

ANNEE 2019

N°

**ASPECTS HISTO-MOLÉCULAIRES D'UNE COHORTE DE 27 CAS DE LYMPHOMES AGRESSIFS
D'ORIGINE B DU MÉDIASTIN**

THESE
Présentée

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

et soutenue publiquement le 04 octobre 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par BEKMEZIAN Nahina

Née le 08 avril 1989

A Nîmes

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.

De juridiction constante, en s'appropriant tout ou partie d'une œuvre pour l'intégrer dans son propre document, l'étudiant se rend coupable d'un délit de contrefaçon (au sens de l'article L.335.1 et suivants du code de la propriété intellectuelle). Ce délit est dès lors constitutif d'une fraude pouvant donner lieu à des poursuites pénales conformément à la loi du 23 décembre 1901 dite de répression des fraudes dans les examens et concours publics.

ANNEE 2019

N°

**ASPECTS HISTO-MOLÉCULAIRES D'UNE COHORTE DE 27 CAS DE LYMPHOMES AGRESSIFS
D'ORIGINE B DU MÉDIASTIN**

THESE
Présentée

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

et soutenue publiquement le 04 octobre 2019

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par BEKMEZIAN Nahina

Née le 08 avril 1989

A Nîmes

Année Universitaire 2019-2020
au 1^{er} **Septembre 2019**

Doyen :
Assesseurs :

M. Marc MAYNADIÉ
M. Pablo ORTEGA-DEBALLON
Mme Laurence DUVILLARD

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

			Discipline
M.	Sylvain	AUDIA	Médecine interne
M.	Marc	BARDOU	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	BASTIE	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	BAULOT	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Yannick	BEJOT	Neurologie
Mme	Christine	BINQUET	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
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	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	Alain	BRON	Ophthalmologie
M.	Laurent	BRONDEL	Physiologie
Mme	Mary	CALLANAN	Hématologie type biologique
M.	Patrick	CALLIER	Génétique
Mme	Catherine	CHAMARD-NEUWIRTH	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	CHARLES	Réanimation
M.	Jean-Christophe	CHAUVET-GELINIER	Psychiatrie d'adultes, Addictologie
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	Ophthalmologie
M.	Frédéric	DALLE	Parasitologie et mycologie
M.	Alexis	DE ROUGEMONT	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Hervé	DEVILLIERS	Médecine interne
M.	Serge	DOUVIER	Gynécologie-obstétrique
Mme	Laurence	DUVILLARD	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Olivier	FACY	Chirurgie générale
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.	François	GHIRINGHELLI	Cancérologie
M.	Pierre Grégoire	GUINOT	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Frédéric	HUET	Pédiatrie
M.	Pierre	JOUANNY	Gériatrie
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-Francis	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	MAYNADIÉ	Hématologie – transfusion
M.	Marco	MIDULLA	Radiologie et imagerie médicale
M.	Thibault	MOREAU	Neurologie
M.	Klaus Luc	MOURIER	Neurochirurgie
Mme	Christiane	MOUSSON	Néphrologie
M.	Paul	ORNETTI	Rhumatologie
M.	Pablo	ORTEGA-DEBALLON	Chirurgie Générale
M.	Pierre Benoit	PAGES	Chirurgie thoracique et vasculaire
M.	Jean-Michel	PETIT	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Christophe	PHILIPPE	Génétique
M.	Lionel	PIROTH	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	QUANTIN	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Jean-Pierre	QUENOT	Réanimation
M.	Patrick	RAY	Médecine d'urgence
M.	Patrick	RAT	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	REBIBOU	Néphrologie
M.	Frédéric	RICOLFI	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	SAGOT	Gynécologie-obstétrique
M	Maxime	SAMSON	Médecine interne
M.	Emmanuel	SAPIN	Chirurgie Infantile
M.	Emmanuel	SIMON	Gynécologie-obstétrique
M.	Éric	STEINMETZ	Chirurgie vasculaire
Mme	Christel	THAUVIN	Génétique
M.	Benoit	TROJAK	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Pierre	VABRES	Dermato-vénéréologie
M.	Bruno	VERGÈS	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	ZWETYENGA	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

PROFESSEURS EN SURNOMBRE

M.	Alain	BERNARD (surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M.	Bernard	BONIN (Surnombre jusqu'au 31/08/2020)	Psychiatrie d'adultes
M.	Jean-Marie	CASILLAS-GIL (Surnombre jusqu'au 31/08/2020)	Médecine physique et réadaptation
M.	Pascal	CHAVANET (Surnombre jusqu'au 31/08/2021)	Maladies infectieuses

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

			Discipline Universitaire
M.	Jean-Louis	ALBERINI	Biophysiques et médecine nucléaire
Mme	Lucie	AMOUREUX BOYER	Bactériologie
Mme	Shaliha	BECHOUA	Biologie et médecine du développement
M.	Mathieu	BLOT	Maladies infectieuses
M.	Benjamin	BOUILLET	Endocrinologie
Mme	Marie-Claude	BRINDISI	Nutrition
Mme	Marie-Lorraine	CHRETIEN	Hématologie
Mme	Vanessa	COTTET	Nutrition
M.	Damien	DENIMAL	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Ségolène	GAMBERT-NICOT	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Marjolaine	GEORGES	Pneumologie
Mme	Françoise	GOIRAND	Pharmacologie fondamentale
M.	Charles	GUENANCIA	Physiologie
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.	Pierre	MARTZ	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Alain	PUTOT	Gériatrie
M.	Paul-Mickaël	WALKER	Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEURS EMERITES

M.	Laurent	BEDENNE	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Jean-François	BESANCENOT	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	François	BRUNOTTE	(01/09/2017 au 31/08/2020)
M.	Philippe	CAMUS	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Jean	CUISENIER	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Jean-Pierre	DIDIER	(01/11/2018 au 31/10/2021)
Mme	Monique	DUMAS-MARION	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Claude	GIRARD	(01/01/2019 au 31/12/2021)
M.	Maurice	GIROUD	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	François	MARTIN	(01/09/2018 au 31/08/2021)
M.	Henri-Jacques	SMOLIK	(01/09/2019 au 31/08/2022)
M.	Pierre	TROUILLOUD	(01/09/2017 au 31/08/2020)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

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

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Katia	MAZALOVIC	Médecine Générale
-----	-------	------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

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

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

M.	Clément	CHARRA	Médecine Générale
Mme	Anne	COMBERNOUX -WALDNER	Médecine Générale
M.	Benoit	DAUTRICHE	Médecine Générale
M.	Alexandre	DELESVAUX	Médecine Générale
M.	Rémi	DURAND	Médecine Générale
M.	Arnaud	GOUGET	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Lucie	BERNARD	Anglais
M.	Didier	CARNET	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	EVRARD	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

M.	Mathieu	BOULIN	Pharmacie clinique
M.	François	GIRODON	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques
Mme	Evelyne	KOHLI	Immunologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

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



Université de Bourgogne
UFR des Sciences de Santé
Circonscription Médecine



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 : Monsieur le Professeur MARTIN Laurent

Membres : Monsieur le Professeur MAYNADIE Marc

Madame le Professeur CALLANAN Mary

Monsieur le Docteur CASANOVAS René Olivier

Monsieur le Docteur RAMLA Selim

SERMENT D'HIPPOCRATE

"Au moment d'être admis(e) 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(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) 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(e) et méprisé(e) si j'y manque."

REMERCIEMENTS

À mon jury,

Monsieur le Professeur Laurent MARTIN, Président du jury,

Je vous remercie pour le soutien et la disponibilité que vous m'avez accordés durant l'encadrement de ce travail. Je vous remercie pour votre bienveillance et votre patience. Je vous remercie également pour votre enseignement durant ces cinq années d'internat et les connaissances que vous m'avez apportées qui m'aideront à me perfectionner dans ma carrière future d'anatomopathologiste. Veuillez recevoir mes plus sincères remerciements et mon plus profond respect.

Monsieur le Professeur Marc MAYNADIÉ,

C'est un honneur pour moi de vous avoir parmi ce jury et d'avoir accepté de juger de cette thèse. Nos spécialités s'entrecroisent et je vous remercie de l'intérêt que vous apportez à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et mon plus profond respect.

Madame le Professeur Mary CALLANAN,

C'est un honneur pour moi de vous avoir parmi ce jury et d'avoir accepté de juger de cette thèse. Je vous remercie pour votre implication dans cette étude et du temps passé pour permettre à ce travail d'avancer pas à pas. Je vous remercie également pour l'immense connaissance scientifique que vous apportez à ces différents travaux de recherche. Veuillez recevoir l'expression de mes plus sincères remerciements.

Monsieur le Docteur Olivier CASASNOVAS,

Je vous remercie pour tout l'intérêt, le soutien et l'aide que vous avez accordés à ce travail. Je vous remercie également pour votre disponibilité et pour votre sens critique clinique apporté à cette étude tout au long de la construction de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et ma profonde gratitude.

Monsieur le Docteur Selim RAMLA,

Selim, je te remercie pour ton soutien moral indéniable depuis le début dans ce travail et cela jusqu'au dernier moment, et surtout pour ton aide à me donner confiance et à m'apporter la force nécessaire. Je te remercie pour le regard extérieur que tu m'as donné sur le sujet tout au long de l'avancée de l'écriture, pour ton immense savoir scientifique et pour ton sens de la rigueur qui a aidé à la construction de ce travail. Aussi, je souhaite remercier grandement Bénédicte et Romain pour leur implication.

Je te remercie également en tant que co-interne, à ces premiers semestres avec Gilles où tu nous as tant appris en macroscopie. Tant de temps passé dans cette salle mais toujours avec le sourire, la bonne humeur et beaucoup d'éclats de rire !

Mais surtout je te remercie en tant qu'amie, à toutes nos discussions passées à philosopher sur la vie et à refaire le monde.

Reçois par ces quelques lignes, l'expression de toute ma reconnaissance, mon amitié et de tous mes vœux de bonheur avec Bénédicte.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	14
RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	17
INTRODUCTION.....	18
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	23
Patients inclus	23
Données cliniques et de suivi	23
Données FDG-TEP	23
Histologie, immunohistochimie et hybridation in situ	24
Analyses moléculaires	25
Analyses statistiques.....	25
RÉSULTATS	26
Patients et tissus.....	26
Sur le plan clinique.....	26
Données radio-métaboliques (FDG-TEP scanner).....	27
Sur le plan thérapeutique	27
Évolution des patients	28
Sur le plan histopathologique et immunophénotypique	29
Sur le plan moléculaire et technique.....	32
<input type="checkbox"/> Profils mutationnels par pathologie	33
<input type="checkbox"/> Nombre de mutations par pathologie.....	33
<input type="checkbox"/> Mutations par pathologie	34
<input type="checkbox"/> Variants par pathologie.....	35
<input type="checkbox"/> Mutations et progression de la maladie.....	36
Corrélations anatomo-cliniques et mutationnelles.....	37
<input type="checkbox"/> Corrélations entre le nombre de mutations et le type de pathologie.....	37
<input type="checkbox"/> Corrélations entre le nombre de mutations par patient et le stade d'Ann Arbor	37
<input type="checkbox"/> Corrélations entre l'expression de PDL1 et le stade d'Ann Arbor.....	37
<input type="checkbox"/> Corrélations entre l'expression de PDL1 et le nombre de mutations par patient	38
<input type="checkbox"/> Corrélations entre l'expression de PDL1 et les mutations de <i>CD58</i> , <i>SOCS1</i> et <i>XPO1</i>	38
DISCUSSION.....	39
Profil mutationnel des PMBL et des GZL de type PMBL.....	39
Profil mutationnel des cHL et des GZL de type cHL.....	41
Profil mutationnel des GZL.....	42

Mutations de mauvais pronostic	43
Paysage mutationnel corrélé à la clinique.....	43
Paysage mutationnel corrélé aux caractéristiques histo-pathologiques	43
Possibilités d'améliorations de notre étude à envisager.....	44
<input type="checkbox"/> Échantillonnage.....	44
<input type="checkbox"/> Technique d'extraction des échantillons.....	44
Hypothèses physiopathologiques.....	46
Voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, dans la survie cellulaire et dans la réponse immune.....	46
<input type="checkbox"/> Immunité (<i>B2M</i> , <i>CIITA</i> et <i>CD58</i>).....	46
<input type="checkbox"/> Voie de signalisation JAK-STAT (<i>SOCS1</i>).....	47
<input type="checkbox"/> Voie de signalisation NF-κB (<i>TNFAIP3</i>)	47
<input type="checkbox"/> Export nucléocytoplasmique (<i>XPO1</i>)	47
<input type="checkbox"/> Rho-ROCK (<i>GNAI3</i>).....	48
Mutations prédictives de mauvais pronostic.....	48
<input type="checkbox"/> Réparation des dommages de l'ADN (<i>ATM</i> et <i>TP53</i>)	48
<input type="checkbox"/> Epissage (<i>CREBBP</i>).....	49
<input type="checkbox"/> Voie du BCR (<i>PLCG2</i>).....	49
<input type="checkbox"/> Immunité (<i>TNFRSF14</i>)	49
Microenvironnement tumoral	50
CONCLUSION	51
CONCLUSIONS SIGNÉES	53
RÉFÉRENCES	55
TABLEAUX ET FIGURES.....	63

TABLE DES TABLEAUX ET FIGURES

FIGURES DE L'INTRODUCTION ET DE LA DISCUSSION

Figure A. Aspects histo-moléculaires de l'ontogenèse des DLBCL et PMBL.	19
Figure B. Relations moléculaires entre PMBL, cHL et DLBCL-GC.	20
Figure C. Principales voies de signalisation intracellulaires dérégulées dans les PMBL.	40
Figure D. Résumé schématique des mécanismes identifiés dans la pathogenèse des PMBL.	50
Figure E. Dérégulation de la réponse immunitaire anti-tumorale dans le microenvironnement tumoral des PMBL.	51

TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques cliniques, métaboliques et critères évolutifs de l'ensemble des 27 patients dans chacune des 3 pathologies (PMBL, GZL et cHL).	64
Tableau 2. Caractéristiques histologiques et immuno-phénotypiques des PMBL, GZL et cHL.	65

FIGURES

Figure 1. Images de FDG-TEP scanner avec données de SUV max, TMTV0 et TLG pour les PMBL, GZL et cHL.	66
Figure 2. Caractéristiques morphologiques sur lames HES des PMBL, GZL et cHL.	67
Figure 3. Caractéristiques immunohistochimiques des marqueurs B des PMBL, GZL et cHL.	68
Figure 4. Caractéristiques immunohistochimiques des marqueurs centro-germinatifs des PMBL, GZL et cHL.	69
Figure 5. Caractéristiques immunohistochimiques des marqueurs BCL2, cMYC et Ki67 des PMBL, GZL et cHL.	70
Figure 6. Caractéristiques immunohistochimiques des marqueurs d'activation des cellules B (CD30-CD23), marqueur myéloïde (CD15) et du CD23 des PMBL, GZL et cHL.	71
Figure 7. Caractéristiques immunohistochimiques des checkpoints inhibiteurs des lymphocytes T intervenant dans la réponse immune des PMBL, des GZL et des cHL.	72

Figure 8. Microenvironnement lymphocytaire T et macrophagique analysé par étude immunohistochimique avec les anticorps anti-CD3 (lymphocytes T) et anti-CD68 (macrophages) des PMBL, GZL et cHL.	73
Figure 9. Graphique représentant le profil mutationnel des PMBL.	74
Figure 10. Graphique représentant le profil mutationnel des GZL.	74
Figure 11. Graphique représentant le profil mutationnel des cHL.	74
Figure 12. Graphique représentant les 3 profils mutationnels (PMBL, GZL et cHL).	75
Figure 13. <i>Heatmap</i> représentant les mutations des 28 gènes identifiées dans les lymphomes de notre cohorte.	76
Figure 14. Courbe de PFS en fonction du statut mutationnel du gène <i>ATM</i> .	77
Figure 15. Courbe de PFS en fonction du statut mutationnel du gène <i>CREBBP</i> .	77
Figure 16. Courbe de PFS en fonction du statut mutationnel du gène <i>PLCG2</i> .	77
Figure 17. Courbe de PFS en fonction du statut mutationnel du gène <i>TP53</i> .	77

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABVD : association d'Adriamycine, Bléomycine, Vinblastine et Dacarbazine

ABC : Activated B Cell-like

ACVBP : association d'Adriamycine, Cyclophosphamide, Vindésine, Bléomycine et Prednisone

ARID1A : At Rich Interaction Domain 1 A

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

B2M : Bêta-2-Microglobuline

BCR : B-cell Receptor

BEACOPP : association de Bléomycine, Etoposide, Adriamycine, Cyclophosphamide, Vincristine, Procarbazine et Prednisone

CCL17 : C-C motif Chemokine Ligand 17

CCND3 : Cyclin D 3

CD : Cluster de Différenciation

CD58 : Cluster de Différenciation 58

cHL : classic Hodgkin Lymphoma (Lymphome de Hodgkin de type classique)

cHL-NS : Nodular Sclerosis classic Hodgkin Lymphoma (Lymphome de Hodgkin de type classique Scléro-Nodulaire)

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CIITA : Class II TransActivator

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CREBBP ou CBP : CRB-Binding Protein

CXCR4: CXC motif Chemokine Receptor 4

DHAP : association de Dexaméthasone, Cisplatine et Cytarabine

DIN : DNA Integrity Number

DLBCL : Diffuse Large B Cell Lymphoma (Lymphome Diffus à Grandes Cellules B)

