que nos amorces soient spécifiques d'une région d'ADN, il faut donc que statistiquement elles comprennent un minimum de 16 nucléotides ($4^{15} < 3,4 \text{ milliards} < 4^{16}$). Il est cependant recommandé de choisir des tailles comprises entre 18 et 22 nucléotides car la répartition des bases sur le génome n'est pas aléatoire [199] [200]. Ces amorces doivent éviter de comporter des bases variables d'un individu à l'autre, c'est-à-dire des nucléotides du polymorphisme. Elles doivent s'hybrider à l'ADN source de la même façon, si bien que leurs richesses en G-C doivent être identiques et elles ne doivent pas comporter de séquences répétées. Elles doivent également encadrer une région d'ADN source pas trop grande. Il faut de ce fait, diviser les séquences trop longues à amplifier.

Selon ces critères, et au moyen de l'outil en ligne *Genome Browser* de l'Université de Californie Santa Cruz (UCSC) et de l'outil en ligne *ExonPrimer* du centre Helmholtz de Munich, nous avons choisi les séquences d'amorces présentées dans le tableau suivant (tableau II).

Tableau II – Amorces utilisées.

PCR	Gène	Exons	Sens	Séquence	Taille des amplicons	Durée d'élongation
PCR #1	CD79B	4 à 5	Sens	TGAGGACAATGGCATCTACTTC	876	1 min
			Anti-sens	ATGTCCTCATAGGTGGCTGTC		
PCR #2	EZH2	2 à 3	Sens	GCTTGATAGCAGAAACCCCTC	1788	2 min
			Anti-sens	TGGGGTTACAACAGTGAGTCAG		
PCR #3	EZH2	4 à 8	Sens	AGTATGGGAAGGGTTGGAGG	6711	7 min
			Anti-sens	GCAAAAGATTTTCAGAGCAATCC		
PCR #4	EZH2	9 à 15	Sens	GAGAAATCACGACTCATTCCAG	6202	7 min
			Anti-sens	TCAGAATTTGCTGGTTTCTCC		
PCR #5	EZH2	16 à 20	Sens	TCACTTGGGGAAAGTAGAGGG	4802	5 min
			Anti-sens	CCTGAAAGCAGTTATTGACACG		
PCR #6	CARD11	4 à 5	Sens	AAAATAACGCTCACCAAATCC	2318	2 min 30
			Anti-sens	CCTTAATTCATTTGCGGAGTG		
PCR #7	CARD11	6 à 9	Sens	CAGGAACTCTCCATCAACAGG	3277	3 min 30
			Anti-sens	GCACCTGGCTTCTGGTTTG		
PCR #8	CARD11	10 à 11	Sens	CATTAGGCTGGACTGATGGG	2610	3 min
			Anti-sens	GAGGGTCAAAGAGTCCTTTTCG		
PCR #9	CARD11	12 à 14	Sens	GTTAGAAGGAGGTTGGGGATG	3692	4 min
			Anti-sens	AAGCTCACAGGGCATCTCTC		
PCR #10	MYD88	3 à 4	Sens	GTGGTGTTAAGAGCATGGGTG	1697	2 min
			Anti-sens	AGCATGTAGTCCAGCAACAGC		
PCR #11	TP53	1 à 9	Sens	AGAGGGAGTGGTTGTTAAGAGATG	4179	4 min 30
			Anti-sens	TTTGAAAGCTGGTCTGGTCC		
PCR #12	TP53	8 à 11	Sens	AAGGGTGGTTGGGAGTAGATG	4622	4 min 30
			Anti-sens	TTGTAAACTAACCTTAAGTCAAG		

Nous avons réalisé ces 12 PCR à partir de l'ADN extrait sur les échantillons à l'étape précédente.

3.2.4 Vérification des produits de PCR

Les produits de PCR sont déposés sur des gels d'agarose à 1 %, puis une électrophorèse est réalisée. Cette électrophorèse, nous permet après révélation, de vérifier la taille et la qualité attendues des ADN.

3.2.5 Groupage des produits de PCR par patient

Les 12 produits de PCR sélectionnés vont être groupés par patient afin de réaliser un pool. Nous avons groupé les produits de PCR, en fonction de leur taille en prenant 1 μ L par kb. Cette stratégie a été adoptée pour deux raisons. D'une part, parce que les rendements de PCR sont moins bons pour les PCR longues ce qui résulte en une concentration finale en amplicon plus faible. D'autre part, parce qu'il est nécessaire pour maintenir un taux de couverture suffisant lors du séquençage d'avoir une plus grande quantité d'amplicons longs car ils contiennent plus d'informations à séquencer.

3.2.6 Purification du pool et dosage de la quantité d'ADN de chaque pool

Pour éliminer les restes d'amorces, de nucléotides, de polymérase et d'ions de la PCR, qui peuvent par la suite interférer avec le séquençage, nous avons utilisé le kit « QIAquick PCR Purification Kit » de chez Qiagen en appliquant le protocole préconisé par le fabricant [194].

Nous avons dosé la quantité d'ADN présents dans chaque pool, au moyen de la méthode utilisée lors de la phase initiale de qualification des ADN.

Les résultats sont les suivants :

Tableau III – Liste des concentrations d'ADN extraits, pour chacun des échantillons.

Échantillon	ADN en ng/ μ L
1602	21,5
1619	17,4
1622	19,8
1623	18,2
1625	16,6
1626	21,4
1630	21,1
1632	25
1634	20,7
1638	21,1

Les ADN sont ensuite dilués dans une quantité d'eau en fonction de leur concentration initiale, afin d'arriver à une concentration de 0,2 ng/ μ L dans 100 μ L d'eau.

3.2.7 Génération des bibliothèques d'ADN, selon la méthode Nextera d'Illumina

Le but de cette méthode est de préparer l'ADN source, pour qu'il soit séquençé par l'automate de NGS MiSeq. Cette préparation consiste à fragmenter l'ADN source en tronçons de taille identique et d'ajouter de part et d'autre de ces fragments, une séquence nucléotidique spécifique à chacun des patients (index) permettant d'étiqueter leurs ADN et ainsi de les grouper dans la même solution. Cette méthode ajoute également une séquence d'adaptateurs nécessaires aux étapes de séquençage. Ces étapes ont été réalisées selon le protocole Nextera [201] (figure 3.1).

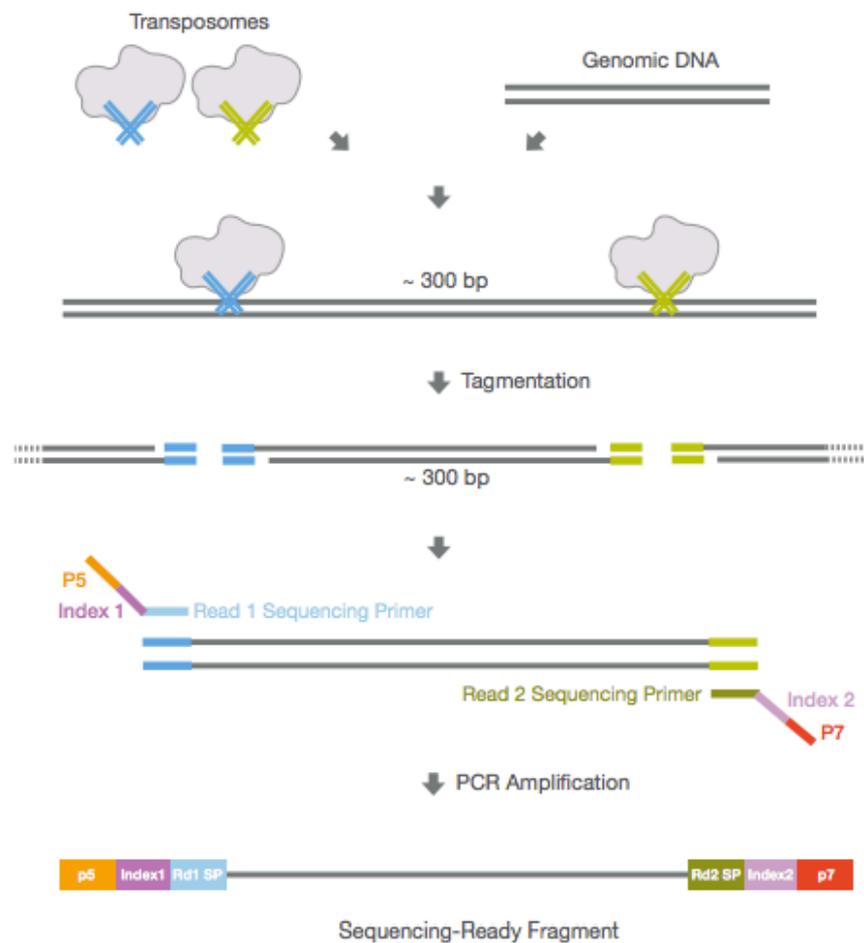


Figure 3.1 – Étapes de préparation de la bibliothèque selon la technique Nextera.

Tagmentation de l'ADN source

Cette première étape utilise des enzymes appelées transposomes qui vont fragmenter l'ADN source, toutes les 300 paires de bases, en ajoutant de part et d'autre des fragments, une séquence nucléotidique appelée « tag ».

Cette réaction se fait avec une quantité d'ADN préconisée de 1 ng soit 5 µL de la solution précédente (c'est-à-dire environ l'équivalent de 279 copies du génome humain).

Amplification par PCR

Cette étape permet d'amplifier l'ADN fragmenté et d'ajouter les index et les adaptateurs sur les fragments. Pour cela, les amorces de séquençage sont complémentaires des tags précédemment ajoutés par les transposomes. Ces amorces contiennent une séquence non complémentaire des tags

qui comporte les index et les adaptateurs p5 et p7. Ces amorces seront incorporées à l'amplicon lors de l'élongation.

Purification par billes magnétiques

Cette technique permet de sélectionner les amplicons de PCR, d'éliminer les réactifs et les oligonucléotides des amorces et d'éluer les amplicons dans un volume plus petit (figure 3.2). À la suite de cette étape, nous avons ajouté à la méthode Nextera, le dosage des différentes quantités d'ADN afin de vérifier le bon déroulement des étapes précédentes.

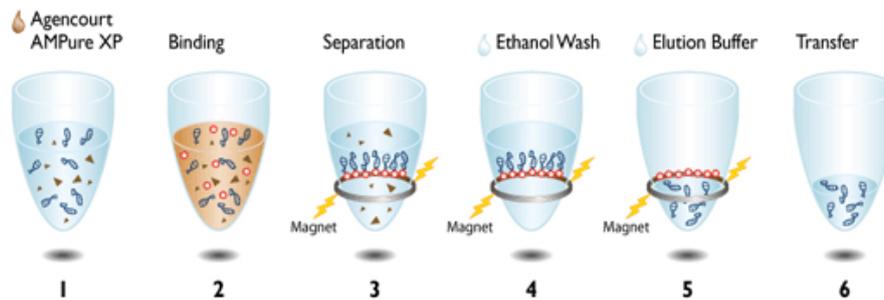


Figure 3.2 – Schéma du principe de purification par billes magnétiques.

Normalisation et groupage des échantillons en pool

Dans un premier temps, une étape de normalisation des quantités d'ADN permet d'éviter la sur-représentation d'un échantillon par rapport à un autre.

Dans un deuxième temps, les échantillons patients sont groupés dans la même solution et les ADN sont dénaturés pour obtenir des brins monocaténares.

3.3 Séquençage massif en parallèle

La technique de séquençage massif en parallèle permet de séquencer simultanément, tous les fragments d'ADN source. Elle se fait en deux grandes étapes, la première est la génération de *cluster* de fragments identiques en séquence et la seconde est le séquençage par cycle lecture-lavage. Ces étapes sont entièrement automatisées par l'automate MiSeq.

3.3.1 Génération des clusters par amplification en pont

Cette étape est réalisée par l'automate sur une plaque de verre appelée *flow cell*. L'objectif de cette étape est de permettre la génération d'un amas de fragment d'ADN de séquence identique sur un même secteur de la *flow cell*. Il existe différentes tailles de *flow cell*. Pour les besoins de notre méthode, nous avons choisi la *flow cell* standard permettant de lire 15 millions de fragments différents en 26 heures.

Cette *flow cell* est composée d'un maillage d'oligonucléotides. Ces oligonucléotides sont de deux types, l'un est un oligonucléotide complémentaire des adaptateurs p5, l'autre un oligonucléotide complémentaire des adaptateurs p7. Ils sont fixés de façon covalente à la plaque de verre, par une de leurs extrémités, ce qui permet aux fragments d'ADN source, lors de leur mise en

contact avec la *flow cell* de s'hybrider aux oligonucléotides. Ces fragments d'ADN source sont ainsi fixés par une de leurs extrémités à la *flow cell*; leurs autres extrémités étant libres. Les oligonucléotides fixés sur la *flow cell* doivent être en excès par rapport aux fragments d'ADN source.

Après cette hybridation, une étape d'élongation est réalisée avec pour amorce les oligonucléotides fixés sur la *flow cell* (figure 3.3 (a)). Le brin copié va donc être sur la même molécule que l'oligonucléotide amorce et ainsi être lié de façon covalente à la *flow cell*. Enfin, une étape de déshybridation par chauffage et un lavage permettent d'éliminer le fragment source (figure 3.3 (b)).

Par la suite, une nouvelle hybridation est réalisée cette fois entre l'extrémité libre du fragment d'ADN qui vient d'être polymérisé et un oligonucléotide adjacent sur la *flow cell*. Ce fragment d'ADN forme ainsi un pont (oligonucléotide complémentaire de p7, si l'oligonucléotide de l'étape précédente était complémentaire de p5 et *vice et versa*) (figure 3.3 (c)). Il s'ensuit une étape d'élongation puis de déshybridation-lavage (figure 3.3 (d) et (e)).

Ces étapes successives d'hybridation en pont, d'élongation, puis de déshybridation-lavage vont s'enchaîner et aboutir à la saturation des oligonucléotides de la *flow cell* (figure 3.3 – f). Elles vont générer plus de 1000 copies du brin original, en environ 2 heures.

La dernière étape sélectionne uniquement les fragments d'ADN amplifiés à partir des oligonucléotides complémentaires de p7 par clivage des fragments fixés sur p5. Ces fragments sont nommés par convention « fragment sens » (*forward*).

Chaque fragment d'ADN source est ainsi amplifié. Après ces différentes étapes, une surface précise de la *flow cell* va être composée de la même séquence nucléotidique.

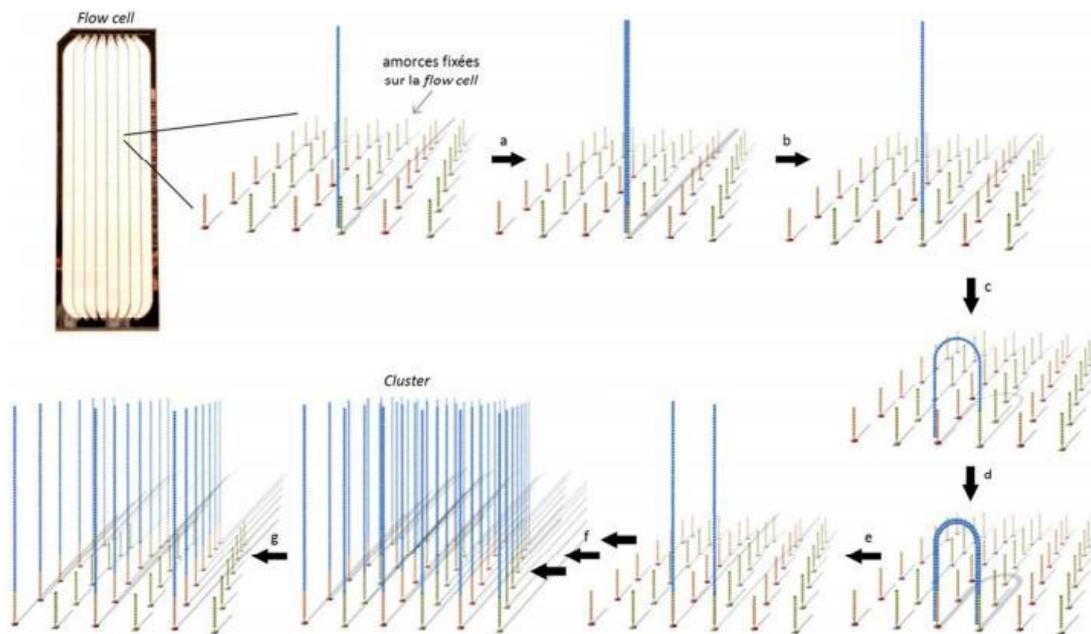


Figure 3.3 – Représentation des différentes étapes d'amplification en pont, aboutissant à la formation d'un clone d'ADN en amas.

3.3.2 Séquençage

Le séquençage s'effectue sur des millions de *cluster* en parallèle (figure 3.4).

Le séquençage des brins sens s'effectue par l'enchaînement de cycles de lecture-lavage.

Tout d'abord, les extrémités libres (3') sont bloquées et l'automate ajoute les réactifs. Ces derniers sont composés par des nucléotides terminant marqués par un fluorochrome de couleur spécifique à leur base (une couleur par base), par des amorces de séquençage et par des ADN polymérase. Les amorces s'hybrident ensuite aux fragments d'ADN ; la polymérase se fixe et initie l'extension du fragment d'ADN en incorporant un premier nucléotide. Ce nucléotide bloque l'extension. Un laser rouge va alors exciter les fluorochromes A et C et un laser vert, les fluorochromes G et C. L'émission est donc lue sur quatre longueurs d'ondes différentes. La caméra, par un jeu de filtres acquiert quatre images de la *flow cell*. Chaque image a pour intensité de pixel l'intensité d'émission du fluorochrome spécifique à chacune des quatre bases. Enfin, la partie bloquante du nucléotide incorporé va être éliminée, tout comme son fluorochrome. Un nouveau cycle débute enfin après une phase de lavage. Ce cycle est répété 150 fois.

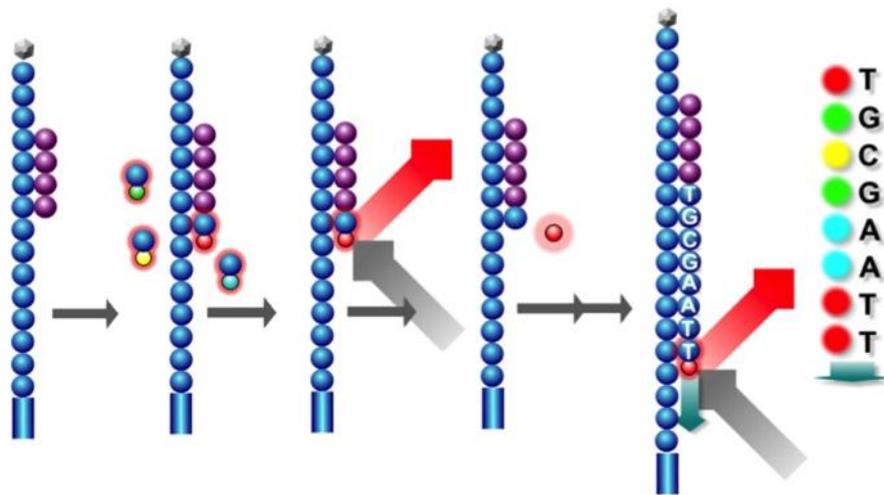


Figure 3.4 – Étapes de séquençage selon la technique des oligonucléotides terminant marqués réversibles.

Le séquençage des brins anti-sens se fait après une nouvelle amplification en pont qui se termine par la sélection des brins anti-sens et par un nouveau séquençage.

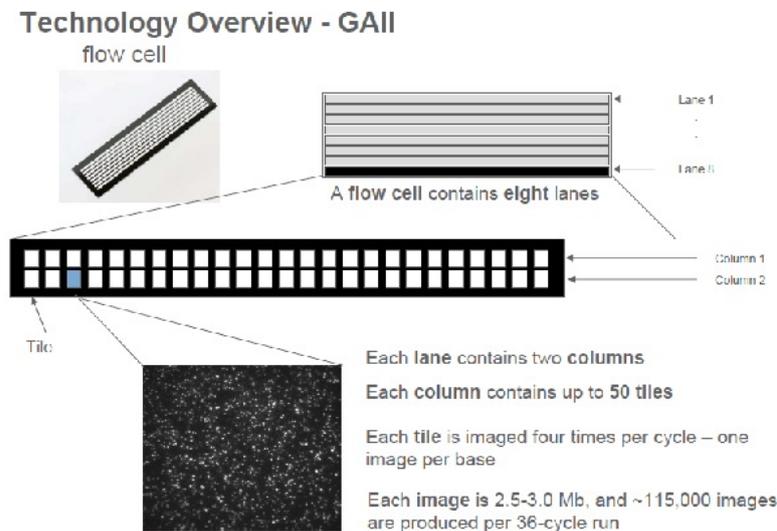


Figure 3.5 – Schéma du principe de lecture de la flow cell, en bas une image prise par la caméra de l'automate sur une longueur d'onde lors de l'acquisition montrant les clusters (ce schéma représente la flow cell d'un GenomeAnalyze II qui est la première version du MiSeq).

3.4 Analyse informatique des résultats

Hormis la première étape d'analyse des données qui est réalisée par l'automate, les étapes suivantes sont réalisées en externe par la Société Sophia Genetic. Cette solution a été choisie car l'analyse des données de séquençage nécessite d'une part des capacités de calcul importantes qui ne sont pas accessibles facilement au CHU de Dijon, et d'autre part du travail de bio-informaticiens spécialisés, pouvant maintenir à jour les logiciels et développer des nouvelles solutions. Un *pipeline* d'analyse informatique a cependant été développé en interne durant la mise au point de la méthode. Il a permis de vérifier les résultats.

3.4.1 Génération des séquences par patient

Un premier algorithme informatique permet pour chaque cycle de séquençage, à partir des quatre images de la *flow cell* d'identifier les *clusters*, de leur attribuer une lettre correspondant à la base identifiée et d'y associer un score correspondant à la qualité d'identification de la base. Ce score équivaut à la probabilité que la base identifiée soit la base réelle. Cet algorithme est répété pour chacun des cycles ce qui permet d'identifier la séquence nucléotidique de chaque *cluster*. L'identification sur chacun des *clusters* de la séquence index permet également d'associer chaque séquence aux différents patients. L'algorithme qui calcule le score de qualité est inspiré de l'al-

gorithme *phred* [202] modifié pour utiliser les données d'intensité et de bruit-de-fond spécifiques à cette technique.

Cet algorithme génère un fichier texte appelé « fastQ », pour chaque patient. Ce fichier est constitué d'un bloc de données de quatre lignes pour chaque *cluster*. La première ligne correspond à l'identifiant de la séquence (position du *cluster*, sens de lecture, index du patient), la deuxième correspond à la séquence nucléotidique du *cluster*, la troisième correspond à l'identifiant du score de qualité (qui peut être uniquement constitué d'un signe « + », si les lignes se suivent dans le fichier), la quatrième ligne correspond à une séquence de caractères ou chaque caractère équivaut au score de qualité de chacune des bases transcrite sur la première ligne [203]. Par exemple :

```
@M01381 :33 :000000000-A5LDB :1 :1101 :16234 :1611 1 :N :0 :34
CAACGCGGTGTGCGACGAGCTCCACATCTACTGCTCGCGCTGCACGGCCGACC
+
FGG@GGCHHFBGIFHFHFGGF3DEGFFHHHGHHHHHHHHHHHHGHGHEGGGCF
```

3.4.2 Vérification et filtrage de la qualité

Une première vérification de la qualité d'identification des bases se fait avec le programme *FastQc* [204]. Celui-ci permet d'avoir une vision globale des scores de qualité (figure 3.6). Il combine pour chaque cycle, les données de qualité de tous les fragments ; cela permet de vérifier que l'identification des bases dans les derniers cycles ne dépasse pas un seuil d'erreur trop important.

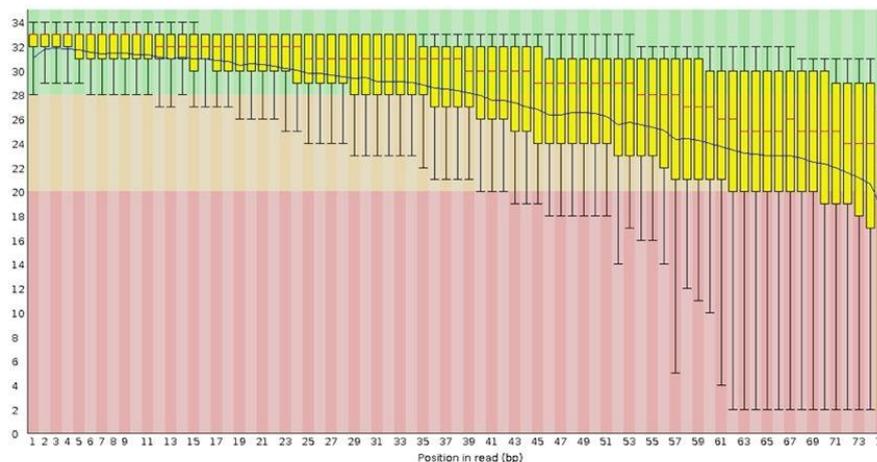


Figure 3.6 – Graphique représentant en ordonnée la qualité d'identification et en abscisse le cycle (ici 75 cycles).

Ensuite, les séquences sont filtrées avec le programme « *cutadapt* ». Un premier filtrage élimine les fins de séquences commençant par une base étant en dessous du score de qualité 25 (probabilité d'erreur de 1/316). Un deuxième filtrage reconnaît les séquences des adaptateurs et des index qui peuvent ne pas avoir été filtrés par l'automate lors de la première phase d'analyse et les élimine.

Une seconde vérification de la qualité est faite, afin que toutes les bases identifiées soient de bonne qualité.

3.4.3 Alignement

Les différentes séquences correspondant aux fragments d'ADN source séquencés sont alignées sur le génome humain de référence en l'occurrence, le génome humain du Genome Reference Consortium (GRC), en version 19, datant de 2009, soit le GRCh37/hg19. L'algorithme utilisé s'inspire de la transformation de Burrows-Wheeler. Le programme qui en découle pour traiter nos données de séquençage s'appelle « bwa-mem ». Il en résulte un fichier de type SAM [205] (figure 3.7). Différents filtrages sur la qualité des alignements sont par la suite appliqués au fichier SAM qui est enfin compressé dans un fichier BAM.

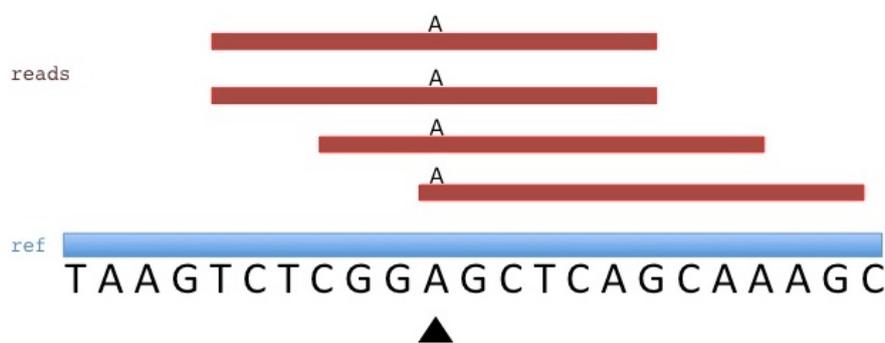


Figure 3.7 – Schéma de l'alignement des fragments séquencés en rouge sur le génome de référence en bleu.

3.4.4 Identification des variants

L'identification des variants est réalisée par le programme « VarScan2 » ou « Mutect » qui génère un fichier *variant call format* VCF. Ce fichier associe à chaque variant : sa position sur le génome de référence, sa fraction allélique, les différents scores de qualité, le nombre de fois où ce variant a été identifié sur les séquences sens et anti-sens, ainsi que le nombre de fois où la base de référence a été identifiée sur les séquences sens et anti-sens.