EBER : ARNs de latence de l'Epstein Barr Virus présents dans les cellules B infectées

EBV: Epstein Barr Virus

EP300: E1A binding protein P300

FDG-TEP: FluoroDesoxyGlucose-Positron Emission Tomography

FFPE : tissus préalablement fixés dans le formol et inclus en paraffine

FOXO1: FOlkhead boX protein O1

GC: Germinal-Center B cell like

GNA13: Guanine Nucleotide-binding protein subunit Alpha-13

GVD : association de Gemcitabine, Vinorelbine et Doxorubicine

GZL : Gray Zone Lymphoma (Lymphome Gray Zone)

HES : Hématoxyline Eosine Safran

HL : Hodgkin Lymphoma (Lymphome de Hodgkin)

HRS : Hodgkin et Reed-Sternberg

IHC: ImmunoHistoChimie

IR: Infra-Rouge

IRF4: Interferon Regulatory Factor 4

JAK-STAT: JAnus Kinase Signal Transducer and Activator of Transcription

KMT2A: Lysine N-MethylTransferase 2A

KMT2D: Lysine N-MethylTransferase 2D

LNH: Lymphome Non Hodgkinien

MAL: Myelin And Lymphocyte

MEF2B: Myocyte Enhancer binding Factor 2B

MHC: Major Histocompatibility Complex

MYD88: MYeloid Differentiation primary response 88

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B

NFKBIE: Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cell Inhibitor Epsilon

NGS : Séquençage de Nouvelle Génération

NK : Natural Killer

NOS: Not Otherwise Specified

NOTCH2: neurogenic locus NOTCH homolog protein 2

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OS : survie globale

PAX5 : paired box protein PAX-5

PDL- : Programmed Death Ligand

PFS : survie sans progression

PMBL : Primary Médiastinal B cell Lymphoma (Lymphome B Primitif du Médiastin)

PIM1: proto-oncogène serine/threonine-proteine kinase PIM-1

PLCG2 : PhosphoLipase C Gamma 2

PRDM1 : PR Domain zinc finger protein 1

R- : Rituximab associé à-

RC : Rémission Complète

R-CHOP : association de Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxyadriamycine, Vincristine et Prednisone

REL : proto-oncogène c-REL

SOCS1: Suppressor Of Cytokine Signaling protein 1

STAT6: Signal Transducer and Activator of Transcription 6

SUV : valeur de fixation normalisée

SUV max : valeur maximale de fixation normalisée

TCR: T-cell Receptor

TDM: TomoDensitoMétrie

TLG : activité glycolytique totale

TMTV: Volume Métabolique Total Tumoral

TNFAIP3: Tumor Necrosis Factor Alpha Induced Protein 3

TNFRSF14: Tumor Necrosis Factor ligand SuperFamily, member 14

TP53: Tumor Protein 53

Vs: Versus

WES: Whole Exome Sequencing

WGS: Whole Genome Sequencing

XPO1: exportine 1

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Introduction. Les lymphomes agressifs d'origine B du médiastin qui incluent les lymphomes primitifs du médiastin (PMBL), les lymphomes de Hodgkin classique (cHL) et les formes intermédiaires ou gray zone (GZL) ont des caractéristiques proches qui rendent parfois leurs diagnostics difficiles.

Objectif. Le but de ce travail rétrospectif est de préciser les caractéristiques, cliniques, métaboliques, histopathologiques, phénotypiques et moléculaires de ces 3 entités.

Matériels et méthodes. Les 27 cas analysés, diagnostiqués entre 2011 et 2017, incluaient 13 PMBL, 5 GZL et 9 cHL. Les données cliniques et métaboliques ont été collectées dans les dossiers. L'analyse des lames a précisé leurs aspects morphologiques et leurs phénotypes. Le profil mutationnel a été déterminé par technique de séquençage haut débit utilisant un panel de 30 gènes.

Résultats. Des mutations récurrentes, impliquées dans les voies de signalisation NF- κ B (*TNFAIP3*), JAK-STAT (*SOCS1*) et RhoA/ROCK (*GNA13*), dans l'immunité (*B2M*, *CD58*, *CIITA*) et dans le transport nucléo-cytoplasmique (*XPO1*) ont été associées au PMBL ($p < 0,05$). Certaines d'entre elles (*CD58*, *SOCS1* et *XPO1*) étaient corrélées à l'expression de PDL1 ($p < 0,05$). D'autres mutations (*ATM*, *CREBBP*, *PLCG2*, *TP53* et *TNFRSF14*) ont été associées à une évolution défavorable des PMBL ($p < 0,05$). Aucune mutation n'a pu être liée aux 2 autres pathologies (GZL et cHL).

Conclusions. La détermination du profil mutationnel des lymphomes agressifs du médiastin paraît particulièrement intéressante pour les PMBL. Les mutations associées à cette pathologie (activation de voies de signalisation, échappement à l'immunité anti-tumorale, transport nucléo-cytoplasmique) sont probablement corrélées à sa lymphomagénèse et à la surexpression de PDL1.

MOTS-CLES : LYMPHOMES, MEDIASTIN, NF- κ B, JAK-STAT, ECHAPPEMENT IMMUNITAIRE, XPO1, FACTEURS PRONOSTIQUES, PDL1.

INTRODUCTION

Les lymphomes « agressifs matures » d'origine B sont les lymphomes les plus fréquents. Ils représentent environ 45% des lymphomes nouvellement diagnostiqués (1). Ils incluent les lymphomes diffus à grandes cellules B *not otherwise specified* (DLBCL NOS), les lymphomes B primitifs du médiastin (PMBL), les lymphomes de Hodgkin classique (cHL), les lymphomes de Burkitt, les lymphomes inclassables (intermédiaires entre DLBCL et cHL) et les lymphomes de haut grade avec réarrangement de *MYC*, *BCL2* et/ou *BCL6* (2,3).

L'hétérogénéité moléculaire des DLBCL a été mise en évidence grâce aux études de profils d'expressions géniques, introduisant la notion de cellule d'origine. Trois sous-groupes principaux ont ainsi été établis, correspondant à différents stades physiologiques de différenciation et de maturation des lymphocytes B : le sous-groupe GCB (germinal center B-cell like), le sous-groupe ABC (activated B-cell like) (4,5) et le sous-groupe PMBL (cellules B médullaires thymiques sans recirculation et caractérisées par un phénotype B activé) (6,7). D'un point de vue nosologique, cette hétérogénéité implique des différences épidémiologiques (âge), thérapeutiques et pronostiques (8,9).

Les PMBL représentent 2 à 3% des lymphomes non Hodgkiniens (LNH) et ont longtemps été considérés comme un sous-type de DLBCL. Ils se caractérisent par une atteinte médiastinale (10), mais également par le jeune âge des patients atteints, autour de la troisième décennie, avec une légère prédominance féminine (11) quand la plupart des lymphomes, tous types confondus, affectent d'avantage les hommes de plus de soixante ans. Ainsi, grâce à une approche multidisciplinaire intégrant les données de la biologie moléculaire aux données épidémiologiques, cliniques et histo-pathologiques, cette entité a été individualisée dans la révision de la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des tumeurs lymphoïdes en 2008 (11,12).

Sur le plan histo-pathologique, les cellules tumorales sont nombreuses et leurs noyaux sont de forme et de taille variables, fréquemment entourés d'un abondant cytoplasme pâle. De fins tractus fibreux compartimentent des groupes de cellules tumorales, donnant à l'ensemble un aspect en rayon de miel (13). Les aspects immuno-phénotypiques caractéristiques sont la conservation du programme lymphocytaire B (CD19, CD20, CD22, CD79a), la positivité des facteurs de transcription (BOB1, PU-1, OCT2 et PAX5) (14,15) et la positivité du CD30 souvent faible (16).

En revanche, les profils d'expressions géniques éloignent les PMBL des DLBCL (17) et les rapprochent paradoxalement des cHL (8,12).

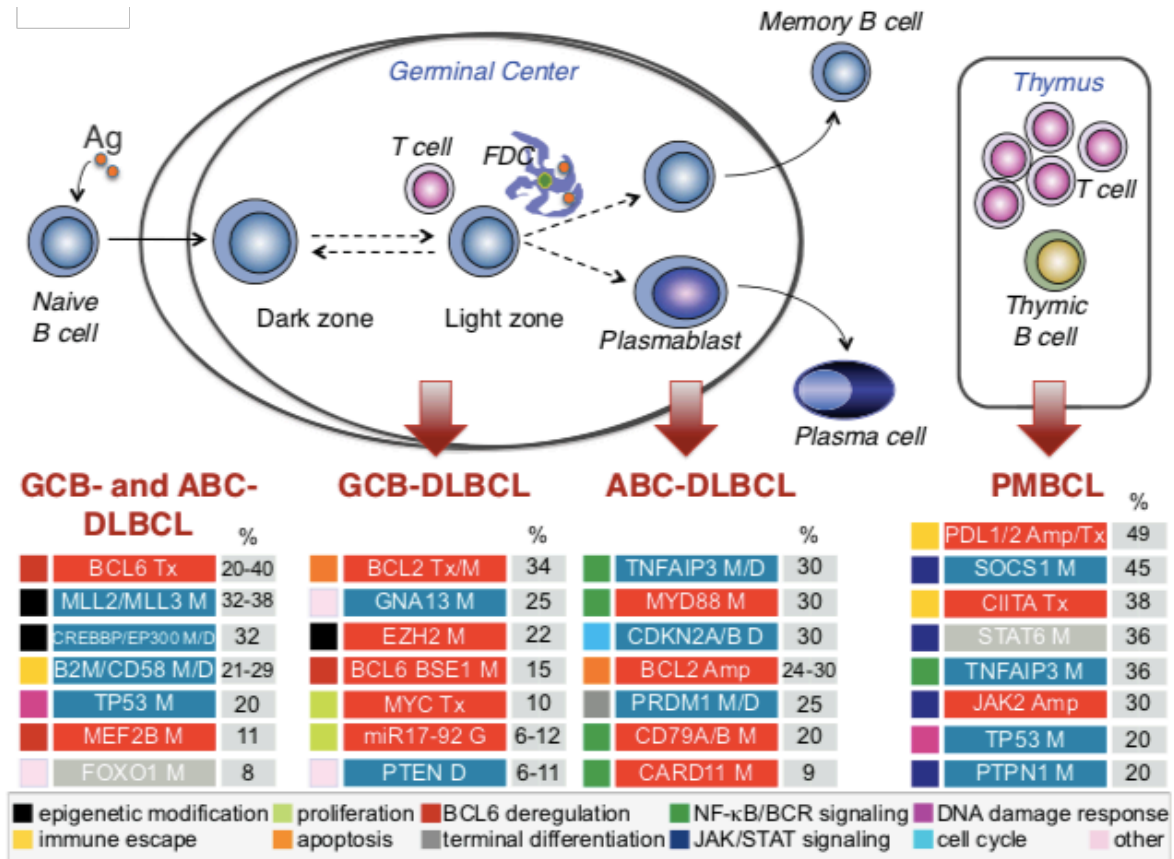


Figure A. Aspects histomoléculaires de l'ontogénèse des DLBCL et PMBL. Les DLBCL de sous-types GC (germinal center B-cell like) et ABC (activated B-cell like) et les PMBL (lymphocytes B médullaires thymiques sans recirculation) proviennent de cellules d'origine différentes. Les principales altérations génétiques survenant dans ces 3 entités présentent des spectres différents. En bleu : perte de fonction ; en rouge : gain de fonction. (D'après Pasqualucci et al, *The genetic landscape of diffuse large B cell lymphoma*, *Semin Hematol.* 2015).

Les cHL affectent les adultes jeunes, notamment le sous-type sclérosant nodulaire (cHL-NS) qui représente 70% des cas de cHL, habituellement diagnostiqués chez les patients entre 15 et 34 ans, sans prédominance de sexe (18). Une atteinte médiastinale est présente dans 60% des cas de cHL-NS, ce qui est moins le cas dans les formes à cellularité mixte, riches en lymphocytes ou déplétées en lymphocytes (19). Sur le plan histopathologique, les cellules tumorales de Reed-Sternberg et de Hodgkin sont caractéristiques des HL ; elles sont de grande taille et présentent un noyau unique ou bilobé muni d'un nucléole proéminent. La rareté des éléments tumoraux contraste avec l'importance du microenvironnement composé de lymphocytes B et T, de macrophages et de polynucléaires éosinophiles (19). Dans cette forme de cHL d'architecture sclérosante et nodulaire, de larges bandes

Initialement, le terme de lymphome inclassable, intermédiaire entre lymphome diffus à grandes cellules B et lymphome de Hodgkin classique, encore nommé gray zone (GZL) a été utilisé pour définir ce groupe de lymphomes agressifs pour lesquels la classification dans une catégorie était difficile. Les GZL présentent des critères cliniques, morphologiques, immuno-phénotypiques intermédiaires entre HL et DLBCL/PMBL (8,31–37). Cliniquement, les GZL concernent préférentiellement les hommes de 20 à 40 ans, et une atteinte médiastinale est fréquemment mentionnée (31,36).

En 2012, Gualco *et al* (38), à la suite des travaux de Traverse-Glehen *et al* (36), ont décrit quatre sous-types de GZL, traduisant le spectre morphologique et phénotypique qui caractérise cette entité pathologique:

- le sous-type 1, dont la morphologie correspond à un cHL, et dont le phénotype associe une expression de CD30 et/ou de CD15, avec un marquage intense et diffus par les marqueurs de phénotype lymphocytaire B (CD20 et/ou CD79a) et/ou l'expression de CD45.
- le sous-type 2, dont la morphologie correspond à un PMBL, et dont le phénotype associe une expression forte de CD30 et CD15 ou d'EBER, avec soit une expression de CD45 sans CD20, soit une expression de CD20 sans CD45.
- le sous-type 3 présente des caractéristiques morphologiques intermédiaires entre PMBL et cHL, une expression variable de CD15, CD45 et CD20 et une expression de CD30 le plus souvent diffuse et intense lorsque la morphologie rappelle un cHL, ou plus faible et focale dans les secteurs de morphologie se rapprochant du PMBL.
- le sous-groupe 4 inclut les cas composites où les contingents de PMBL et celui de cHL sont présents dans des secteurs bien séparés. Ils peuvent être synchrones, présents dans le même ganglion ou dans des ganglions différents, ou métachrones avec parfois plusieurs années qui séparent ces deux diagnostics. Dans ces formes métachrones, un cHL est souvent antérieurement diagnostiqué, le diagnostic de GZL étant alors posé lors d'une récurrence après plusieurs années (39)(40).

Le diagnostic de GZL est un challenge diagnostique pour le pathologiste (41), et son pronostic est moins bon que celui des PMBL ou des cHL (31,38,42–46). Par conséquent, il est important de bien identifier cette entité nosologique nécessitant une approche thérapeutique et un suivi adapté (34).

Le microenvironnement immunitaire joue un rôle important dans le développement des tumeurs et des lymphomes (47,48). L'immunité anti-tumorale permet d'éliminer à un stade précoce les cellules tumorales. Toutefois, les interactions directes et indirectes entre les cellules immunitaires et les cellules néoplasiques permettent de façonner le microenvironnement et de favoriser l'émergence de tumeurs cliniquement apparente. Les molécules impliquées dans la synapse immunologique comme *PDL1* et *PDL2* jouent un rôle important dans les mécanismes d'immunosuppression. Leur inhibition par des thérapies ciblées paraît donc tout à fait pertinente pour rétablir une immunité anti-tumorale efficace à condition bien sûr qu'elle ait pu se développer.

La fréquence de l'atteinte médiastinale parfois exclusive est une caractéristique commune des PMBL, GZL et cHL. Dans un travail antérieur, nous avons proposé, par une approche pluridisciplinaire, une intégration des données cliniques, d'imagerie métabolique et des caractéristiques histo-pathologiques afin de mieux identifier ces GZL.

L'objectif de notre travail est d'étudier le profil mutationnel de ces pathologies par séquençage ciblé à l'aide d'un panel de 52 gènes, et de proposer une approche moléculaire diagnostique permettant de mieux identifier les lymphomes B matures agressifs du médiastin.

Dans un second temps, nous tenterons d'identifier les mutations ayant un impact pronostique, ou une corrélation à un profil phénotypique.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Patients inclus

Nous avons inclus dans cette étude rétrospective 27 patients porteurs d'un lymphome B agressif avec atteinte médiastinale prédominante, diagnostiqué entre 2011 et 2017. Nous disposions pour ces patients de tissu FFPE en quantité suffisante. Les données cliniques et métaboliques (scanner au 18f-FluoroDesoxyGlucose-Positron Emission Tomography ou 18F-FDG-TEP) ont été collectées dans les dossiers ou auprès des médecins nucléaires.

Données cliniques et de suivi

Vingt-six patients ont été traités dans le service d'Hématologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) François Mitterrand de Dijon. Deux de ces patients ont poursuivi leur traitement au CHU de Nîmes et au CHU de Lille (ce dernier est perdu de vue depuis son départ). Le dernier patient a été traité dans le service d'Hématologie du CHU de Besançon.

Les informations concernant l'évolution des patients les plus récentes ont été recueillies en juillet 2019 (n=3).

Données FDG-TEP

Tous les patients ont bénéficié d'un 18F-FDG-TEP au diagnostic avec recueil de la valeur maximale de fixation normalisée (SUV max) et des valeurs du volume métabolique total tumoral (TMTV) et d'activité glycolytique totale (TLG).