Durant la dernière étape, le VCF est annoté. Les mutations sont caractérisées par leurs conséquences sur la protéine et par leurs présences dans les bases de données, notamment la base de données du catalogue des mutations somatiques dans les cancers (COSMIC) [206].

3.5 Limites et biais

3.5.1 Biais induits par l'utilisation d'ADN extrait de FFPE

Plusieurs biais résultent de l'utilisation du formaldéhyde dans le traitement des échantillons.

Le premier est la fragmentation de l'ADN qui peut entraîner des rendements faibles d'amplification. Cette fragmentation résulte d'une part de l'utilisation de formaldéhyde et d'autre part de mauvaises conditions de stockage des échantillons. Le formaldéhyde, surtout à faible pH, augmente la formation de base apurinique ou apyrimidinique [207], puis aboutit à la fragmentation de l'ADN. L'environnement quant à lui, concourt également à la fragmentation de l'ADN des échantillons, par l'action de la chaleur et des UV.

Une autre source de biais provient de l'augmentation du taux d'erreur dans l'amplification de l'ADN, lors de la PCR. En effet, sur des échantillons d'ADN de tissus frais, le taux d'erreur est de $1/10^5$ bases. Dans les échantillons FFPE, ce taux passe à $1/500$ bases [208]. La majorité des erreurs provient de la désamination hydrolytique causée par le formaldéhyde. Cette réaction chimique fait passer la cytosine en uracil ou en thymine si cette cytosine est méthylée, cela entraîne des erreurs C>T (et G>A) [209]. Le formaldéhyde peut également rendre les nucléotides qui composent l'ADN apuriniques ou apyrimidiniques, principalement dans les zones riches en A-T, lors de l'amplification de l'ADN par la Taq polymérase qui va insérer des adénines au niveau des bases manquantes.

Plusieurs solutions pour contrôler les problèmes de fragmentation sont possibles : la conservation des échantillons dans une salle tempérée et à l'abri de la lumière, l'utilisation de préparation de formaldéhyde ayant un pH le plus neutre possible, l'utilisation de taille d'amplicons plus courte et au mieux la réalisation de PCR nichée.

3.5.2 Artefacts de PCR

Les artefacts de PCR entraînent des erreurs de deux types, soit des erreurs de reproduction de la séquence nucléotidique, soit des biais qui déforment la distribution des produits de PCR aboutissant à une sur-représentation d'un amplicon par rapport aux autres.

Les erreurs d'amplification peuvent aboutir à la formation de molécules chimériques notamment des hétéroduplexes. La formation de molécules chimériques se produit principalement lorsque la concentration en produit de PCR augmente. Plusieurs mécanismes peuvent aboutir à la formation de ces molécules. Elles surviennent lorsque des produits de PCR incomplets agissent comme amorce sur des séquences hétérologues, ou lorsque la dénaturation n'est pas complète et que la polymérase continue sur le brin complémentaire encore en partie hybridé.

Plusieurs facteurs favorisent la survenue d'erreur :

- Une concentration forte en Mg^{++} et en dNTP.
- Un nombre élevé de cycles (les PCR nichées ont un taux d'erreur divisé par deux).
- Une faible quantité d'ADN initiale.
- L'absence d'activité de *proofreading*.

Une solution idéale permettant de filtrer les mutations résultant d'erreurs d'amplification serait de réaliser deux PCR indépendantes et par extension, de traiter tous les échantillons à analyser en *duplicate*. Cette solution permettrait de filtrer les mutations non reproduites, car la probabilité de reproduire les mêmes erreurs est faible [210]. L'utilisation de l'uracil-DNA glycosylase (UDG) limite également les erreurs ; elle divise par deux le nombre de mutations [209] [211].

3.5.3 Artefacts induits par le séquençage sur MiSeq

Il existe différents biais induits par le séquençage sur MiSeq. Les erreurs de couverture entraînent une déviation de la distribution uniforme du nombre de lecture par base séquencée. Les autres erreurs sont des erreurs de précision dans l'identification d'insertion, de délétion et de mutation ponctuelle.

La technique utilisée porte en elle, plusieurs sources de bruits s'ajoutant au signal des *clusters*; cela peut entraîner des faux-positifs de substitution.

Un des biais provient du fait que seules deux longueurs d'ondes d'excitation sont utilisées pour lire les bases, une rouge pour les bases A et C et une verte pour les bases G et T. Cela entraîne ainsi, tout comme en cytométrie de flux, une fuite de l'intensité d'émission d'un fluorochrome dans la fenêtre de détection de l'autre fluorochrome (figure 3.8 – d). Ce problème est source de faux-positif par la substitution de A>C, C>A et de G>T, T>G.

Une autre source de bruit émerge des problèmes de déphasage et de pré-phasage lors des cycles de polymérisation et entraîne également un bruit de fond dans le signal du *cluster* (figure 3.8 – b). Ces problèmes surviennent lorsque certains brins du *cluster* sont en avance ou en retard dans leur polymérisation par rapport aux autres brins du *cluster*. Les problèmes de déphasage sont dus entre autres, à une mauvaise élimination des parties terminantes ou des fluorochromes présents sur les nucléotides. Cette mauvaise élimination entraîne un retard de polymérisation du brin touché par rapport aux autres brins du *cluster*. Les problèmes de pré-phasage induisent quant à eux, une avance dans la polymérisation du brin touché qui peuvent être causés par un mauvais lavage des réactifs à la fin d'un cycle, ou par l'absence de partie terminante sur un des nucléotides incorporés [212].

Une dernière source de bruit provient de la perte des brins par leur décrochement de la *flow cell*, qui au fur et à mesure des cycles va diminuer le signal du *cluster* (figure 3.8 – c).

La survenue d'erreur est proportionnelle au nombre de cycles de séquençage; la taille du fragment qui va pouvoir être séquencé est donc limitée par le nombre de cycles.

Les artefacts sont généralement contrôlés par le programme interne de l'automate au moyen de l'application de différents algorithmes (matrice de compensation pour éliminer les problèmes de fuite de signal, normalisation pour éliminer le bruit de fond, utilisation du modèle de Markov pour les problèmes de phasage, modèle de *clustering* hiérarchique pour décider de l'identité de la base, apprentissage supervisé par un témoin interne le phiX dont la séquence est connue) [213].

Malgré les efforts entrepris pour contrôler les erreurs, il persiste environ 0,23 % d'erreurs sur chaque fragment [214] qui dans 95 % des cas sont des substitutions. La majorité des erreurs de lecture surviennent au début et à la fin des cycles de séquençage. Il a aussi été démontré que les scores de qualité, calculés par cette technique, sont mal corrélés à la présence de faux-positif.

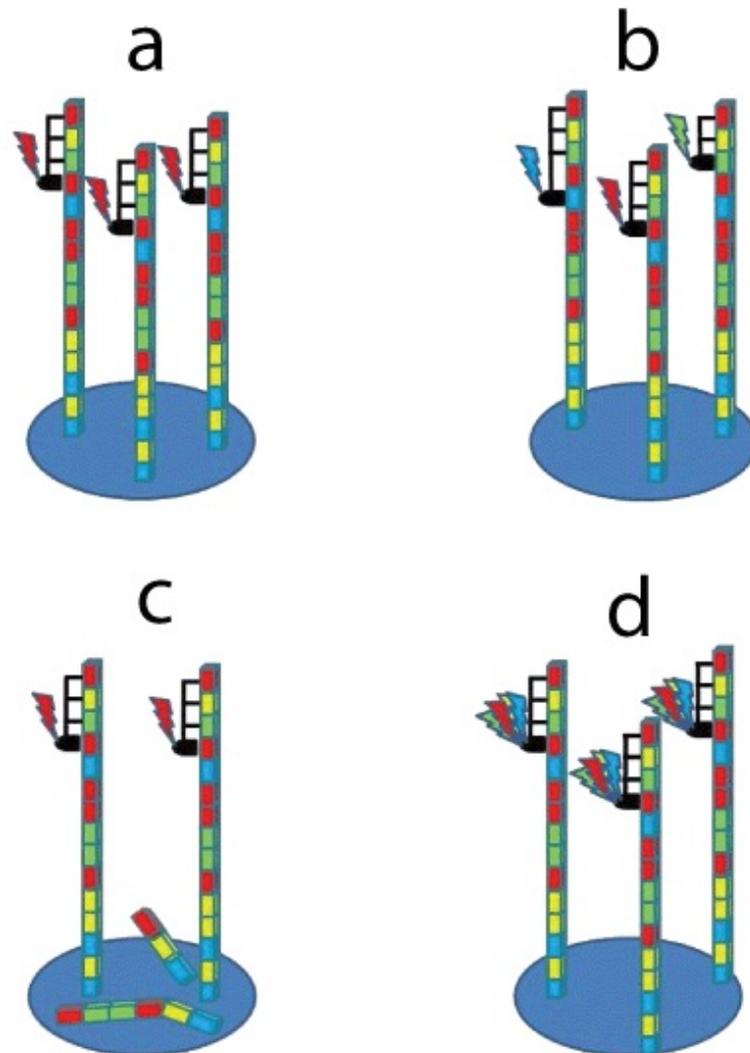


Figure 3.8 – Schéma des différentes sources de bruit lors de la lecture du signal des clusters. Les bases des fragments sont représentées par des rectangles de couleur et les polymérases en noir. En a, absence de bruit, le cluster lu émet pour tous ses brins, la même couleur. En b, bruits de pré-phasage à gauche, et de déphasage à droite. En c, perte d'intensité du signal du fait de la perte de brin. En d, bruits dans l'identification de la longueur d'onde causés par la fuite du signal [213].

Partie 4

Résultats

À partir du fichier brut issu du séquençage, nous avons sélectionné les mutations faux-sens non-synonymes ne faisant pas partie du polymorphisme normal. Soixante substitutions correspondants à ces critères ont été identifiées.

Les résultats sont détaillés ici, par patient. Chaque mutation est caractérisée par sa fraction allélique à laquelle elle a été identifiée, et par le résultat que cette mutation provoque sur la protéine.

4.1 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1602

Mutations ponctuelles identifiées sur EZH2

S84L

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 148529838 du chromosome 7 (chr7: 148529838G>A) avec une couverture allélique de 1,35 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue sur seulement deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 4/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 84 d'une leucine (non-polaire) se fait à la place d'une sérine (polaire).

L'analyse structurale révèle que cette mutation porte sur le domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

K156E

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une cytosine en position 148526838 du chromosome 7 (chr7: 148526838T>C) avec une couverture allélique de 1,9 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 5/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 156 d'un glutamate (acide) se fait à la place d'une lysine (basique).

L'analyse structurale révèle que cette mutation porte sur le domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

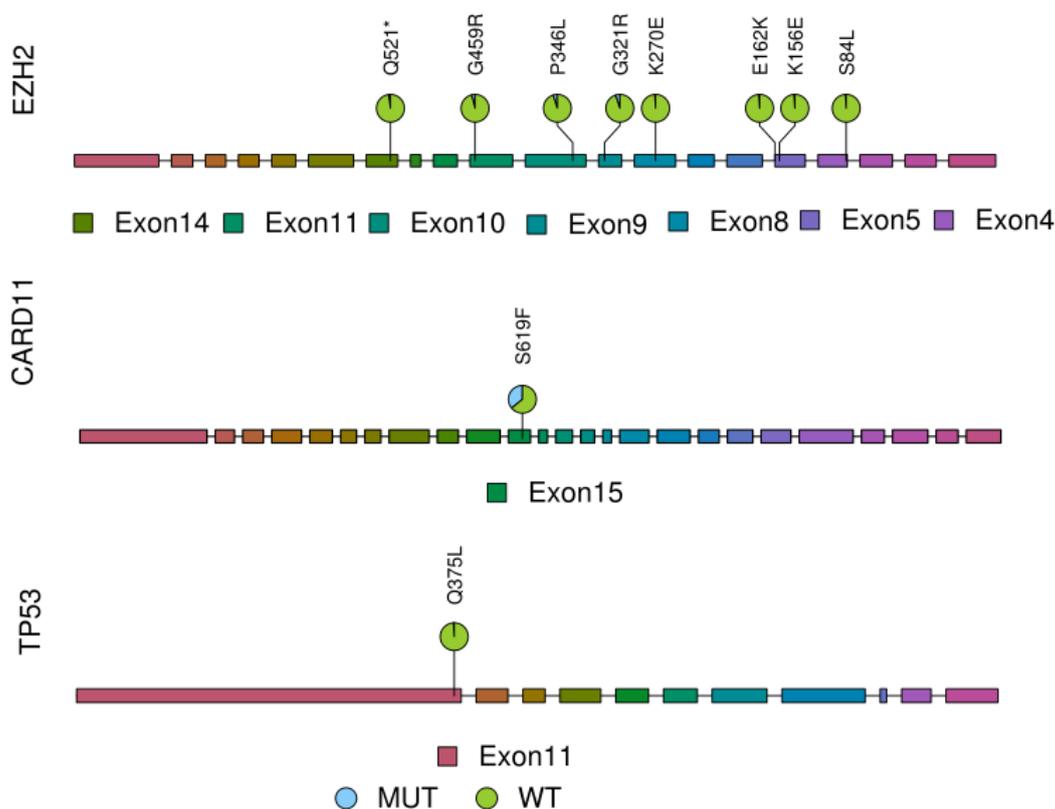


Figure 4.1 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1602.

E162K

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 148526820 du chromosome 7 (chr7: 148526820C>T) avec une couverture allélique de 1,54 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 5/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 162 d'une lysine (basique) se fait à la place d'un glutamate (acide).

L'analyse structurale révèle que cette mutation porte sur le domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

K270E

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une cytosine en position 148523645 du chromosome 7 (chr7: 148523645T>C) avec une couverture allélique de 1,23 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 8/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 270 d'un glutamate (acide) se fait à la place d'une lysine (basique).

L'analyse structurale révèle que cette mutation porte sur le domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

G321R

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 148516711 du chromosome 7 (chr7: 148516711C>T) avec une couverture allélique de 5,41 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 9/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 321 d'une arginine (basique) se fait à la place d'une glycine (non-polaire).

L'analyse structurale révèle que cette mutation porte sur le domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

P346L

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 148515157 du chromosome 7 (chr7: 148515157G>A) avec une couverture allélique de 5,13 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 10/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 346 d'une leucine (non-polaire) se fait à la place d'une proline (non-polaire).

L'analyse structurale révèle que cette mutation porte sur le domaine d'interaction avec la protéine CDYL, une enzyme entraînant l'acétylation des histones.

G459R

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 148514334 du chromosome 7 (chr7: 148514334C>T) avec une couverture allélique de 4,17 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 11/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 156 d'une arginine (basique) se fait à la place d'une glycine (non-polaire).

L'analyse structurale révèle que cette mutation porte sur le domaine d'interaction avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

Q521*

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 148512102 du chromosome 7 (chr7: 148512102G>A) avec une couverture allélique de 2,47 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 14/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un non-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, en position 521, la survenue d'un codon stop (TAA ochre) se fait à la place de l'incorporation d'une glutamine (polaire).

Mutation ponctuelle identifiée sur *CARD11*

S619F

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 2963951 du chromosome 7 (chr7: 2963951G>A) avec une couverture allélique de 36,35 %. Cette substitution touche l'exon 13/25 du gène *CARD11* codant pour la protéine CAR11. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 619 d'une phénylalanine (non-polaire) se fait à la place d'un sérine (polaire).

Mutation ponctuelle identifiée sur *TP53*

Q375L

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une adénine en position 7572985 du chromosome 17 (chr17: 7572985T>A) avec une couverture allélique de 1,15 %. Cependant, cette mutation a été identifiée en valeur absolue sur un seul sens de lecture ce qui peut signer un artefact de séquençage. Cette substitution touche l'exon 11/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 375 d'une leucine (non-polaire) se fait à la place d'une glutamine (polaire).

4.2 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1619

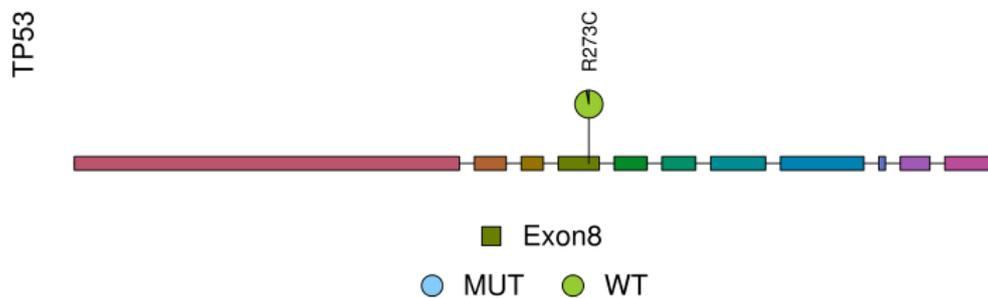


Figure 4.2 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1619.

Mutation ponctuelle identifiée sur *TP53*

R273C

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 7577121 du chromosome 17 (chr17: 7577121G>A) avec une couverture allélique de 3,59 %. Cette substitution touche l'exon 8/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 273, d'une cystéine (polaire) se fait à la place d'une arginine (basique).

4.3 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1622

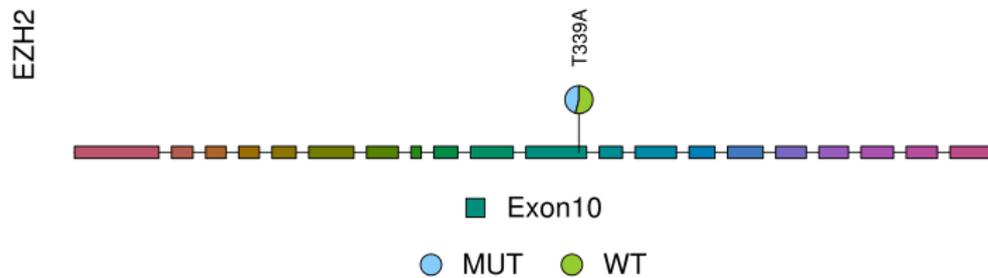


Figure 4.3 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1622.

Mutation ponctuelle identifiée sur EZH2

T339A

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une cystine en position 148515179 du chromosome 7 (chr7: 148515179T>C) avec une couverture allélique de 46,18 %. Cette substitution touche l'exon 10/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 339 d'une alanine (non-polaire) se fait à la place d'une thréonine (polaire).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B, ainsi qu'avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

4.4 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1623

Mutation ponctuelle identifiée sur MYD88

M170V

Le séquençage a identifié une substitution d'une adénine par une guanine en position 38181884 du chromosome 3 (chr3: 38181884A>G) avec une couverture allélique de 1,14 %. Cette substitution touche l'exon 3/5 du gène *MYD88* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 170 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'une méthionine (non-polaire).

Mutations ponctuelles identifiées sur CARD11

R436W

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 2976706 du chromosome 7 (chr7: 2976706G>A) avec une couverture allélique de 3 %. Cette substitution touche l'exon 9/25 du gène *CARD11* codant pour la protéine CAR11. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 436 d'un tryptophane (non-polaire) se fait à la place d'une arginine (basique).

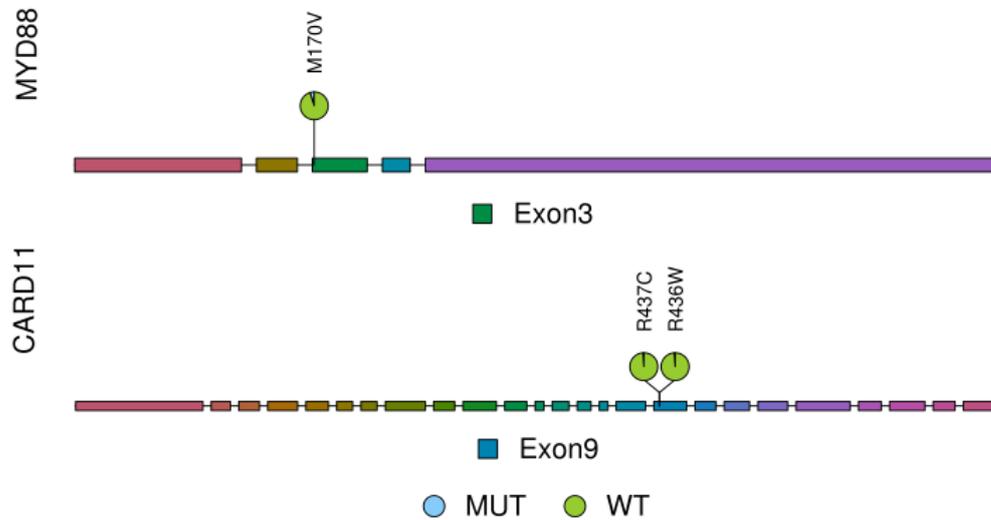


Figure 4.4 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1623.

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine de type superhélice.

R437C

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 2976703 du chromosome 7 (chr7: 2976703G>A) avec une couverture allélique de 2,5 %. Cette substitution touche l'exon 9/25 du gène *CARD11* codant pour la protéine CAR11. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 437 d'une cystéine (polaire) se fait à la place d'une arginine (basique).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine de type superhélice.

4.5 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1625

Mutation ponctuelle identifiée sur MYD88

L265P

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une cytosine en position 38182641 du chromosome 3 (chr3 :38182641T>C) avec une couverture allélique de 22,35 %. Cette substitution touche une thymine, très conservée phylogénétiquement, de l'exon 5/5 du gène *MYD88* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 265 (ou 273 selon l'isoforme) d'une proline (non-polaire) se fait à la place d'une leucine (non-polaire).

L'analyse structurale de la protéine MYD88 révèle que la mutation affecte le domaine du récepteur Toll-Interleukine (TIR).

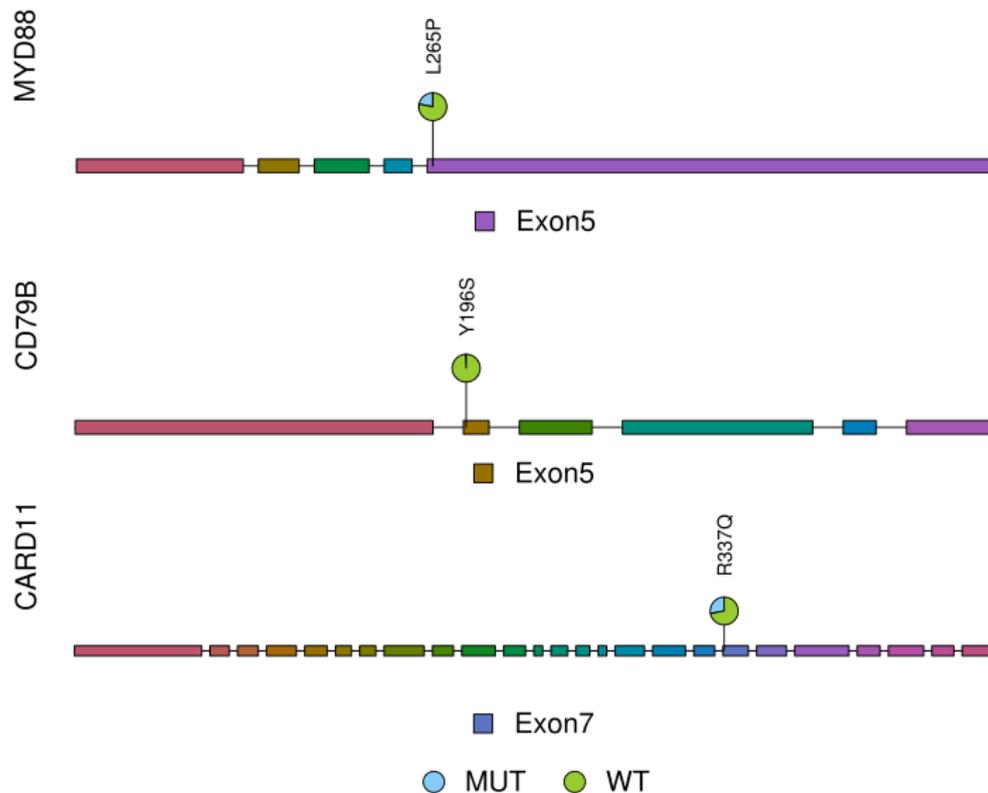


Figure 4.5 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1625.

Mutation ponctuelle identifiée sur CD79B

Y196S

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une guanine en position 62006798 du chromosome 17 (chr17: 62006798T>G) avec une couverture allélique de 54,64 %. Cette substitution touche l'exon 5/6 du gène *CD79B* codant pour la protéine homologue. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 196 d'une sérine (polaire) se fait à la place d'une tyrosine (polaire).

Cette mutation touche la première tyrosine (Y196) du motif ITAM de CD79B.

Mutation ponctuelle identifiée sur CARD11

R337Q

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 2978320 du chromosome 7 (chr7: 2978320C>T) avec une couverture allélique de 28,41 %. Cette substitution touche l'exon 7/25 du gène *CARD11* codant pour la protéine CAR11. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 337 d'une glutamine (polaire) se fait à la place d'une arginine (basique).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine de type super-hélice.

4.6 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1626

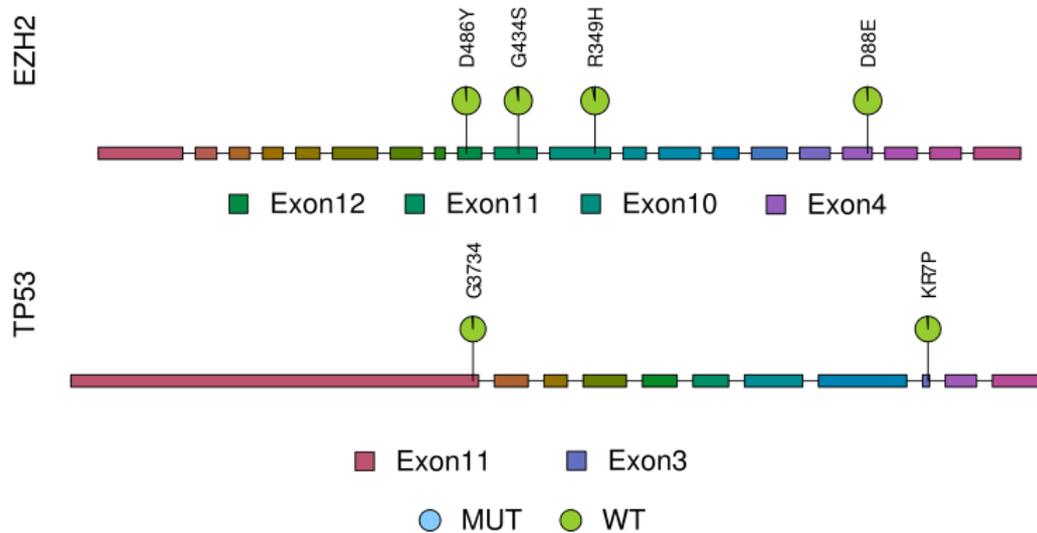


Figure 4.6 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1626.

Mutations ponctuelles identifiées sur EZH2

D486Y

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 148513810 du chromosome 7 (chr7: 148513810C>A) avec une couverture allélique de 1,36 %. Cette substitution touche l'exon 12/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 486 d'une tyrosine (polaire) se fait à la place d'un aspartate (acide).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

G434S

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 148514409 du chromosome 7 (chr7: 148514409C>T) avec une couverture allélique de 2,22 %. Cette substitution touche l'exon 11/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 434 d'une sérine (polaire) se fait à la place d'une glycine (non-polaire).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

R349H

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 148515148 du chromosome 7 (chr7: 148515148C>T) avec une couverture allélique de 3,03 %. Cette substitution touche l'exon 10/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 349 d'une histidine (basique) se fait à la place d'une arginine (basique).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

D88E

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une thymine en position 148529825 du chromosome 7 (chr7: 148529825G>T) avec une couverture allélique de 1,02 %. Cette substitution touche l'exon 4/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 88 d'un glutamate (acide) se fait à la place d'un aspartate (acide).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

Mutations ponctuelles identifiées sur TP53

K373R

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une cytosine en position 7572991 du chromosome 17 (chr17: 7572991T>C) avec une couverture allélique de 1,9 %. Cette substitution touche l'exon 11/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 373 d'une arginine (basique) se fait à la place d'une lysine (basique).