Les images de TEP scanner corps entier ont été acquises de manière séquentielle; elles sont le résultat de l'association d'une scintigraphie et d'un scanner par tomodensitométrie (TDM) après injection d'une petite quantité de 18F-FluoroDesoxyGlucose (Gemini TOF, Philips Medical System, Pays-Bas). Le TDM était utilisé pour visualiser les données anatomiques.

Les patients étaient à jeûn au moins 6 heures avant l'injection de 18F-FDG. La glycémie a été vérifiée puis chaque patient a reçu une injection intra-veineuse de 3 MBq/kg de 18F-FDG. Une heure d'attente était requise avant la réalisation de l'examen d'imagerie. D'abord étaient réalisées les images de TDM. Puis les images de TEP scanner ont été acquises. Pour finir les images 3D couplées TEP/TDM ont été examinées selon les plans axial, coronal et sagittal.

Le logiciel utilisé est développé par le Beth Israel Deaconess Medical Center (États-Unis) qui est connecté au logiciel d'analyse d'images FIJI (États-Unis).

Histologie, immunohistochimie et hybridation in situ

Les caractéristiques morphologiques ont été analysées sur des coupes colorées par l'Hématoxyline Eosine Safran (HES), provenant de tissus préalablement fixés dans le formol et inclus en paraffine (FFPE).

Les analyses immunohistochimiques (IHC) ont été réalisées sur des coupes FFPE de 4 µm grâce à l'automate Dako Omnis (Agilent, Etats-Unis) avec les anticorps suivants : CD20 (*L26*, prêt à l'emploi), CD79a (*JCB117*, prêt à l'emploi), PAX5 (*DAK-Pax5*, prêt à l'emploi), BOB1 (*SP92*, dilution 1:100), CD10 (*56C6*, prêt à l'emploi), BCL6 (*PG-B6p*, prêt à l'emploi), MUM1 (*MUM1p*, dilution 1 :50), BCL2 (*I24*, prêt à l'emploi), c-MYC (*EP121*, dilution 1 :25), Ki67 (*MIB-1*, prêt à l'emploi), CD15 (*Carb-3*, prêt à l'emploi), CD30 (*Ber-H2*, prêt à l'emploi), EMA (*E29*, dilution 1 :100), CD3 (polyclonal, prêt à l'emploi), CD5 (*4C7*, prêt à l'emploi), CD23 (*DAK-CD23*, prêt à l'emploi), ALC/CD45 (*2B11+ PD7/26*, prêt à l'emploi), CD68 (*KP1*, prêt à l'emploi), CD38 (*EP135*, dilution 1 :100), PDL1 (*22C3*, dilution 1 :50) et PDL2 (*MIH18*, dilution 1 :50).

La technique d'hybridation *in situ* a été réalisée sur coupes FFPE grâce à l'automate Dako Omnis (Agilent, Etats-Unis) à l'aide de la sonde EBER qui détecte des ARNs de latence d'EBV.

Les lames ont été numérisées avec le scanner Nanozoomer 2.0 HT (Hamamatsu, Japon). Les lames virtuelles ont été visualisées avec le logiciel NDP.view2 Viewing (Hamamatsu, Japon).

Pour l'interprétation des immunomarquages, nous avons évalué la quantité de cellules tumorales marquées (0 à 100 %, par tranche de 10 %). Pour certains des anticorps (PAX5, CD38, PDL1 et PDL2), l'intensité du marquage a été évaluée : absence de marquage, faible marquage, marquage modéré et marquage intense.

Analyses moléculaires

L'ADN extrait de chaque tumeur grâce à l'automate Qiasymphony (Qiagen, Pays-Bas) a été analysé en séquençage haut débit. Il provenait d'ADN FFPE après sélection de la zone tumorale d'intérêt par macrodissection.

L'ADN était alors fragmenté puis amplifié ce qui permettait le séquençage clonal de manière massive et parallèle.

Il a été choisi de réaliser ce séquençage ciblé à haut débit avec le séquenceur NextSeq d'Illumina (États-Unis), avec la méthode « capture ».

Les données séquencées étaient ensuite envoyées à la plateforme de Sophia Genetics (base internationale de données génomiques). Elles ont été analysées et les variants ont été ainsi définis (à l'aide du logiciel Sophia DDM).

Le lymphopanel utilisé, initialement désigné pour étudier les lymphomes à grandes cellules, comprenait les gènes suivants : *ARID1A*, *B2M*, *BCL2*, *BRAF*, *BTK*, *CARD11*, *CCND3*, *CD58*, *CD79A*, *CD79B*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CIITA*, *CREBBP*, *CXCR4*, *EP300*, *EZH2*, *FOXO1*, *GNAI3*, *ID3*, *IRF4*, *MEF2B*, *MYC*, *MYD88*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *PIMI*, *PLCG2*, *PRDM1*, *SOCS1*, *STAT6*, *TCF3*, *TNFAIP3*, *TNFRSF14*, *TP53*, *XPO1*, *ATM*, *BCL6*, *PAX5*, *REL*, *KMT2A/MLL*, *CREBBP*, *KMT2D*, *CCND1*, *SF3B1*, *PTEN*, *FBXW7*, *PTPN1*, *NFKBIE*, *MAL*, *KRAS* et *NRAS*.

Analyses statistiques

Les corrélations ont été réalisées avec différents tests (*Chi-squared*, *Welch*, *T-test*). Les résultats étaient considérés significatifs lorsque le $p < 0,05$. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel *Medcalc Statistical*.

RÉSULTATS

Patients et tissus (cf. tableau 1)

La cohorte des 27 patients comprenait 13 femmes et 14 hommes (âge médian : $37\pm 13,5$). Il s'agissait de 13 PMBL (48,1%), 5 GZL (18,5 %) et 9 cHL (33,3%). L'âge médian au diagnostic était 31 ans pour les PMBL (extrêmes 19 et 69 ans), 44 ans pour les GZL (extrêmes 36 et 64 ans) et 43 ans pour les cHL (extrêmes 19 et 56 ans).

La plupart des biopsies de tumeurs ont été réalisées sous médiastinoscopie (13/13 PMBL, 3/5 GZL, et 8/9 LH). Pour les autres cas, des biopsies de ganglions (cervicaux et axillaires) et une biopsie du lobe supérieur du poumon droit ont été pratiquées.

Sur le plan clinique (cf. tableau 1)

Selon la classification d'Ann Arbor, 14 patients (56,6%) présentaient, au diagnostic, une maladie localisée (stades I et II) et 13 patients (44,4%) une maladie avancée (stades III et IV) dont 12 stade IV avec atteinte extra-nodale : hépatique, gastrique, péricardique, pulmonaire, rénale... Parmi les 13 patients de stades avancés, 6 étaient porteur d'un PMBL.

Le diamètre maximal de la masse médiastinale a été mesuré en centimètre sur le TDM. Un diamètre supérieur à 10 cm définissait une forte masse tumorale ou *Bulky*. Les PMBL avait le diamètre médian le plus élevé ($12,8\pm 2,4$ cm, extrêmes 7 et 16 cm), dont 12/13 *Bulky*. Pour les GZL, la médiane était de $6,1\pm 6,7$ cm (extrêmes 1,9 et 15 cm) dont 1 seul *Bulky*. Pour les cHL, la médiane était de $8,4\pm 3,5$ cm (extrêmes 3,5 et 13,3 cm) dont 3 *Bulky*.

Neuf des 16 patients avec forte masse tumorale avaient une maladie disséminée (stades III-IV d'Ann Arbor).

Données radio-métaboliques (FDG-TEP scanner) (cf. tableau 1 et figure 1)

La SUV max médiane, le TMTV0 médian et le TLG médian au diagnostic étaient respectivement de 17 ± 7 (extrêmes 2,9 et 28,8), 267 ± 323 mL (extrêmes 5,17 et 1405) et 1680 ± 2171 (extrêmes 210 et 7044).

Pour les PMBL, la médiane de SUV max était au diagnostic de $18,8\pm 7,8$ (extrêmes 2,9 et 28,8) ; celle du TMTV0 de 386 ± 384 mL (extrêmes 45,3 et 1405,5) et celle du TLG de 4185 ± 2214 (extrêmes 333 et 7044).

Pour les GZL, la médiane de SUV max était au diagnostic de $21,3\pm 4,2$ (extrêmes 16,6 et 26,6) ; celle du TMTV0 de $43,5\pm 372$ mL (extrêmes 29,3 et 679) et celle du TLG de 359 ± 2314 (extrêmes 320 et 4346).

Pour les cHL, la médiane de SUV max était au diagnostic de $10,6\pm 4,9$ (extrêmes 4,5 et 17,7) ; celle du TMTV0 de 233 ± 188 mL (extrêmes 5,2 et 617) et celle du TLG de 1227 ± 707 (extrêmes 210 et 1935).

Les PMBL avaient les valeurs les plus élevées de TMTV0 et de TLG. Les cHL présentaient les valeurs les plus basses de SUV max.

Sur le plan thérapeutique

Les PMBL et GZL ont été traités par R-ACVBP ou R-CHOP (12/13 PMBL et 3/5 GZL). Certains ont reçus du R-DHAP (1 PMBL) ou R-DHAOX puis R-GVD (1 PMBL, au moment de la rechute). Un PMBL a été traité par BEACOPP puis DHAP au moment de la rechute. Deux GZL ont été traités par R-BEACOPP ou ABVD puis R-DHAP puis R-GVD. Les patients cHL ont reçus ABVD seul (n=3) puis du BEACOPP escaladé (n=4) ou BEACOPP escaladé seul (n=1) ou BEACOPP puis DHAP (n=1).

Évolution des patients (cf. tableau 1)

La médiane de survie globale (OS) de notre cohorte était de $37,2 \pm 21,6$ mois (extrêmes de 5,7 et 78,6). La médiane de survie sans progression (PFS) était de $36,8 \pm 22,8$ mois (extrêmes 4 et 78,6).

Parmi les 27 patients de la cohorte, 22 patients étaient en rémission complète (RC) et n'ont pas présenté de progression ni de rechute. Cinq patients ont progressé sous traitement : 1 patient a été perdu de vue (PMBL), 2 patients sont décédés et les 2 derniers sont aux dernières nouvelles (01/07/2019 et 10/07/2019) en rémission complète.

Pour les PMBL, les médianes de survie globale et de survie sans progression étaient respectivement de $19,4 \pm 18,2$ mois (extrêmes 5,7 et 60,2) et $19,4 \pm 19,3$ mois (extrêmes 4 et 60,2). Dix/13 étaient en RC. Les 2 autres patients (stade IV d'Ann Arbor) ont présenté une progression sous traitement à 8 et 4 mois après le diagnostic et sont décédés respectivement à 11 et 5,7 mois après le diagnostic. Le dernier patient a été perdu de vue.

Pour les GZL, les médianes de survie globale et de survie sans progression étaient respectivement de $37,2 \pm 14,4$ mois (extrêmes 9,6 et 44,6) et $37,2 \pm 16,8$ mois (extrêmes 9,6 et 44,6). Aux dernières nouvelles, 5/5 patients étaient en RC aux dernières nouvelles : l'un d'eux a présenté une progression sous traitement (sa survie globale était de 20,1 mois et sa survie sans progression était de 9,4 mois).

Pour les cHL, les médianes de survie globale et de survie sans progression étaient respectivement de $59 \pm 19,3$ mois (extrêmes 17,4 et 78,6) et $59 \pm 24,2$ mois (extrêmes 11,5 et 78,6). Aux dernières nouvelles, 9/9 patients étaient en RC aux dernières nouvelles : l'un d'eux a présenté une progression sous traitement (sa survie globale était de 55,5 mois et sa survie sans progression était de 11,5 mois).

Sur le plan histopathologique et immunophénotypique (cf. tableau 2 et figures 2 à 8)

- PMBL

L'architecture était diffuse. Les cellules tumorales étaient de taille moyenne à grande, d'aspect monomorphe. On n'identifiait pas de cellules Sternbergoïdes. Les noyaux étaient tantôt ovoïdes, tantôt aux contours irréguliers. Ils présentaient toujours un petit nucléole, ou plusieurs pour 1 des cas. L'activité mitotique était modérée dans 6 cas. Le cytoplasme était pâle et peu abondant dans 8 cas. Il était pâle et abondant pour les 5 autres cas. La fibrose était pénicillée ou serpentineuse dans la plupart des cas. Dans 1 cas, celle-ci formait de fines bandes de collagène. Le microenvironnement lymphocytaire était peu abondant dans 9 cas, modéré dans 3 cas et abondant pour le dernier. Le microenvironnement macrophagique était peu abondant dans la plupart des cas, ou modéré pour 1 cas et absent pour le dernier. On observait des remaniements nécrotiques dans 4 cas. Dans 1 cas, un résidu ganglionnaire a été identifié. En revanche, aucun résidu thymique n'a été observé. Le pourcentage de cellules tumorales était élevé, compris entre 70 et 95%, pour une médiane de $80\pm 0,07\%$ (la plus élevée des 3 pathologies).

A l'analyse immunohistochimique, l'expression des marqueurs de différenciation lymphocytaire B étaient conservés : CD20, CD79a, BOB1 et PAX5 avec une forte intensité de marquage pour PAX5 dans 11 cas et une médiane de cellules marquées de $70\pm 0,3\%$ pour BOB1 (extrêmes 0 et 100). L'antigène lymphocytaire (CD45 ou ALC) et BCL6 étaient présents dans plus de la moitié des cas avec une médiane de cellules marquées de $60\pm 0,38\%$ (extrêmes 0 et 100) pour Bcl-6. Les marquages avec les anticorps anti-MUM1, anti-BCL2, anti-c-MYC, anti-CD30, anti-CD23 et anti-CD38 étaient présents et hétérogènes au moins dans la moitié des cas. PDL1 était détecté dans 6 cas : marquage diffus et intense dans 1 cas, diffus d'intensité faible à modérée dans 3 cas et faible et focal dans les 2 derniers cas. PDL2 était détecté dans 4 cas : marquage diffus et intense dans 2 cas et focal et faible dans les 2 derniers cas. PDL1 et PDL2 étaient co-exprimés dans des 2 cas. L'index de prolifération médian évalué avec l'anticorps anti-Ki67 était de $90\pm 0,11\%$ (extrêmes 70 et 100). Il n'y avait pas de marquage ou seulement marquage de rares cas, avec les anticorps anti-CD10, anti-CD15, anti-EMA, et les marqueurs lymphocytaires T, CD3 et CD5. L'EBV n'était jamais détecté. Concernant le microenvironnement, le rapport macrophages/cellules tumorales médian était de 0,2 (extrêmes 0,01 et 0,5).

- GZL

Trois cas avaient une morphologie de type PMBL, 1 cas une morphologie de type cHL et le dernier était composite avec les 2 types morphologiques.

Les 3 cas présentant une morphologie de type PMBL étaient d'architecture diffuse. Les cellules tumorales étaient de taille moyenne à grande, l'un d'eux avait un aspect monomorphe. Dans tous les cas, des cellules Sternbergoïdes ont été identifiées (dans 1 cas, elles étaient rares). Les noyaux étaient uniques ou bilobés, ponctués d'un ou plusieurs nucléoles. L'activité mitotique était faible. Le cytoplasme était pâle et abondant. Dans 2 des cas, l'infiltrat inflammatoire était polymorphe avec présence de polynucléaires éosinophiles, histiocytes et lymphocytes. La fibrose était fine, serpentineuse. Le microenvironnement lymphocytaire était modéré dans 2 des cas, ou abondant dans le dernier des cas. Le microenvironnement macrophagique était variable. Il n'a pas été mis en évidence de nécrose. Dans 1 cas, un reliquat ganglionnaire a été observé. Aucun résidu thymique n'a été retrouvé.

Le seul cas présentant une morphologie de type cHL avait une architecture scléro-nodulaire. Les cellules tumorales étaient de grande taille de type Sternbergoïde. Les noyaux étaient uniques ou bilobés avec un ou plusieurs nucléoles. L'activité mitotique était modérée. Le cytoplasme était peu abondant avec un fin liseré pâle périnucléaire. L'infiltrat inflammatoire n'était pas polymorphe. La fibrose était annulaire. Le microenvironnement lymphocytaire était modéré, le microenvironnement macrophagique était faible. Il n'a pas été mis en évidence de nécrose. Aucun résidu ganglionnaire ou thymique n'a été retrouvé.

Le seul cas composite avait architecture diffuse ou scléro-nodulaire. Les cellules tumorales étaient de petite taille, d'aspect monomorphe. Quelques cellules Sternbergoïdes ont été observées. Les noyaux étaient tantôt clairs, tantôt hyperchromatiques, irréguliers. Ils étaient nucléolés. L'activité mitotique était faible. Le cytoplasme était abondant et pâle. Le stroma inflammatoire était hétérogène. La fibrose était annulaire ou serpentineuse. Le microenvironnement lymphocytaire était modéré, le microenvironnement macrophagique était faible. Il n'a pas été mis en évidence de nécrose. Aucun résidu ganglionnaire ou thymique n'a été retrouvé.

Pour les 5 cas de GZL, le pourcentage de cellules tumorales était compris entre 40 et 70%, pour une médiane de $50 \pm 0,13\%$.

A l'analyse immunohistochimique, l'expression des marqueurs de différenciation lymphocytaire B étaient conservés dans tous les cas : CD20, CD79a avec une médiane de cellules marquées de $90 \pm 0,22\%$ (extrêmes 50 et 100) et PAX5 avec une médiane de cellules marquées de $80 \pm 0,18\%$

(extrêmes 60 et 100) et une intensité de marquage variable pour ce dernier. L'anticorps anti-BOB1 présentait également un marquage dans tous les cas avec une médiane de $50\pm 0,3\%$ (extrêmes 5 et 80). CD45 était présent dans tous les cas. Le marquage avec l'anticorps anti-CD30 était également présent dans tous les cas avec une médiane de $80\pm 0,33\%$ (extrêmes 20 et 100). Les marqueurs B du centre germinatif étaient marqués dans l'ensemble des cas avec l'anticorps anti-MUM1 avec une médiane de $50\pm 0,15\%$ (extrêmes 30 et 70) et dans 4/5 cas pour l'anticorps anti-BCL6 avec une médiane de $40\pm 0,30\%$ (extrêmes 0 et 70). CD38 était trouvé dans 4/5 cas avec une médiane de $80\pm 0,4\%$ (extrêmes 0 et 100) et avec une intensité de marquage forte. Pour au moins la moitié des cas, le marquage était hétérogène avec les anticorps anti-CD15 et anti-CD23. BCL2 et c-MYC, était retrouvé dans 2 des cas de manière hétérogène. PDL1 était détecté dans tous les cas : marquage diffus et intense dans 3 cas, faible dans 1 cas de type cHL et de type PMBL. PDL2 était détecté dans 2 des cas : marquage intense dans le cas composite, et faible et focal dans 1 des cas de type PMBL. L'index de prolifération médian évalué avec l'anticorps anti-Ki67 était de $80\pm 0,13\%$ (extrêmes 55 et 80). Il n'y avait pas de marquage avec les anticorps anti-CD10, anti-EMA et les marqueurs lymphocytaires T, CD3 et CD5. L'EBV n'était jamais détecté. Concernant le microenvironnement, le rapport macrophages/cellules tumorales médian était de 0,4 (extrêmes 0,2 et 1,5).

Il n'y avait pas de corrélation entre la morphologie des GZL et l'immunophénotype de chaque sous-type de GZL.

- cHL

Le sous-type était scléro-nodulaire dans tous les cas. Les cellules tumorales étaient de grande taille avec présence de cellules de Reed Sternberg et de cellules de Hodgkin. Les noyaux larges étaient uniques ou bilobés. Ils présentaient un ou deux volumineux nucléoles. L'activité mitotique était faible. Le cytoplasme était pâle et abondant. Ces cellules baignaient au sein d'un infiltrat inflammatoire polymorphe composé de macrophages, polynucléaires éosinophiles et petits lymphocytes. La fibrose était annulaire avec de larges bandes de collagène circulaires. Le microenvironnement lymphocytaire et macrophagique était abondant dans la quasi-totalité des cas. Il n'a pas été mis en évidence de nécrose. Dans 1 cas, un résidu ganglionnaire a été identifié ; dans 1 autre, un résidu thymique a été retrouvé. Le pourcentage de cellules tumorales était faible, compris entre 5 et 40%, pour une médiane de $5\pm 0,12\%$ (la plus faible des 3 pathologies).

A l'analyse immunohistochimique, l'expression des marqueurs de différenciation lymphocytaire B étaient absents (CD20 et CD79a) dans tous les cas ; sauf dans 1 cas pour chacun des anticorps (marquage de 10% des cellules). Le PAX5 était conservé dans tous les cas avec une médiane de cellules marquées de $20\pm 0,36\%$ (extrêmes 10 et 100) ; marquage faible dans la plupart des cas et fort dans 1 cas. Les anticorps anti-CD30 et anti-MUM1 marquaient 100 % des cellules tumorales dans tous les cas. CD15 était présent dans 9 cas sur 10 avec une médiane de $20\pm 0,45\%$ (extrêmes 0 et 100). c-MYC était présent dans la moitié des cas. CD38 était présent de manière diffuse dans moins de la moitié des cas. BCL2 et BCL6 étaient présents dans de rares cas. PDL1 était détecté dans presque tous les cas et d'intensité forte dans la moitié des cas. PDL2 n'a pas été détecté. L'index de prolifération médian évalué avec l'anticorps anti-Ki67 était de $90\pm 0,23\%$ (extrêmes 40 et 100). Il n'y avait pas de marquage avec les anticorps anti-CD45, anti-BOB1, anti-CD10, anti-CD23, anti-EMA, et les marqueurs lymphocytaires T, CD3 et CD5. L'EBV n'a jamais été détecté. Concernant le microenvironnement, le rapport macrophages/cellules tumorales médian était de 2 (extrêmes 0,15 et 5). Au sein du microenvironnement tumoral, les lymphocytes T étaient majoritaires par rapport aux lymphocytes B.

Sur le plan moléculaire et technique

Le pourcentage de cellules tumorales a été défini au moment de la sélection de la zone tumorale d'intérêt. La médiane de cellules tumorales était de $85\pm 8,5\%$ (extrêmes 70 et 95) pour les PMBL, de $50\pm 13,4\%$ (extrêmes 40 et 70) pour les GZL et de $10\pm 24,9\%$ (extrêmes 5 et 80) pour les cHL.

La médiane de concentration de l'ADN extrait était pour l'ensemble de la cohorte de $35,2\pm 49,6$ ng/ μ l (extrêmes 5 et 214), de $46,3\pm 44,6$ ng/ μ l (extrêmes 1,8 et 149) pour les PMBL, de $41,1\pm 86,3$ ng/ μ l (extrêmes 3,1 et 59,8) pour les GZL et de $26,3\pm 20,1$ ng/ μ l (extrêmes 5,1 et 68,7) pour les cHL.

La médiane du score de qualité DNA Integrity Number (DIN) était pour l'ensemble de la cohorte de $2\pm 0,9$ (extrêmes 1 et 5,2), de $2,1\pm 3,2$ (extrêmes 1 et 4,3) pour les PMBL, de $1,7\pm 0,2$ (extrêmes 1,6 et 2) pour les GZL et de $2,1\pm 1,2$ (extrêmes 1,7 et 5,2) pour les cHL.

Sur le plan moléculaire et analytique

Dans notre étude, nous n'avons analysé que les gènes suivants : *ARID1A*, *ATM*, *B2M*, *CCND3*, *CD58*, *CIITA*, *CREBBP*, *CXCR4*, *EP300*, *FOXO1*, *GNA13*, *IRF4*, *KMT2A*, *KMT2D*, *MAL*, *MEF2B*, *MYD88*, *NFKBIE*, *NOTCH2*, *PAX5*, *PIMI*, *PLCG2*, *PRDMI*, *REL*, *SOCS1*, *STAT6*, *TNFAIP3*, *TNFRSF14*, *TP53*, *XPO1*.

Tous les patients présentaient au moins 1 mutation. Au total, 213 mutations avec 139 variants répartis sur 27 gènes ont été mises en évidence. Pour tous les gènes il a été identifié au moins un variant. Aucune mutation du gène *MYD88* n'a été identifié.

- Profils mutationnels par pathologie

Ils sont résumés dans les **figures 9 à 13**.

- Nombre de mutations par pathologie

Pour l'ensemble de la cohorte, la médiane du nombre de mutations par patient était de 3 ± 10 mutations (extrêmes 1 et 48).

Pour les PMBL, 168 mutations ont été identifiées, la médiane du nombre de mutations par patient était de $11 \pm 12,3$ mutations (extrêmes 1 et 48), valeur la plus élevée des 3 pathologies.

Pour les GZL, 27 mutations ont été identifiées, la médiane du nombre de mutations par patient était de $3 \pm 5,7$ mutations (extrêmes 1 et 15).

Pour les cHL, 18 mutations ont été identifiées, la médiane du nombre de mutations par patient était de $2 \pm 1,1$ mutations (extrêmes 1 et 4), valeur la plus basse des 3 pathologies.

- Mutations par pathologie

Certaines mutations étaient associées de manière statistiquement significative au groupe des PMBL.

Seize mutations de *B2M* étaient détectées (PMBL *Versus* GZL et cHL, $p=0,0003$) chez 12 patients (7 variants) dont 14 mutations chez 10 PMBL (76,9%). Les 2 autres mutations de *B2M* étaient présentes dans 2 cas de GZL (40%). Aucune mutation de *B2M* n'a été détectée dans le groupe des cHL. Parmi les 14 mutations identifiées dans les PMBL, 5 sont des délétions/insertions, 2 des mutations non-sens et 7 des mutations sur le codon d'initiation (*no-start*).

Dix mutations de *CD58* étaient présentes (PMBL *Vs* GZL et cHL, $p=0,0326$) chez 6 patients (8 variants) dont 8 mutations chez 5 PMBL (38,5%). Les 2 autres mutations de *CD58* étaient présentes dans 1 cas de GZL (20%). Aucune mutation de *CD58* n'a été détectée dans le groupe des cHL. Parmi les 8 mutations identifiées dans les PMBL, on dénombre 2 délétions/insertions, 5 mutations faux-sens et 1 mutation sur le site d'épissage (+2).

Vingt-une mutations de *CIITA* étaient présentes (PMBL *Vs* GZL et cHL, $p=0,0120$) chez 15 patients (11 variants) dont 16 mutations chez 10 PMBL (76,9%). Les autres mutations de *CIITA* étaient présentes dans 3 GZL (60%) et 2 cHL (22,2%). Parmi les 16 mutations identifiées dans les PMBL, on dénombre 1 délétion/insertion, 12 mutations faux-sens, 1 une mutation sur le codon d'initiation (*no-start*) et 2 mutations sur le site d'épissage (+1).

Les 9 mutations de *GNAI3* (6 variants) n'étaient présentes (PMBL *Vs* GZL et cHL, $p=0,0178$) que chez 5 des patients avec PMBL (38,5%). Aucune mutation de *GNAI3* n'a été détectée dans les groupes des GZL et des cHL. Parmi les 9 mutations identifiées, on dénombre 1 délétion/insertion, 2 mutations faux-sens, 3 mutations non-sens, 1 mutation sur le site d'épissage (+2) et 2 mutations sur le site d'épissage (+1).

Soixante mutations de *SOCS1* étaient présentes (PMBL Vs GZL et cHL, $p=0,0022$) chez 9 patients (41variants) dont 54 mutations chez 8 PMBL (61,5%). Les 6 autres mutations de *SOCS1* étaient présentes dans 1 cas de GZL (20%). Aucune mutation de *SOCS1* n'a été détectée dans le groupe des cHL. Parmi les 54 mutations identifiées dans les PMBL, on dénombre 9 délétions/insertions, 1 mutation avec décalage de 18 nucléotides dans le cadre de lecture (*inframe_18*), 2 mutations *inframe_24*, 1 mutation *inframe_54*, 38 mutations faux-sens, 2 mutations non-sens et 1 mutation sur le codon d'initiation (*no-start*).

Quatorze mutations de *TNFAIP3* étaient présentes (PMBL Vs GZL et cHL, $p=0,0144$) chez 7 patients (11variants) dont 13 mutations chez 6 PMBL (46,2%). La dernière mutation de *TNFAIP3* était présente dans 1 cas de GZL (20%). Aucune mutation de *TNFAIP3* n'a été détectée dans le groupe des cHL. Parmi les 13 mutations identifiées dans les PMBL, on dénombre 6 délétions/insertions, 4 mutations faux-sens et 3 mutations non-sens.

Six mutations (1 seul variant, *p.Glu571Lys*) de *XPO1* étaient présentes (PMBL Vs GZL et cHL, $p=0,0382$) chez 4 patients PMBL (30,8%). Aucune mutation de *XPO1* n'a été détectée dans les groupes des GZL et des cHL. Il s'agissait d'une mutation faux-sens.

Les mutations des autres gènes n'étaient pas associées de manière statistiquement significative aux autres pathologies (GZL et cHL).

- Variants par pathologie

Des variants étaient associées de manière statistiquement significative (GZL Vs PMBL et cHL, $p=0,0359$) au groupe des GZL : *ARID1A p.Ala1589Gly*, *B2M p.Leu12Pro*, *CD58 p.Phe116Val*, *CD58 p.Phe74Cys*, *EP300 p.Gly168Glu*, *KMT2A p.Glu2871Lys*, *MEF2B p.Arg90Trp*, *NFKBIE p.Arg166His*, *NOTCH2 p.Arg1581Gln*, *SOCS1 p.Ala16_Ala17delinsSerThr*, *SOCS1 p.Ala3_His4delinsThrAsn*, *SOCS1 p.Gln6His*, *SOCS1 p.Thr15Ala*, *STAT6 p.Glu444Lys*, *TNFAIP3 p.Leu147Glnfs_7*.

- Mutations et progression de la maladie (cf. figures 14 à 17)

Certaines mutations étaient corrélées à la progression sous traitement de manière statistiquement significative :

La seule mutation d'*ATM* (variant *p.Thr2853Lys*) identifiée dans la cohorte était présente chez 1 patient PMBL qui a progressé sous traitement (progression sous traitement *Vs* absence de progression, $p < 0,0001$). Ce variant d'*ATM* est une mutation faux-sens.

Une mutation de *CREBBP* était présente (progression *Vs* absence de progression, $p < 0,0001$) chez 1 patient PMBL (variant *p.Lys1550del*) qui a progressé sous traitement. C'est la seule mutation de *CREBBP* identifiée dans la cohorte. Ce variant de *CREBBP* est une mutation *inframe_3*.

Sept mutations de *PLCG2* étaient identifiées (progression *Vs* absence de progression, $p = 0,0165$) chez 6 patients (sur 2 variants : *p.Asn571Ser* et *p.Pro522Arg*) dont 3 qui ont progressé sous traitement (50% des patients mutés pour ce gène) : 2 PMBL et 1 GZL. C'était le variant *PLCG2 p.Pro522Arg* qui était identifié chez tous les patients qui ont rechuté. Ce variant de *PLCG2* est une mutation faux-sens.

Trois mutations de *TP53* étaient présentes (progression *Vs* absence de progression, $p < 0,0001$) chez 2 patients PMBL (sur 3 variants : *p.Arg196**, *p.Arg273Cys* et *p.Ile251Thr*) qui ont progressé sous traitement (100% des patients mutés pour ce gène). Le variant *p.Arg196** est une mutation non-sens et a été identifié chez 1 des patients. Les 2 autres variants qui sont des mutations faux-sens ont été identifiés chez le dernier patient : *p.Arg273Cys* et *p.Ile251Thr*.

Après exclusion du groupe des cHL, une mutation de *TNFRSF14* était présente (progression *Vs* absence de progression, $p = 0,0436$) chez 1 patient PMBL qui a progressé sous traitement. C'est la seule mutation de *TNFRSF14* (variant *p.Trp201**, non-sens) identifiée parmi les groupes des PMBL et GZL.

Corrélations anatomo-cliniques et mutationnelles

- Corrélations entre le nombre de mutations et le type de pathologie

On a observé une corrélation entre le nombre de mutations par patient et le type de pathologie. Les PMBL étaient « plus mutés » [$11 \pm 12,3$ mutations (extrêmes 1 et 48)], que les cHL [$2 \pm 1,1$ mutations (extrêmes 1 et 4)] ($p=0,0077$). Les GZL étaient également « plus mutés » [$3 \pm 5,7$ mutations (extrêmes 1 et 15)] que les cHL ($p<0,001$). Le nombre de mutations des PMBL et des GZL n'était pas statistiquement différent.

- Corrélations entre le nombre de mutations par patient et le stade d'Ann Arbor

Sur l'ensemble de la cohorte, la médiane du nombre de mutations des 14 patients avec une maladie localisée (stades I et II d'Ann Arbor) [$2,5 \pm 5\%$ (extrêmes 1 et 15)] était différente ($p=0,001$) de celle des 13 patients avec une maladie avancée (stades III et IV d'Ann Arbor) [$4 \pm 13,3\%$ (extrêmes 1 et 48)].

- Corrélation entre l'expression de PDL1 et le stade d'Ann Arbor

Dans le groupe des PMBL, la médiane des cellules marquées par l'anticorps anti-PDL1 des 6 patients avec une maladie localisée (stades I et II d'Ann Arbor) [$0 \pm 3,8\%$ (extrêmes 0 et 10)] était différente ($p=0,0239$) de celle des 7 patients avec une maladie avancée (stades III et IV d'Ann Arbor) [$75 \pm 44\%$ (extrêmes 0 et 100)].

- Corrélations entre l'expression de PDL1 et le nombre de mutations par patient

Sur l'ensemble de la cohorte, la médiane du nombre de mutations des 13 patients avec une expression de PDL1 de plus de 50% des cellules tumorales [$3 \pm 13,4\%$ (extrêmes 1 et 48)] était différente ($p=0,001$) de celle des 14 patients avec une expression de PDL1 de moins de 50% des cellules tumorales [$3,5 \pm 4,8\%$ (extrêmes 1 et 14)].

- Corrélation entre l'expression de PDL1 et les mutations de *CD58*, *SOCS1* et *XPO1*

Dans le groupe des PMBL, les mutations des gènes *CD58* ($p=0,0130$), *SOCS1* ($p=0,0359$) et *XPO1* ($p=0,0091$) étaient corrélées à un marquage avec l'anticorps anti-PDL1.

En revanche, il n'y avait pas de corrélation entre les critères métaboliques, les autres critères anatomo-cliniques et le profil mutationnel.

DISCUSSION

L'objectif principal de notre travail était de s'appuyer sur les outils de la biologie moléculaire dans le but d'établir un profil mutationnel permettant de caractériser les PMBL, les cHL et surtout d'identifier les GZL parfois mal individualisés malgré des critères morphologiques et immunophénotypiques ayant fait l'objet d'une définition consensuelle (36,38). Cet enjeu diagnostique est important car il a des implications thérapeutiques et pronostiques.