P27S

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 7579717 du chromosome 17 (chr17: 7579717G>A) avec une couverture allélique de 1,17 %. Cette substitution touche l'exon 3/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 27 d'une sérine (polaire) se fait à la place d'une proline (non-polaire).

4.7 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1630

Mutation ponctuelle identifiée sur MYD88

L265P

Pour l'analyse de cette mutation se reporter au patient 1625 (page 66). Cette mutation a été identifiée chez ce patient avec une couverture allélique de 27,6 %.

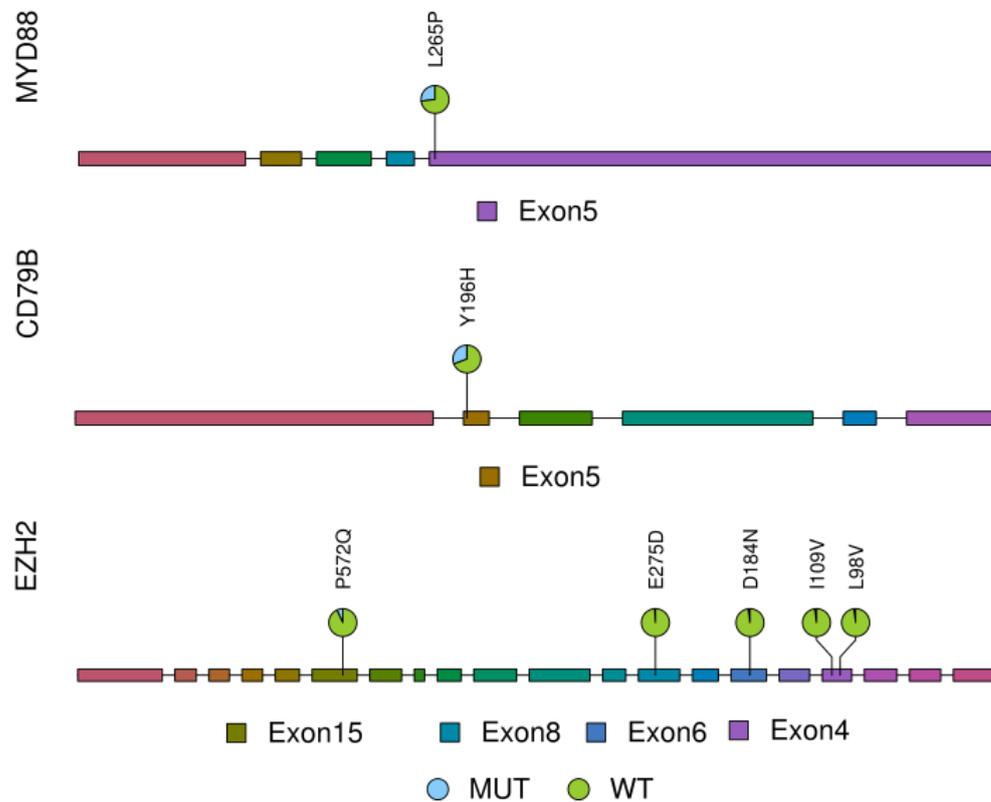


Figure 4.7 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1630.

Mutation ponctuelle identifiée sur CD79B

Y196H

Le séquençage a identifié une substitution d'une adénine par une guanine en position 62006799 du chromosome 17 (chr17: 62006799A>G) avec une couverture allélique de 31,34 %. Cette substitution touche l'exon 5 du gène *CD79B* codant pour la protéine *CD79B*. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction, en l'occurrence l'incorporation en position 196 d'une histidine se fait à la place d'une tyrosine.

Cette mutation touche la première tyrosine (Y196) du motif ITAM de *CD79B*.

Mutation ponctuelle identifiée sur EZH2

L98V

Le séquençage a identifié une substitution d'une adénine par une cytosine en position 148529797 du chromosome 7 (chr7: 148529797A>C) avec une couverture allélique de 2,22 %. Cette substitution touche l'exon 4/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 98 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'une leucine (non-polaire).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

I109V

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une cytosine en position 148529764 du chromosome 7 (chr7: 148529764T>C) avec une couverture allélique de 2,06 %. Cette substitution touche l'exon 4/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 109 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'une isoleucine (non-polaire).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

D184N

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 148525907 du chromosome 7 (chr7: 148525907C>T) avec une couverture allélique de 2,11 %. Cette substitution touche l'exon 6/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 184 d'une asparagine (polaire) se fait à la place d'un aspartate (acide).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

E275D

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une adénine en position 148523628 du chromosome 7 (chr7: 148523628C>A) avec une couverture allélique de 1,4 %. Cette substitution touche l'exon 8/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 275 d'un aspartate (acide) se fait à la place d'un glutamate (acide).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

P572Q

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une thymine en position 148511172 du chromosome 7 (chr7: 148511172G>T) avec une couverture allélique de 7,69 %. Cette substitution touche l'exon 15/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 572 d'une glutamine (polaire) se fait à la place d'une proline (non-polaire).

4.8 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1632

Mutations ponctuelles identifiées sur EZH2

G235C

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une adénine en position 148524281 du chromosome 7 (chr7: 148524281C>A) avec une couverture allélique de 3,92 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 7/20 du gène *EZH2* codant pour

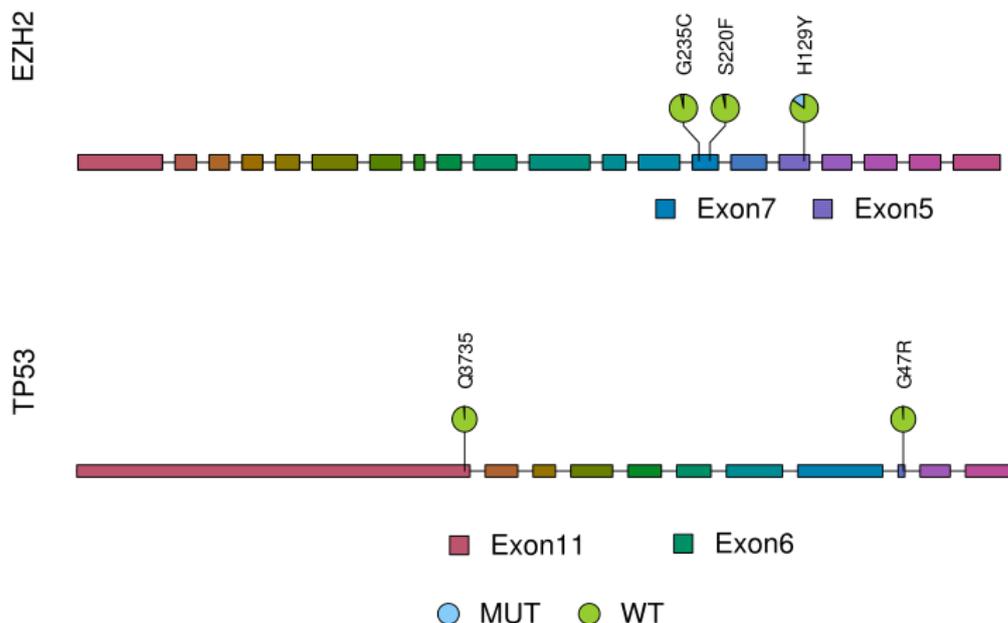


Figure 4.8 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1632.

la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 235 d'une cystéine (polaire) se fait à la place d'une glycine (non-polaire).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

S220F

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 148524325 du chromosome 7 (chr7: 148524325G>A) avec une couverture allélique de 3,7 %. Cependant, ce variant n'a été retrouvé en valeur absolue seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 7/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 220 d'une phénylalanine (non-polaire) se fait à la place d'une sérine (polaire).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

H129Y

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 148526919 du chromosome 7 (chr7: 148526919G>A) avec une couverture allélique de 15,38 %. Cependant ce variant n'a été retrouvé seulement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cette substitution touche l'exon 5/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homo-

nyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 129 d'une tyrosine (polaire) se fait à la place d'une histidine (basique).

L'analyse structurale de la protéine *EZH2* révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

Mutations ponctuelles identifiées sur TP53

Q375G

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une cytosine en position 7572985 du chromosome 17 (chr17: 7572985T>C) avec une couverture allélique de 1,07 %. Cette substitution touche l'exon 11/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 375 d'une guanine (non-polaire) se fait à la place d'une glutamine (polaire).

D208V

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une adénine en position 7578226 du chromosome 17 (chr17: 7578226T>A) avec une couverture allélique de 12,06 %. Cette substitution touche l'exon 6 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 208 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'une asparagine (polaire).

4.9 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1634

Mutations ponctuelles identifiées sur CARD11

R260Q

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 2979468 du chromosome 7 (chr7: 2979468C>T) avec une couverture allélique de 1,1 %. Cette substitution touche l'exon 6/25 du gène *CARD11* codant pour la protéine CAR11. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 260 d'une glutamine (polaire) se fait à la place d'un arginine (basique).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine de type superhélice.

I323S

Le séquençage a identifié une substitution d'une adénine par une cytosine en position 2978362 du chromosome 7 (chr7: 2978362A>C) avec une couverture allélique de 1,13 %. Cette substitution touche l'exon 7/25 du gène *CARD11* codant pour la protéine CAR11. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 323 d'une sérine (polaire) se fait à la place d'une isoleucine (non-polaire).

L'analyse structurale de la protéine CAR11 révèle que la mutation affecte un domaine de type superhélice.

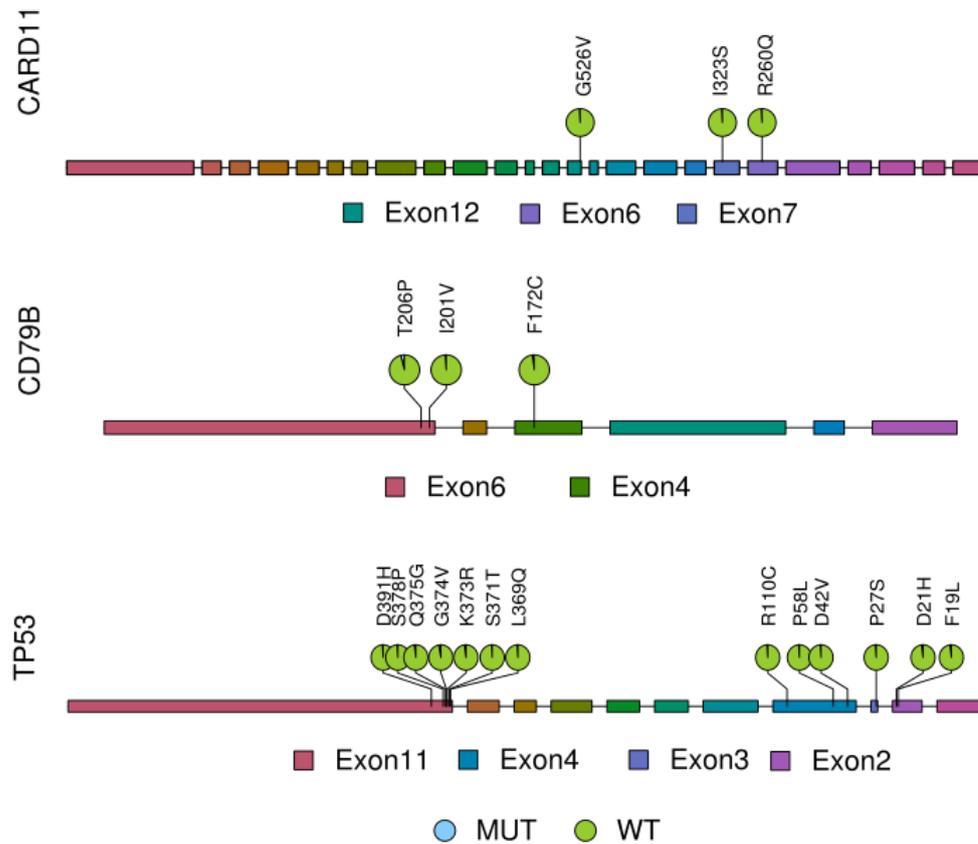


Figure 4.9 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1634.

G526V

Le séquençage a identifié une substitution d'une cystine par une adénine en position 2969702 du chromosome 7 (chr7: 2969702C>A) avec une couverture allélique de 1,01 %. Cette substitution touche l'exon 12/25 du gène *CARD11* codant pour la protéine CAR11. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 526 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'une glycine (non-polaire).

Mutations ponctuelles identifiées sur CD79B

F172C

Le séquençage a identifié une substitution d'une adénine par une cytosine en position 62007164 du chromosome 17 (chr17: 62007164A>C) avec une couverture allélique de 2,01 %. Cette substitution touche l'exon 4/6 du gène *CD79B* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 172 d'une cystéine (polaire) se fait à la place d'une phénylalanine (non-polaire).

I201V

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une cytosine en position 62006675 du chromosome 17 (chr17: 62006675T>C) avec une couverture allélique de 1,61 %. Cette substitution touche l'exon 6/6 du gène *CD79B* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 201 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'une iso-leucine (non-polaire).

T206P

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une guanine en position 62006660 du chromosome 17 (chr17: 62006660T>G) avec une couverture allélique de 4,55 %. Cette substitution touche l'exon 6/6 du gène *CD79B* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 206 d'une proline (non-polaire) se fait à la place d'une thréonine (polaire).

Mutations ponctuelles identifiées sur TP53

F19L

Le séquençage a identifié une substitution d'une adénine par une guanine en position 7579858 du chromosome 17 (chr17: 7579858A>G) avec une couverture allélique de 2,17 %. Cette substitution touche l'exon 2/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 19 d'une leucine (non-polaire) se fait à la place d'une phénylalanine (non-polaire).

D21H

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une guanine en position 7579852 du chromosome 17 (chr17: 7579852C>G) avec une couverture allélique de 2,3 %. Cette substitution touche l'exon 2/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 21 d'une histidine (basique) se fait à la place d'un aspartate (acide).

D42V

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une adénine en position 7579562 du chromosome 17 (chr17: 7579562T>A) avec une couverture allélique de 1,44 %. Cette substitution touche l'exon 4/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 42 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'un aspartate (acide).

P58L

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 7579514 du chromosome 17 (chr17: 7579514G>A) avec une couverture allélique de 1,18 %. Cette substitution touche l'exon 4/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 58 d'une leucine (non-polaire) se fait à la place d'une proline (non-polaire).

R110C

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 7579359 du chromosome 17 (chr17: 7579359G>A) avec une couverture allélique de 1,04 %. Cette substitution touche l'exon 4/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 110 d'une cystéine (polaire) se fait à la place d'une arginine (basique).

L369Q, S371T, G374V, Q375G et S378P

Le séquençage a identifié les substitutions suivantes sur le chromosome 17 :

- Une substitution d'une adénine par une thymine en position 7573003 et 7572998 (chr17: 7573003A>T et chr17: 7572998A>T).
- Une substitution d'une cytosine par une adénine en position 7572988 (chr17: 7572988C>A).
- Une substitution d'une thymine par une cytosine en position 7572985 (chr17: 7572985T>C).
- Une substitution d'une adénine par une guanine en position 7572977 (chr17: 7572977A>G).

D391H

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une guanine en position 7572938 du chromosome 17 (chr17: 7572938C>G) avec une couverture allélique de 1,63 %. Cette substitution touche l'exon 11/11 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 391 d'une histidine (basique) se fait à la place d'un aspartate (acide).

4.10 Mutations ponctuelles identifiées sur le patient 1638

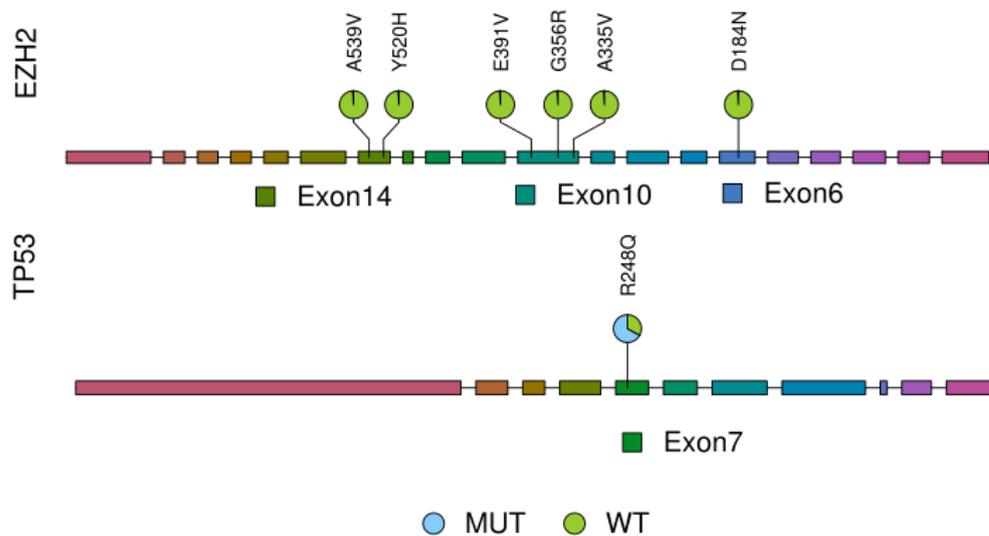


Figure 4.10 – Schéma des mutations ponctuelles retrouvées chez le patient 1638.

Mutations ponctuelles identifiées sur EZH2

D184N

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 148525907 du chromosome 7 (chr7: 148525907C>T) avec une couverture allélique de 1,45 %. Cette substitution touche l'exon 6/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 184 d'une asparagine (polaire) se fait à la place L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B.

A335V

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 148515190 du chromosome 7 (chr7: 148515190G>A) avec une couverture allélique de 1,69 %. Cette substitution touche l'exon 10/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 335 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'une alanine (non-polaire).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec d'autres méthyltransférases : DNMT1, DNMT3A et DNMT3B, ainsi qu'avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

G356R

Le séquençage a identifié une substitution d'une cystéine par une thymine en position 148515128 du chromosome 7 (chr7: 148515128C>T) avec une couverture allélique de 1,6 %. Cette substitution touche l'exon 10/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 356 d'une arginine (basique) se fait à la place d'une glycine (non-polaire).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

E391V

Le séquençage a identifié une substitution d'une thymine par une adénine en position 148515022 du chromosome 7 (chr7: 148515022T>A) avec une couverture allélique de 1,7 %. Cette substitution touche l'exon 10/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 391 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'un glutamate (acide).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

Y520H

Le séquençage a identifié une substitution d'une adénine par une guanine en position 148512105 du chromosome 7 (chr7: 148512105A>G) avec une couverture allélique de 1,04 %. Cette substitution touche l'exon 14/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 520 d'une histidine (basique) se fait à la place d'une tyrosine (polaire).

L'analyse structurale de la protéine EZH2 révèle que la mutation affecte un domaine d'interaction avec une enzyme entraînant l'acétylation des histones, la protéine CDYL.

A539V

Le séquençage a identifié une substitution d'une guanine par une adénine en position 148512047 du chromosome 7 (chr7: 148512047G>A) avec une couverture allélique de 1,26 %. Cette substitution touche l'exon 14/20 du gène *EZH2* codant pour la protéine homonyme. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 539 d'une valine (non-polaire) se fait à la place d'une alanine (non-polaire).

Mutation ponctuelle identifiée sur TP53

R248Q

Le séquençage a identifié une substitution d'une cytosine par une thymine en position 7577538 du chromosome 17 (chr17: 7577538C>T) avec une couverture allélique de 67,82 %. Cette substitution touche l'exon 7 du gène *TP53* codant pour la protéine p53. Elle est responsable d'un faux-sens lors de la traduction ; en l'occurrence, l'incorporation en position 248 d'une glutamine (polaire) se fait à la place d'une arginine (basique).

4.11 Synthèse

Les mutations identifiées pour chaque patient sont synthétisées dans les deux tableaux qui suivent.

Tableau I – Liste des mutations faux-sens non-synonymes retrouvées numéro un.

Patients	Gènes	Position (hg19)	Substitution	Isoforme mutant	Fraction allélique	Couverture sens et anti-sens
1602	<i>CARD11</i>	chr7 :2963951	G/A	S619F	36,35%	468/2093
1602	<i>EZH2</i>	chr7: 148512102	G/A	Q521	2,47 %	1/1
1602	<i>EZH2</i>	chr7: 148514334	C/T	G459R	4,17 %	1/1
1602	<i>EZH2</i>	chr7: 148515157	G/A	P346L	5,13 %	1/1
1602	<i>EZH2</i>	chr7: 148516711	C/T	G321R	5,41 %	0/2
1602	<i>EZH2</i>	chr7: 148523645	T/C	K270E	1,23 %	1/1
1602	<i>EZH2</i>	chr7: 148526820	C/T	E162K	1,54 %	1/1
1602	<i>EZH2</i>	chr7: 148526838	T/C	K156E	1,9 %	1/1
1602	<i>EZH2</i>	chr7: 148529838	G/A	S84L	1,35 %	1/1
1602	<i>TP53</i>	chr17: 7572985	T/A	Q375L	1,15 %	20/0
1619	<i>TP53</i>	chr17: 7577121	G/A	R273C	3,59 %	295/381
1623	<i>MYD88</i>	chr3: 38181884	A/G	M170V	1,14 %	2/0
1623	<i>CARD11</i>	chr7: 2976703	G/A	R437C	2,50 %	4/0
1623	<i>CARD11</i>	chr7: 2976706	G/A	R436W	3 %	5/0
1622	<i>EZH2</i>	chr7: 148515179	T/C	T339A	46,18 %	42/113
1625	<i>CARD11</i>	chr7: 2978320	C/T	R337Q	28,41 %	562/851
1625	<i>CD79B</i>	chr17: 62006798	T/G	Y196S	54,64 %	1340/301
1625	<i>MYD88</i>	chr3: 38182641	T/C	L265P	22,35 %	4416/4546
1626	<i>EZH2</i>	chr7: 148513810	C/A	D486Y	1,36 %	1/1
1626	<i>EZH2</i>	chr7: 148514409	C/T	G434S	2,22 %	0/2
1626	<i>EZH2</i>	chr7: 148515148	C/T	R349H	3,03 %	1/1
1626	<i>EZH2</i>	chr7: 148529825	G/T	D88E	1,02 %	0/2
1626	<i>TP53</i>	chr17: 7572991	T/C	K373R	1,9 %	27/1
1626	<i>TP53</i>	chr17: 7579717	G/A	P27S	1,17 %	1/1
1630	<i>MYD88</i>	chr3: 38182641	T/C	L265P	27,6 %	1119/913
1630	<i>EZH2</i>	chr7: 148511172	G/T	P572Q	7,69 %	1/1
1630	<i>EZH2</i>	chr7: 148523628	C/A	E275D	1,4 %	1/1
1630	<i>EZH2</i>	chr7: 148525907	C/T	D184N	2,11 %	6/0
1630	<i>EZH2</i>	chr7: 148529764	T/C	I109V	2,06 %	1/1
1630	<i>EZH2</i>	chr7: 148529797	A/C	L98V	2,22 %	1/1
1630	<i>CD79B</i>	chr17: 62006799	A/G	Y196H	31,34 %	1313/301

Tableau II – Liste des mutations faux-sens non-synonymes retrouvées tableau deux.

Patients	Gènes	Position (hg19)	Substitution	Isoforme mutant	Fraction allélique	Couverture sens et anti-sens
1632	<i>EZH2</i>	chr7: 148524281	C/A	G235C	3,92%	2/0
1632	<i>EZH2</i>	chr7: 148524325	G/A	S220F	3,7 %	1/1
1632	<i>EZH2</i>	chr7: 148526919	G/A	H129Y	15,38 %	1/1
1632	<i>TP53</i>	chr17: 7572985	T/C	Q375G	1,07 %	13/2
1632	<i>TP53</i>	chr17: 7578226	T/A	D208V	12,06 %	434/276
1634	<i>CARD11</i>	chr7: 2969702	C/A	G526V	1,01 %	0/7
1634	<i>CARD11</i>	chr7: 2978362	A/C	I323S	1,13 %	1/14
1634	<i>CARD11</i>	chr7: 2979468	C/T	R260Q	1,1 %	14/0
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7572938	C/G	D391H	1,63 %	10/0
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7572977	A/G	S378P	1,93 %	7/0
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7572985	T/C	Q375G	2,48 %	15/0
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7572988	C/A	G374V	3,54 %	17/1
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7572991	T/C	K373R	2,21 %	14/0
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7572998	A/T	S371T	1,98 %	9/0
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7573003	A/T	L369Q	1,31 %	8/0
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7579359	G/A	R110C	1,04 %	0/18
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7579514	G/A	P58L	1,18 %	0/11
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7579562	T/A	D42V	1,44 %	0/9
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7579852	C/G	D21H	2,3 %	16/0
1634	<i>TP53</i>	chr17: 7579858	A/G	F19L	2,17 %	15/0
1634	<i>CD79B</i>	chr17: 62006660	T/G	T206P	4,55 %	2/0
1634	<i>CD79B</i>	chr17: 62006675	T/C	I201V	1,61 %	1/1
1634	<i>CD79B</i>	chr17: 62007164	A/C	F172C	2,01 %	33/6
1638	<i>EZH2</i>	chr7: 148512047	G/A	A539V	1,26 %	1/1
1638	<i>EZH2</i>	chr7: 148512105	A/G	Y520H	1,04 %	1/1
1638	<i>EZH2</i>	chr7: 148515022	T/A	E391V	1,7 %	1/2
1638	<i>EZH2</i>	chr7: 148515128	C/T	G356R	1,6 %	1/1
1638	<i>EZH2</i>	chr7: 148515190	G/A	A335V	1,69 %	0/2
1638	<i>EZH2</i>	chr7: 148525907	C/T	D184N	1,45 %	11/1
1638	<i>TP53</i>	chr17: 7577538	C/T	R248Q	67,82 %	1770/3110

Partie 5

Discussion

Cette discussion porte sur la caractérisation des mutations identifiées. Les données issues de la littérature et des bases de données accessibles en ligne permettent d'identifier les mutations pathogènes, non pathogènes et les probables faux-positifs.

Patient 1602

Chez ce patient, les variants codants pour les isoformes mutants d'*EZH2* ont été identifiés en valeur absolue uniquement sur deux lectures ce qui est insuffisant pour les identifier avec certitude. De plus, la consultation de la base de données COSMIC ne fournit aucune publication ayant identifié ces variants, hormis pour l'isoforme E162K ou l'isoforme sur le même codon E162* a été identifié dans des cellules de cancer de l'endomètre [206].

La mutation codant pour l'isoforme S619F de *CARD11*, aux vues de sa couverture, touche la majorité des cellules néoplasiques du prélèvement séquencé. Aucune étude publiée n'a identifié ce variant. Cependant, plusieurs identifications de mutations sur l'exon 13 ont été observées dans des cancers pulmonaires, œsophagiens, coliques, ovariens et cutanés [206]. Cette mutation peut correspondre à une mutation passagère survenue sur le clone principal, mais son rôle actif dans la lymphomagénèse ne peut être exclu.

Pour l'isoforme Q375L de *TP53*, la mutation n'a été identifiée en valeur absolue que sur une seule lecture, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. Cependant, la consultation de la base de données COSMIC fournit deux études ayant identifié des variants sur le même codon, l'une dans un gliome (Q375K) et l'autre dans trois carcinomes (Q375*) [215]. En dernier lieu, le résultat de l'analyse fonctionnelle (GVGD) donne un risque très faible de pathogénicité (1/7) [216].

L'analyse ne retrouve **pas de mutation pathogène confirmée** sur ce patient.

Patient 1619

La base de données COSMIC fournit une étude retrouvant l'isoforme mutant R273C de *TP53*. Ce mutant a été identifié deux fois dans des échantillons de syndromes myélodysplasiques dans une étude publiée en 2013. Dans cette étude, les échantillons d'ADN ont été obtenus à partir de cellules mononuclées sanguines ou médullaires. La technique de séquençage réalisée est celle du panel (111 gènes) par capture en NGS. 738 patients ont été séquencés. 43 mutations de *TP53* ont été identifiées, dont deux codants pour R273C [217]. R273C a également été identifié 163 fois dans des échantillons d'autres néoplasies. Enfin, il a été identifié chez un patient atteint

du syndrome de Li-Fraumeni. Ce patient a été diagnostiqué d'une tumeur du système nerveux central à l'âge de 26 ans et d'une leucémie à l'âge de 28 ans [218].

Le résultat de l'analyse fonctionnelle (GVGD) donne un risque très élevé de pathogénicité (7/7) [219]. En effet, il a été mis en évidence que la fonction de ce mutant est modifiée [220]. Le codon muté est connu pour coder l'acide aminé qui entre en contact avec les séquences ADN ciblées par p53, participant ainsi directement à la fonction de facteur de transcription de p53. L'isoforme mutant sur le même codon, le R273H est connu pour être un mutant gain-de-fonction contact (cf. page 25).

Les arguments épidémiologiques et fonctionnels permettent donc de suspecter fortement que la mutation R273C est pathogène par perte-de-fonction.

Le gain-de-fonction a été prouvé pour la mutation R273H touchant le même codon. Le fait que le même codon soit touché suggère que la mutation R273C est donc aussi, très probablement, pathogène par gain-de-fonction. Cependant, la couverture allélique faible, mesurée à 3,59 % fait néanmoins douter de la pathogénicité de cette mutation. Elle serait réellement pathogène, elle aurait été sélectionnée positivement au sein du clone néoplasique. Toutefois, il est possible que le prélèvement séquencé ne contienne que peu d'ADN néoplasique ou qu'un sous-clone portant cette mutation soit apparu récemment. Il convient donc de confirmer l'identification de cette mutation sur un nouveau prélèvement.

Au total, pour ce patient, on retrouve une mutation de **TP53 pathogène avec cependant une faible couverture allélique nécessitant la confirmation de l'identification de cette mutation sur un nouveau prélèvement**. Il est également important de noter que cette mutation, si elle s'avère réelle, est d'intérêt thérapeutique (cf. page 26).

Patient 1622

La fraction allélique de la mutation d'*EZH2* codant pour l'isoforme T339A est de 46,18 %. Ce résultat est en faveur de sa conservation au sein de la population clonale des cellules néoplasiques séquencées. Cela nous permet d'émettre l'hypothèse de son rôle dans la lymphomagenèse. Cependant, il n'existe encore aucune étude qui identifie cette mutation. Son implication dans la lymphomagenèse ne peut donc être affirmée par cet unique argument.

Cette mutation d'*EZH2* est cependant cohérente par rapport au sous-type centre germinatif de ce lymphome à grandes cellules. En effet, *EZH2* est fréquemment muté dans ces lymphomes et très rarement muté dans les sous-types cellules B activés (ABC) [171]. Il s'agit d'une **mutation pathogène probable**.

Patient 1623

Les mutations identifiées sur *MYD88* et *CARD11* ne sont pas référencées comme pathogènes. Leurs faibles couvertures alléliques ne permettent pas d'exclure qu'elles soient des faux-positifs résultant d'un artefact de PCR ou de séquençage.

L'analyse des résultats ne retrouve **pas de mutation pathogène**.

Patient 1625

La mutation codant pour l'isoforme L265P de *MYD88* a été identifiée avec une fraction allélique suffisante mesurée à 22,35 %. La base de données COSMIC a fourni l'identification de cette mutation dans 1596 échantillons d'hémopathies malignes. Un tableau liste (cf. page 117)

les études ayant identifié cet isoforme. Ces nombreuses identifications suggèrent que cet isoforme mutant est sélectionné positivement au sein des cellules néoplasiques. En effet, la protéine mutante MYD88 L265P s'est révélée être une mutation pathogène gain-de-fonction la rendant active constitutivement et favorisant ainsi, la prolifération néoplasique par la stimulation de la voie NF- κ B (cf. page 33).

La mutation de *CD79B* responsable de l'isoforme mutant Y196S a été identifiée avec une couverture allélique de 54,64 %, ce qui suffit pour considérer qu'elle n'est pas un faux-positif. Dans la littérature, cette mutation a été retrouvée six fois dans de l'ADN provenant de cellules hématologiques malignes. Le tableau II (cf. page 119) recense les études ayant identifié cette mutation; ces données suggèrent une sélection positive de cette mutation favorisant ainsi, la prolifération des cellules néoplasiques. Cette mutation touche la première tyrosine (Y196) du motif ITAM de CD79B. Il a été prouvé que les mutations sur cet acide aminé sont pathogènes par gain-de-fonction (cf. page 29).

Le séquençage du gène *CARD11* a identifié la mutation responsable de l'isoforme R337Q avec une couverture allélique suffisante de 28,41 %. Une étude publiée en 2010, a identifié ce variant à trois reprises, notamment dans un échantillon de lymphome primitif du système nerveux central. Dans cette étude, l'ADN a été extrait à partir d'une biopsie stéréoscopique et le séquençage a été réalisé par la technique de Sanger; 42 patients ont été séquencés et 6 mutations ont été retrouvées sur *CARD11* dont un isoforme mutant R337Q [221].

La mutation R337Q de *CARD11* est soit une mutation non pathogène passagère sur le clone principal, soit une mutation pathogène conductrice. Elle est moins probablement une mutation pathogène conductrice, car elle n'a pas été retrouvée antérieurement dans un grand nombre de néoplasie.

Les mutations L265P de *MYD88* et Y196S de *CD79B* sont confirmées être des mutations pathogènes conductrices (cf. pages 29 et 33). Leurs fractions alléliques sont cohérentes avec leurs sélections au sein du clone néoplasique. Ces deux mutations sont souvent retrouvées ensemble, dans les lymphomes B à grandes cellules de sous-type activé [164]. Selon une autre étude, il semble que lorsque ces deux mutations sont présentes, les cellules néoplasiques sont sensibles à l'ibrutinib [133].

Patient 1626

Les variants codants pour les isoformes mutants D486Y, G434S et D88E d'*EZH2* ont été identifiés en valeur absolue uniquement, sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour les identifier avec certitude. De plus, la consultation de la base de données COSMIC ne fournit aucune étude ayant identifié ces variants.

La mutation entraînant l'isoforme mutant K373R de *TP53* a été identifiée avec une couverture allélique de 1,9 %, ce qui correspond en valeur absolue, à son identification sur 28 lectures. Ce chiffre est faible, mais pas négligeable. La base de données COSMIC référence l'identification de ce variant dans un échantillon de gliome [222]. Cependant, cette mutation est très probablement un faux-positif résultant d'un artefact de séquençage. Sa faible couverture allélique va dans le sens de cette hypothèse; en effet, 27 identifications sur 28 lectures ont été réalisées sur le brin sens. De plus, elle a été identifiée chez deux patients de notre cohorte, ce qui la rend statistiquement improbable du fait de la rareté de son identification dans les études. L'acide aminé de p53 Lys³⁷³ est un site de modification post-traductionnel par méthylation dépendant de l'action des enzymes G9a et G9l. Il a été prouvé que la méthylation ou la di-méthylation de cet acide aminé s'accompagne *in vitro* d'une perte de fonction de p53. Il a aussi été prouvé que le variant K373R ne peut pas être méthylé, ce qui est en défaveur de son action pathogène [223] (ce variant a

servi de contrôle négatif dans l'étude référencée précédemment). En fin, le résultat de l'analyse fonctionnelle (GVGD) donne un risque très faible de pathogénicité (1/7) [219].

L'isoforme mutant de TP53, P27S a été identifié en valeur absolue uniquement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. De plus, le résultat de l'analyse fonctionnelle (GVGD) donne un risque très faible de pathogénicité (1/7) [219] et la base de données COSMIC ne recense pas la mutation.

Au total, l'analyse des résultats pour ce patient ne retrouve **pas de mutation pathogène confirmée**.

Patient 1630

Les mutations d'*EZH2* retrouvées sur ce patient n'ont pas une fraction allélique suffisante pour pouvoir les identifier avec certitude. De plus, ces mutations n'apparaissent dans aucune base de données.

La mutation codant pour MYD88^{L265P} a été identifiée chez ce patient avec une couverture allélique de 27,6 %, ce qui suffit pour confirmer sa présence. Pour la discussion sur cette mutation se reporter au patient 1625 (cf. page 82) chez qui l'identification de cette mutation a également été réalisée.

La mutation de *CD79B* codant pour l'isoforme Y196H a été identifiée avec une couverture allélique suffisante de 31,34 %. Dans la littérature scientifique, cette mutation a été identifiée seize fois dans de l'ADN provenant de cellules néoplasiques issues d'hémopathies malignes [206]. Le tableau III (cf. page 120) référence les études ayant identifié cette mutation dans les hémopathies malignes. Ces données suggèrent une sélection positive de cette mutation par les cellules néoplasiques favorisant leur prolifération. Cette mutation touche la première tyrosine (Y196) du motif ITAM de CD79B. Il a été prouvé que des mutations sur cet acide aminé sont pathogènes par gain-de-fonction (cf. page 29).

Les mutations **L265P de MYD88 et Y196H de CD79B sont confirmées comme étant des mutations pathogènes conductrices**. Leurs fractions allélique sont cohérentes avec leurs sélections au sein du clone néoplasique. Ces mutations sont fréquemment retrouvées ensemble dans les lymphomes B à grandes cellules de sous-type activé [164]. Lorsque ces deux mutations sont présentes, les cellules néoplasiques semblent être sensibles à l'ibrutinib [133] (cf. pages 29 et 33).

Patient 1632

Les mutations d'*EZH2* retrouvées chez ce patient ont été identifiées, en valeur absolue, uniquement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour les identifier avec certitude. De plus, la base de données COSMIC ne fournit aucune publication ayant identifié ces variants.

La mutation Q375G de *TP53* a été identifiée, en valeur absolue, uniquement sur deux lectures, ce qui est insuffisant pour l'identifier avec certitude. De plus, la base de données COSMIC ne fournit aucune publication ayant identifié ce variant et le résultat de l'analyse fonctionnelle (GVGD) donne un risque très faible de pathogénicité (1/7) [219].

La mutation D208V de *TP53* a été identifiée, avec une couverture allélique suffisante de 12,06%. Des isoformes mutants de p53, au niveau du codon 208, ont été retrouvés dans trente-neuf échantillons provenant de nombreuses pathologies tumorales (des gliomes, des carcinomes hépatiques, pulmonaires, ovariens pancréatiques et de l'estomac) [206]. Cet isoforme a également été identifié à deux reprises dans la littérature, dans des pathologies hématologiques malignes. Le tableau IV (cf. page 121) liste les études ayant identifié la mutation D208V dans les hémopathies

malignes. Le résultat de l'analyse fonctionnelle (GVGD) donne un risque très fort de pathogénicité (7/7) [219]. Cette mutation est donc très probablement pathogène par perte-de-fonction, mais aucune étude n'a mis en évidence son mécanisme pathogène.

L'isoforme mutant de *TP53*, **D208V est donc probablement pathogène** par perte-de-fonction, mais puisqu'aucune étude sur cette mutation n'a été publiée, il n'est donc pas possible de l'affirmer avec certitude.

Patient 1634

Les mutations retrouvées sur *CD79B*, *CARD11* et *TP53* ont une fraction allélique trop faible pour pouvoir être identifiées avec certitude.

Le résultat de l'analyse ne donne **aucune mutation pathogène**.

Patient 1638

La mutation D184N est également retrouvée chez ce patient. Étant donné l'absence d'identification de cette mutation dans la littérature, il est très peu probable que cette mutation soit une mutation réelle ; il s'agirait donc plutôt d'un faux-positif.

Les autres mutations d'*EZH2* ont été identifiées, en valeur absolue, uniquement sur deux ou trois lectures, ce qui est insuffisant pour les identifier avec certitude. De plus, la base de données COSMIC ne fournit aucune publication ayant identifié ces variants.

La mutation de *TP53* codant pour l'isoforme R248Q a été identifiée avec une couverture allélique suffisante de 67,82 %. Elle est retrouvée dans l'ensemble des pathologies tumorales. Selon la base de données de l'IARC (recensant plus de 29.000 mutations somatiques de *TP53*), la mutation R248Q représente dans les hémopathies malignes 8,7 % des mutations *hotspot* de *TP53* et 6,3 % dans les adénopathies malignes [224]. L'identification de cette mutation dans différentes pathologies tumorales est reportée dans 734 publications [206]. Les principales études ayant identifié la mutation R248Q dans les hémopathies malignes sont quant à elles, listées dans le tableau V (cf. page 122). Il a été prouvé que cette mutation faux-sens entraîne chez la souris le rajeunissement de l'âge de survenue des tumeurs et la diminution de leur survie (prolifération doublée pour un lymphome T) par rapport à des souris p53^{-/-} [87]. Cette mutation faux-sens est une mutation pathogène gain-de-fonction qui transforme *TP53*, à l'état sauvage un gène suppresseur de tumeur, en un mutant oncogène [225] et en plus lui fait perdre son activité suppressive de tumeur. Ce mutant fait partie des mutants contacts gain-de-fonction de p53 (cf. page 25).

Au total, on retrouve chez ce patient une **mutation pathogène confirmée, la mutation de *TP53* R248Q**, qui correspond à un mutant gain-de-fonction de *TP53*. L'évolution défavorable de la patiente est cohérente avec la présence de ce variant.

Synthèse

Sur les gènes des échantillons de dix patients séquencés, nous avons identifié, grâce à notre méthode de séquençage, soixante substitutions :

- Quatre patients ont des mutations pathogènes (patients 1619, 1625, 1630 et 1638), dont une est à confirmer (patient 1619).
- Trois patients ont des mutations probablement pathogènes (patients 1602, 1622 et 1632).
- Chez trois autres patients, aucune mutation sur les gènes séquencés n'a été mise en évidence (patients 1623, 1626 et 1634).

Ces résultats, présentés dans le tableau I (cf. page 87), sont cohérents avec les examens anatomopathologiques et les données de la littérature. En effet, deux lymphomes de sous-type non-GC (ABC) ont des mutations sur la voie de signalisation du BCR (patients 1625 et 1630) et un lymphome de sous-type GC a une mutation sur *EZH2* (patient 1622). Les mutations L265P de *MYD88* et Y196 de *CD79B* sont très fréquemment retrouvées dans les sous-types ABC [112]. Cependant, la mutation T339A n'a pour l'instant jamais été reportée dans les sous-types GCB qui sont pourtant connus pour leur enzyme *EZH2* activée de façon constitutive [171] [177].

On retrouve une co-occurrence fréquente des mutations *MYD88* L265P et *CD79B* Y196, ce qui est cohérent avec les résultats de la littérature [164]. À ce jour, l'isoforme mutant L265P est associé à un pronostic péjoratif, mais il ne s'agit pas d'un marqueur indépendant. Il est fréquemment associé au sous-type ABC également de pronostic péjoratif [226]. Cependant, ces mutations sont d'intérêt thérapeutique ; car associées, elles restaurent la sensibilité à l'ibrutinib [133].

On observe également une cohérence avec l'évolution clinique. En effet, on retrouve un pronostic péjoratif pour l'isoforme mutant gain-de-fonction de type contact R248Q [227] (cf. page 25). Cependant, la signification pronostique de ce mutant n'est pas tranchée. Les études sont contradictoires. En effet, son action gain-de-fonction a été démontrée dans un modèle murin qui révèle que les souris homozygotes R248Q ont une survie diminuée et développent des néoplasies plus tôt que les souris p53 nulles [87]. Une étude portant sur les cancers du sein montre que dix patients portant une mutation de *TP53*, de type contact, ont un pronostic particulièrement péjoratif [228].

Il a également été mesuré, que des lignées cellulaires de cancer du sein exprimant ce mutant, ont une capacité de déformation plus grande ; ce qui est associé à un pouvoir invasif plus important [229]. Un pouvoir invasif plus important a également été mesuré dans des lignées cellulaires R248Q provenant de cancer pulmonaire non à petites cellules [230]. Une étude portant sur 206 patients atteints par un cancer du sein a montré une survie médiane globale de 35 mois pour les patients ayant une mutation sur le site de liaison à l'ADN de *TP53*, et de 80 mois pour l'ensemble des patients portant une mutation de *TP53* (codons 102 à 292) [231]. Cependant, cette étude ne porte pas précisément sur R248Q. Malgré de nombreuses études sur le sujet (cf. page 25), le lien de cause à effet et la responsabilité de cette mutation dans la lymphomagenèse n'ont pas clairement été établis. En effet, des études contradictoires existent. Notamment, une étude de survie de forte puissance traitant également des cancers du sein, retrouve un impact minimal sur le pronostic des mutations de *TP53* portant sur les codons 248 et 273 (sur 178 échantillons tumoraux mutés *TP53*, 25 % le sont sur les codons 248 et 273) [232]. Cette mutation est probablement due à une désamination aléatoire, mécanisme favorisé par l'enzyme NOS-2 (par la production de monoxyde d'azote) [233]. Cette enzyme est fréquemment sur-exprimée dans les hémopathies [234]. Il se pourrait donc que cette mutation soit retrouvée dans les LBDGC, non parce qu'elle procure un avantage sélectif aux cellules néoplasiques, mais parce qu'elle est le résultat d'un autre mécanisme oncogénique. Cette dernière hypothèse ferait passer cette mutation, d'une mutation pathogène conductrice (*driver*), à une mutation passagère [235].

En fin, notre étude nous a permis également d'identifier 51 mutations ayant une faible couverture. Ces faibles couvertures sont retrouvées sur *EZH2* dans 51 % des cas, et sur *TP53* dans 33 % des cas. Rapporté à la taille des amplicons, il y a une mutation toutes les 500 paires de bases pour *EZH2* et pour *TP53*. Les amplicons de ces deux gènes sont les plus longs, leur taux de mutation est corrélé à leur faible couverture allélique lors du séquençage. Cette couverture allélique peut entraîner l'identification de mutations qui sont probablement des faux-positifs et qui auraient été filtrées par l'automate s'il y avait eu une plus grande couverture allélique. Il est néanmoins possible de contrôler ce biais en adaptant notre méthode ; pour limiter la taille de ces amplicons, il serait possible de les diviser en de multiples fragments.

Tableau I – Tableau de synthèse.

Patient	Age au diagnostic	Diagnostic anatomopathologique	Date du diagnostic	Cytogénétique	Mutation confirmée pathogène	Mutation pathogène probable	Stade Ann Arbor	Score IPIaa	Traitement	Nombre de cycles de traitement	Date de première rémission complète	Rechute	Date de dernier suivi	Décès
1602	80	LBDGC non-GC	15/01/2016	Probable translocation IGH avec BCL6	Absence	CARD11: S619F	IV	3	R-mini-CHOP	6	18/04/2016	Non	13/06/2016	Non
1619	67	LBDGC GC	14/03/2014		TP53: R273C (à confirmer)	Absence	III	1	R-CHOP + PL	6	25/06/2014	Non	19/05/2016	Non
1622	27	LBDGC GC	14/04/2014	Absence d'anomalie	Absence	EZH2: T339A	IV	2	GA101+ACVBP + autogreffe	7	22/07/2014	Non	30/06/2016	Non
1623	36	Lymphome B sclérosant du médiastin	05/05/2014	Non réalisé	Absence	Absence	IV	2	GA101+ACVBP + autogreffe	7	18/12/2014	Non	07/07/2016	Non
1625	77	LBDGC non-GC	30/06/2014	Absence (sur moelle)	MYD88: L265P + CD79B: Y196S	Absence	IV	1	R-CHOP	6	08/09/2014	Non	08/06/2016	Non
1626	19	Lymphome de Burkitt	18/07/2014	Double fusion IGH/MYC + réarrangement BCL2	Absence	Absence	IV	1	FCOPADEM	7	02/10/2014	Non	26/04/2016	Non
1630	86	LBDGC non-GC	24/11/2015		MYD88: L265P + CD79B: Y196H	Absence	IV	3	Non réalisée	Non réalisée	Non	Non	26/11/2015	Oui
1632	69	LBDGC non-GC	27/11/2015		Absence	TP53: D208V	I	0	R-CHOP	6	03/02/2016	Non	16/05/2016	Non
1634	60	LBDGC GC	07/09/2015	Absence de remaniement	Absence	Absence	I	1	R-CHOP	6	30/09/2015	Non	30/06/2016	Non
1638	46	LBDGC	08/10/2014	Non réalisé	TP53: R248Q	Absence	IV	2	R-CHOP+CSP + R-HV + R-GVD + VFD +	>12	Absence de réponse	Absence de réponse	16/08/2016	Non

Conclusion

Notre méthode de séquençage massivement parallélisé sur l'automate NGS MiSeq a été mise en place pour la première fois, au Laboratoire de génétique moléculaire de Dijon. Elle nous a permis d'identifier beaucoup de mutations faux-sens. Une petite partie des ces mutations s'est révélée pathogène ; la majorité n'étant pas identifiée de façon certaine en raison d'une couverture allélique faible. Ces résultats sont néanmoins encourageants. En effet, cette méthode a été capable d'identifier des mutations pathogènes.

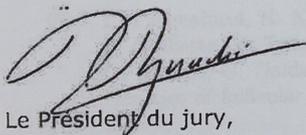
Par rapport à la technique de type Sanger, l'intérêt principal de notre méthode réside en sa capacité à séquencer simultanément plusieurs patients et plusieurs gènes. Elle nous a permis également, de séquencer l'ensemble de l'ADN présent dans l'échantillon et de mesurer les fractions alléliques des différentes mutations. Cette mesure est utile à l'interprétation des résultats et pourrait permettre, par la suite, de caractériser différents sous-clones présents au sein des tumeurs.

En effet, cette méthode permet de séquencer simultanément plusieurs gènes sur différents échantillons, ce qui rend possible le séquençage d'échantillons de néoplasies différentes avec des *panels* de gènes d'intérêts spécifiques. La partie nécessitant le plus de temps opérateur est la partie la plus délicate ; c'est celle de l'enrichissement ciblé. Cette méthode est néanmoins facilement adaptable à la recherche de mutations sur d'autres gènes.

D'ors et déjà, nous avons identifié des solutions pour l'améliorer et pour diminuer le taux de faux-positif. Ainsi, des méthodes d'enrichissement par capture et par PCR multiplex sont disponibles et pourront la rendre plus rapide, plus flexible et plus robuste pour d'autres études et pour la prise en charge en routine des patients.

CONCLUSIONS

Notre méthode de séquençage massif en parallèle sur l'automate MiSeq nous a permis d'identifier beaucoup de mutations faux-sens. Une petite partie des ces mutations s'est révélée être pathogène, la majorité n'étant pas identifiée de façon certaine en raison d'une couverture allélique faible. Ces résultats sont néanmoins encourageants car il s'agit de la première fois que cette méthode a été mise en œuvre dans le laboratoire de génétique moléculaire et qu'elle a prouvé être capable d'identifier des mutations pathogènes, de plus nous avons des solutions pour améliorer notre méthode et faire baisser le taux de faux-positif. Cette méthode a pour principal intérêt par rapport à l'ancienne méthode de type Sanger, sa capacité à séquencer plusieurs patients et plusieurs gènes en même temps. Elle permet également de séquencer l'ensemble de l'ADN présent dans l'échantillon et ainsi de mesurer les fractions alléliques des différentes mutations, ce qui est utile à l'interprétation des résultats et qui par la suite pourrait permettre de caractériser différents sous-clones présents au sein de la tumeur. Cette méthode peut être adaptée facilement pour la recherche de mutation sur d'autres gènes, de plus il n'est pas obligatoire de séquencer les mêmes gènes sur tous les échantillons en même temps ce qui rend possible dans le même temps le séquençage d'échantillons de néoplasies différentes avec une recherche de mutation sur des gènes différents. Dans notre méthode la partie la plus délicate et qui nécessite le plus de temps opérateur est la partie d'enrichissement ciblé. Des méthodes d'enrichissement par capture et par PCR multiplex sont disponibles



Le Président du jury,

Pr. H. MAUNADIÉ

Vu et permis d'imprimer

Dijon, le 7 SEPTEMBRE 2016

Le Doyen



Pr. F. HUET

Bibliographie

- [1] W. W. Choi, D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, M. A. Piris, A. H. Banham, J. Delabie, R. M. Braziel, H. Geng, J. Iqbal, G. Lenz, J. M. Vose, C. P. Hans, K. Fu, L. M. Smith, M. Li, Z. Liu, R. D. Gascoyne, A. Rosenwald, G. Ott, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, D. L. Jaye, L. M. Staudt, and W. C. Chan. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin. Cancer Res.*, 15(17) :5494–5502, Sep 2009. 15, 23, 24
- [2] Bossard N Cowppli-Bony A Voirin N Delafosse P Remontet L Troussard X Maynadié M. Monnereau A, Uhry Z. Survie des personnes atteintes de cancer en france métropolitaine 1989-2013. *Institut de veille sanitaire*, Partie 2 – Hémopathies malignes :144 pages, 2016. 19, 22
- [3] Harris NL Jaffe ES Pileri SA Stein H et al. Swerdlow SH, Campo E. Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (2008). *Lyon, France : IARC Press*, 4, 2008. 19, 23
- [4] E. Chigrinova, A. Rinaldi, I. Kwee, D. Rossi, P. M. Rancoita, J. C. Strefford, D. Oscier, K. Stamatopoulos, T. Papadaki, F. Berger, K. H. Young, F. Murray, R. Rosenquist, T. C. Greiner, W. C. Chan, E. M. Orlandi, M. Lucioni, R. Marasca, G. Inghirami, M. Ladetto, F. Forconi, S. Cogliatti, H. Votavova, S. H. Swerdlow, S. Stilgenbauer, M. A. Piris, A. Matolcsy, D. Spagnolo, E. Nikitin, A. Zamo, V. Gattei, G. Bhagat, G. Ott, E. Zucca, G. Gaidano, and F. Bertoni. Two main genetic pathways lead to the transformation of chronic lymphocytic leukemia to Richter syndrome. *Blood*, 122(15) :2673–2682, Oct 2013. 19
- [5] L. Pasqualucci, H. Khiabani, M. Fangazio, M. Vasishtha, M. Messina, A. B. Holmes, P. Ouillette, V. Trifonov, D. Rossi, F. Tabbo, M. Ponzoni, A. Chadburn, V. V. Murty, G. Bhagat, G. Gaidano, G. Inghirami, S. N. Malek, R. Rabadan, and R. Dalla-Favera. Genetics of follicular lymphoma transformation. *Cell Rep*, 6(1) :130–140, Jan 2014. 19, 121
- [6] Lennert K Rilke F Stansfeld A van Unnik J Gérard-Marchant R, Hamlin I. Classification of non-hodgkin’s lymphomas. 1974. 20
- [7] R. J. Lukes and R. D. Collins. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*, 34(4 Suppl) ::1488–1503, Oct 1974. 20
- [8] A. G. Stansfeld, J. Diebold, H. Noel, Y. Kapanci, F. Rilke, G. Kelenyi, C. Sundstrom, K. Lennert, J. A. van Unnik, and O. Mioduszewska. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet*, 1(8580) :292–293, Feb 1988. 20
- [9] A. Lopez-Guillermo, L. Colomo, M. Jimenez, F. Bosch, N. Villamor, L. Arenillas, A. Muntanola, S. Montoto, E. Gine, D. Colomer, S. Bea, E. Campo, and E. Montserrat. Diffuse