Notre travail a porté sur une cohorte de 27 patients (13 PMBL, 9 cHL et 5 GZL), dont nous avons étudié les caractéristiques mutationnelles par séquençage ciblé à l'aide d'un panel de 52 gènes, qui a l'avantage d'être plus rapide et moins coûteux que les analyses du génome entier (Whole Genome Sequencing) ou de sa partie codante (Whole Exome Sequencing) (49,50).

Les gènes ont été sélectionnés à partir d'études récentes concernant les PMBL, les DLBCL (49,51,52), et/ou les cHL (12,53).

Profil mutationnel des PMBL et des GZL de type PMBL

Grâce à cette étude, nous observons un nombre plus élevé de mutations pour le groupe des PMBL avec un total de 168 mutations identifiées chez 13 patients. Le taux de mutations par patient est le plus élevé, [(médiane de $11 \pm 12,3$ mutations (extrêmes 1 et 48)] avec un total de 168 mutations identifiées chez 13 patients.

Les mutations des gènes *B2M*, *CD58*, *CIITA*, *GNAI3*, *SOCS1*, *TNFAIP3*, et *XPO1* sont associées au PMBL ($p < 0,05$). Plus particulièrement, les mutations de *GNAI3* et *XPO1* sont exclusivement associées à ce groupe.

Les gènes *B2M*, *CD58*, *SOCS1* et *TNFAIP3* sont également mutés dans les GZL de type PMBL.

Les mutations des gènes *ATM*, *CREBBP*, *CXCR4*, *FOXO1*, *IRF4*, *PRDMI* et *TP53* observées dans le groupe PMBL ne sont pas statistiquement significatives ; elles n'intéressent qu'un nombre faible de patients.

ARID1A, *NFKBIE* et *STAT6* étaient mutés indifféremment dans les PMBL et dans les GZL de type PMBL et de type cHL. Ces résultats sont comparables à ceux de l'étude de Mareschal *et al.* qui a étudié les profils mutationnels des PMBL et DLBCL réfractaires par WES. Dans cette étude, les PMBL présentent un nombre plus important de mutations que les DLBCL GCB et ABC (49).

Les altérations génétiques retrouvées par Mareschal *et al.*, intéressaient les mêmes voies de signalisation que dans notre étude : la voie JAK-STAT (*SOCS1*, *STAT6*, *IL4R*, *PTPNI*), la voie de signalisation NF-κB (*TNFAIP3*, *NFKBIA*, *NFKBIE*, *REL*), les gènes impliqués dans la réponse immunitaire (*B2M*, *CIITA*, *CD58*), et le transport nucléo-cytoplasmique (*XPO1*) (8,26,54). D'autres études ont mis en évidence des altérations de régulateurs épigénétiques comme *EP300* (50).

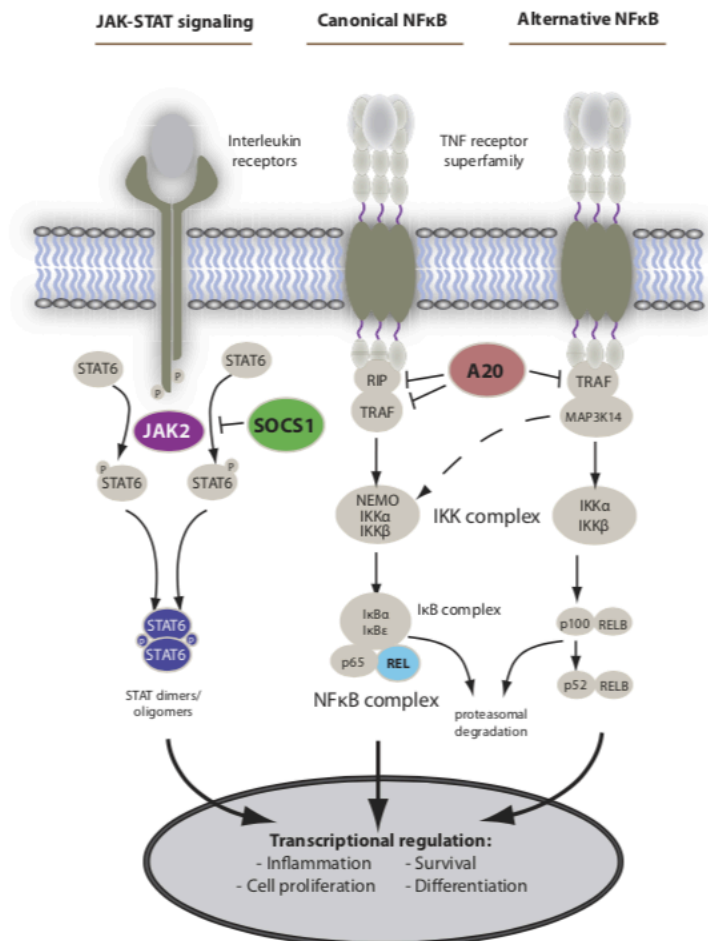


Figure C. Principales voies de signalisation intracellulaires dérégulées dans les PMBL. Les voies de signalisation JAK-STAT et NF-κB sont dérégulées dans les PMBL. Les gènes impliqués sont en couleur. (D'après Steidl, Gascoyne, *The molecular pathogenesis of PMBL*, Blood. 2011).

Profil mutationnel des cHL et des GZL de type cHL

Malgré le risque de faux négatifs dans les cHL en raison de la paucité de cellules tumorales et de la « dilution » de l'ADN tumoral, nous avons pu identifier 18 mutations pour l'ensemble des patients cHL, intéressant 12 gènes (*ARID1A*, *CCND3*, *CIITA*, *EP300*, *KMT2A*, *MAL*, *NFKBIE*, *NOTCH2*, *PAX5*, *PIMI*, *PLCG2*, *TNFRSF14*) (8,5% des mutations de la cohorte).

Ces mutations ont été retrouvées dans les 2 autres pathologies, hormis celle du gène *MAL*, qui n'était présente que dans les cHL. Des mutations du gène *MAL* ont déjà été décrites dans les cHL et les PMBL (8,40,55).

Dans les différentes études, le profil mutationnel des cHL est proche de celui des PMBL (8), caractérisé par une activation des voies de signalisation JAK-STAT et NF- κ B, aboutissant à une inhibition de l'immunité anti-tumorale, un échappement à l'apoptose et à une prolifération cellulaire. Liang *et al* ont identifié par NGS ciblé dans les cHL, des mutations de *B2M*, *XPO1*, *SOCS1* et *TNFAIP3*, mutations que nous avons mises en évidence dans nos cas de cHL et de PMBL (56). Les études utilisant les techniques de microdissection ou de flow sorting permettant une analyse exclusive des cellules de Reed Sternberg et de Hodgkin, révèlent également des mutations sur ces mêmes voies : JAK-STAT (*STAT6*), Rho/ROCK (*GNAI3*), transporteur nucléocytoplasmique (*XPO1*) (57) et NF- κ B (*TNFAIP3*) (58,59).

Profil mutationnel des GZL

Dans notre étude, le profil mutationnel des GZL ne permet pas de différencier les GZL des PMBL et des cHL : *ARID1A*, *NFKBIE* et *STAT6* étaient mutés dans les GZL de type PMBL et dans les PMBL, bien que les variants étaient différents dans ces 2 sous-groupes. Il en est de même pour *EP300* qui est muté dans un cas de GZL de type cHL et un cas de cHL.

Les variants associés au groupe des GZL (GZL vs PMBL/cHL, $p=0,0359$) sont peu représentatifs d'un profil mutationnel, malgré la significativité des résultats, chaque variant n'ayant été identifié qu'une seule fois.

Les travaux menés sur le profil moléculaire des GZL révèlent que leurs caractéristiques moléculaires sont intermédiaires entre cHL et PMBL, incluant des gains et des amplifications de *JAK2*, *REL*, *PDL1* et *CIITA* (35). Cependant, *Eberle et al.* ont mis en évidence un profil de méthylation des GZL les distinguant des PMBL et des cHL (60).

Mutations de mauvais pronostic

Nous avons par ailleurs identifié plusieurs mutations associées à une progression (*ATM* *p.Thr2853Lys*, *CREBBP* *p.Lys1550del*, *PLCG2*: *p.Asn571Ser* et *p.Pro522Arg*, *TP53* : *p.Arg196**, *p.Arg273Cys* et *p.Ile251Thr*, *TNFRSF14* *p.Trp201*) de la maladie ($p < 0,05$). Ces dernières n'ont été retrouvées que dans le PMBL. De plus, les 2 cas de décès dans la cohorte des PMBL présentaient des mutations des gènes *ATM*, *TP53*, *CREBBP*, *PLCG2* et/ou *TNFRSF14* (ainsi que des mutations des gènes impliqués dans les voies de signalisation JAK-STAT et/ou NF- κ B. L'accumulation de mutations altérant plusieurs voies de signalisation serait donc un facteur de mauvais pronostic.

Paysage mutationnel corrélé à la clinique

Nous avons également constaté une association statistique entre le nombre de mutations et le pronostic : les patients présentant une maladie disséminée (stades III/IV de la classification d'Ann Arbor), avaient un nombre plus important de mutations par rapport aux patients présentant une maladie localisée (stades I/II de la classification d'Ann Arbor) ($p = 0,001$).

Paysage mutationnel corrélé aux caractéristiques histo-pathologiques

Parallèlement à l'analyse du profil mutationnel des différents sous-groupes, nous avons constaté que l'expression de PDL1 par les cellules tumorales était corrélée à un nombre élevé de mutations, et ce tout particulièrement dans le sous-groupe des PMBL : l'expression de PDL1 était associée aux mutations de *SOSCI*, *CD58*, et *XPO1* ($p < 0,05$).

Possibilités d'améliorations de notre étude à envisager

- Échantillonnage

Le faible nombre de patients inclus dans notre travail, du fait de la rareté relative de ces pathologies, est le principal facteur limitant.

- Technique d'extraction des échantillons

Notre étude est réalisée à partir d'échantillons tissulaires fixés dans le formol et inclus en paraffine, dont nous avons extrait l'ADN. Cette exposition au formol entraîne des artéfacts de déamination de nucléotides (transformation des thymine en adénine). C'est pourquoi, il aurait été préférable de travailler sur des ADN issus d'échantillons congelés, mais ce type de tissu n'était pas disponible pour l'ensemble des cas de notre série et aurait donc pu constituer un biais.

Par ailleurs, nous avons dû exclure les gènes *REL* et *KMT2D* en raison d'un important bruit de fond. En effet, ces deux gènes présentent de nombreuses régions riches en GC, réputées plus difficiles à séquencer du fait de la répétition de nombreuses liaisons hydrogènes (3 liaisons hydrogènes entre les nucléotides G et C). Enfin, la chimie du séquenceur (2 fluorochromes pour 4 nucléotides) est un autre facteur qui induit un bruit de fond.

La technique de macrodissection a été utilisée afin de sélectionner une zone d'intérêt riche en cellules tumorales. La zone d'intérêt a été repérée sur la lame HES. Le pourcentage de cellules tumorales a été déterminé dans cette zone qui a été macro-disséquée sur le bloc de paraffine. La médiane de concentration de l'ADN extrait était plus faible pour les cHL ($26,3 \pm 20,1$ ng/ μ l *Vs* $46,3 \pm 44,6$ ng/ μ l pour les PMBL). La médiane du score de qualité DIN était comparable dans les 3 pathologies.

Le plus faible pourcentage de cellules tumorales dans les cHL ($10 \pm 24,9\%$) est expliqué par l'abondance des cellules du microenvironnement immunitaire même dans les zones qui sont pourtant les plus riches en cellules tumorales. L'ADN extrait était donc un mélange de celui des cellules tumorales et des cellules du microenvironnement.

La technique de microdissection est une alternative à la macro-dissection. La microdissection tissulaire laser (rayons infra-rouges, ultra-violets ou les 2) permet d'isoler des cellules ou des groupes cellulaires pour des analyses génomiques ou protéomiques. Celle qui utilise un laser IR, fonctionne avec un film thermosensible, posé au-dessus de la coupe FFPE, qui doit être préalablement chauffé pour être activé. A travers une capsule, les rayons IR de basse énergie sont dirigés sur les cellules d'intérêt et celles-ci sont transférées sur le film activé. La capsule est ensuite soulevée permettant l'adhésion des cellules puis ces dernières sont extraites du film pour être utilisées dans différentes analyses (RT-PCR en temps réel ou analyses du transcriptome). Cette technique pourrait permettre de sélectionner uniquement les cellules de HRS présentes dans les LH et d'analyser uniquement l'ADN tumoral qui nous intéresse (53,57,62–64).

Une autre stratégie aurait pu être utilisée : le *flow sorting* qui permet d'enrichir le matériel en cellules tumorales à partir de bloc FFPE. Après déparaffinage, dissociation et remise en suspension, les cellules peuvent être triées par cytométrie en flux (grâce à un marquage immunohistochimique). Toutefois, les cellules de HRS, sont fragiles et souvent détruites dans le cytomètre car les pressions différentielles nécessaires au bon alignement des cellules sont élevées.

Cette technique a néanmoins été utilisée récemment dans certaines études (58,59).

Hypothèses physiopathologiques

Voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, dans la survie cellulaire et dans la réponse immune

Les gènes analysés peuvent être regroupés selon les voies de signalisation suivante :

- Immunité (*B2M*, *CIITA* et *CD58*)

Le gène *B2M* (*Beta-2-Microglobuline*) code pour une des protéines du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe 1 qui permet la reconnaissance des antigènes par les cellules T cytotoxiques. Elles entraînent une modification, une diminution ou l'absence de l'expression des molécules de classe 1 du CMH ; permettant aux cellules tumorales d'échapper au système immunitaire. Des mutations de ce gène ont déjà été identifiées dans les PMBL et les cHL (49,59).

Le gène *CIITA* (*Class II TransActivator*) code pour le facteur de transcription de même nom qui régule le CMH de classe 2. La protéine CIITA contient un domaine d'activation transcriptionnelle et un domaine de liaison au GTP. Elle utilise la liaison GTP pour faciliter son transport dans le noyau. Une fois dans le noyau, elle agit comme un régulateur positif de la transcription des gènes du CMH de classe II. Physiologiquement, le peptide antigénique associé au CMH de classe 2 est présenté au récepteur T (TCR) pour initier la réponse immune adaptative. Dans le cas de la cellule tumorale B, la survenue de mutations de *CIITA* engendrent une diminution de l'activité anti-tumorale *via* des capacités de présentation de l'antigène diminuées et/ou anormales conduisant à la production de lymphocytes anergiques (26,65). Des réarrangements chromosomiques impliquant *CIITA* et des mutations de ce gènes ont été décrits dans les cHL et PMBL (66–68).

Le gène *CD58* (*Cluster de Différenciation 58*) code pour une molécule qui assure la reconnaissance des cellules tumorales en formant un couple avec CD2 qui est un ligand présent à la surface des lymphocytes T/NK. Ce lien entre CD2 et CD58 stabilise l'accrochage entre la cellule tumorale et le lymphocyte T nécessaire à l'activation du lymphocyte T (51). Les mutations de ce gène sont responsables d'une anergie des lymphocytes T dans la réponse anti-tumorale. Des délétions partielles de ce gène entraînant une diminution de l'expression membranaire de CD58 ont été rapportée dans les PMBL (52).

- Voie de signalisation JAK-STAT (*SOCS1*)

Le gène *SOCS1* (*Suppressor Of Cytokine Signaling 1*) code pour la protéine homonyme régulatrice de la voie JAK-STAT. Les mutations de *SOCS1* entraînant une perte de fonction sont associées à une activation non contrôlée de la voie JAK-STAT, entraînant un avantage prolifératif et de survie aux cellules tumorales. De telles mutations sont décrites dans les PMBL (69) et les cHL (70).

- Voie de signalisation NF-κB (*TNFAIP3*)

Le gène *TNFAIP3* (*tumor necrosis factor alpha induced protein 3*) code la protéine cytoplasmique A20 qui régule négativement la voie de signalisation NF-κB en contrôlant la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, la production de cytokines et jouant un rôle clé dans la réponse immune. La perte de fonction de cette protéine par délétion ou mutation du gène *TNFAIP3* a été largement démontrée dans les PMBL et les cHL (71,72).

- Export nucléocytoplasmique (*XPO1*)

Le gène *XPO1* (*exportine 1*) code pour une exportine, protéine qui joue un rôle majeur dans l'export nucléo-cytoplasmique et donc dans l'homéostasie cellulaire. Elle a pour cibles des régulateurs de la transcription ou des protéines jouant un rôle dans plusieurs voies de signalisation (NFKBIE et NFKBIA), et tout particulièrement p53, protéine suppressive de tumeurs (73). La localisation des protéines est essentielle pour leurs activités et le bon fonctionnement de la cellule. Or dans les tumeurs, on observe une localisation cellulaire cytoplasmique aberrante de certaines protéines qui régulent le cycle cellulaire ou l'apoptose. Les mutations activatrices de *XPO1* entraînent une augmentation de l'export nucléaire. Par exemple, elle favorise l'export de p53, évitant ainsi l'entrée en apoptose de la cellule. La protéine p53, dont le fonctionnement est normalement nucléaire, ne peut plus exercer son activité. Des mutations activatrices de *XPO1* ont déjà été identifiées dans une cohorte de PMBL (74). Des travaux ont mis en évidence que STAT6 est un « cargo » de l'exportine 1 et que les mutations de *XPO1* augmentaient la localisation nucléaire de STAT6 dans les lignées de cellules tumorales de PMBL génétiquement modifiées (augmentation de l'expression de STAT6), avec pour conséquence une activation de la voie de signalisation JAK-STAT (61). Cette même mutation *XPO1 p.E571K* a également été identifiée dans une cohorte de cHL (56).