- large B-cell lymphoma : clinical and biological characterization and outcome according to the nodal or extranodal primary origin. *J. Clin. Oncol.*, 23(12) :2797–2804, Apr 2005. 20
- [10] R. Chung, R. Lai, P. Wei, J. Lee, J. Hanson, A. R. Belch, A. R. Turner, and T. Reiman. Concordant but not discordant bone marrow involvement in diffuse large B-cell lymphoma predicts a poor clinical outcome independent of the International Prognostic Index. *Blood*, 110(4) :1278–1282, Aug 2007. 20
- [11] J. Campbell, J. F. Seymour, J. Matthews, M. Wolf, J. Stone, and S. Juneja. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur. J. Haematol.*, 76(6) :473–480, Jun 2006. 20
- [12] P. Bhagat, M. U. Sachdeva, P. Sharma, S. Naseem, J. Ahluwalia, R. Das, N. Varma, A. Law, and P. Malhotra. Primary bone marrow lymphoma is a rare neoplasm with poor outcome : case series from single tertiary care centre and review of literature. *Hematol Oncol*, 34(1) :42–48, Mar 2016. 20
- [13] T. F. Bruno and M. Donoff. Superior vena cava syndrome and telangiectasia in a man with lymphoma. *CMAJ*, 177(10) :1177–1179, Nov 2007. 20
- [14] J. Y. Seo, K. Y. Ha, M. U. Kim, Y. C. Kim, and Y. H. Kim. Spinal cord compression by B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma in a patient seropositive for human immunodeficiency virus : a case report. *J Med Case Rep*, 8 :324, 2014. 20
- [15] D. O’Mahony, R. L. Peikarz, W. P. Bandettini, A. E. Arai, W. H. Wilson, and S. E. Bates. Cardiac involvement with lymphoma : a review of the literature. *Clin Lymphoma Myeloma*, 8(4) :249–252, Aug 2008. 20
- [16] G. Mantzios, P. Tsigotis, F. Veliou, I. Boutsikakis, L. Petraki, J. Kolovos, S. Papageorgiou, and Y. Robos. Primary adrenal lymphoma presenting as Addison’s disease : case report and review of the literature. *Ann. Hematol.*, 83(7) :460–463, Jul 2004. 20
- [17] S. Nakayama, T. Yokote, M. Tsuji, Y. Hirata, K. Iwaki, A. Takayama, U. Nishiwaki, N. Hiraoka, T. Akioka, T. Miyoshi, Y. Masuda, and T. Hanafusa. Multiple cytokine-producing testicular malignant lymphoma with clinical symptoms resembling infectious signs. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 27(1) :103–107, 2014. 20
- [18] K. C. Lakshmaiah, B. K. Viveka, N. Anil Kumar, M. L. Saini, S. Sinha, and K. S. Saini. Gastric diffuse large B cell lymphoma presenting as paraneoplastic cerebellar degeneration : case report and review of literature. *J Egypt Natl Canc Inst*, 25(4) :231–235, Dec 2013. 20
- [19] M. Fiegl, A. Muigg, A. Smekal, J. Krugmann, S. Dirnhofer, and R. Greil. Diffuse large B-cell lymphoma with infiltration-associated peripheral neuropathy and paraneoplastic myopathy with a prolonged course over seven years. *Leuk. Lymphoma*, 43(8) :1687–1690, Aug 2002. 20
- [20] J. H. Yang, S. J. Choi, C. H. Won, S. Chang, M. W. Lee, J. R. Huh, K. H. Lee, J. H. Choi, and K. C. Moon. Paraneoplastic erythroderma : an unusual manifestation of diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Dermatol.*, 52(9) :1149–1151, Sep 2013. 20
- [21] A. Sirelkhatim, E. Kaiserova, A. Kolenova, J. Puskacova, Z. Subova, D. Petrzkalkova, K. Banikova, J. Suvada, and D. Sejnova. Systemic malignancies presenting as primary osteolytic lesion. *Bratisl Lek Listy*, 110(10) :630–635, 2009. 20

- [22] S. A. Rosenberg. Classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 84(5) :1359–1360, Sep 1994. 21
- [23] S. Gurbuxani, S. Gurbuxani, J. Anastasi, and E. Hyjek. Diffuse large B-cell lymphoma—more than a diffuse collection of large B cells : an entity in search of a meaningful classification. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 133(7) :1121–1134, Jul 2009. 21
- [24] S. Li, J. R. Eshleman, and M. J. Borowitz. Lack of surface immunoglobulin light chain expression by flow cytometric immunophenotyping can help diagnose peripheral B-cell lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 118(2) :229–234, Aug 2002. 21
- [25] M. Yamaguchi, M. Seto, M. Okamoto, R. Ichinohasama, N. Nakamura, T. Yoshino, J. Suzumiya, T. Murase, I. Miura, T. Akasaka, J. Tamaru, R. Suzuki, Y. Kagami, M. Hirano, Y. Morishima, R. Ueda, H. Shiku, and S. Nakamura. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma : a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood*, 99(3) :815–821, Feb 2002. 21
- [26] K. Fu, D. D. Weisenburger, W. W. Choi, K. D. Perry, L. M. Smith, X. Shi, C. P. Hans, T. C. Greiner, P. J. Bierman, R. G. Bociek, J. O. Armitage, W. C. Chan, and J. M. Vose. 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(28) :4587–4594, Oct 2008. 22
- [27] J. W. Friedberg and R. I. Fisher. Diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 22(5) :941–952, Oct 2008. 22
- [28] J. O. Armitage. My treatment approach to patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Mayo Clin. Proc.*, 87(2) :161–171, Feb 2012. 22
- [29] B. Coiffier, C. Thieblemont, E. Van Den Neste, G. Lepage, I. Plantier, S. Castaigne, S. Lefort, G. Marit, M. Macro, C. Sebban, K. Belhadj, D. Bordessoule, C. Ferme, and H. Tilly. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients : a study by the Groupe d’Etudes des Lymphomes de l’Adulte. *Blood*, 116(12) :2040–2045, Sep 2010. 22
- [30] A. A. Alizadeh, M. B. Eisen, R. E. Davis, C. Ma, I. S. Lossos, A. Rosenwald, J. C. Boldrick, H. Sabet, T. Tran, X. Yu, J. I. Powell, L. Yang, G. E. Marti, T. Moore, J. Hudson, L. Lu, D. B. Lewis, R. Tibshirani, G. Sherlock, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. Warnke, R. Levy, W. Wilson, M. R. Grever, J. C. Byrd, D. Botstein, P. O. Brown, and L. M. Staudt. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, 403(6769) :503–511, Feb 2000. 23
- [31] A. Rosenwald, G. Wright, W. C. Chan, J. M. Connors, E. Campo, R. I. Fisher, R. D. Gascoyne, H. K. Muller-Hermelink, E. B. Smeland, J. M. Giltner, E. M. Hurt, H. Zhao, L. Averett, L. Yang, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, R. Simon, R. D. Klausner, J. Powell, P. L. Duffey, D. L. Longo, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, W. G. Sanger, B. J. Dave, J. C. Lynch, J. Vose, J. O. Armitage, E. Montserrat, A. Lopez-Guillermo, T. M. Grogan, T. P. Miller, M. LeBlanc, G. Ott, S. Kvaloy, J. Delabie, H. Holte, P. Krajci, T. Stokke, and L. M. Staudt. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, 346(25) :1937–1947, Jun 2002. 23
- [32] H. Nyman, M. Adde, M. L. Karjalainen-Lindsberg, M. Taskinen, M. Berglund, R. M. Amini, C. Blomqvist, G. Enblad, and S. Leppa. Prognostic impact of immunohistochemically defined germinal center phenotype in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with immunochemotherapy. *Blood*, 109(11) :4930–4935, Jun 2007. 23

- [33] M. G. Tibiletti, V. Martin, B. Bernasconi, B. Del Curto, L. Pecciarini, S. Uccella, G. Pruneri, M. Ponzoni, L. Mazzucchelli, G. Martinelli, A. J. Ferreri, G. Pinotti, A. Assanelli, M. Scandurra, C. Doglioni, E. Zucca, C. Capella, and F. Bertoni. BCL2, BCL6, MYC, MALT 1, and BCL10 rearrangements in nodal diffuse large B-cell lymphomas : a multicenter evaluation of a new set of fluorescent in situ hybridization probes and correlation with clinical outcome. *Hum. Pathol.*, 40(5) :645–652, May 2009. [DOI :10.1016/j.humpath.2008.06.032] [PubMed :19144384]. 23
- [34] H. Nogai, B. Dorken, and G. Lenz. Pathogenesis of non-Hodgkin’s lymphoma. *J. Clin. Oncol.*, 29(14) :1803–1811, May 2011. [DOI :10.1200/JCO.2010.33.3252] [PubMed :21483013]. 23
- [35] S. Bea, A. Zettl, G. Wright, I. Salaverria, P. Jehn, V. Moreno, C. Burek, G. Ott, X. Puig, L. Yang, A. Lopez-Guillermo, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. O. Armitage, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, T. M. Grogan, R. Braziel, R. I. Fisher, E. B. Smeland, S. Kvaloy, H. Holte, J. Delabie, R. Simon, J. Powell, W. H. Wilson, E. S. Jaffe, E. Montserrat, H. K. Muller-Hermelink, L. M. Staudt, E. Campo, and A. Rosenwald. Diffuse large B-cell lymphoma subgroups have distinct genetic profiles that influence tumor biology and improve gene-expression-based survival prediction. *Blood*, 106(9) :3183–3190, Nov 2005. [PubMed Central :PMC1895326] [DOI :10.1182/blood-2005-04-1399] [PubMed :16046532]. 23, 24
- [36] H. Akasaka, T. Akasaka, M. Kurata, C. Ueda, A. Shimizu, T. Uchiyama, and H. Ohno. Molecular anatomy of BCL6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assays. *Cancer Res.*, 60(9) :2335–2341, May 2000. [PubMed :10811103]. 23
- [37] G. Lenz, G. W. Wright, N. C. Emre, H. Kohlhammer, S. S. Dave, R. E. Davis, S. Carty, L. T. Lam, A. L. Shaffer, W. Xiao, J. Powell, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, E. Campo, E. S. Jaffe, J. Delabie, E. B. Smeland, L. M. Rimsza, R. I. Fisher, D. D. Weisenburger, W. C. Chan, and L. M. Staudt. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(36) :13520–13525, Sep 2008. 23, 30
- [38] R. Nedomova, T. Papajik, V. Prochazka, K. Indrak, and M. Jarosova. Cytogenetics and molecular cytogenetics in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, 157(3) :239–247, Sep 2013. [DOI :10.5507/bp.2012.085] [PubMed :23132512]. 23
- [39] C. P. Hans, D. D. Weisenburger, T. C. Greiner, R. D. Gascoyne, J. Delabie, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, E. Campo, R. M. Braziel, E. S. Jaffe, Z. Pan, P. Farinha, L. M. Smith, B. Falini, A. H. Banham, A. Rosenwald, L. M. Staudt, J. M. Connors, J. O. Armitage, and W. C. Chan. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*, 103(1) :275–282, Jan 2004. 23
- [40] H. S. Hwang, C. S. Park, D. H. Yoon, C. Suh, and J. Huh. High concordance of gene expression profiling-correlated immunohistochemistry algorithms in diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Am. J. Surg. Pathol.*, 38(8) :1046–1057, Aug 2014. 23
- [41] E. Campo, S. H. Swerdlow, N. L. Harris, S. Pileri, H. Stein, and E. S. Jaffe. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond : evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19) :5019–5032, May 2011. 23
- [42] J. J. Steinhardt and R. B. Gartenhaus. Promising personalized therapeutic options for diffuse large B-cell Lymphoma Subtypes with oncogene addictions. *Clin. Cancer Res.*, 18(17) :4538–4548, Sep 2012. 23

- [43] C. J. Brown, S. Lain, C. S. Verma, A. R. Fersht, and D. P. Lane. Awakening guardian angels : drugging the p53 pathway. *Nat. Rev. Cancer*, 9(12) :862–873, Dec 2009. 24
- [44] K. H. Vousden and X. Lu. Live or let die : the cell’s response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2(8) :594–604, Aug 2002. 24
- [45] A. Petitjean, E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S. V. Tavtigian, P. Hainaut, and M. Olivier. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype : lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.*, 28(6) :622–629, Jun 2007. 24, 27
- [46] Z. Y. Xu-Monette, L. Wu, C. Visco, Y. C. Tai, A. Tzankov, W. M. Liu, S. Montes-Moreno, K. Dybkaer, A. Chiu, A. Orazi, Y. Zu, G. Bhagat, K. L. Richards, E. D. Hsi, X. F. Zhao, W. W. Choi, X. Zhao, J. H. van Krieken, Q. Huang, J. Huh, W. Ai, M. Ponzoni, A. J. Ferreri, F. Zhou, B. S. Kahl, J. N. Winter, W. Xu, J. Li, R. S. Go, Y. Li, M. A. Piris, M. B. M?ller, R. N. Miranda, L. V. Abruzzo, L. J. Medeiros, and K. H. Young. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP : report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*, 120(19) :3986–3996, Nov 2012. 24
- [47] A. J. Levine. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3) :323–331, Feb 1997. 24
- [48] D. P. Lane. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381) :15–16, Jul 1992. 24
- [49] Y. Yin and W. H. Shen. PTEN : a new guardian of the genome. *Oncogene*, 27(41) :5443–5453, Sep 2008. 24
- [50] T. F. Burns, P. Fei, K. A. Scata, D. T. Dicker, and W. S. El-Deiry. Silencing of the novel p53 target gene Snk/Plk2 leads to mitotic catastrophe in paclitaxel (taxol)-exposed cells. *Mol. Cell. Biol.*, 23(16) :5556–5571, Aug 2003. 24
- [51] K. H. Vousden and C. Prives. Blinded by the Light : The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3) :413–431, May 2009. 25
- [52] K. T. Biegging, S. S. Mello, and L. D. Attardi. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer*, 14(5) :359–370, May 2014. 25
- [53] G. G. Johnson, P. D. Sherrington, A. Carter, K. Lin, T. Liloglou, J. K. Field, and A. R. Pettitt. A novel type of p53 pathway dysfunction in chronic lymphocytic leukemia resulting from two interacting single nucleotide polymorphisms within the p21 gene. *Cancer Res.*, 69(12) :5210–5217, Jun 2009. 25
- [54] X. Wu, J. H. Bayle, D. Olson, and A. J. Levine. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.*, 7(7A) :1126–1132, Jul 1993. 25
- [55] J. Momand, D. Jung, S. Wilczynski, and J. Niland. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res.*, 26(15) :3453–3459, Aug 1998. 25
- [56] M. Li, J. Luo, C. L. Brooks, and W. Gu. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J. Biol. Chem.*, 277(52) :50607–50611, Dec 2002. 25
- [57] Y. Yang, R. L. Ludwig, J. P. Jensen, S. A. Pierre, M. V. Medaglia, I. V. Davydov, Y. J. Safiran, P. Oberoi, J. H. Kenten, A. C. Phillips, A. M. Weissman, and K. H. Vousden. Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell*, 7(6) :547–559, Jun 2005. 25

- [58] C. L. Brooks and W. Gu. p53 ubiquitination : Mdm2 and beyond. *Mol. Cell*, 21(3) :307–315, Feb 2006. 25
- [59] M. Mihara, S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U. M. Moll. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell*, 11(3) :577–590, Mar 2003. 25
- [60] S. P. Wang, W. L. Wang, Y. L. Chang, C. T. Wu, Y. C. Chao, S. H. Kao, A. Yuan, C. W. Lin, S. C. Yang, W. K. Chan, K. C. Li, T. M. Hong, and P. C. Yang. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nat. Cell Biol.*, 11(6) :694–704, Jun 2009. 25
- [61] H. Peinado, D. Olmeda, and A. Cano. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression : an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer*, 7(6) :415–428, Jun 2007. 25
- [62] S. O. Lim, H. Kim, and G. Jung. p53 inhibits tumor cell invasion via the degradation of snail protein in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett.*, 584(11) :2231–2236, Jun 2010. 25
- [63] D. Kenzelmann Broz and L. D. Attardi. In vivo analysis of p53 tumor suppressor function using genetically engineered mouse models. *Carcinogenesis*, 31(8) :1311–1318, Aug 2010. 25
- [64] B. Austen, J. E. Powell, A. Alvi, I. Edwards, L. Hooper, J. Starczynski, A. M. Taylor, C. Fegan, P. Moss, and T. Stankovic. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*, 106(9) :3175–3182, Nov 2005. 25
- [65] F. Jardin and B. Coiffier. TP53 and outcome in DLBCL : not only the coding region. *Blood*, 121(22) :4433–4434, May 2013. 25
- [66] F. Vikhanskaya, M. M. Siddique, M. Kei Lee, M. Brogini, and K. Sabapathy. Evaluation of the combined effect of p53 codon 72 polymorphism and hotspot mutations in response to anticancer drugs. *Clin. Cancer Res.*, 11(12) :4348–4356, Jun 2005. 25
- [67] Y. Li, F. Guessous, S. Kwon, M. Kumar, O. Ibidapo, L. Fuller, E. Johnson, B. Lal, I. Husaini, Y. Bao, J. Laterra, D. Schiff, and R. Abounader. PTEN has tumor-promoting properties in the setting of gain-of-function p53 mutations. *Cancer Res.*, 68(6) :1723–1731, Mar 2008. 25
- [68] S. Haupt, D. Raghunath, and Y. Haupt. Mutant p53 Drives Cancer by Subverting Multiple Tumor Suppression Pathways. *Front Oncol*, 6 :12, 2016. 25
- [69] P. P. Pandolfi, M. Alcalay, M. Fagioli, D. Zangrilli, A. Mencarelli, D. Diverio, A. Biondi, F. Lo Coco, A. Rambaldi, and F. Grignani. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.*, 11(4) :1397–1407, Apr 1992. 25
- [70] F. Valenti, F. Fausti, F. Biagioni, T. Shay, G. Fontemaggi, E. Domany, M. B. Yaffe, S. Strano, G. Blandino, and S. Di Agostino. Mutant p53 oncogenic functions are sustained by Plk2 kinase through an autoregulatory feedback loop. *Cell Cycle*, 10(24) :4330–4340, Dec 2011. 25
- [71] E. Kalo, I. Kogan-Sakin, H. Solomon, E. Bar-Nathan, M. Shay, Y. Shetzer, E. Dekel, N. Goldfinger, Y. Buganim, P. Stambolsky, I. Goldstein, S. Madar, and V. Rotter. Mutant

- p53R273H attenuates the expression of phase 2 detoxifying enzymes and promotes the survival of cells with high levels of reactive oxygen species. *J. Cell. Sci.*, 125(Pt 22) :5578–5586, Nov 2012. 25
- [72] C. Zhang, J. Liu, Y. Liang, R. Wu, Y. Zhao, X. Hong, M. Lin, H. Yu, L. Liu, A. J. Levine, W. Hu, and Z. Feng. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nat Commun*, 4 :2935, 2013. 25
- [73] W. A. Freed-Pastor, H. Mizuno, X. Zhao, A. Langer ^d, S. H. Moon, R. Rodriguez-Barrueco, A. Barsotti, A. Chicas, W. Li, A. Polotskaia, M. J. Bissell, T. F. Osborne, B. Tian, S. W. Lowe, J. M. Silva, A. L. B ^rresen-Dale, A. J. Levine, J. Bargonetti, and C. Prives. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell*, 148(1-2) :244–258, Jan 2012. 25
- [74] D. R. Morales and A. D. Morris. Metformin in cancer treatment and prevention. *Annu. Rev. Med.*, 66 :17–29, 2015. 25
- [75] M. Kollareddy, E. Dimitrova, K. C. Vallabhaneni, A. Chan, T. Le, K. M. Chauhan, Z. I. Carrero, G. Ramakrishnan, K. Watabe, Y. Haupt, S. Haupt, R. Pochampally, G. R. Boss, D. G. Romero, C. G. Radu, and L. A. Martinez. Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nat Commun*, 6 :7389, 2015. 25
- [76] M. Subramanian, P. Francis, S. Bilke, X. L. Li, T. Hara, X. Lu, M. F. Jones, R. L. Walker, Y. Zhu, M. Pineda, C. Lee, L. Varanasi, Y. Yang, L. A. Martinez, J. Luo, S. Ambs, S. Sharma, L. M. Wakefield, P. S. Meltzer, and A. Lal. A mutant p53/let-7i-axis-regulated gene network drives cell migration, invasion and metastasis. *Oncogene*, 34(9) :1094–1104, Feb 2015. 26
- [77] S. Weissmueller, E. Manchado, M. Saborowski, J. P. Morris, E. Wagenblast, C. A. Davis, S. H. Moon, N. T. Pfister, D. F. Tschaharganeh, T. Kitzing, D. Aust, E. K. Markert, J. Wu, S. M. Grimmond, C. Pilarsky, C. Prives, A. V. Biankin, and S. W. Lowe. Mutant p53 drives pancreatic cancer metastasis through cell-autonomous PDGF receptor \hat{I}^2 signaling. *Cell*, 157(2) :382–394, Apr 2014. 26
- [78] P. M. Do, L. Varanasi, S. Fan, C. Li, I. Kubacka, V. Newman, K. Chauhan, S. R. Daniels, M. Bocchetta, M. R. Garrett, R. Li, and L. A. Martinez. Mutant p53 cooperates with ETS2 to promote etoposide resistance. *Genes Dev.*, 26(8) :830–845, Apr 2012. 26
- [79] J. Zhu, M. A. Sammons, G. Donahue, Z. Dou, M. Vedadi, M. Getlik, D. Barsyte-Lovejoy, R. Al-awar, B. W. Katona, A. Shilatifard, J. Huang, X. Hua, C. H. Arrowsmith, and S. L. Berger. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature*, 525(7568) :206–211, Sep 2015. 26
- [80] P. Dong, M. Karaayvaz, N. Jia, M. Kaneuchi, J. Hamada, H. Watari, S. Sudo, J. Ju, and N. Sakuragi. Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene*, 32(27) :3286–3295, Jul 2013. 26
- [81] A. Ali, Z. Wang, J. Fu, L. Ji, J. Liu, L. Li, H. Wang, J. Chen, C. Caulin, J. N. Myers, P. Zhang, J. Xiao, B. Zhang, and X. Li. Differential regulation of the REG \hat{I}^3 -proteasome pathway by p53/TGF- \hat{I}^2 signalling and mutant p53 in cancer cells. *Nat Commun*, 4 :2667, 2013. 26

- [82] H. Wang, W. Bao, F. Jiang, Q. Che, Z. Chen, F. Wang, H. Tong, C. Dai, X. He, Y. Liao, B. Liu, J. Sun, and X. Wan. Mutant p53 (p53-R248Q) functions as an oncogene in promoting endometrial cancer by up-regulating REG β . *Cancer Lett.*, 360(2) :269–279, May 2015. 26
- [83] X. Chen, L. F. Barton, Y. Chi, B. E. Clurman, and J. M. Roberts. Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REG γ proteasome. *Mol. Cell*, 26(6) :843–852, Jun 2007. 26
- [84] J. He, L. Cui, Y. Zeng, G. Wang, P. Zhou, Y. Yang, L. Ji, Y. Zhao, J. Chen, Z. Wang, T. Shi, P. Zhang, R. Chen, and X. Li. REG β is associated with multiple oncogenic pathways in human cancers. *BMC Cancer*, 12 :75, 2012. 26
- [85] M. Oren and E. Kotler. p53 mutations promote proteasomal activity. *Nat. Cell Biol.*, 18(8) :833–835, Jul 2016. 26
- [86] D. Walerych, K. Lisek, R. Sommaggio, S. Piazza, Y. Ciani, E. Dalla, K. Rajkowska, K. Gaweda-Walerych, E. Ingallina, C. Tonelli, M. J. Morelli, A. Amato, V. Eterno, A. Zambelli, A. Rosato, B. Amati, J. R. Wi \acute{n} iewski, and G. Del Sal. Proteasome machinery is instrumental in a common gain-of-function program of the p53 missense mutants in cancer. *Nat. Cell Biol.*, 18(8) :897–909, Aug 2016. 26
- [87] W. Hanel, N. Marchenko, S. Xu, S. X. Yu, W. Weng, and U. Moll. Two hot spot mutant p53 mouse models display differential gain of function in tumorigenesis. *Cell Death Differ.*, 20(7) :898–909, Jul 2013. 26, 85, 86
- [88] J. M. Lambert, P. Gorzov, D. B. Veprintsev, M. Soderqvist, D. Segerback, J. Bergman, A. R. Fersht, P. Hainaut, K. G. Wiman, and V. J. Bykov. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer Cell*, 15(5) :376–388, May 2009. 26
- [89] S. Deneberg, H. Cherif, V. Lazarevic, P. O. Andersson, M. von Euler, G. Juliusson, and S. Lehmann. An open-label phase I dose-finding study of APR-246 in hematological malignancies. *Blood Cancer J*, 6(7) :e447, 2016. 26
- [90] Y. Cho, S. Gorina, P. D. Jeffrey, and N. P. Pavletich. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex : understanding tumorigenic mutations. *Science*, 265(5170) :346–355, Jul 1994. 27
- [91] A. C. Joerger and A. R. Fersht. The tumor suppressor p53 : from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(6) :a000919, Jun 2010. [PubMed Central :PMC2869527] [DOI :10.1101/cshperspect.a000919] [PubMed :20516128]. 27
- [92] D. Krappmann and M. Vincendeau. Mechanisms of NF- κ B deregulation in lymphoid malignancies. *Semin. Cancer Biol.*, Jun 2016. 27
- [93] K. H. Lim, Y. Yang, and L. M. Staudt. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF- κ B in lymphoid malignancies. *Immunol. Rev.*, 246(1) :359–378, Mar 2012. 27
- [94] D. J. Rawlings, M. A. Schwartz, S. W. Jackson, and A. Meyer-Bahlburg. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat. Rev. Immunol.*, 12(4) :282–294, Apr 2012. 28
- [95] S. Gerondakis and U. Siebenlist. Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5) :a000182, May 2010. 28

- [96] K. Basso, U. Klein, H. Niu, G. A. Stolovitzky, Y. Tu, A. Califano, G. Cattoretti, and R. Dalla-Favera. Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood*, 104(13) :4088–4096, Dec 2004. 28
- [97] K. Rajewsky. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381(6585) :751–758, Jun 1996. 28
- [98] N. S. De Silva and U. Klein. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.*, 15(3) :137–148, Mar 2015. 28
- [99] I. Luque and C. Gelinas. Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 8(2) :103–111, Apr 1997. 28
- [100] M. Karin. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(5) :a000141, Nov 2009. 28
- [101] J. Mandelbaum, G. Bhagat, H. Tang, T. Mo, M. Brahmachary, Q. Shen, A. Chadburn, K. Rajewsky, A. Tarakhovsky, L. Pasqualucci, and R. Dalla-Favera. BLIMP1 is a tumor suppressor gene frequently disrupted in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, 18(6) :568–579, Dec 2010. 28
- [102] H. Schmidlin, S. A. Diehl, M. Nagasawa, F. A. Scheeren, R. Schotte, C. H. Uittenbogaart, H. Spits, and B. Blom. Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression. *Blood*, 112(5) :1804–1812, Sep 2008. 28
- [103] W. Tam, M. Gomez, A. Chadburn, J. W. Lee, W. C. Chan, and D. M. Knowles. Mutational analysis of PRDM1 indicates a tumor-suppressor role in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 107(10) :4090–4100, May 2006. 28
- [104] G. Wright, B. Tan, A. Rosenwald, E. H. Hurt, A. Wiestner, and L. M. Staudt. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100(17) :9991–9996, Aug 2003. 28
- [105] D. P. Calado, B. Zhang, L. Srinivasan, Y. Sasaki, J. Seagal, C. Unitt, S. Rodig, J. Kutok, A. Tarakhovsky, M. Schmidt-Supprian, and K. Rajewsky. Constitutive canonical NF- κ B activation cooperates with disruption of BLIMP1 in the pathogenesis of activated B cell-like diffuse large cell lymphoma. *Cancer Cell*, 18(6) :580–589, Dec 2010. 28
- [106] R. E. Davis, K. D. Brown, U. Siebenlist, and L. M. Staudt. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.*, 194(12) :1861–1874, Dec 2001. 28
- [107] L. Mansouri, L. A. Sutton, V. Ljungstrom, S. Bondza, L. Arngarden, S. Bhoi, J. Larsson, D. Cortese, A. Kalushkova, K. Plevova, E. Young, R. Gunnarsson, E. Falk-Sorqvist, P. Lonn, A. F. Muggen, X. J. Yan, B. Sander, G. Enblad, K. E. Smedby, G. Juliusson, C. Belessi, J. Rung, N. Chiorazzi, J. C. Strefford, A. W. Langerak, S. Pospisilova, F. Davi, M. Hellstrom, H. Jernberg-Wiklund, P. Ghia, O. Soderberg, K. Stamatopoulos, M. Nilsson, and R. Rosenquist. Functional loss of $\text{I}\kappa\text{B}\beta$ leads to NF- κ B deregulation in aggressive chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, 212(6) :833–843, Jun 2015. 28
- [108] S. Palmer and Y. H. Chen. Bcl-3, a multifaceted modulator of NF-kappaB-mediated gene transcription. *Immunol. Res.*, 42(1-3) :210–218, 2008. 28
- [109] T. D. Gilmore and S. Gerondakis. The c-Rel Transcription Factor in Development and Disease. *Genes Cancer*, 2(7) :695–711, Jul 2011. 28

- [110] M. Chin, M. Herscovitch, N. Zhang, D. J. Waxman, and T. D. Gilmore. Overexpression of an activated REL mutant enhances the transformed state of the human B-lymphoma BJAB cell line and alters its gene expression profile. *Oncogene*, 28(20) :2100–2111, May 2009. 28
- [111] H. Nogai, S. S. Wenzel, S. Hailfinger, M. Grau, E. Kaergel, V. Seitz, B. Wollert-Wulf, M. Pfeifer, A. Wolf, M. Frick, K. Dietze, H. Madle, A. Tzankov, M. Hummel, B. Dorken, C. Scheidereit, M. Janz, P. Lenz, M. Thome, and G. Lenz. $\text{I}\kappa\text{B-}\zeta$ controls the constitutive NF- κB target gene network and survival of ABC DLBCL. *Blood*, 122(13) :2242–2250, Sep 2013. 28
- [112] M. Compagno, W. K. Lim, A. Grunn, S. V. Nandula, M. Brahmachary, Q. Shen, F. Bertoni, M. Ponzoni, M. Scandurra, A. Califano, G. Bhagat, A. Chadburn, R. Dalla-Favera, and L. Pasqualucci. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 459(7247) :717–721, Jun 2009. 29, 86
- [113] R. M. Young, T. Wu, R. Schmitz, M. Dawood, W. Xiao, J. D. Phelan, W. Xu, L. Menard, E. Meffre, W. C. Chan, E. S. Jaffe, R. D. Gascoyne, E. Campo, A. Rosenwald, G. Ott, J. Delabie, L. M. Rimsza, and L. M. Staudt. Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(44) :13447–13454, Nov 2015. 29
- [114] J. M. Dal Porto, S. B. Gauld, K. T. Merrell, D. Mills, A. E. Pugh-Bernard, and J. Cambier. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.*, 41(6-7) :599–613, Jul 2004. 29
- [115] H. Flaswinkel and M. Reth. Dual role of the tyrosine activation motif of the Ig-alpha protein during signal transduction via the B cell antigen receptor. *EMBO J.*, 13(1) :83–89, Jan 1994. 29
- [116] R. E. Davis, V. N. Ngo, G. Lenz, P. Tolar, R. M. Young, P. B. Romesser, H. Kohlhammer, L. Lamy, H. Zhao, Y. Yang, W. Xu, A. L. Shaffer, G. Wright, W. Xiao, J. Powell, J. K. Jiang, C. J. Thomas, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, N. A. Johnson, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, W. H. Wilson, J. Delabie, E. B. Smeland, R. I. Fisher, R. M. Braziel, R. R. Tubbs, J. R. Cook, D. D. Weisenburger, W. C. Chan, S. K. Pierce, and L. M. Staudt. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*, 463(7277) :88–92, Jan 2010. 29
- [117] A. Gazumyan, A. Reichlin, and M. C. Nussenzweig. Ig beta tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization. *J. Exp. Med.*, 203(7) :1785–1794, Jul 2006. 29
- [118] L. Sun, L. Deng, C. K. Ea, Z. P. Xia, and Z. J. Chen. The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol. Cell*, 14(3) :289–301, May 2004. 29
- [119] M. Jaworski and M. Thome. The paracaspase MALT1 : biological function and potential for therapeutic inhibition. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73(3) :459–473, Feb 2016. 29
- [120] G. Lenz, R. E. Davis, V. N. Ngo, L. Lam, T. C. George, G. W. Wright, S. S. Dave, H. Zhao, W. Xu, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, J. Delabie, E. B. Smeland, R. I. Fisher, W. C. Chan, and L. M. Staudt. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science*, 319(5870) :1676–1679, Mar 2008. 30

- [121] E. Bohers, S. Mareschal, A. Bouzefen, V. Marchand, P. Ruminy, C. Maingonnat, A. L. Menard, P. Etancelin, P. Bertrand, S. Dubois, M. Alcantara, C. Bastard, H. Tilly, and F. Jardin. Targetable activating mutations are very frequent in GCB and ABC diffuse large B-cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 53(2) :144–153, Feb 2014. 30, 33, 118
- [122] S. Rosebeck, A. O. Rehman, P. C. Lucas, and L. M. McAllister-Lucas. From MALT lymphoma to the CBM signalosome : three decades of discovery. *Cell Cycle*, 10(15) :2485–2496, Aug 2011. 30
- [123] V. N. Ngo, R. E. Davis, L. Lamy, X. Yu, H. Zhao, G. Lenz, L. T. Lam, S. Dave, L. Yang, J. Powell, and L. M. Staudt. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature*, 441(7089) :106–110, May 2006. 30
- [124] A. S. Brohl, J. R. Stinson, H. C. Su, T. Badgett, C. D. Jennings, G. Sukumar, S. Sindiri, W. Wang, L. Kardava, S. Moir, C. L. Dalgard, J. A. Moscow, J. Khan, and A. L. Snow. Germline CARD11 Mutation in a Patient with Severe Congenital B Cell Lymphocytosis. *J. Clin. Immunol.*, 35(1) :32–46, Jan 2015. 30
- [125] D. Buchbinder, J. R. Stinson, D. J. Nugent, L. Heurtier, F. Suarez, G. Sukumar, C. L. Dalgard, C. Masson, M. Parisot, Y. Zhang, H. F. Matthews, H. C. Su, A. Durandy, A. Fischer, S. Kracker, and A. L. Snow. Mild B-cell lymphocytosis in patients with a CARD11 C49Y mutation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 136(3) :819–821, Sep 2015. 30
- [126] M. Juilland and M. Thome. Role of the CARMA1/BCL10/MALT1 complex in lymphoid malignancies. *Curr. Opin. Hematol.*, 23(4) :402–409, Jul 2016. 30
- [127] C. Vicente-Duenas, L. Fontan, I. Gonzalez-Herrero, I. Romero-Camarero, V. Segura, M. A. Aznar, E. Alonso-Escudero, E. Campos-Sanchez, L. Ruiz-Roca, M. Barajas-Diego, A. Sargadoy, J. I. Martinez-Ferrandis, F. Abollo-Jimenez, C. Bertolo, I. Penuelas, F. J. Garcia-Criado, M. B. Garcia-Cenador, T. Tousseyn, X. Agirre, F. Prosper, F. Garcia-Bragado, E. D. McPhail, I. S. Lossos, M. Q. Du, T. Flores, J. M. Hernandez-Rivas, M. Gonzalez, A. Salar, B. Bellosillo, E. Conde, R. Siebert, X. Sagaert, C. Cobaleda, I. Sanchez-Garcia, and J. A. Martinez-Climent. Expression of MALT1 oncogene in hematopoietic stem/progenitor cells recapitulates the pathogenesis of human lymphoma in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(26) :10534–10539, Jun 2012. 30
- [128] Q. Qiao, C. Yang, C. Zheng, L. Fontan, L. David, X. Yu, C. Bracken, M. Rosen, A. Melnick, E. H. Egelman, and H. Wu. Structural architecture of the CARMA1/Bcl10/MALT1 signalosome : nucleation-induced filamentous assembly. *Mol. Cell*, 51(6) :766–779, Sep 2013. 30
- [129] N. Knies, B. Alankus, A. Weilemann, A. Tzankov, K. Brunner, T. Ruff, M. Kremer, U. B. Keller, G. Lenz, and J. Ruland. Lymphomagenic CARD11/BCL10/MALT1 signaling drives malignant B-cell proliferation via cooperative NF- κ B and JNK activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(52) :E7230–7238, Dec 2015. 30
- [130] M. Roschewski, L. M. Staudt, and W. H. Wilson. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat Rev Clin Oncol*, 11(1) :12–23, Jan 2014. [DOI :10.1038/nrclinonc.2013.197] [PubMed :24217204]. 31, 32
- [131] L. A. Honigberg, A. M. Smith, M. Sirisawad, E. Verner, D. Loury, B. Chang, S. Li, Z. Pan, D. H. Thamm, R. A. Miller, and J. J. Buggy. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(29) :13075–13080, Jul 2010. 31

- [132] R. W. Hendriks, S. Yuvaraj, and L. P. Kil. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat. Rev. Cancer*, 14(4) :219–232, Apr 2014. 31
- [133] W. H. Wilson, R. M. Young, R. Schmitz, Y. Yang, S. Pittaluga, G. Wright, C. J. Lih, P. M. Williams, A. L. Shaffer, J. Gerecitano, S. de Vos, A. Goy, V. P. Kenkre, P. M. Barr, K. A. Blum, A. Shustov, R. Advani, N. H. Fowler, J. M. Vose, R. L. Elstrom, T. M. Habermann, J. C. Barrientos, J. McGreivy, M. Fardis, B. Y. Chang, F. Clow, B. Munneke, D. Moussa, D. M. Beaupre, and L. M. Staudt. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat. Med.*, 21(8) :922–926, Aug 2015. 31, 83, 84, 86
- [134] C. Wu, N. F. de Miranda, L. Chen, A. M. Wasik, L. Mansouri, W. Jurczak, K. Galazka, M. Dlugosz-Danecka, M. Machaczka, H. Zhang, R. Peng, R. D. Morin, R. Rosenquist, B. Sander, and Q. Pan-Hammarstrom. Genetic heterogeneity in primary and relapsed mantle cell lymphomas : Impact of recurrent CARD11 mutations. *Oncotarget*, May 2016. 31
- [135] S. Q. Zhang, S. M. Smith, S. Y. Zhang, and Y. Lynn Wang. Mechanisms of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukaemia and non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 170(4) :445–456, Aug 2015. 31
- [136] LLC Janssen Research & Development. A study of the bruton's tyrosine kinase inhibitor, pci-32765 (ibrutinib), in combination with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in patients with newly diagnosed non-germinal center b-cell subtype of diffuse large b-cell lymphoma, 2016. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01855750>. 31
- [137] ANSM. ATU ibrutinib, 2014. http://ansm.sante.fr/content/download/59075/761323/version/2/file/pi-140217-Atu-Ibrutinib_v2.pdf. 31
- [138] J. W. Friedberg, J. Sharman, J. Sweetenham, P. B. Johnston, J. M. Vose, A. Lacasce, J. Schaefer-Cuttillo, S. De Vos, R. Sinha, J. P. Leonard, L. D. Cripe, S. A. Gregory, M. P. Sterba, A. M. Lowe, R. Levy, and M. A. Shipp. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 115(13) :2578–2585, Apr 2010. 32
- [139] J. Wagner, P. von Matt, R. Sedrani, R. Albert, N. Cooke, C. Ehrhardt, M. Geiser, G. Rummel, W. Stark, A. Strauss, S. W. Cowan-Jacob, C. Beerli, G. Weckbecker, J. P. Evnou, G. Zenke, and S. Cottens. Discovery of 3-(1H-indol-3-yl)-4-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)quinazolin-4-yl]pyrrole-2,5-dione (AEB071), a potent and selective inhibitor of protein kinase C isotypes. *J. Med. Chem.*, 52(20) :6193–6196, Oct 2009. 32
- [140] T. L. Naylor, H. Tang, B. A. Ratsch, A. Enns, A. Loo, L. Chen, P. Lenz, N. J. Waters, W. Schuler, B. Dorken, Y. M. Yao, M. Warmuth, G. Lenz, and F. Stegmeier. Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Res.*, 71(7) :2643–2653, Apr 2011. 32
- [141] R. Rahal, M. Frick, R. Romero, J. M. Korn, R. Kridel, F. C. Chan, B. Meissner, H. E. Bhang, D. Ruddy, A. Kauffmann, A. Farsidjani, A. Derti, D. Rakiec, T. Naylor, E. Pfister, S. Kovats, S. Kim, K. Dietze, B. Dorken, C. Steidl, A. Tzankov, M. Hummel, J. Monahan, M. P. Morrissey, C. Fritsch, W. R. Sellers, V. G. Cooke, R. D. Gascoyne, G. Lenz, and F. Stegmeier. Pharmacological and genomic profiling identifies NF- κ B-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat. Med.*, 20(1) :87–92, Jan 2014. 32
- [142] Novartis Pharmaceuticals. Study of aeb071 (a protein kinase c inhibitor) in patients with cd79-mutant diffuse large b-cell lymphoma, 2015. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01402440>. 32

- [143] Fayad LE Lee J Di Rocco A Ogura M et al. Crump MLS, Leppa S. A phase III study of enzastaurin in patients with high-risk diffuse large b cell lymphoma following response to primary treatment : the prelude trial. *Blood*, 122(21) :371, 2013. 32
- [144] K. Dunleavy, S. Pittaluga, M. S. Czuczman, S. S. Dave, G. Wright, N. Grant, M. Shovlin, E. S. Jaffe, J. E. Janik, L. M. Staudt, and W. H. Wilson. Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 113(24) :6069–6076, Jun 2009. 32
- [145] P. L. Zinzani, C. Pellegrini, E. Merla, F. Ballerini, A. Fabbri, A. Guarini, V. Pavone, G. Quintini, B. Puccini, M. L. Vigliotti, V. Stefoni, E. Derenzini, A. Broccoli, L. Gandolfi, F. Quirini, B. Casadei, L. Argnani, and M. Baccarani. Bortezomib as salvage treatment for heavily pretreated relapsed lymphoma patients : a multicenter retrospective study. *Hematol Oncol*, 31(4) :179–182, Dec 2013. 32
- [146] X. Y. Pei, Y. Dai, J. Felthousen, S. Chen, Y. Takabatake, L. Zhou, L. E. Youssefian, M. W. Sanderson, W. W. Bodie, L. B. Kramer, R. Z. Orlowski, and S. Grant. Circumvention of Mcl-1-dependent drug resistance by simultaneous Chk1 and MEK1/2 inhibition in human multiple myeloma cells. *PLoS ONE*, 9(3) :e89064, 2014. 32
- [147] R. Shringarpure, L. Catley, D. Bhole, R. Burger, K. Podar, Y. T. Tai, B. Kessler, P. Galarly, H. Ploegh, P. Tassone, T. Hideshima, C. Mitsiades, N. C. Munshi, D. Chauhan, and K. C. Anderson. Gene expression analysis of B-lymphoma cells resistant and sensitive to bortezomib. *Br. J. Haematol.*, 134(2) :145–156, Jul 2006. 32
- [148] G. Roue, P. Perez-Galan, A. Mozos, M. Lopez-Guerra, S. Xargay-Torrent, L. Rosich, I. Saborit-Villarroya, E. Normant, E. Campo, and D. Colomer. The Hsp90 inhibitor IPI-504 overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma in vitro and in vivo by down-regulation of the prosurvival ER chaperone BiP/Grp78. *Blood*, 117(4) :1270–1279, Jan 2011. 32
- [149] R. Scholtysik, M. Kreuz, M. Hummel, M. Rosolowski, M. Szczepanowski, W. Klapper, M. Loeffler, L. Trumper, R. Siebert, and R. Kuppers. Characterization of genomic imbalances in diffuse large B-cell lymphoma by detailed SNP-chip analysis. *Int. J. Cancer*, 136(5) :1033–1042, Mar 2015. 32
- [150] L. Fontan, C. Yang, V. Kabaleeswaran, L. Volpon, M. J. Osborne, E. Beltran, M. Garcia, L. Cerchietti, R. Shaknovich, S. N. Yang, F. Fang, R. D. Gascoyne, J. A. Martinez-Climent, J. F. Glickman, K. Borden, H. Wu, and A. Melnick. MALT1 small molecule inhibitors specifically suppress ABC-DLBCL in vitro and in vivo. *Cancer Cell*, 22(6) :812–824, Dec 2012. 32
- [151] L. H. Zhang, J. Kosek, M. Wang, C. Heise, P. H. Schafer, and R. Chopra. Lenalidomide efficacy in activated B-cell-like subtype diffuse large B-cell lymphoma is dependent upon IRF4 and cereblon expression. *Br. J. Haematol.*, 160(4) :487–502, Feb 2013. 32
- [152] P. P. Chamberlain, A. Lopez-Girona, K. Miller, G. Carmel, B. Pagarigan, B. Chie-Leon, E. Rychak, L. G. Corral, Y. J. Ren, M. Wang, M. Riley, S. L. Delker, T. Ito, H. Ando, T. Mori, Y. Hirano, H. Handa, T. Hakoshima, T. O. Daniel, and B. E. Cathers. Structure of the human Cereblon-DDB1-lenalidomide complex reveals basis for responsiveness to thalidomide analogs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 21(9) :803–809, Sep 2014. 32
- [153] G. Lu, R. E. Middleton, H. Sun, M. Naniong, C. J. Ott, C. S. Mitsiades, K. K. Wong, J. E. Bradner, and W. G. Kaelin. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins. *Science*, 343(6168) :305–309, Jan 2014. 32

- [154] P. R. Hagner, H. W. Man, C. Fontanillo, M. Wang, S. Couto, M. Breider, C. Bjorklund, C. G. Havens, G. Lu, E. Rychak, H. Raymon, R. K. Narla, L. Barnes, G. Khambatta, H. Chiu, J. Kosek, J. Kang, M. D. Amantangelo, M. Waldman, A. Lopez-Girona, T. Cai, M. Pourdehnad, M. Trotter, T. O. Daniel, P. H. Schafer, A. Klippel, A. Thakurta, R. Chopra, and A. K. Gandhi. CC-122, a pleiotropic pathway modifier, mimics an interferon response and has antitumor activity in DLBCL. *Blood*, 126(6) :779–789, Aug 2015. 32
- [155] G. S. Nowakowski. Evolution : IMiDs to PPMs, revolution in DLBCL ? *Blood*, 126(6) :698–700, Aug 2015. 32
- [156] F. J. Hernandez-Ilizaliturri, G. Deeb, P. L. Zinzani, S. A. Pileri, F. Malik, W. R. Macon, A. Goy, T. E. Witzig, and M. S. Czuczman. Higher response to lenalidomide in relapsed/-refractory diffuse large B-cell lymphoma in nongerminal center B-cell-like than in germinal center B-cell-like phenotype. *Cancer*, 117(22) :5058–5066, Nov 2011. 32
- [157] G. S. Nowakowski, B. LaPlant, T. M. Habermann, C. E. Rivera, W. R. Macon, D. J. Inwards, I. N. Micallef, P. B. Johnston, L. F. Porrata, S. M. Ansell, R. R. Klebig, C. B. Reeder, and T. E. Witzig. Lenalidomide can be safely combined with R-CHOP (R2CHOP) in the initial chemotherapy for aggressive B-cell lymphomas : phase I study. *Leukemia*, 25(12) :1877–1881, Dec 2011. 32
- [158] T. E. Witzig, G. S. Nowakowski, T. M. Habermann, A. Goy, F. J. Hernandez-Ilizaliturri, A. Chiappella, U. Vitolo, N. Fowler, and M. S. Czuczman. A comprehensive review of lenalidomide therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Ann. Oncol.*, 26(8) :1667–1677, Aug 2015. 32
- [159] Y. Yang, A. L. Shaffer, N. C. Emre, M. Ceribelli, M. Zhang, G. Wright, W. Xiao, J. Powell, J. Platig, H. Kohlhammer, R. M. Young, H. Zhao, Y. Yang, W. Xu, J. J. Buggy, S. Balasubramanian, L. A. Mathews, P. Shinn, R. Guha, M. Ferrer, C. Thomas, T. A. Waldmann, and L. M. Staudt. Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*, 21(6) :723–737, Jun 2012. 32
- [160] Gharibo M Gironella M Santoro A Rasco DW et al. Ribrag V, Damian S. Cc-122 degrades the lymphoid transcription factor aiolos (ikzf3) by modulating cereblon and shows clinical activity in a phase ib study of subjects with relapsed or refractory non-hodgkin’s lymphoma and multiple myeloma. *San Francisco, CA USA : Presented at the ASH 56th Annual Meeting*, 2014. 32
- [161] S. Gerondakis, R. J. Grumont, and A. Banerjee. Regulating B-cell activation and survival in response to TLR signals. *Immunol. Cell Biol.*, 85(6) :471–475, 2007. 33
- [162] V. N. Ngo, R. M. Young, R. Schmitz, S. Jhavar, W. Xiao, K. H. Lim, H. Kohlhammer, W. Xu, Y. Yang, H. Zhao, A. L. Shaffer, P. Romesser, G. Wright, J. Powell, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, J. Delabie, E. B. Smeland, R. I. Fisher, R. M. Braziel, R. R. Tubbs, J. R. Cook, D. D. Weisenburger, W. C. Chan, and L. M. Staudt. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature*, 470(7332) :115–119, Feb 2011. 33, 118
- [163] C. Fernandez-Rodriguez, B. Bellosillo, M. Garcia-Garcia, B. Sanchez-Gonzalez, E. Gimeno, M. C. Vela, S. Serrano, C. Besses, and A. Salar. MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 28(10) :2104–2106, Oct 2014. 33, 118
- [164] Y. Kim, H. Ju, D. H. Kim, H. Y. Yoo, S. J. Kim, W. S. Kim, and Y. H. Ko. CD79B and MYD88 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum. Pathol.*, 45(3) :556–564, Mar 2014. 33, 83, 84, 86, 119, 120

- [165] S. Poulain, C. Roumier, A. Decambron, A. Renneville, C. Herbaux, E. Bertrand, S. Tricot, A. Daudignon, S. Galiegue-Zouitina, V. Soenen, O. Theisen, N. Gardel, O. Nibourel, C. Roche-Lestienne, B. Quesnel, P. Duthilleul, C. Preudhomme, and X. Leleu. MYD88 L265P mutation in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood*, 121(22) :4504–4511, May 2013. 33
- [166] G. Knittel, P. Liedgens, D. Korovkina, J. M. Seeger, Y. Al-Baldawi, M. Al-Maarri, C. Fritz, K. Vlantis, S. Bezhanova, A. H. Scheel, O. O. Wolz, M. Reimann, P. Moller, C. Lopez, M. Schlesner, P. Lohneis, A. N. Weber, L. Trumper, L. M. Staudt, M. Ortmann, M. Pasparakis, R. Siebert, C. A. Schmitt, A. R. Klatt, F. T. Wunderlich, S. C. Schafer, T. Persigehl, M. Montesinos-Rongen, M. Odenthal, R. Buttner, L. P. Frenzel, H. Kashkar, and H. C. Reinhardt. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood*, 127(22) :2732–2741, Jun 2016. 33
- [167] P. N. Kelly, D. L. Romero, Y. Yang, A. L. Shaffer, D. Chaudhary, S. Robinson, W. Miao, L. Rui, W. F. Westlin, R. Kapeller, and L. M. Staudt. Selective interleukin-1 receptor-associated kinase 4 inhibitors for the treatment of autoimmune disorders and lymphoid malignancy. *J. Exp. Med.*, 212(13) :2189–2201, Dec 2015. 33
- [168] Inc Idera Pharmaceuticals. Dose escalation study in patients with relapsed or refractory dlbcl and myd88 l265p mutation, 2016. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02252146>. 33
- [169] S. Varambally, S. M. Dhanasekaran, M. Zhou, T. R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M. G. Sanda, D. Ghosh, K. J. Pienta, R. G. Sewalt, A. P. Otte, M. A. Rubin, and A. M. Chinnaiyan. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 419(6907) :624–629, Oct 2002. [DOI :10.1038/nature01075] [PubMed :12374981]. 33
- [170] J. Yan, S. B. Ng, J. L. Tay, B. Lin, T. L. Koh, J. Tan, V. Selvarajan, S. C. Liu, C. Bi, S. Wang, S. N. Choo, N. Shimizu, G. Huang, Q. Yu, and W. J. Chng. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood*, 121(22) :4512–4520, May 2013. [DOI :10.1182/blood-2012-08-450494] [PubMed :23529930]. 33
- [171] R. D. Morin, N. A. Johnson, T. M. Severson, A. J. Mungall, J. An, R. Goya, J. E. Paul, M. Boyle, B. W. Woolcock, F. Kuchenbauer, D. Yap, R. K. Humphries, O. L. Griffith, S. Shah, H. Zhu, M. Kimbara, P. Shashkin, J. F. Charlot, M. Tcherpakov, R. Corbett, A. Tam, R. Varhol, D. Smailus, M. Moksa, Y. Zhao, A. Delaney, H. Qian, I. Birol, J. Schein, R. Moore, R. Holt, D. E. Horsman, J. M. Connors, S. Jones, S. Aparicio, M. Hirst, R. D. Gascoyne, and M. A. Marra. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.*, 42(2) :181–185, Feb 2010. [PubMed Central :PMC2850970] [DOI :10.1038/ng.518] [PubMed :20081860]. 33, 82, 86
- [172] R. J. Ryan, M. Nitta, D. Borger, L. R. Zukerberg, J. A. Ferry, N. L. Harris, A. J. Iafrate, B. E. Bernstein, A. R. Sohani, and L. P. Le. EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas. *PLoS ONE*, 6(12) :e28585, 2011. [PubMed Central :PMC3237460] [DOI :10.1371/journal.pone.0028585] [PubMed :22194861]. 33
- [173] Bodor C et al. Ezh2 y641 mutations in follicular lymphoma. leukemia. *official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund*, 25 :726–729, 2011. 33

- [174] R. Margueron and D. Reinberg. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*, 469(7330) :343–349, Jan 2011. [PubMed Central :PMC3760771] [DOI :10.1038/nature09784] [PubMed :21248841]. 34
- [175] A. P. Bracken, D. Pasini, M. Capra, E. Prosperini, E. Colli, and K. Helin. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.*, 22(20) :5323–5335, Oct 2003. [PubMed Central :PMC213796] [DOI :10.1093/emboj/cdg542] [PubMed :14532106]. 34
- [176] A. Herrera-Merchan, L. Arranz, J. M. Ligos, A. de Molina, O. Dominguez, and S. Gonzalez. Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. *Nat Commun*, 3 :623, 2012. [DOI :10.1038/ncomms1623] [PubMed :22233633]. 34
- [177] D. B. Yap, J. Chu, T. Berg, M. Schapira, S. W. Cheng, A. Moradian, R. D. Morin, A. J. Mungall, B. Meissner, M. Boyle, V. E. Marquez, M. A. Marra, R. D. Gascoyne, R. K. Humphries, C. H. Arrowsmith, G. B. Morin, and S. A. Aparicio. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood*, 117(8) :2451–2459, Feb 2011. [PubMed Central :PMC3062411] [DOI :10.1182/blood-2010-11-321208] [PubMed :21190999]. 34, 86
- [178] C. J. Sneeringer, M. P. Scott, K. W. Kuntz, S. K. Knutson, R. M. Pollock, V. M. Richon, and R. A. Copeland. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(49) :20980–20985, Dec 2010. [PubMed Central :PMC3000297] [DOI :10.1073/pnas.1012525107] [PubMed :21078963]. 34
- [179] M. T. McCabe, A. P. Graves, G. Ganji, E. Diaz, W. S. Halsey, Y. Jiang, K. N. Smitheman, H. M. Ott, M. B. Pappalardi, K. E. Allen, S. B. Chen, A. Della Pietra, E. Dul, A. M. Hughes, S. A. Gilbert, S. H. Thrall, P. J. Tummino, R. G. Kruger, M. Brandt, B. Schwartz, and C. L. Creasy. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(8) :2989–2994, Feb 2012. [PubMed Central :PMC3287005] [DOI :10.1073/pnas.1116418109] [PubMed :22323599]. 34
- [180] C. R. Majer, L. Jin, M. P. Scott, S. K. Knutson, K. W. Kuntz, H. Keilhack, J. J. Smith, M. P. Moyer, V. M. Richon, R. A. Copeland, and T. J. Wigle. A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. *FEBS Lett.*, 586(19) :3448–3451, Sep 2012. [DOI :10.1016/j.febslet.2012.07.066] [PubMed :22850114]. 34
- [181] E. Ezhkova, H. A. Pasolli, J. S. Parker, N. Stokes, I. H. Su, G. Hannon, A. Tarakhovsky, and E. Fuchs. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell*, 136(6) :1122–1135, Mar 2009. [PubMed Central :PMC2716120] [DOI :10.1016/j.cell.2008.12.043] [PubMed :19303854]. 34
- [182] G. Caretti, M. Di Padova, B. Micales, G. E. Lyons, and V. Sartorelli. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.*, 18(21) :2627–2638, Nov 2004. [PubMed Central :PMC525543] [DOI :10.1101/gad.1241904] [PubMed :15520282]. 34
- [183] L. Wang, Q. Jin, J. E. Lee, I. H. Su, and K. Ge. Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(16) :7317–7322, Apr 2010. [PubMed Central :PMC2867706] [DOI :10.1073/pnas.1000031107] [PubMed :20368440]. 34