- Rho-ROCK (*GNA13*)

Le gène *GNA13* (*Guanine Nucleotide-binding protein subunit Alpha-13*) code pour une protéine qui joue un rôle important dans la transmission du signal en liant et en dissociant GTP et GDP. Elle est exprimée dans les cellules B du centre germinatif non tumoral. Des mutations inactivatrices de *GNA13* ont été mises en évidence dans les DLBCL, entraînant une hyperactivation de RhoA ainsi qu'une augmentation d'AKT phosphorylée, conférant alors un avantage de survie aux lymphocytes B mutés. Des mutations inactivatrices de *GNA13* ont également été décrites dans les PMBL (52) et les cHL (57).

Mutations prédictives de mauvais pronostic

- Réparation des dommages de l'ADN (*ATM* et *TP53*)

Ces gènes sont impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire.

Le gène *TP53* (*Tumor Protein 53*) est un gène suppresseur de tumeur qui est souvent muté dans les cancers, codant pour la protéine p53, et qui a la capacité de se lier à l'ADN. Cette dernière, grâce à son domaine de transactivation, va pouvoir induire ou réprimer l'expression d'un large nombre de gènes conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, ou la sénescence.

A l'état physiologique, en cas de dommage à l'ADN ou de stress cellulaire, la protéine ATM, codée par le gène *ATM* (*Ataxia Telangiectasia Mutated*), va être activée par phosphorylation puis va elle-même phosphoryler p53 pour l'activer. La protéine p53 va alors induire l'arrêt du cycle cellulaire par l'expression de p21. Des altérations de *TP53* dans une cohorte de PMBL ont été identifiées dans les travaux de Scarpa *et al* (75).

Les mutations faux-sens et non-sens du gène *TP53* et la mutation faux-sens du gène *ATM* seraient responsables de l'inactivation de la mort cellulaire programmée, favorisant la survie des cellules tumorales.

ATM et *TP53* ont un rôle pronostic péjoratif dans diverses hémopathies malignes (76). Dans une étude menées sur une cohorte de DLBCL, les mutations d'*ATM* étaient associées à une évolution défavorable (77,78).

- Epissage (*CREBBP*)

Le gène *CREBBP* ou *CBP* (*CRB-Binding Protein*) code pour la protéine CREB, à domaine leucine zipper, permettant sa dimérisation et son interaction directe avec l'ADN. C'est une acétyltransférase, coactivateur transcriptionnel, modifiant la structure de la chromatine (par acétylation des histones) et activant la transcription des gènes cibles. La dérégulation de *CREBBP* par mutation somatique et l'expression aberrante de *CREBBP/EP300* prédispose au cancer. Dans les DLBCL, les mutations de *CREBBP* et de *EP300* sont associées à une évolution péjorative (77).

- Voie du BCR (*PLCG2*)

Le gène *PLCG2* (*PhosphoLipase C Gamma 2*) code pour la protéine homonyme, qui est une enzyme hydrolysant les liaisons ester des phospholipides. *PLCG2* est activée par des récepteurs à activité tyrosine kinase. Elle permet la phosphorylation de protéines cytoplasmiques et nucléaires, ayant un rôle régulateur dans la voie du BCR. En effet, la survie des lymphocytes B non tumoraux dépend d'une cascade complexe de voies de signalisation initiée par le BCR, en l'absence de quoi, les lymphocytes B meurent par apoptose.

Dans les hémopathies malignes lymphoïdes B, les interactions entre le microenvironnement tumoral et les cellules tumorales pourraient activer certaines de ces voies. Cette activation initierait une signalisation en cascade impliquant plusieurs kinases, comme BTK, et aboutissant à une survie et une prolifération incontrôlées des lymphocytes B tumoraux par l'activation de la voie de signalisation NF- κ B (79).

- Immunité (*TNFRSF14*)

Le gène *TNFRSF14* (*Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily, Member 14*) code pour une cytokine de la famille du TNF. Cette cytokine est exprimée à la surface des lymphocytes T activés et agit comme facteur de co-stimulation des cellules T. Elle induit le recrutement et la stimulation des cellules immunitaires effectrices au sein des tumeurs et augmente l'immunité anti-tumorale. Elle favorise la conversion de l'état anti-inflammatoire du microenvironnement tumoral vers un stade pro-inflammatoire qui favoriserait les mécanismes d'immunosuppression. Les mutations de *TNFRSF14* permettraient ainsi aux cellules tumorales d'échapper à la réponse immune en empêchant ce switch vers une réponse pro-inflammatoire.

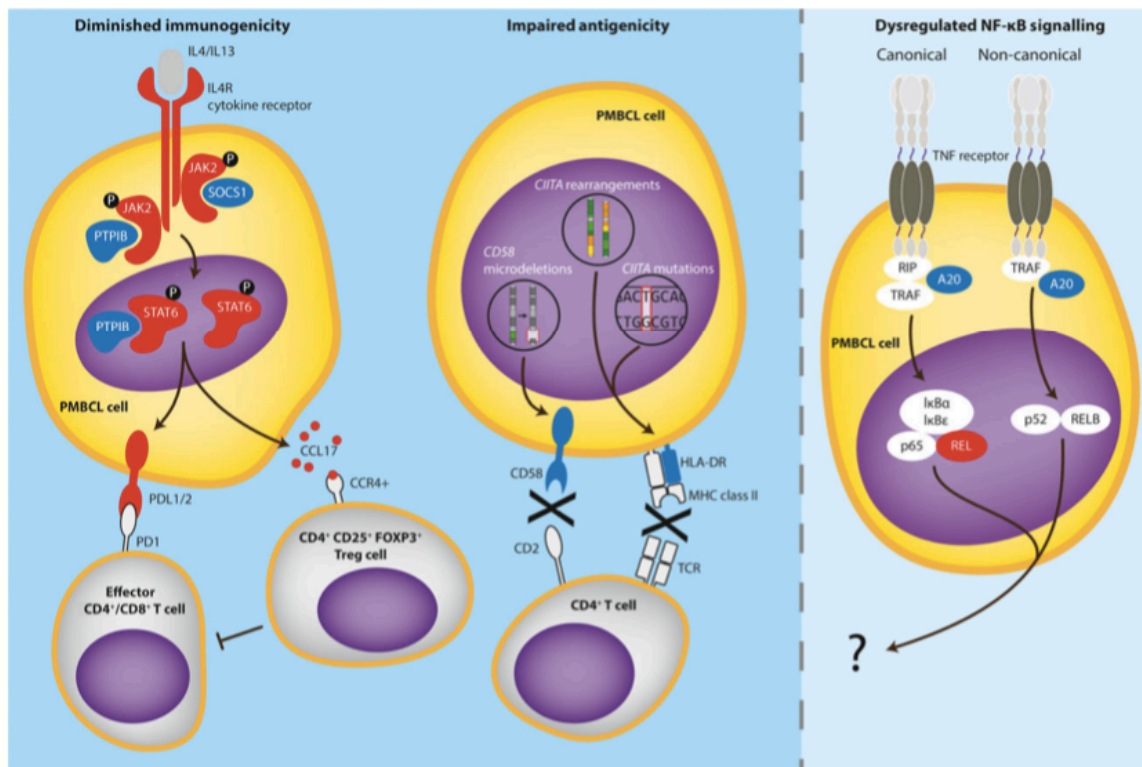


Figure E. Dérégulation de la réponse immunitaire anti-tumorale dans le microenvironnement tumoral des PMBL. Les altérations génétiques (rouges) activatrices et les mutations inactivatrices (bleues) composant la voie de signalisation JAK-STAT altèrent la réponse immune anti-tumorale via l'augmentation des Programmed cell Death Ligands (PDLs) et du C-C motif chemokine ligand 17 (CCL17). Des microdélétions de CD58 et des mutations ou des réarrangements structuraux de CIITA perturbent également l'immunité anti-tumorale via une anergie des lymphocytes T et la formation d'un CMH de classe II non fonctionnel, respectivement. L'impact des altérations génétiques survenant sur un des composants de NF-κB sur le microenvironnement tumoral des PMBL n'est pas encore connu. (D'après Lees, *Biology and therapy of PMBL: current status and future directions*, bhj, 2019).

CONCLUSION

La détermination du profil mutationnel des lymphomes matures agressifs du médiastin paraît particulièrement intéressante pour les PMBL avec l'identification de mutations survenant dans les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, dans la survie cellulaire et dans la réponse immune : voies de signalisation NF- κ B (*TNFAIP3*) et JAK-STAT (*SOCS1*), voie Rho/ROCK (*GNA13*), immunité (*B2M*, *CD58*, *CIITA*) et transport nucléo-cytoplasmique (*XPO1*). Ces mutations associées aux PMBL sont probablement corrélées à sa lymphomagenèse et à la surexpression de PDL1 via des mutations de *CD58*, *SOCS1* et *XPO1*. D'autres mutations survenant sur *ATM*, *CREBBP*, *PLCG2*, *TP53* et *TNFRSF14* sont probablement associées à un mauvais pronostic.

Les cHL étaient peu mutés et le profil mutationnel des GZL n'a pas permis de les différencier des PMBL et des cHL.

CONCLUSIONS SIGNÉES

THESE SOUTENUE PAR M^{LLE} BEKMEZIAN Nahina

CONCLUSIONS

Dans cette étude, le nombre de mutation le plus élevé concernaient les lymphomes B agressifs d'origine B de stades avancés (Ann Arbor III/IV) ($p=0,001$) et les PMBL/GZL ($p=0,007/p<0,001$).

Les mutations récurrentes associées aux PMBL ($p<0,05$) interviennent dans les voies de signalisation NK- κ B (*TNFAIP3*), JAK-STAT (*SOCS1*) et RhoA/ROCK (*GNA13*), dans l'immunité anti-tumorale (*B2M*, *CD58* et *CIITA*) et dans le transport nucléo-cytoplasmique (*XPO1*). Certaines mutations (*CD58*, *SOCS1* et *XPO1*) étaient associées à l'expression de PDL1 ($p<0,05$) et d'autres (*ATM*, *CREBBP*, *PLCG2*, *TP53* et *TNFRSF14*) à une évolution défavorable (rechute et/ou décès) des PMBL ($p<0,05$). L'expression de PDL1 était en outre associée aux PMBL de stades avancés (Ann Arbor III/IV) ($p=0,0239$).

Aucune mutation n'a pu être associée aux GZL et cHL ni aux autres caractéristiques histopathologiques et métaboliques.


Le Président du jury,

Pr. Laurent MARTIN



Vu et permis d'imprimer
Dijon, le 19 SEPTEMBRE 2019
Le Doyen

Pr. M. MAYNADIÉ



RÉFÉRENCES

1. Laurent C, Baron M, Amara N, Haioun C, Dandoit M, Maynadié M, et al. Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. *J Clin Oncol* [Internet]. 20 juin 2017 [cité 27 avr 2019];35(18):2008-17. Disponible sur: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.71.2083>
2. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* [Internet]. 19 mai 2016 [cité 17 juin 2019];127(20):2375-90. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2016-01-643569>
3. Ott G. Aggressive B-cell lymphomas in the update of the 4th edition of the World Health Organization classification of haematopoietic and lymphatic tissues: refinements of the classification, new entities and genetic findings. *Br J Haematol* [Internet]. sept 2017 [cité 2 sept 2019];178(6):871-87. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.14744>
4. Wright G, Tan B, Rosenwald A, Hurt EH, Wiestner A, Staudt LM. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 19 août 2003 [cité 16 sept 2019];100(17):9991-6. Disponible sur: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1732008100>
5. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *2000*;403:9.
6. Copie-Bergman C. Interleukin 4-induced gene 1 is activated in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 1 avr 2003 [cité 10 juin 2019];101(7):2756-61. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-07-2215>
7. Bergkvist KS, Nørgaard MA, Bøgsted M, Schmitz A, Nyegaard M, Gaihede M, et al. Characterization of memory B cells from thymus and its impact for DLBCL classification. *Exp Hematol* [Internet]. oct 2016 [cité 27 avr 2019];44(10):982-990.e11. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X16301874>
8. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, Yu X, Gaulard P, Gascoyne RD, et al. Molecular Diagnosis of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma Identifies a Clinically Favorable Subgroup of Diffuse Large B Cell Lymphoma Related to Hodgkin Lymphoma. *J Exp Med* [Internet]. 15 sept 2003 [cité 27 avr 2019];198(6):851-62. Disponible sur: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20031074>
9. Dunleavy K, Pittaluga S, Maeda LS, Advani R, Chen CC, Hessler J, et al. Dose-Adjusted EPOCH-Rituximab Therapy in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* [Internet]. 11 avr 2013 [cité 17 juin 2019];368(15):1408-16. Disponible sur: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1214561>
10. Johnson PWM, Davies AJ. Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. *2008*;10.
11. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* [Internet]. 12 mai 2011 [cité 3 sept 2019];117(19):5019-32. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-01-293050>
12. Savage KJ. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* [Internet]. 21 août 2003 [cité 27 avr 2019];102(12):3871-9. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-06-1841>

13. Barth TF, Leithäuser F, Joos S, Bentz M, Möller P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma: where do we stand? *Lancet Oncol* [Internet]. avr 2002 [cité 27 avr 2019];3(4):229-34. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204502007143>
14. Hoeller S, Zihler D, Zlobec I, Obermann EC, Pileri SA, Dirnhofer S, et al. BOB.1, CD79a and cyclin E are the most appropriate markers to discriminate classical Hodgkin's lymphoma from primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Histopathology* [Internet]. janv 2010 [cité 27 avr 2019];56(2):217-28. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2009.03462.x>
15. Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jöhrens-Leder K, Foss H-D, Jundt F, et al. Differential Eμ enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol* [Internet]. janv 2004 [cité 17 juin 2019];202(1):60-9. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1485>
16. Higgins JP, Warnke RA. CD30 Expression Is Common in Mediastinal Large B-Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1 août 1999 [cité 17 juin 2019];112(2):241-7. Disponible sur: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1093/ajcp/112.2.241>
17. Tsang P, Cesarman E, Chadburn A, Knowlest DM. Molecular Characterization of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma. :9.
18. Au WY. Hodgkin's lymphoma in Chinese migrants to British Columbia: a 25-year survey. *Ann Oncol* [Internet]. 1 avr 2004 [cité 17 juin 2019];15(4):626-30. Disponible sur: <https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/mdh132>
19. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabattini E, Zinzani PL, Piccaluga PP, et al. Hodgkin's lymphoma: the pathologist's viewpoint. *J Clin Pathol* [Internet]. 1 mars 2002 [cité 17 juin 2019];55(3):162-76. Disponible sur: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.55.3.162>
20. Tzankov A. Expression of B-Cell Markers in Classical Hodgkin Lymphoma: A Tissue Microarray Analysis of 330 Cases. *Mod Pathol* [Internet]. 1 nov 2003 [cité 17 juin 2019];16(11):1141-7. Disponible sur: <http://modpath.uscapjournals.org/cgi/doi/10.1097/01.MP.0000093627.51090.3F>
21. Foss H-D, Reusch R, Demel G, Lenz G, Anagnostopoulos I, Hummel M, et al. Frequent Expression of the B-Cell-Specific Activator Protein in Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin's Disease Provides Further Evidence for Its B-Cell Origin. :7.
22. Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson PG. Expression of B-cell Antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg Cells. 1991;139(4):7.
23. Skinnider BF. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* [Internet]. 15 janv 2002 [cité 17 juin 2019];99(2):618-26. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood.V99.2.618>
24. Guiter C. Constitutive STAT6 activation in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 15 juill 2004 [cité 2 sept 2019];104(2):543-9. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-10-3545>
25. Scheeren FA, Diehl SA, Smit LA, Beaumont T, Naspetti M, Bende RJ, et al. IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood* [Internet]. 1 mai 2008 [cité 2 sept 2019];111(9):4706-15. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2007-08-105643>

26. Steidl C, Gascoyne RD. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 8 sept 2011 [cité 27 avr 2019];118(10):2659-69. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2011-05-326538>
27. Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD. Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma: Increasing Evidence of the Importance of the Microenvironment. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 mai 2011 [cité 2 sept 2019];29(14):1812-26. Disponible sur: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.32.8401>
28. Savage KJ. Lymphoma Series: Variants of Large-Cell Lymphoma. :8.
29. Gain of chromosome arm 9p is characteristic of primary mediastinal b-cell lymphoma (MBL): Comprehensive molecular cytogenetic analysis and presentation of a novel MBL cell line. :9.
30. Joos S, Otafio-Joos MI, Ziegler S, Bruderlein S, Moller P, Lichter P. Primary Mediastinal (Thymic) B-Cell Lymphoma Is Characterized by Gains of Chromosomal Material Including 9p and Amplification of the REL Gene. :9.
31. Garcia JF, Mollejo M, Fraga M, Forteza J, Muniesa JA, Perez-Guillermo M, et al. Large B-cell lymphoma with Hodgkin's features. *Histopathology* [Internet]. juill 2005 [cité 27 avr 2019];47(1):101-10. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2559.2005.02175.x>
32. Rudiger T, Jaffe ES, Delsol G, deWolf-Peeters C, Gascoyne RD, Georgii A, et al. Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases (« grey zone » lymphoma). *Ann Oncol* [Internet]. 1 janv 1998 [cité 4 sept 2019];9(suppl 5):S31-8. Disponible sur: https://academic.oup.com/annonc/article-lookup/doi/10.1093/annonc/9.suppl_5.S31
33. Quintanilla-Martinez L, de Jong D, de Mascarel A, Hsi ED, Kluin P, Natkunam Y, et al. Gray zones around diffuse large B cell lymphoma. Conclusions based on the workshop of the XIV meeting of the European Association for Hematopathology and the Society of Hematopathology in Bordeaux, France. *J Hematop* [Internet]. nov 2009 [cité 20 juill 2019];2(4):211-36. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s12308-009-0053-9>
34. Sarkozy C, Molina T, Ghesquières H, Michallet A-S, Dupuis J, Damotte D, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: clinico-pathological characteristics and outcomes of 99 patients from the Lymphoma Study Association. *Haematologica* [Internet]. janv 2017 [cité 27 avr 2019];102(1):150-9. Disponible sur: <http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2016.152256>
35. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D, Ben-Neriah S, Burroni B, Cornillon J, et al. Gray-zone Lymphoma Between cHL and Large B-Cell Lymphoma: A Histopathologic Series From the LYSA. *Am J Surg Pathol* [Internet]. mars 2019 [cité 27 avr 2019];43(3):341-51. Disponible sur: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00000478-201903000-00006>
36. Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, Sorbara L, Alonso MA, Raffeld M, et al. Mediastinal Gray Zone Lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(11):11.
37. Pilichowska M, Pittaluga S, Ferry JA, Hemminger J, Chang H, Kanakry JA, et al. Clinicopathologic consensus study of gray zone lymphoma with features intermediate between DLBCL and classical HL. *Blood Adv* [Internet]. 12 déc 2017 [cité 9 avr 2019];1(26):2600-9. Disponible sur: <http://www.bloodadvances.org/lookup/doi/10.1182/bloodadvances.2017009472>
38. Gualco G, Natkunam Y, Bacchi CE. The spectrum of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: a description of 10 cases. *Mod Pathol* [Internet]. mai 2012 [cité 27 avr 2019];25(5):661-74. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/modpathol2011200>

39. Gonzalez CL, Medeiros LJ, Jaffe ES. Composite Lymphoma: *A Clinicopathologic Analysis of Nine Patients with Hodgkin's Disease and B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma*. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1 juill 1991 [cité 17 juin 2019];96(1):81-9. Disponible sur: <https://academic.oup.com/ajcp/article/96/1/81/1828684>
40. Calvo KR, Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Jaffe ES. Molecular Profiling Provides Evidence of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma as a Distinct Entity Related to Classic Hodgkin Lymphoma: Implications for Mediastinal Gray Zone Lymphomas as an Intermediate Form of B-Cell Lymphoma. *Adv Anat Pathol* [Internet]. sept 2004 [cité 27 avr 2019];11(5):227-38. Disponible sur: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00125480-200409000-00001>
41. O'Malley DP. Distinguishing Classical Hodgkin Lymphoma, Gray Zone Lymphoma, and Large B-cell Lymphoma: A Proposed Scoring System. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;00(00):6.
42. Minami J, Dobashi N, Asai O, Yano S, Osawa H, Takei Y, et al. Two Cases of Mediastinal Gray Zone Lymphoma. *J Clin Exp Hematop* [Internet]. 2010 [cité 20 juill 2019];50(2):143-9. Disponible sur: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jslrt/50.143?from=CrossRef>
43. Dunleavy K, Grant C, Eberle FC, Pittaluga S, Jaffe ES, Wilson WH. Gray Zone Lymphoma: Better Treated Like Hodgkin Lymphoma or Mediastinal Large B-Cell Lymphoma? *Curr Hematol Malig Rep* [Internet]. sept 2012 [cité 27 avr 2019];7(3):241-7. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s11899-012-0130-5>
44. Dunleavy K, Wilson WH. Primary mediastinal B-cell lymphoma and mediastinal gray zone lymphoma: do they require a unique therapeutic approach? *Blood* [Internet]. 1 janv 2015 [cité 9 avr 2019];125(1):33-9. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood-2014-05-575092>
45. Evens AM, Kanakry JA, Sehn LH, Kritharis A, Feldman T, Kroll A, et al. Gray zone lymphoma with features intermediate between classical Hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: Characteristics, outcomes, and prognostication among a large multicenter cohort. *Am J Hematol* [Internet]. 2015 [cité 13 mars 2019];90(9):778-83. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajh.24082>
46. Wilson WH, Pittaluga S, Nicolae A, Camphausen K, Shovlin M, Steinberg SM, et al. A prospective study of mediastinal gray-zone lymphoma. *Blood* [Internet]. 4 sept 2014 [cité 27 avr 2019];124(10):1563-9. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2014-03-564906>
47. Twa DDW, Chan FC, Ben-Neriah S, Woolcock BW, Mottok A, Tan KL, et al. Genomic rearrangements involving programmed death ligands are recurrent in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 27 mars 2014 [cité 27 avr 2019];123(13):2062-5. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood-2013-10-535443>
48. Shi M, Roemer MGM, Chapuy B, Liao X, Sun H, Pinkus GS, et al. Expression of Programmed Cell Death 1 Ligand 2 (PD-L2) Is a Distinguishing Feature of Primary Mediastinal (Thymic) Large B-cell Lymphoma and Associated With PDCD1LG2 Copy Gain: *Am J Surg Pathol* [Internet]. déc 2014 [cité 27 avr 2019];38(12):1715-23. Disponible sur: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000478-201412000-00017>
49. Mareschal S, Dubois S, Viailly P-J, Bertrand P, Bohers E, Maingonnat C, et al. Whole exome

sequencing of relapsed/refractory patients expands the repertoire of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma: Exome Sequencing of Refractory DLBCL. *Genes Chromosomes Cancer* [Internet]. mars 2016 [cité 27 avr 2019];55(3):251-67. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/gcc.22328>

50. Mottok A, Hung SS, Chavez EA, Woolcock B, Telenius A, Chong LC, et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 10 juill 2019 [cité 2 sept 2019];blood.2019001126. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood.2019001126>

51. Lees C, Keane C, Gandhi MK, Gunawardana J. Biology and therapy of primary mediastinal B-cell lymphoma: current status and future directions. *Br J Haematol* [Internet]. avr 2019 [cité 9 sept 2019];185(1):25-41. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/bjh.15778>

52. Dubois S, Viailly P-J, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res* [Internet]. 15 juin 2016 [cité 27 avr 2019];22(12):2919-28. Disponible sur: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-2305>

53. Steidl C, Diepstra A, Lee T, Chan FC, Farinha P, Tan K, et al. Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed-Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* [Internet]. 25 oct 2012 [cité 2 sept 2019];120(17):3530-40. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-06-439570>

54. Dai H, Ehrentraut S, Nagel S, Eberth S, Pommerenke C, Dirks WG, et al. Genomic Landscape of Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma Cell Lines. Coleman WB, éditeur. *PLOS ONE* [Internet]. 23 nov 2015 [cité 2 sept 2019];10(11):e0139663. Disponible sur: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0139663>

55. Copie-Bergman C, Gaulard P, Alonso MA. The MAL Gene Is Expressed in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma. :10.

56. Liang WS, Vergilio J, Sahlia B, Huang HJ, Oki Y, Garrido-Laguna I, et al. Comprehensive Genomic Profiling of Hodgkin Lymphoma Reveals Recurrently Mutated Genes and Increased Mutation Burden. *The Oncologist* [Internet]. févr 2019 [cité 2 sept 2019];24(2):219-28. Disponible sur: <http://theoncologist.alphamedpress.org/lookup/doi/10.1634/theoncologist.2018-0058>

57. Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, Penson A, Fortini E, Pettrossi V, et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* [Internet]. 31 mai 2018 [cité 2 sept 2019];131(22):2454-65. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/lookup/doi/10.1182/blood-2017-11-814913>

58. Juskevicius D, Jucker D, Dietsche T, Perrina V, Ruffle A, Ruiz C, et al. Novel cell enrichment technique for robust genetic analysis of archival classical Hodgkin lymphoma tissues. *Lab Invest* [Internet]. nov 2018 [cité 2 sept 2019];98(11):1487-99. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41374-018-0096-6>

59. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, Giulino-Roth L, Tam W, Liu Y, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* [Internet]. 12 févr 2015 [cité 17 juin 2019];125(7):1061-72. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2014-11-610436>

60. Eberle FC, Rodriguez-Canales J, Wei L, Hanson JC, Killian JK, Sun H-W, et al. Methylation

profiling of mediastinal gray zone lymphoma reveals a distinctive signature with elements shared by classical Hodgkin's lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Haematologica* [Internet]. 1 avr 2011 [cité 27 avr 2019];96(4):558-66. Disponible sur: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2010.033167>

61. Miloudi H, Leroy K, Jardin F, Sola B. STAT6 is a cargo of exportin 1: Biological relevance in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Cell Signal* [Internet]. juin 2018 [cité 27 avr 2019];46:76-82. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0898656818300639>

62. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* [Internet]. 28 oct 2010 [cité 27 avr 2019];116(17):3268-77. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-05-282780>

63. Steidl C, Telenius A, Shah SP, Farinha P, Barclay L, Boyle M, et al. Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood* [Internet]. 22 juill 2010 [cité 16 sept 2019];116(3):418-27. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-12-257345>

64. Hartmann S, Martin-Subero JI, Gesk S, Husken J, Giefing M, Nagel I, et al. Detection of genomic imbalances in microdissected Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's lymphoma by array-based comparative genomic hybridization. *Haematologica* [Internet]. 1 sept 2008 [cité 16 sept 2019];93(9):1318-26. Disponible sur: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.12875>

65. Rimsza LM. Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project. *Blood* [Internet]. 1 juin 2004 [cité 17 sept 2019];103(11):4251-8. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-07-2365>

66. Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, et al. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* [Internet]. 17 mars 2011 [cité 27 avr 2019];471(7338):377-81. Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09754>

67. Moller P, Lammler B, Herrmann B, Otto HF, MOLDENHAUERT G, MOMBURGT F. The primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type has variable defects in MHC antigen expression. :7.

68. Mottok A, Woolcock B, Chan FC, Tong KM, Chong L, Farinha P, et al. Genomic Alterations in CIITA Are Frequent in Primary Mediastinal Large B Cell Lymphoma and Are Associated with Diminished MHC Class II Expression. *Cell Rep* [Internet]. nov 2015 [cité 27 avr 2019];13(7):1418-31. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124715011626>

69. Melzner I. Biallelic mutation of SOCS-1 impairs JAK2 degradation and sustains phospho-JAK2 action in the MedB-1 mediastinal lymphoma line. *Blood* [Internet]. 15 mars 2005 [cité 27 avr 2019];105(6):2535-42. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2004-09-3701>

70. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with

nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene* [Internet]. avr 2006 [cité 17 juin 2019];25(18):2679-84. Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/1209151>

71. Schmitz R, Hansmann M-L, Bohle V, Martin-Subero JI, Hartmann S, Mechtersheimer G, et al. *TNFAIP3* (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med* [Internet]. 11 mai 2009 [cité 27 avr 2019];206(5):981-9. Disponible sur: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20090528>

72. Nomoto J, Hiramoto N, Kato M, Sanada M, Maeshima AM, Taniguchi H, et al. Deletion of the *TNFAIP3/A20* gene detected by FICTION analysis in classical Hodgkin lymphoma. *BMC Cancer* [Internet]. déc 2012 [cité 2 sept 2019];12(1):457. Disponible sur: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-457>

73. Yoshimura M, Ishizawa J, Ruvolo V, Dilip A, Quintás-Cardama A, McDonnell TJ, et al. Induction of p53-mediated transcription and apoptosis by exportin-1 (XPO1) inhibition in mantle cell lymphoma. *Cancer Sci* [Internet]. juill 2014 [cité 16 sept 2019];105(7):795-801. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/cas.12430>

74. Jardin F, Pujals A, Pelletier L, Bohers E, Camus V, Mareschal S, et al. Recurrent mutations of the exportin 1 gene (XPO1) and their impact on selective inhibitor of nuclear export compounds sensitivity in primary mediastinal B-cell lymphoma: XPO1 Mutations in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma. *Am J Hematol* [Internet]. sept 2016 [cité 27 avr 2019];91(9):923-30. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajh.24451>

75. Scarpa A, Moore PS, Rigaud G, Inghirami G, Montresor M, Menegazzi M, et al. Molecular features of primary mediastinal B-cell lymphoma: involvement of p16INK4A, p53 and c-myc. *Br J Haematol* [Internet]. oct 1999 [cité 27 avr 2019];107(1):106-13. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2141.1999.01678.x>

76. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, Tai YC, Tzankov A, Liu W -m., et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood* [Internet]. 8 nov 2012 [cité 18 sept 2019];120(19):3986-96. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2012-05-433334>

77. Juskevicius D, Jucker D, Klingbiel D, Mamot C, Dirnhofer S, Tzankov A. Mutations of CREBBP and SOCS1 are independent prognostic factors in diffuse large B cell lymphoma: mutational analysis of the SAKK 38/07 prospective clinical trial cohort. *J Hematol Oncol* [Internet]. déc 2017 [cité 10 juin 2019];10(1):70. Disponible sur: <http://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-017-0438-7>

78. Cao Y, Zhu T, Zhang P, Xiao M, Yi S, Yang Y, et al. Mutations or copy number losses of *CD58* and *TP53* genes in diffuse large B cell lymphoma are independent unfavorable prognostic factors. *Oncotarget* [Internet]. 13 déc 2016 [cité 18 sept 2019];7(50). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/13065>

79. Marafioti T. Expression of intracellular signaling molecules in classical and lymphocyte predominance Hodgkin disease. *Blood* [Internet]. 1 janv 2004 [cité 17 juin 2019];103(1):188-93. Disponible sur: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2003-05-1487>

TABLEAUX ET FIGURES

	COHORTE	PMBL	GZL	CHL
Total des patients	27	13	5	9
Sexe (femme)	13	7	3	3
Age (années)				
Médiane±Ecart-type	38±13,5	31±14,8	44±10	43±12,6
Minimales et maximales	19-69	19-69	36-64	19-56
Classification d'Ann Arbor				
I	5 (20,8%)	3 (23%)	1 (20%)	1 (11,1%)
II	9 (33,3%)	4 (30,8%)	1 (20%)	4 (44,4%)
III	1 (3,7%)	0	1 (20%)	0
IV	12 (44,4%)	6 (46%)	2 (40%)	4 (44,4%)
Diamètre maximal au TDM (cm)				
Médiane±Ecart-type	12±4	12,8±2,4	6,1±6,7	8,4±3,5
Minimales et maximales	1,9-16	7-16	1,9-15	3,5-13,3
« Bulky »	16 (59,3%)	12 (92,3%)	1 (20%)	3 (33,3%)
FDG-TEP scanner au diagnostic				
Médiane±Ecart-type de la SUV max	18,8±7,8	18,8±7,8	21,3±4,2	10,6±4,9
Min-max	2,9-28,8	2,9-28,8	16,6-26,6	4,5-17,7
Médiane±Ecart-type du TMTV0 (mL)	386±385	386±385	43,5±372	233±188
Min-max	45-1405	45,3-1405	29,3-680	5,2-617
Médiane±Ecart-type du TLG	4185±2215	4185±2215	358±2314	1227±707
Min-max	333-7043	333-7044	320-4347	210-1935
Survie globale (mois)				
Médiane±Ecart-type	37,2±21,6	19,4±18,2	37±14,3	59±19,3
Min-max	5,7-78,6	5,7-60,2	9,6-44,6	17,4-78,6
Survie sans progression (mois)				
Médiane±Ecart-type	36,8±22,8	19,4±19,3	37±16,8	59±24
Min-max	4-78,6	4-60,2	9,6-44,6	11,5-78,6
Patients en rémission complète/rechutes	24/5	10/3	5/1	9/1
Patients perdus de vu	1	1	0	0

Tableau 1. Caractéristiques cliniques, métaboliques et critères évolutifs de l'ensemble des 27 patients dans chacune des 3 pathologies (PMBL, GZL et CHL).