- [184] D. Schwarz, S. Varum, M. Zemke, A. Scholer, A. Baggiolini, K. Draganova, H. Koseki, D. Schubeler, and L. Sommer. Ezh2 is required for neural crest-derived cartilage and bone formation. *Development*, 141(4) :867–877, Feb 2014. [DOI :10.1242/dev.094342] [PubMed :24496623]. 34
- [185] I. Velichutina, R. Shakhovich, H. Geng, N. A. Johnson, R. D. Gascoyne, A. M. Melnick, and O. Elemento. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. *Blood*, 116(24) :5247–5255, Dec 2010. [PubMed Central :PMC3012542] [DOI :10.1182/blood-2010-04-280149] [PubMed :20736451]. 34
- [186] K. H. Kim and C. W. Roberts. Targeting EZH2 in cancer. *Nat. Med.*, 22(2) :128–134, Feb 2016. [PubMed Central :PMC4918227] [DOI :10.1038/nm.4036] [PubMed :26845405]. 34
- [187] S. T. Lee, Z. Li, Z. Wu, M. Aau, P. Guan, R. K. Karuturi, Y. C. Liou, and Q. Yu. Context-specific regulation of NF- κ B target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol. Cell*, 43(5) :798–810, Sep 2011. [DOI :10.1016/j.molcel.2011.08.011] [PubMed :21884980]. 34
- [188] Inc. Epizyme. An open-label, multicenter, phase 1/2 study of e7438 (ezh2 histone methyl transferase [hmt] inhibitor) as a single agent in subjects with advanced solid tumors or with b-cell lymphomas, 2016. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01897571>. 34
- [189] M. T. McCabe, H. M. Ott, G. Ganji, S. Korenchuk, C. Thompson, G. S. Van Aller, Y. Liu, A. P. Graves, A. Della Pietra, E. Diaz, L. V. LaFrance, M. Mellinger, C. Duquenne, X. Tian, R. G. Kruger, C. F. McHugh, M. Brandt, W. H. Miller, D. Dhanak, S. K. Verma, P. J. Tummino, and C. L. Creasy. EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature*, 492(7427) :108–112, Dec 2012. [DOI :10.1038/nature11606] [PubMed :23051747]. 34
- [190] W. Qi, H. Chan, L. Teng, L. Li, S. Chuai, R. Zhang, J. Zeng, M. Li, H. Fan, Y. Lin, J. Gu, O. Ardayfio, J. H. Zhang, X. Yan, J. Fang, Y. Mi, M. Zhang, T. Zhou, G. Feng, Z. Chen, G. Li, T. Yang, K. Zhao, X. Liu, Z. Yu, C. X. Lu, P. Atadja, and E. Li. Selective inhibition of Ezh2 by a small molecule inhibitor blocks tumor cells proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109(52) :21360–21365, Dec 2012. [PubMed Central :PMC3535655] [DOI :10.1073/pnas.1210371110] [PubMed :23236167]. 34
- [191] GlaxoSmithKline. A study to investigate the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical activity of gsk2816126 in subjects with relapsed/refractory diffuse large b cell lymphoma, transformed follicular lymphoma, other non-hodgkin’s lymphomas, solid tumors and multiple myeloma, 2016. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02082977>. 34
- [192] GlaxoSmithKline. A study evaluating cpi-1205 in patients with b-cell lymphomas, 2016. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02395601>. 34
- [193] S. K. Verma, X. Tian, L. V. LaFrance, C. Duquenne, D. P. Suarez, K. A. Newlander, S. P. Romeril, J. L. Burgess, S. W. Grant, J. A. Brackley, A. P. Graves, D. A. Scherzer, A. Shu, C. Thompson, H. M. Ott, G. S. Aller, C. A. Machutta, E. Diaz, Y. Jiang, N. W. Johnson, S. D. Knight, R. G. Kruger, M. T. McCabe, D. Dhanak, P. J. Tummino, C. L. Creasy, and W. H. Miller. Identification of Potent, Selective, Cell-Active Inhibitors of the Histone Lysine Methyltransferase EZH2. *ACS Med Chem Lett*, 3(12) :1091–1096, Dec 2012. [PubMed Central :PMC4025676] [DOI :10.1021/ml3003346] [PubMed :24900432]. 34
- [194] QIAGEN. Qiagen protocole tissue lc 200 v7 dsp and tissue hc 200 v7 dsp. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=12501b6b-0636-4fbc-90bc-13974972763c&lang=fr-FR>. 46, 50

- [195] V. L. Singer, L. J. Jones, S. T. Yue, and R. P. Haugland. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Anal. Biochem.*, 249(2) :228–238, Jul 1997. [DOI :10.1006/abio.1997.2177] [PubMed :9212875]. 47
- [196] K. L. Manchester. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *BioTechniques*, 20(6) :968–970, Jun 1996. [PubMed :8780864]. 47
- [197] J. D. Robin, A. T. Ludlow, R. LaRanger, W. E. Wright, and J. W. Shay. Comparison of DNA Quantification Methods for Next Generation Sequencing. *Sci Rep*, 6 :24067, 2016. [PubMed Central :PMC4822169] [DOI :10.1038/srep24067] [PubMed :27048884]. 47
- [198] J. MARMUR and P. DOTY. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.*, 5 :109–118, Jul 1962. [PubMed :14470099]. 47
- [199] O. T. Avery, C. M. Macleod, and M. McCarty. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J. Exp. Med.*, 79(2) :137–158, Feb 1944. [PubMed Central :PMC2135445] [PubMed :19871359]. 48
- [200] M. Snyder. Completion of a rough draft of the DNA sequence of human : an important milestone. *Funct. Integr. Genomics*, 1(3) :153, Nov 2000. [DOI :10.1007/s101420000031] [PubMed :11793233]. 48
- [201] Illumina. Nextera xt library preparation guide. http://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-guide-15031942-01.pdf. 50
- [202] B. Ewing and P. Green. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*, 8(3) :186–194, Mar 1998. [PubMed :9521922]. 56
- [203] Illumina. Technical note for understanding quality scores. www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_understanding_quality_scores.pdf. 56
- [204] Babraham Bioinformatics – [urlhttp://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/](http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). 56
- [205] The SAM/BAM Format Specification Working Group. Sequence alignment/map format specification, Nov 2015. <http://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf>. 57
- [206] S. A. Forbes, G. Bhamra, S. Bamford, E. Dawson, C. Kok, J. Clements, A. Menzies, J. W. Teague, P. A. Futreal, and M. R. Stratton. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 10 :Unit 10.11, Apr 2008. [PubMed Central :PMC2705836] [DOI :10.1002/0471142905.hg1011s57] [PubMed :18428421]. 57, 81, 84, 85
- [207] J. A. Sikorsky, D. A. Primerano, T. W. Fenger, and J. Denvir. DNA damage reduces Taq DNA polymerase fidelity and PCR amplification efficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355(2) :431–437, Apr 2007. [PubMed Central :PMC1945218] [DOI :10.1016/j.bbrc.2007.01.169] [PubMed :17303074]. 58
- [208] C. Williams, F. Ponten, C. Moberg, P. Soderkvist, M. Uhlen, J. Ponten, G. Sitbon, and J. Lundeberg. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival

- specimens. *Am. J. Pathol.*, 155(5) :1467–1471, Nov 1999. [PubMed Central :PMC1866966] [DOI :10.1016/S0002-9440(10)65461-2] [PubMed :10550302]. 58
- [209] H. Do, S. Q. Wong, J. Li, and A. Dobrovic. Reducing sequence artifacts in amplicon-based massively parallel sequencing of formalin-fixed paraffin-embedded DNA by enzymatic depletion of uracil-containing templates. *Clin. Chem.*, 59(9) :1376–1383, Sep 2013. [DOI :10.1373/clinchem.2012.202390] [PubMed :23649127]. 58
- [210] L. Agell, S. Hernandez, S. de Muga, J. A. Lorente, N. Juanpere, R. Esgueva, S. Serrano, A. Gelabert, and J. Lloreta. KLF6 and TP53 mutations are a rare event in prostate cancer : distinguishing between Taq polymerase artifacts and true mutations. *Mod. Pathol.*, 21(12) :1470–1478, Dec 2008. [DOI :10.1038/modpathol.2008.145] [PubMed :19020536]. 58
- [211] H. Do and A. Dobrovic. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil- DNA glycosylase. *Oncotarget*, 3(5) :546–558, May 2012. [PubMed Central :PMC3388184] [DOI :10.18632/oncotarget.503] [PubMed :22643842]. 58
- [212] M. Schirmer, U. Z. Ijaz, R. D’Amore, N. Hall, W. T. Sloan, and C. Quince. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Res.*, 43(6) :e37, Mar 2015. [PubMed Central :PMC4381044] [DOI :10.1093/nar/gku1341] [PubMed :25586220]. 59
- [213] S. Datta, S. Datta, S. Kim, S. Chakraborty, and R. S. Gill. Statistical Analyses of Next Generation Sequence Data : A Partial Overview. *J Proteomics Bioinform*, 3(6) :183–190, Jun 2010. [PubMed Central :PMC2989618] [DOI :10.4172/jpb.1000138] [PubMed :21113236]. 59, 60
- [214] S. Junemann, F. J. Sedlazeck, K. Prior, A. Albersmeier, U. John, J. Kalinowski, A. Mellmann, A. Goesmann, A. von Haeseler, J. Stoye, and D. Harmsen. Updating benchmark sequencing performance comparison. *Nat. Biotechnol.*, 31(4) :294–296, Apr 2013. [DOI :10.1038/nbt.2522] [PubMed :23563421]. 59
- [215] J. S. Ross, K. Wang, R. N. Al-Rohil, T. Nazeer, C. E. Sheehan, G. A. Otto, J. He, G. Palmer, R. Yelensky, D. Lipson, S. Ali, S. Balasubramanian, J. A. Curran, L. Garcia, K. Mahoney, S. R. Downing, M. Hawryluk, V. A. Miller, and P. J. Stephens. Advanced urothelial carcinoma : next-generation sequencing reveals diverse genomic alterations and targets of therapy. *Mod. Pathol.*, 27(2) :271–280, Feb 2014. [DOI :10.1038/modpathol.2013.135] [PubMed :23887298]. 81
- [216] S. V. Tavtigian, A. M. Deffenbaugh, L. Yin, T. Judkins, T. Scholl, P. B. Samollow, D. de Silva, A. Zharkikh, and A. Thomas. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J. Med. Genet.*, 43(4) :295–305, Apr 2006. [PubMed Central :PMC2563222] [DOI :10.1136/jmg.2005.033878] [PubMed :16014699]. 81
- [217] E. Papaemmanuil, M. Gerstung, L. Malcovati, S. Tauro, G. Gundem, P. Van Loo, C. J. Yoon, P. Ellis, D. C. Wedge, A. Pellagatti, A. Shlien, M. J. Groves, S. A. Forbes, K. Raine, J. Hinton, L. J. Mudie, S. McLaren, C. Hardy, C. Latimer, M. G. Della Porta, S. O’Meara, I. Ambaglio, A. Galli, A. P. Butler, G. Walldin, J. W. Teague, L. Quek, A. Sternberg, C. Gambacorti-Passerini, N. C. Cross, A. R. Green, J. Boulton, P. Vyas, E. Hellstrom-Lindberg, D. Bowen, M. Cazzola, M. R. Stratton, and P. J. Campbell. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 122(22) :3616–3627, Nov 2013. [PubMed Central :PMC3837510] [DOI :10.1182/blood-2013-08-518886] [PubMed :24030381]. 81

- [218] T. Frebourg, N. Barbier, Y. X. Yan, J. E. Garber, M. Dreyfus, J. Fraumeni, F. P. Li, and S. H. Friend. Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, 56(3) :608–615, Mar 1995. [PubMed Central :PMC1801151] [PubMed :7887414]. 82
- [219] Kato S Ishioka C Tavgigian SV Hainaut P Olivier M. Petitjean A, Mathe E. Impact of mutant p53 functional properties on tp53 mutation patterns and tumor phenotype : lessons from recent developments in the iarc tp53 database., Jun 2007. Version R18, April 2016. 82, 84, 85
- [220] C. Ishioka, T. Frebourg, Y. X. Yan, M. Vidal, S. H. Friend, S. Schmidt, and R. Iggo. Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat. Genet.*, 5(2) :124–129, Oct 1993. [DOI :10.1038/ng1093-124] [PubMed :8252037]. 82
- [221] M. Montesinos-Rongen, R. Schmitz, A. Brunn, S. Gesk, J. Richter, K. Hong, O. D. Wiestler, R. Siebert, R. Kuppers, and M. Deckert. Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF-kappaB pathway in primary CNS lymphoma. *Acta Neuropathol.*, 120(4) :529–535, Oct 2010. [DOI :10.1007/s00401-010-0709-7] [PubMed :20544211]. 83
- [222] K. Moriya, M. K. Kaneko, X. Liu, M. Hosaka, F. Fujishima, J. Sakuma, S. Ogasawara, M. Watanabe, Y. Sasahara, S. Kure, and Y. Kato. IDH2 and TP53 mutations are correlated with gliomagenesis in a patient with Maffucci syndrome. *Cancer Sci.*, 105(3) :359–362, Mar 2014. [PubMed Central :PMC4317937] [DOI :10.1111/cas.12337] [PubMed :24344754]. 83
- [223] J. Huang, J. Dorsey, S. Chuikov, L. Perez-Burgos, X. Zhang, T. Jenuwein, D. Reinberg, and S. L. Berger. G9a and G9l methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53. *J. Biol. Chem.*, 285(13) :9636–9641, Mar 2010. [PubMed Central :PMC2843213] [DOI :10.1074/jbc.M109.062588] [PubMed :20118233]. 83
- [224] Kato S Ishioka C Tavgigian SV Hainaut P Olivier M. Petitjean A, Mathe E. Impact of mutant p53 functional properties on tp53 mutation patterns and tumor phenotype : lessons from recent developments in the iarc tp53 database., Jun 2007. Version R18, April 2016. 85
- [225] P. A. Muller, A. G. Trinidad, P. Timpson, J. P. Morton, S. Zanivan, P. V. van den Berghe, C. Nixon, S. A. Karim, P. T. Caswell, J. E. Noll, C. R. Coffill, D. P. Lane, O. J. Sansom, P. M. Nielsen, J. C. Norman, and K. H. Vousden. Mutant p53 enhances MET trafficking and signalling to drive cell scattering and invasion. *Oncogene*, 32(10) :1252–1265, Mar 2013. [PubMed Central :PMC3592945] [DOI :10.1038/onc.2012.148] [PubMed :22580601]. 85
- [226] K. Taniguchi, K. Takata, S. S. Chuang, T. Miyata-Takata, Y. Sato, A. Satou, Y. Hashimoto, M. Tamura, K. Nagakita, N. Ohnishi, M. Nougima-Harada, T. Tabata, Y. Y. Kikuti, Y. Maeda, N. Nakamura, M. Tanimoto, and T. Yoshino. Frequent MYD88 L265P and CD79B Mutations in Primary Breast Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.*, 40(3) :324–334, Mar 2016. [DOI :10.1097/PAS.0000000000000592] [PubMed :26752547]. 86
- [227] K. B. Wong, B. S. DeDecker, S. M. Freund, M. R. Proctor, M. Bycroft, and A. R. Fersht. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96(15) :8438–8442, Jul 1999. [PubMed Central :PMC17534] [PubMed :10411893]. 86

- [228] E. M. Berns, I. L. van Staveren, M. P. Look, M. Smid, J. G. Klijn, and J. A. Foekens. Mutations in residues of TP53 that directly contact DNA predict poor outcome in human primary breast cancer. *Br. J. Cancer*, 77(7) :1130–1136, Apr 1998. [PubMed Central :PMC2150115] [PubMed :9569050]. 86
- [229] N. Shtraizent, H. Matsui, A. Polotskaia, and J. Bargonetti. Hot Spot Mutation in TP53 (R248Q) Causes Oncogenic Gain-of-Function Phenotypes in a Breast Cancer Cell Line Derived from an African American patient. *Int J Environ Res Public Health*, 13(1) :ijerph13010022, Jan 2016. [PubMed Central :PMC4730413] [DOI :10.3390/ijerph13010022] [PubMed :26703669]. 86
- [230] K. Yoshikawa, J. Hamada, M. Tada, T. Kameyama, K. Nakagawa, Y. Suzuki, M. Ikawa, N. M. Hassan, Y. Kitagawa, and T. Moriuchi. Mutant p53 R248Q but not R248W enhances in vitro invasiveness of human lung cancer NCI-H1299 cells. *Biomed. Res.*, 31(6) :401–411, Dec 2010. [PubMed :21187651]. 86
- [231] F. Vegran, M. Rebucci, S. Chevrier, M. Cadouot, R. Boidot, and S. Lizard-Nacol. Only missense mutations affecting the DNA binding domain of p53 influence outcomes in patients with breast carcinoma. *PLoS ONE*, 8(1) :e55103, 2013. [PubMed Central :PMC3554672] [DOI :10.1371/journal.pone.0055103] [PubMed :23359294]. 86
- [232] B. Powell, R. Soong, B. Iacopetta, R. Seshadri, and D. R. Smith. Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 6(2) :443–451, Feb 2000. [PubMed :10690522]. 86
- [233] S. Ambs, W. P. Bennett, W. G. Merriam, M. O. Ogunfusika, S. M. Oser, A. M. Harrington, P. G. Shields, E. Felley-Bosco, S. P. Hussain, and C. C. Harris. Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(1) :86–88, Jan 1999. [PubMed :9890175]. 86
- [234] R. V. Mendes, A. R. Martins, G. de Nucci, F. Murad, and F. A. Soares. Expression of nitric oxide synthase isoforms and nitrotyrosine immunoreactivity by B-cell non-Hodgkin’s lymphomas and multiple myeloma. *Histopathology*, 39(2) :172–178, Aug 2001. [PubMed :11493334]. 86
- [235] P. Hainaut and G. P. Pfeifer. Somatic TP53 Mutations in the Era of Genome Sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med*, Aug 2016. [DOI :10.1101/cshperspect.a026179] [PubMed :27503997]. 86
- [236] R. D. Morin, S. Assouline, M. Alcaide, A. Mohajeri, R. L. Johnston, L. Chong, J. Grewal, S. Yu, D. Fornika, K. Bushell, T. H. Nielsen, T. Petrogiannis-Haliotis, M. Crump, A. Tosikyan, B. M. Grande, D. MacDonald, C. Rousseau, M. Bayat, P. Sesques, R. Froment, M. Albuquerque, Y. Monczak, K. K. Oros, C. Greenwood, Y. Riazalhosseini, M. Arseneault, E. Camlioglu, A. Constantin, Q. Pan-Hammarstrom, R. Peng, K. K. Mann, and N. A. Johnson. Genetic Landscapes of Relapsed and Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphomas. *Clin. Cancer Res.*, 22(9) :2290–2300, May 2016. [DOI :10.1158/1078-0432.CCR-15-2123] [PubMed :26647218]. 118, 119
- [237] V. Caner, N. Sen Turk, I. C. Baris, G. O. Cetin, E. Tepeli, S. Hacıoglu, I. Sari, S. Zencir, M. H. Dogu, G. Bagci, and A. Keskin. MYD88 expression and L265P mutation in mature B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Genet Test Mol Biomarkers*, 19(7) :372–378, Jul 2015. [DOI :10.1089/gtmb.2015.0041] [PubMed :25978699]. 118

- [238] G. d. a. C. Santos, M. A. Saieg, H. M. Ko, W. R. Geddie, S. L. Boerner, K. J. Craddock, M. Crump, and D. Bailey. Multiplex sequencing for EZH2, CD79B, and MYD88 mutations using archival cytospin preparations from B-cell non-Hodgkin lymphoma aspirates previously tested for MYC rearrangement and IGH/BCL2 translocation. *Cancer Cytopathol*, 123(7) :413–420, Jul 2015. [DOI :10.1002/cncy.21535] [PubMed :25807917]. 118, 119
- [239] L. Arcaini, D. Rossi, M. Lucioni, M. Nicola, A. Brusca, V. Fiaccadori, R. Riboni, A. Ramponi, V. V. Ferretti, S. Cresta, G. M. Casaluci, M. Bonfichi, M. Gotti, M. Merli, A. Maffi, M. Arra, M. Varettoni, S. Rattotti, L. Morello, M. L. Guerrera, R. Sciarra, G. Gaidano, M. Cazzola, and M. Paulli. The NOTCH pathway is recurrently mutated in diffuse large B-cell lymphoma associated with hepatitis C virus infection. *Haematologica*, 100(2) :246–252, Feb 2015. [PubMed Central :PMC4803124] [DOI :10.3324/haematol.2014.116855] [PubMed :25381127]. 118
- [240] N. Gebauer, V. Bernard, C. Thorns, A. C. Feller, and H. Merz. Oncogenic MYD88 mutations are rare events in double-hit B-cell lymphomas. *Acta Haematol.*, 133(1) :113–115, 2015. [DOI :10.1159/000358914] [PubMed :25247317]. 118
- [241] A. Pham-Ledard, M. Beylot-Barry, C. Barbe, M. Leduc, T. Petrella, B. Vergier, F. Martinez, D. Cappellen, J. P. Merlio, and F. Grange. High frequency and clinical prognostic value of MYD88 L265P mutation in primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg-type. *JAMA Dermatol*, 150(11) :1173–1179, Nov 2014. [DOI :10.1001/jamadermatol.2014.821] [PubMed :25055137]. 118
- [242] A. Bruno, B. Boisselier, K. Labreche, Y. Marie, M. Polivka, A. Jouvett, C. Adam, D. Figarella-Branger, C. Miquel, S. Eimer, C. Houillier, C. Soussain, K. Mokhtari, R. Davaeu, and K. Hoang-Xuan. Mutational analysis of primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget*, 5(13) :5065–5075, Jul 2014. [PubMed Central :PMC4148122] [DOI :10.18632/oncotarget.2080] [PubMed :24970810]. 118, 120
- [243] M. C. Cox, A. Di Napoli, S. Scarpino, G. Salerno, C. Tatarelli, C. Talerico, M. Lombardi, B. Monarca, S. Amadori, and L. Ruco. Clinicopathologic characterization of diffuse-large-B-cell lymphoma with an associated serum monoclonal IgM component. *PLoS ONE*, 9(4) :e93903, 2014. [PubMed Central :PMC3976325] [DOI :10.1371/journal.pone.0093903] [PubMed :24705344]. 118
- [244] K. Fujiishi, R. Kitazawa, Y. Nagai, T. Watanabe, K. Bando, S. Kobayashi, Y. Yakushijin, R. Haraguchi, and S. Kitazawa. Acquisition of MYD88 L265P mutation during treatment of diffuse large B cell lymphoma of the parotid gland. *Virchows Arch.*, 464(1) :121–124, Jan 2014. [DOI :10.1007/s00428-013-1514-1] [PubMed :24259032]. 118
- [245] W. Kraan, M. van Keimpema, H. M. Horlings, E. J. Schilder-Tol, M. E. Oud, L. A. Noorduyn, P. M. Kluin, M. J. Kersten, M. Spaargaren, and S. T. Pals. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in primary testicular diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 28(3) :719–720, Mar 2014. [DOI :10.1038/leu.2013.348] [PubMed :24253023]. 118
- [246] G. Ogura, Y. Y. Kikuti, T. Kikuchi, J. Carreras, T. Sato, and N. Nakamura. MYD88 (L265P) Mutation in Malignant Lymphoma Using Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Section. *J Clin Exp Hematop*, 53(2) :175–177, 2013. [PubMed :23995116]. 118
- [247] J. W. Choi, Y. Kim, J. H. Lee, and Y. S. Kim. MYD88 expression and L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma. *Hum. Pathol.*, 44(7) :1375–1381, Jul 2013. [DOI :10.1016/j.humpath.2012.10.026] [PubMed :23380077]. 118

- [248] J. Zhang, V. Grubor, C. L. Love, A. Banerjee, K. L. Richards, P. A. Mieczkowski, C. Dunphy, W. Choi, W. Y. Au, G. Srivastava, P. L. Lugar, D. A. Rizzieri, A. S. Lagoo, L. Bernal-Mizrachi, K. P. Mann, C. Flowers, K. Naresh, A. Evens, L. I. Gordon, M. Czader, J. I. Gill, E. D. Hsi, Q. Liu, A. Fan, K. Walsh, D. Jima, L. L. Smith, A. J. Johnson, J. C. Byrd, M. A. Luftig, T. Ni, J. Zhu, A. Chadburn, S. Levy, D. Dunson, and S. S. Dave. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(4) :1398–1403, Jan 2013. [PubMed Central :PMC3557051] [DOI :10.1073/pnas.1205299110] [PubMed :23292937]. 118, 120
- [249] C. Z. Wang, J. Lin, J. Qian, R. Shao, D. Xue, W. Qian, G. F. Xiao, Z. Q. Deng, J. Yang, Y. Li, and X. X. Chen. Development of high-resolution melting analysis for the detection of the MYD88 L265P mutation. *Clin. Biochem.*, 46(4-5) :385–387, Mar 2013. [DOI :10.1016/j.clinbiochem.2012.11.007] [PubMed :23178471]. 118
- [250] A. Pham-Ledard, D. Cappellen, F. Martinez, B. Vergier, M. Beylot-Barry, and J. P. Merlio. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J. Invest. Dermatol.*, 132(8) :2118–2120, Aug 2012. [DOI :10.1038/jid.2012.102] [PubMed :22495176]. 118
- [251] M. Montesinos-Rongen, E. Godlewska, A. Brunn, O. D. Wiestler, R. Siebert, and M. Deckert. Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.*, 122(6) :791–792, Dec 2011. [DOI :10.1007/s00401-011-0891-2] [PubMed :22020631]. 118
- [252] L. Pasqualucci, V. Trifonov, G. Fabbri, J. Ma, D. Rossi, A. Chiarenza, V. A. Wells, A. Grunn, M. Messina, O. Elliot, J. Chan, G. Bhagat, A. Chadburn, G. Gaidano, C. G. Mullighan, R. Rabadan, and R. Dalla-Favera. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.*, 43(9) :830–837, Sep 2011. [PubMed Central :PMC3297422] [DOI :10.1038/ng.892] [PubMed :21804550]. 118
- [253] R. D. Morin, M. Mendez-Lago, A. J. Mungall, R. Goya, K. L. Mungall, R. D. Corbett, N. A. Johnson, T. M. Severson, R. Chiu, M. Field, S. Jackman, M. Krzywinski, D. W. Scott, D. L. Trinh, J. Tamura-Wells, S. Li, M. R. Firme, S. Rogic, M. Griffith, S. Chan, O. Yakovenko, I. M. Meyer, E. Y. Zhao, D. Smailus, M. Moksa, S. Chittaranjan, L. Rimsza, A. Brooks-Wilson, J. J. Spinelli, S. Ben-Neriah, B. Meissner, B. Woolcock, M. Boyle, H. McDonald, A. Tam, Y. Zhao, A. Delaney, T. Zeng, K. Tse, Y. Butterfield, I. Birol, R. Holt, J. Schein, D. E. Horsman, R. Moore, S. J. Jones, J. M. Connors, M. Hirst, R. D. Gascoyne, and M. A. Marra. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*, 476(7360) :298–303, Aug 2011. [PubMed Central :PMC3210554] [DOI :10.1038/nature10351] [PubMed :21796119]. 118, 119, 120
- [254] G. Fabbri, H. Khiabani, A. B. Holmes, J. Wang, M. Messina, C. G. Mullighan, L. Pasqualucci, R. Rabadan, and R. Dalla-Favera. Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J. Exp. Med.*, 210(11) :2273–2288, Oct 2013. [PubMed Central :PMC3804949] [DOI :10.1084/jem.20131448] [PubMed :24127483]. 119, 122
- [255] G. Troen, A. Warsame, and J. Delabie. CD79B and MYD88 Mutations in Splenic Marginal Zone Lymphoma. *ISRN Oncol*, 2013 :252318, 2013. [PubMed Central :PMC3556831] [DOI :10.1155/2013/252318] [PubMed :23378931]. 120
- [256] S. Yamada, Y. Ishida, A. Matsuno, and K. Yamazaki. Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncoge-

- nic MYD88 and CD79B mutations. *Leuk. Lymphoma*, 56(7) :2141–2145, Jul 2015. [DOI :10.3109/10428194.2014.979413] [PubMed :25347427]. 120
- [257] C. E. Klumb, D. R. Furtado, L. M. de Resende, M. K. Carrico, A. M. Coelho, E. de Meis, R. C. Maia, and F. D. Rumjanek. DNA sequence profile of TP53 gene mutations in childhood B-cell non-Hodgkin's lymphomas : prognostic implications. *Eur. J. Haematol.*, 71(2) :81–90, Aug 2003. [PubMed :12890146]. 121
- [258] M. Kawamura, H. Ohnishi, S. X. Guo, X. M. Sheng, M. Minegishi, R. Hanada, K. Horibe, T. Hongo, Y. Kaneko, F. Bessho, M. Yanagisawa, T. Sekiya, and Y. Hayashi. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*, 23(2) :115–126, Feb 1999. [PubMed :10071127]. 122
- [259] T. Stokke, E. Galteland, H. Holte, L. Smedshammer, Z. Suo, E. B. Smeland, A. L. Børresen-Dale, P. DeAngelis, and H. B. Steen. Oncogenic aberrations in the p53 pathway are associated with a high S phase fraction and poor patient survival in B-cell Non-Hodgkin's lymphoma. *Int. J. Cancer*, 89(4) :313–324, Jul 2000. [PubMed :10956404]. 122
- [260] N. Barnabas, M. Shurafa, D. L. Van Dyke, S. R. Wolman, D. Clark, and M. J. Worsham. Significance of p53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia : a sequential study of 30 patients. *Cancer*, 91(2) :285–293, Jan 2001. [PubMed :11180073]. 122
- [261] A. R. Pettitt, P. D. Sherrington, G. Stewart, J. C. Cawley, A. M. Taylor, and T. Stankovic. p53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia : inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation. *Blood*, 98(3) :814–822, Aug 2001. [PubMed :11468183]. 122
- [262] M. Bellido, D. Capello, A. Altes, C. Estivill, G. Gaidano, R. Pujol, R. Bordes, M. Baiget, G. Saglio, J. Sierra, and J. F. Nomdedeu. Bcl-6 p53 mutations in lymphomas carrying the bcl-2/Jh rearrangement. *Haematologica*, 87(9) :908–917, Sep 2002. [PubMed :12217802]. 122
- [263] T. C. Greiner, C. Dasgupta, V. V. Ho, D. D. Weisenburger, L. M. Smith, J. C. Lynch, J. M. Vose, K. Fu, J. O. Armitage, R. M. Braziel, E. Campo, J. Delabie, R. D. Gascoyne, E. S. Jaffe, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott, A. Rosenwald, L. M. Staudt, M. Y. Im, M. W. Karaman, B. L. Pike, W. C. Chan, and J. G. Hacia. Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(7) :2352–2357, Feb 2006. [PubMed Central :PMC1413716] [DOI :10.1073/pnas.0510441103] [PubMed :16461462]. 122
- [264] P. R. Koduru, K. Raju, V. Vadmal, G. Menezes, S. Shah, M. Susin, J. Kolitz, and J. D. Broome. Correlation between mutation in P53, p53 expression, cytogenetics, histologic type, and survival in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90(10) :4078–4091, Nov 1997. [PubMed :9354678]. 122
- [265] A. Ichikawa, T. Kinoshita, T. Watanabe, H. Kato, H. Nagai, K. Tsushita, H. Saito, and T. Hotta. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.*, 337(8) :529–534, Aug 1997. [DOI :10.1056/NEJM199708213370804] [PubMed :9262496]. 122
- [266] D. Lens, P. J. De Schouwer, R. A. Hamoudi, M. Abdul-Rauf, N. Farahat, E. Matutes, T. Crook, M. J. Dyer, and D. Catovsky. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*, 89(6) :2015–2023, Mar 1997. [PubMed :9058723]. 122
- [267] C. W. Ross, P. D. Ouillette, C. M. Saddler, K. A. Shedden, and S. N. Malek. Comprehensive analysis of copy number and allele status identifies multiple chromosome defects

- underlying follicular lymphoma pathogenesis. *Clin. Cancer Res.*, 13(16) :4777–4785, Aug 2007. [DOI :10.1158/1078-0432.CCR-07-0456] [PubMed :17699855]. 122
- [268] T. C. Greiner, M. J. Moynihan, W. C. Chan, D. M. Lytle, A. Pedersen, J. R. Anderson, and D. D. Weisenburger. p53 mutations in mantle cell lymphoma are associated with variant cytology and predict a poor prognosis. *Blood*, 87(10) :4302–4310, May 1996. [PubMed :8639789]. 122
- [269] L. A. Sutton, V. Ljungstrom, L. Mansouri, E. Young, D. Cortese, V. Navrkalova, J. Malcikova, A. F. Muggen, M. Trbusek, P. Panagiotidis, F. Davi, C. Belessi, A. W. Langerak, P. Ghia, S. Pospisilova, K. Stamatopoulos, and R. Rosenquist. Targeted next-generation sequencing in chronic lymphocytic leukemia : a high-throughput yet tailored approach will facilitate implementation in a clinical setting. *Haematologica*, 100(3) :370–376, Mar 2015. [PubMed Central :PMC4349276] [DOI :10.3324/haematol.2014.109777] [PubMed :25480502]. 122
- [270] O. Odejide, O. Weigert, A. A. Lane, D. Toscano, M. A. Lunning, N. Kopp, S. Kim, D. van Bodegom, S. Bolla, J. H. Schatz, J. Teruya-Feldstein, E. Hochberg, A. Louissaint, D. Dorfman, K. Stevenson, S. J. Rodig, P. P. Piccaluga, E. Jacobsen, S. A. Pileri, N. L. Harris, S. Ferrero, G. Inghirami, S. M. Horwitz, and D. M. Weinstock. A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood*, 123(9) :1293–1296, Feb 2014. [PubMed Central :PMC4260974] [DOI :10.1182/blood-2013-10-531509] [PubMed :24345752]. 122
- [271] D. A. Landau, S. L. Carter, P. Stojanov, A. McKenna, K. Stevenson, M. S. Lawrence, C. Sougnez, C. Stewart, A. Sivachenko, L. Wang, Y. Wan, W. Zhang, S. A. Shukla, A. Vartanov, S. M. Fernandes, G. Saksena, K. Cibulskis, B. Tesar, S. Gabriel, N. Hacohen, M. Meyerson, E. S. Lander, D. Neuberg, J. R. Brown, G. Getz, and C. J. Wu. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152(4) :714–726, Feb 2013. [PubMed Central :PMC3575604] [DOI :10.1016/j.cell.2013.01.019] [PubMed :23415222]. 122
- [272] D. Rossi, S. Rasi, V. Spina, A. Bruscaggin, S. Monti, C. Ciardullo, C. Deambrogi, H. Khiabani, R. Serra, F. Bertoni, F. Forconi, L. Laurenti, R. Marasca, M. Dal-Bo, F. M. Rossi, P. Bulian, J. Nomdedeu, G. Del Poeta, V. Gattei, L. Pasqualucci, R. Rabadan, R. Foa, R. Dalla-Favera, and G. Gaidano. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121(8) :1403–1412, Feb 2013. [PubMed Central :PMC3578955] [DOI :10.1182/blood-2012-09-458265] [PubMed :23243274]. 123
- [273] L. Giulino-Roth, K. Wang, T. Y. MacDonald, S. Mathew, Y. Tam, M. T. Cronin, G. Palmer, N. Lucena-Silva, F. Pedrosa, M. Pedrosa, J. Teruya-Feldstein, G. Bhagat, B. Alobeid, L. Leoncini, C. Bellan, E. Rogena, K. A. Pinkney, M. A. Rubin, R. C. Ribeiro, R. Yelensky, W. Tam, P. J. Stephens, and E. Cesarman. Targeted genomic sequencing of pediatric Burkitt lymphoma identifies recurrent alterations in antiapoptotic and chromatin-remodeling genes. *Blood*, 120(26) :5181–5184, Dec 2012. [PubMed Central :PMC3537311] [DOI :10.1182/blood-2012-06-437624] [PubMed :23091298]. 123
- [274] J. Zhang, C. G. Mullighan, R. C. Harvey, G. Wu, X. Chen, M. Edmonson, K. H. Buetow, W. L. Carroll, I. M. Chen, M. Devidas, D. S. Gerhard, M. L. Loh, G. H. Reaman, M. V. Relling, B. M. Camitta, W. P. Bowman, M. A. Smith, C. L. Willman, J. R. Downing, and S. P. Hunger. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia : a report from the Children’s Oncology Group. *Blood*, 118(11) :3080–

- 3087, Sep 2011. [PubMed Central :PMC3175785] [DOI :10.1182/blood-2011-03-341412] [PubMed :21680795]. 123
- [275] P. A. Beer, C. A. Ortmann, F. Stegelmann, P. Guglielmelli, J. T. Reilly, T. S. Larsen, H. C. Hasselbalch, A. M. Vannucchi, P. Moller, K. Dohner, and A. R. Green. Molecular mechanisms associated with leukemic transformation of MPL-mutant myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 95(12) :2153–2156, Dec 2010. [PubMed Central :PMC2995575] [DOI :10.3324/haematol.2010.029306] [PubMed :20823136]. 123
- [276] K. H. Young, D. D. Weisenburger, B. J. Dave, L. Smith, W. Sanger, J. Iqbal, E. Campo, J. Delabie, R. D. Gascoyne, G. Ott, L. Rimsza, H. K. Muller-Hermelink, E. S. Jaffe, A. Rosenwald, L. M. Staudt, W. C. Chan, and T. C. Greiner. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, 110(13) :4396–4405, Dec 2007. [PubMed Central :PMC2234786] [DOI :10.1182/blood-2007-02-072082] [PubMed :17881637]. 123
- [277] S. Nandi, J. Yu, A. M. Burger, L. S. Reinert, and R. B. Gartenhaus. Expression of DNA mismatch repair proteins in transformed non-Hodgkin’s lymphoma : relationship to smoking. *Leuk. Lymphoma*, 47(9) :1806–1812, Sep 2006. [DOI :10.1080/10428190600652137] [PubMed :17064992]. 123
- [278] M. Trbusek, J. Malcikova, J. Smardova, V. Kuhrova, D. Mentzlova, H. Francova, S. Bukovska, M. Svitakova, P. Kuglik, V. Linkova, M. Doubek, Y. Brychtova, J. Zacial, J. Kujickova, S. Pospisilova, D. Dvorakova, J. Vorlicek, and J. Mayer. Inactivation of p53 and deletion of ATM in B-CLL patients in relation to IgVH mutation status and previous treatment. *Leukemia*, 20(6) :1159–1161, Jun 2006. [DOI :10.1038/sj.leu.2404195] [PubMed :16572201]. 123
- [279] F. Jardin, P. Ruminy, F. Parmentier, X. Troussard, I. Vaida, A. Stamatoullas, S. Lepretre, D. Penther, A. B. Duval, J. M. Picquenot, P. Courville, J. C. Capiod, H. Tilly, C. Bastard, and J. P. Marolleau. TET2 and TP53 mutations are frequently observed in blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Br. J. Haematol.*, 153(3) :413–416, May 2011. [DOI :10.1111/j.1365-2141.2010.08556.x] [PubMed :21275969]. 123

Annexe A

Tableaux

Tableau I – Liste des études ayant identifié la mutation L265P dans les lymphomes B à grandes cellules.

Pathologies	Année de publication	Échantillons	Technique de séquençage	Population séquencée	Nombre de mutations L265P	Références
DLBCL en rechute ou réfractaire	2015	FFPE (1) + FACS de cellules mononucléées périphériques	NGS exome	38	8	[236]
DLBCL	2015	FFPE	Sanger	68	7	[237]
LNH	2015	Cytospin congelé de biopsie à l'aiguille fine	Sanger	40	1	[238]
DLBCL postif pour VHC	2015	Tissus frais congelés	Panel NGS	46	1	[239]
DLBCL double-hit	2015	FFPE	Pyroséquençage	37	1	[240]
DLBCL primitivement cutané	2014	Tissus frais	Sanger	58	34	[241]
Lymphomes SNC	2014	Tissus frais congelés + FFPE	NGS exome	9	1	[242]
DLBCL	2014	Tissus frais	AS-PCR L265P	175	17	[163]
DLBCL	2014	NR	AS-PCR L265P	30	3	[243]
DLBCL	2014	NR	Sanger	161	18 (17 dans ABC-DLBCL)	[121]
DLBCL parotide	2013	FFPE	Sanger	1	1	[244]
DLBCL primitivement testiculaire	2014	FFPE	AS-PCR	37	25	[245]
LNH	2013	FFPE	Sanger	51 (8 DLBCL)	11 (3)	[246]
DLBCL	2013	FFPE	Sanger	124	8	[247]
DLBCL	2013	NR	NGS exome ou génome	94 (dont 21 lignées cellulaires)	15	[248]
DLBCL	2013	FFPE	Courbes de fusion à haute résolution	120	11	[249]
DLBCL primitivement cutané type jambe	2012	Tissus frais congelés et FFPE	Sanger	16	11	[250]
Lymphomes primitifs du CNS	2011	NR	NR	14	7	[251]
DLBCL	2011	NR	Exome NGS	6 (3 ABC-DLCBL)	1 ABC-DLCBL	[252]
DLBCL FL LNH	2011	Tissu frais congelés + FACS	NGS exome ou génome ou RNA-seq	96 DLBCL 13 FL 10 DLBCL (lignée cellulaire) 8 LNH	6 ABC-DLBCL	[253]
DLBCL	2011	Extraction sur lignées cellulaires	Exome NGS	4 lignées cellulaires ABC-DLBCL	4	[162]

Tableau II – Liste les études ayant identifié la mutation Y196S dans les hémopathies malignes.

Pathologies	Année	Échantillons	Technique	Population séquencée	Mutations CD79B	et Y196S	Références
DLBCL FL LNH	2011	Tissus frais congelés FACS	NGS exome ou gé- nome ou RNA-seq	96 DLBCL 13 FL 10 DLBCL (lignées cel- lulaires) 8 LNH	8	1 (ABC-DLBCL)	[253]
LLC Richter	2013	NR	NGS exome	9	2	1	[254]
DLBCL	2014	FFPE	Séquençage direct	187	15	2 (1 ABC 1 GCB)	[164]
DLBCL en rechute ou réfractaire	2015	FFPE (1) + FACS de cellules mononu- cléées périphériques	NGS exome	38	6	1	[236]
LNH	2015	Cytospin congelé de biopsie à l'aiguille fine	Sanger	40	1	1	[238]

Tableau III – Liste des études ayant identifié la mutation Y196H dans les hémopathies malignes.

Pathologies	Année	Échantillons	Technique	Population séquencée	Mutations CD79B	et Y196H	Références
DLBCL FL LNH	2011	Tissus frais congelés FACS	NGS exome ou gé- nome ou RNA-seq	96 DLBCL 13 FL 10 DLBCL (lignées cel- lulaires) 8 LNH	8	2 (2x ABC-DLBCL)	[253]
DLBCL	2013	NR	NGS exome ou gé- nome	94 (dont 21 lignées cellulaires)	7	NR	[248]
LZMs	2013	Tissus frais congelés	Séquençage direct	10 (LZMs) 13 (LZM contrôle)	1	1	[255]
DLBCL	2014	FFPE	Séquençage direct	187	15	1 (ABC-DLBCL)	[164]
Lymphomes SNC	2014	Tissus frais congelés + FFPE	NGS exome	9	3	1	[242]
DLBCL SNC	2015	FFPE	Séquençage direct	18	11	4 (3 L265P+)	[256]

Tableau IV – Liste des études ayant identifié la mutation D208V dans les hémopathies malignes.

Pathologies	Année	Échantillons	Technique	Population séquencée	Mutations TP53	et D208V	Références
LNH (ped.)	2003	FFPE	Séquençage direct	49	11	1	[257]
LF et LF transformés	2014	Tissus frais congelés	NGS exome	12	6	1	[5]

Tableau V – Liste des principales études ayant identifié la mutation R248Q dans les hémopathies malignes.

Pathologies	Année	Échantillons	Technique	Population séquencée	Mutations TP53 et R248Q	Référence
LAL-T (ped.)	1999	Cellules sanguines mononucléées (Ficoll) congelées	Séquençage direct exons 5 à 7	57 (diag.) 14 (rechute) 18 (lignée cellulaire)	3/57 (5%), 1/14 (7%), 12/18 (67%)	1/3, 1/1, 4/12 [258]
LMNH-B	2000	Suspensions cellulaires congelées	Séquençage direct exons 5 à 9	83	8/83 (9,6%)	1/8 [259]
LLC	2000	Extraction ADN à partir du sang périphérique	Séquençage direct exons 5 à 8	30	14/30 (47%)	1/14 [260]
LLC	2001	Culture après ficol sur sang périphérique puis extraction	Séquençage direct exons 5 à 10	13 (population sélectionnée)	6 (46%)	1 [261]
LF	2002	Extraction à partir de sang périphérique ou à l'état frais	Séquençage direct exons 5 à 9	43	7 (16%)	0 (1 R248H et 1 R248W) [262]
LCM	2006	Extraction sur tissu frais	Chromatographie liquide à haute performance sur gel dénaturant, exons 5 à 8	82	16 (19,5%)	1 [263]
LMNH	1997	Suspensions cellulaires à partir de tissus frais	Séquençage direct exons 5 à 8	34 (sélectionnés par SSCP)	25	2 [264]
DLBCL	1997	Extraction sur tissu frais	Séquençage direct exons 5 à 9	23 (sélectionnés par SSCP)	22	2 [265]
LPL-B	1997	NR	Séquençage direct exons 5 à 9	19	10	1 [266]
LF	2007	FACS sang ou tissus frais solubilisés	Séquençage direct exons 5 à 9	58	6	1 [267]
LCM	1996	Tissus congelés	Séquençage direct exons 5 à 8	53	8 (15 %)	2 [268]
LLC (mauvais pronostic)	2015	NR	Panel NGS (ATM, BIRC3, MYD88, NOTCH1, SF3B1, TP53, KLHL6, POT1 and XPO1) + validation Sanger	180	25	2 [269]
AITL	2013	FFPE	NGS exome	85	4	1 [270]
LLC Richter	2013	NR	NGS exome	9	6	1 [254]
LLC	2013	Extraction à partir du sang ou de la moelle	NGS exome	160	21	1 [271]

Suite à la page suivante...

Pathologies	Année	Échantillons	Technique	Population séquencée	Mutations TP53	et R248Q	Références
LLC	2013	Cellules mononucléées sanguines (Ficoll)	Panel NGS	637	54	3	[272]
LB (ped.)	2012	FFPE	Panel NGS	29	12	2	[273]
LAL (ped.)	2011	NR	Panel NGS	187	8	NR	[274]
SMP	2010	CD34+ FACS	Séquençage direct par technique de Sanger	172	4	1	[275]
DLBCL	2007	Tissus frais congelés	Chromatographie liquide à haute performance sur gel dénaturant, exons 5 à 8	113	24	3	[276]
DLBCL	2006	FFPE	Séquençage direct exons 5 à 8	23	6	1	[277]
LLC	2006	Cellules mononucléées sanguines (Ficoll)	Séquençage direct	23	15	1	[278]
LpDC	2011	Extractions à partir de tissus frais	Séquençage direct	14	7	2	[279]

Annexe B

Programme

Programme en R permettant la réalisation des schémas des mutations (*loliplots*) tel qu'ils sont représentés dans la partie résultats.

```
# Programme de visualisation des variants avec
# leur fraction allélique sur les exons
# Thomas Steimlé

library(Gviz)
library(rtracklayer)
library(trackViewer)
library(magrittr)
library(colorspace)

# Exemple pour TP53 :

# A partir de Genome Browser (ici Hg19)
# Recopier les positions des débuts d'exon
# puis les assigner à debEx :

debEx <- c(7571719,7573926,7576852,7577018,7577498,7578176,
           ↪ 7578370,7579311,7579699,7579838,7590694)

# Recopier les positions des fins d'exon
# puis les assigner à finEx :

finEx <- c(7573008,7574033,7576926,7577155,7577608,7578289,
           ↪ 7578554,7579590,7579721,7579937,7590868)

ExonsTP53 <- rbind(debEx, finEx)

# Créer un fichier csv avec une mutation par ligne
# tel que par exemple :
# 1634;7572938;C/G;TP53;1.63;D391H;faux-sens
# Soit :
# Nom;position;mutation;fraction allélique;
# Nom de la mutation;type de mutation
# Puis l'enregistrer par exemple dans :
# data/1634TP53.csv

# Lancer la fonction avec les arguments :
# Adresse du fichier csv, positions des exons
# titre, sens. Dans notre exemple :
```

```

renderMut("data/1634TP53.csv", ExonsTP53, "TP53", "-")

#-----

renderMut <- function(csvP, Exons, nom, sens) {
  csv <- read.csv(csvP, header = F, sep=";")
  pos <- function(x) { return(x-min(Exons)-1) }

  ExonsCent <- pos(Exons)

  rognInt <- function(x) {
    tailleInt <- 50
    res <- matrix(0, nrow = nrow(x), ncol = ncol(x))
    res[,1] <- x[,1]
    for (i in 2:ncol(x)) {
      res[1,i] <- (res[2,i-1] + tailleInt)
      res[2,i] <- (res[1,i] + (x[2,i] - x[1,i]))
    }
    return(res)
  }

  ExonsCR <- rognInt(ExonsCent)

  getPos <- function(x, Exons, ExonsCR) {
    rX <- 0
    posX <- 0
    for (i in 1:ncol(Exons)) {
      if ((x >= Exons[1,i]) & (x <= Exons[2,i])) {
        posX <- i
        rX <- ((x-Exons[1,i])/(Exons[2,i]-Exons[1,i]))
        break
      }
    }
    return(as.numeric( (rX*(ExonsCR[2, posX]-ExonsCR[1, posX])) +
      ↪ ExonsCR[1, posX] ))
  }

  getPosP <- function(x, Exons, ExonsCR) {
    rX <- 0
    posX <- 0
    for (i in 1:ncol(Exons)) {
      if ((x >= Exons[2,i]) & (x <= Exons[1,i])) {
        posX <- i
        rX <- ((x-Exons[2,i])/(Exons[1,i]-Exons[2,i]))
        break
      }
    }
    return(as.numeric( (rX*(ExonsCR[1, posX]-ExonsCR[2, posX])) +
      ↪ ExonsCR[2, posX] ))
  }

  if (csv[1,1] < csv[1,2]) {
    listSNP <- getPos(csv[1,2], Exons, ExonsCR)
    if (nrow(csv) > 1) { for (i in 2:length(csv[,2])) { listSNP <- c(
      ↪ listSNP, getPos(csv[i,2], Exons, ExonsCR)) } }
  } else {
    listSNP <- getPosP(csv[1,2], Exons, ExonsCR)
    if (nrow(csv) > 1) { for (i in 2:length(csv[,2])) { listSNP <- c(
      ↪ listSNP, getPosP(csv[i,2], Exons, ExonsCR)) } }
  }

  sample.gr <- GRanges("chr17", IRanges(listSNP, width=1, names=csv

```

```

    ↪ [,6]))
sample.gr$score <- NULL
sample.gr$label <- NULL
sample.gr$label.col <- NULL

if (sens == "+") {
  ordre <- 1:ncol(Exons)
} else {
  ordre <- ncol(Exons) :1
}

features <- GRanges("chr17", IRanges((ExonsCR[1,]), width=(ExonsCR
  ↪ [2,] - ExonsCR[1,]), names=paste0("Exon", ordre)))
features$fill <- colorspace:rainbow_hcl(ncol(Exons), c = 70, l =
  ↪ 50)
sample.gr$value1 <- as.integer(csv[,5]) #MUT
sample.gr$value2 <- 100 - as.integer(csv[,5])
sample.gr$color <- rep(list(c("#87CEFA", '#98CE31')), length(
  ↪ listSNP))
legend <- list(labels=c("MUT", "WT"), fill=c("#87CEFA", '#98CE31'))
lollipopplot(sample.gr, features, cex=.7, xaxis = c(min(Exons),max(
  ↪ Exons)), type = "pie", ylab= nom, legend = legend)
}

```

Identification de mutations ponctuelles dans les lymphomes B diffus à grandes cellules

Par Thomas STEIMLÉ

Résumé

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) sont les lymphomes non hodgkinien les plus fréquents. Ils sont constitués par onze entités différentes très hétérogènes. Leur diagnostic se base principalement sur l'analyse architecturale et cytologique d'une biopsie tumorale lorsque celle-ci est praticable. Avec l'avancée des techniques de biologie moléculaire, il est possible de connaître le profil mutationnel des cellules néoplasiques constituant ces tumeurs. Ces dernières années, de nombreuses études ont identifié des mutations impliquées dans l'oncogénèse, ce sont les mutations conductrices (ou *drivers*). Partant de ces résultats, des nouvelles molécules ont été développées et ont permis d'agir sur les protéines mutantes, rendant ces mutations actionnables. Ces molécules ont prouvé par la suite qu'elles permettent d'améliorer la prise en charge des patients. Nous avons développé au Laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Dijon, la technique de séquençage massivement parallélisée. Nous avons ainsi séquencé les gènes *EZH2*, *TP53*, *MYD88*, *CD79B* et *CARD11* chez dix patients; neuf étaient atteints de LBDGC et un était atteint de lymphome de Burkitt. Nos résultats retrouvent des mutations pathogènes chez quatre patients, des mutations probablement pathogènes chez trois patients et aucune mutation pathogène sur les gènes séquencés de trois patients. Cette nouvelle méthode de séquençage a pour principal intérêt, par rapport à l'ancienne méthode de type Sanger, sa capacité à séquencer plusieurs patients et plusieurs gènes simultanément, ce qui est un gain temps manifeste. Elle permet également de séquencer l'ensemble de l'ADN présent dans l'échantillon, et ainsi de mesurer les fractions alléliques des mutations. Cette méthode est donc utile à l'interprétation des résultats et pourrait permettre, par la suite, de caractériser différents sous-clones présents au sein de la tumeur.

Mots clés

Lymphome B diffus à grandes cellules, biologie moléculaire, *next generation sequencing* (NGS), *EZH2*, *TP53*, *MYD88*, *CD79B*, *CARD11*, mutation pathogène.