	PMBL	GZL	CHL
Histologie			
Pourcentage de cellules tumorales			
Médiane±Ecart-type (%)	80±0,07	50±0,13	5±0,12
Minimales et maximales	70-95	40-70	5-40
Caractéristiques cytologiques	Cellules de taille moyenne à grande Noyaux petits Cytoplasme abondant et pâle	PMBL-like ou cHL-like, ou les 2 types	Cellules de grande taille: Reed-Sternberg ou Hodgkin
Microenvironnement			
Infiltrat lymphocytaire T	Faible	Modéré à important	Modéré à important
Macrophages/cellules tumorales	1 macrophage pour 5 cellules tumorales (0.2)	1 macrophage pour 2-3 cellules tumorales (0.4)	2 macrophages pour 1 cellule tumorale (2)
Stroma réaction (type de fibrose)	Bandes fines pénicillées de collagène	Bandes de collagène annulaires ou fines	Larges bandes de collagène annulaires
Profils immunophénotypiques			
Marqueurs de différenciation lymphocytaire B	Conservé: CD20, CD79a, Pax5, BOB1 diffus, forte intensité du Pax5.	Conservé: CD20, CD79a, Pax5, BOB1 diffus, intensité variable du Pax5.	En parti perdu: CD79a ou CD20 : rare BOB1 : jamais Pax 5: tous les cas, souvent faible et focal
Marqueurs d'activation lymphocytaire	CD38: hétérogène CD30: hétérogène, co-expression avec CD23	CD38: diffus et intense sauf pour 1 cas CD30: diffus sauf pour 1 cas	CD38: diffus dans moins de la moitié des cas CD30: diffus dans tous les cas
Marqueurs des cellules B du centre germinatif	Bcl6: hétérogène MUM1: hétérogène	Bcl6: focal dans presque tous les cas MUM1: focal dans tous les cas	Bcl6: rare MUM1: tous les cas, souvent diffus
Protéines anti-apoptotiques	Bcl2: hétérogène	Bcl2: moins de la moitié des cas	Bcl2: 1 cas
Checkpoints inhibiteurs de l'immunité	PD-L1: environ moitié des cas, faible intensité PD-L2: moins de la moitié des cas, intensité variable	PD-L1: tous les cas, intensité variable PD-L2: moins de la moitié des cas, intensité variable	PD-L1: presque tous les cas, le plus souvent diffus et intense PD-L2: jamais
Marqueur myéloïde	CD15: 1 cas diffus	CD15: presque tous les cas, hétérogène	CD15: presque tous les cas, hétérogène
Index de prolifération cellulaire	Ki67: 87% des cellules tumorales (moyenne)	Ki67: 74% des cellules tumorales (moyenne)	Ki67: variable

Tableau 2. Caractéristiques histologiques et immunophénotypiques des PMBL, GZL et cHL.

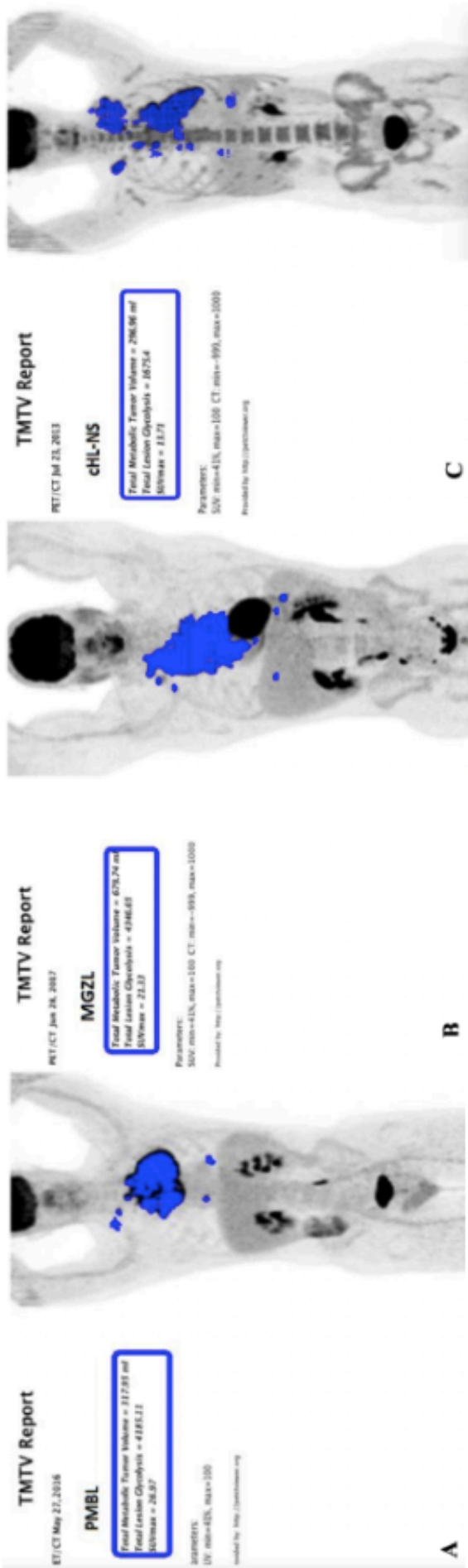
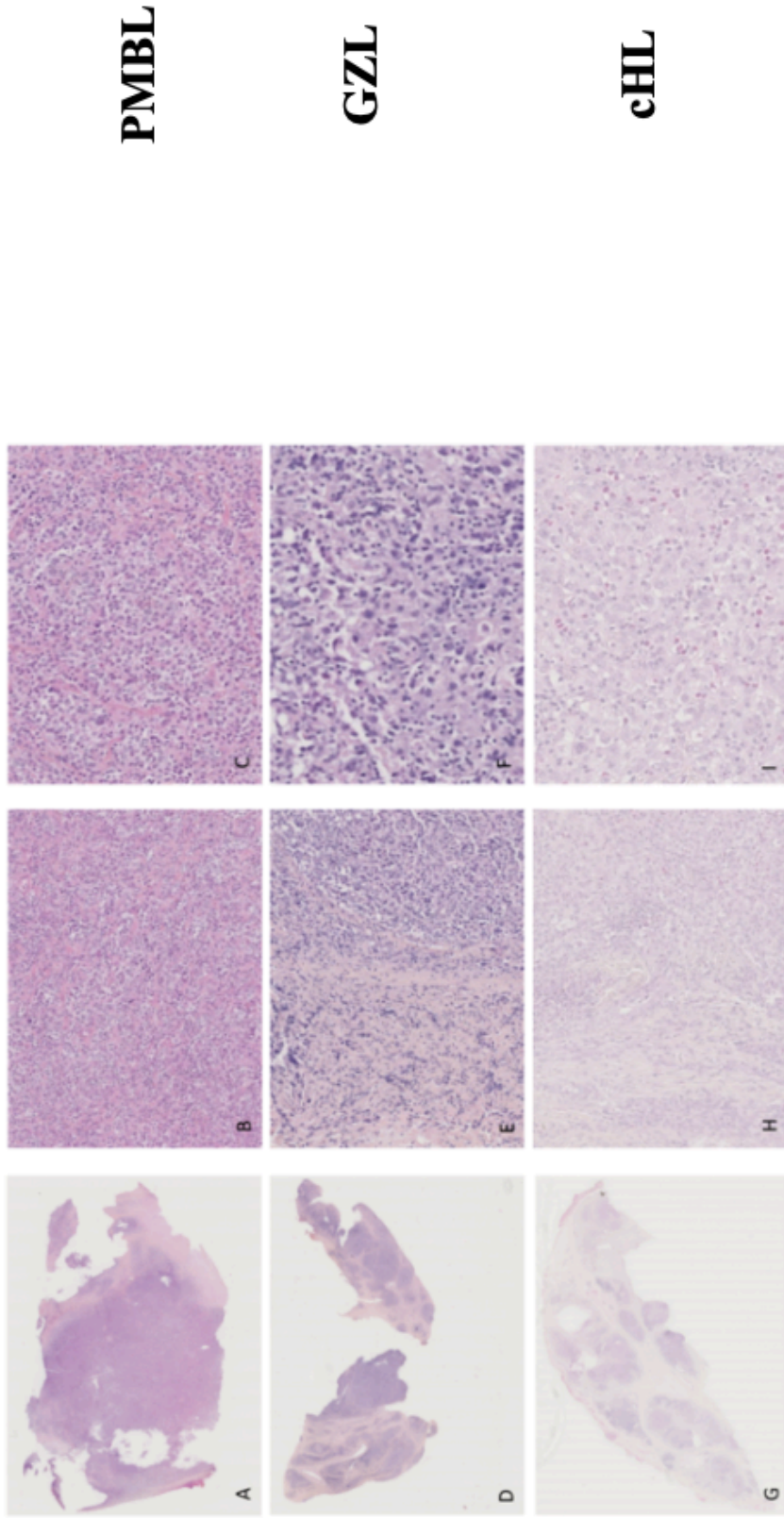


Figure 1. Images de FDG-TEP scanner et données de SUV max, TMTV0 et TLG pour les PMBL (A), GZL (B) et cHL (C). Les PMBL avaient les valeurs les plus élevées de TMTV0 et de TLG. Les cHL présentaient les valeurs les plus basses de SUV max.



PMBL

GZL

cHL

Figure 2. Caractéristiques morphologiques sur lames HES des PMBL (A, B, C), GZL (D, E, F) et cHL (G, H, I). A. A faible grossissement, les PMBL présentent une architecture diffuse. **B-C.** A plus fort grossissement, la prolifération tumorale se compose de cellules de taille moyenne encerclées par une fibrose collagène pénicillée avec un aspect de compartimentalisation des cellules tumorales. Ces dernières présentent un abondant cytoplasme pâle et éosinophile. Le microenvironnement est composé principalement de petits lymphocytes. **D.** A faible grossissement, les GZL présentent une architecture nodulaire avec cerclage des nodules par d'épaisses bandes collagène. **E-F.** A plus fort grossissement, on observe des cellules tumorales ressemblant à celles des PMBL et quelques-unes dont les caractéristiques se rapprochent des cellules HRS. Elles sont compartimentalisées par une fine fibrose pénicillée. Le microenvironnement tumoral est composé de petits lymphocytes et de rares macrophages. **G.** A faible grossissement, les cHL présentent une architecture nodulaire typique délimitée par de larges bandes de fibrose. **H-I.** A plus fort grossissement, de nombreuses cellules de Reed Sternberg et de Hodgkin sont visualisées. Le microenvironnement tumoral est composé de nombreux petits lymphocytes et macrophages et de quelques polynucléaires éosinophiles.

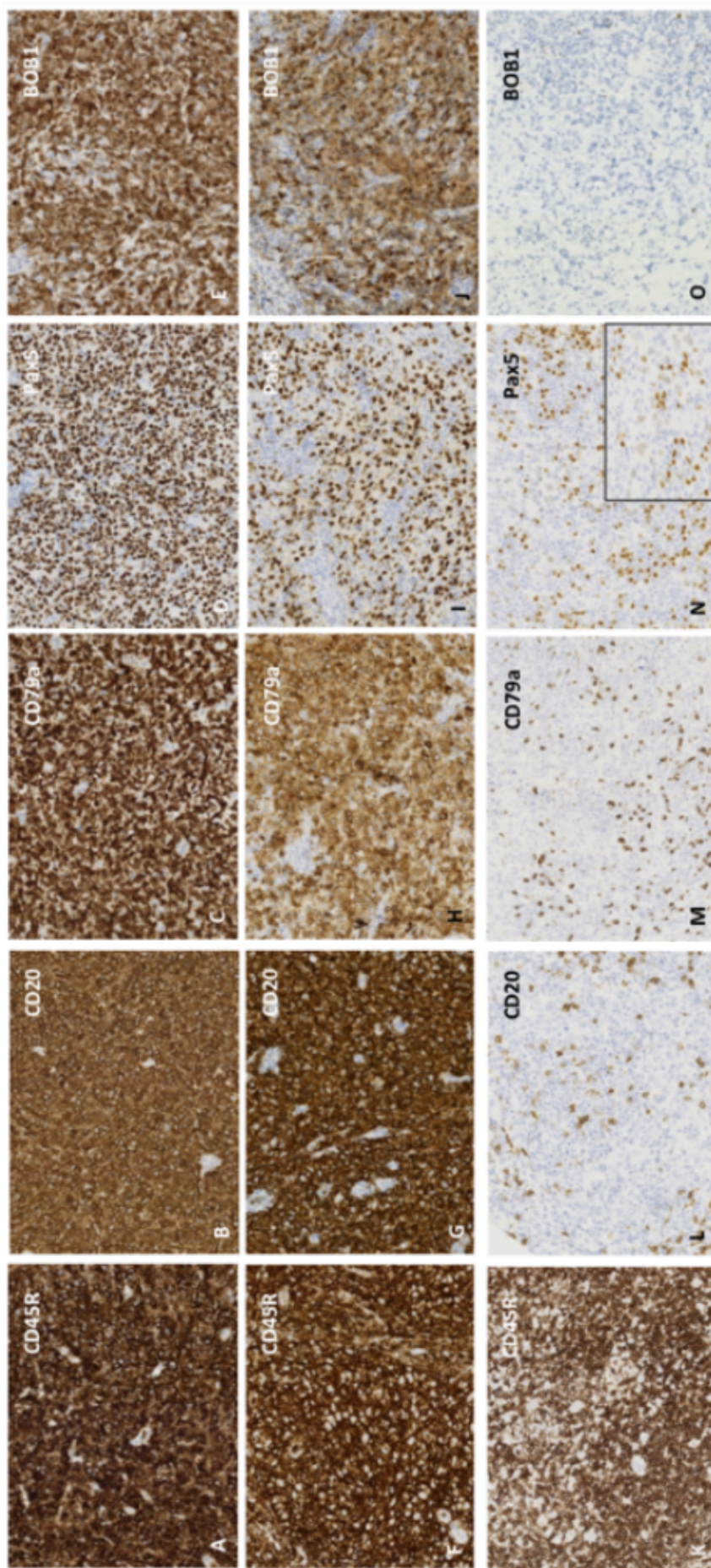
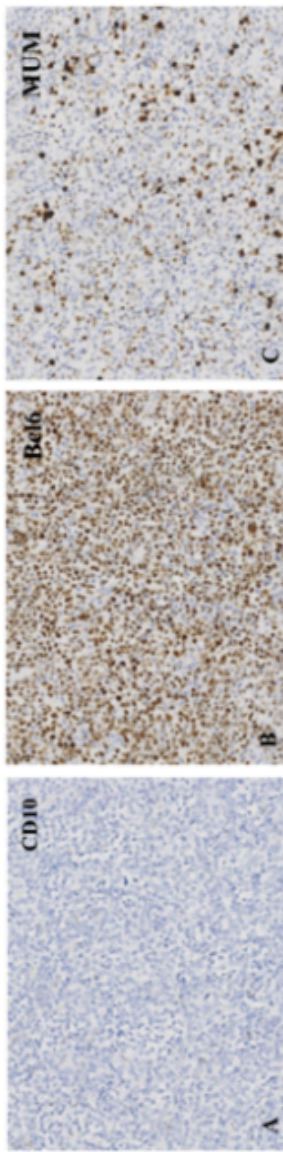
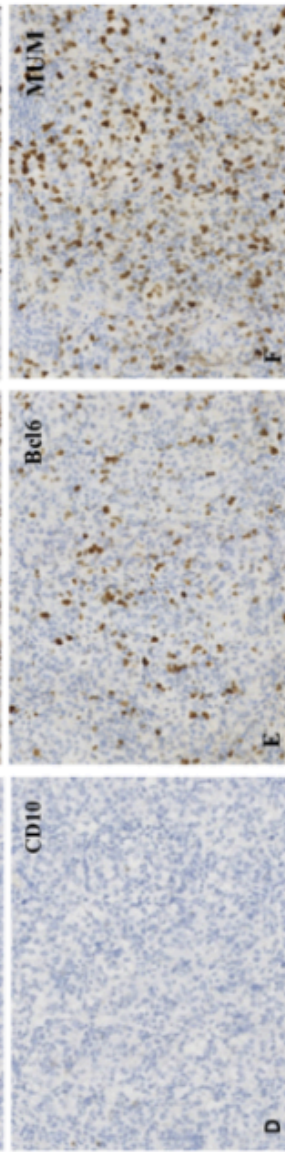


Figure 3. Caractéristiques immunohistochimiques des marqueurs B des PMBL (A-E), GZL (F-J) et cHL (K-O). A-E. Les cellules tumorales des PMBL expriment le CD45 et les marqueurs de différenciation lymphocytaire B : CD20, CD79a, Pax5 (avec une forte intensité) et BOB1. **F-J.** On observe le même phénotype pour les cellules tumorales des GZL. **K-O.** Les cellules de cHL n'expriment pas CD45. Seul Pax5 est exprimé par les cellules tumorales (avec une faible intensité). Les autres anticorps de la lignée B (CD20, CD79a et BOB1) sont négatifs.

PMBL



GZL



cHL

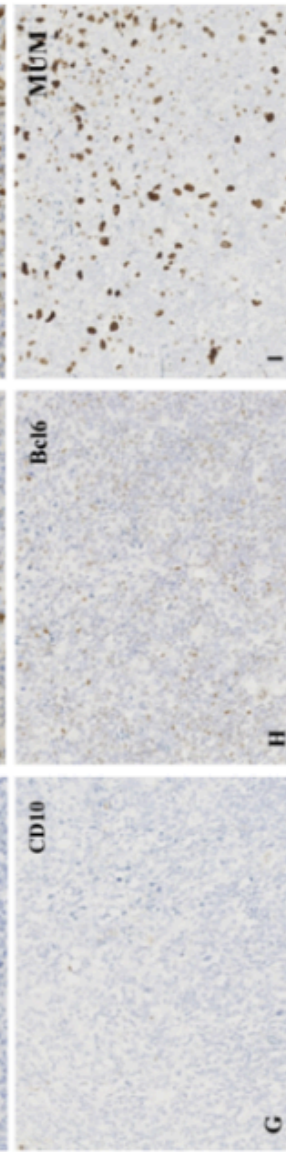


Figure 4. Caractéristiques immunohistochimiques des marqueurs centro-germinatifs des PMBL (A-C), GZL (D-F), et cHL (G-I). A-C. Les cellules tumorales des PMBL expriment BCL6 et MUM1, et sont négatives pour CD10. **D-F.** G-ZL. Les cellules tumorales des GZL et les cellules de HRS des cHL expriment faiblement BCL6 (respectivement 10 et 5% de cellules marquées) alors que MUM1 est exprimé par la plupart des cellules tumorales. Il n'est pas retrouvé d'expression de CD10.

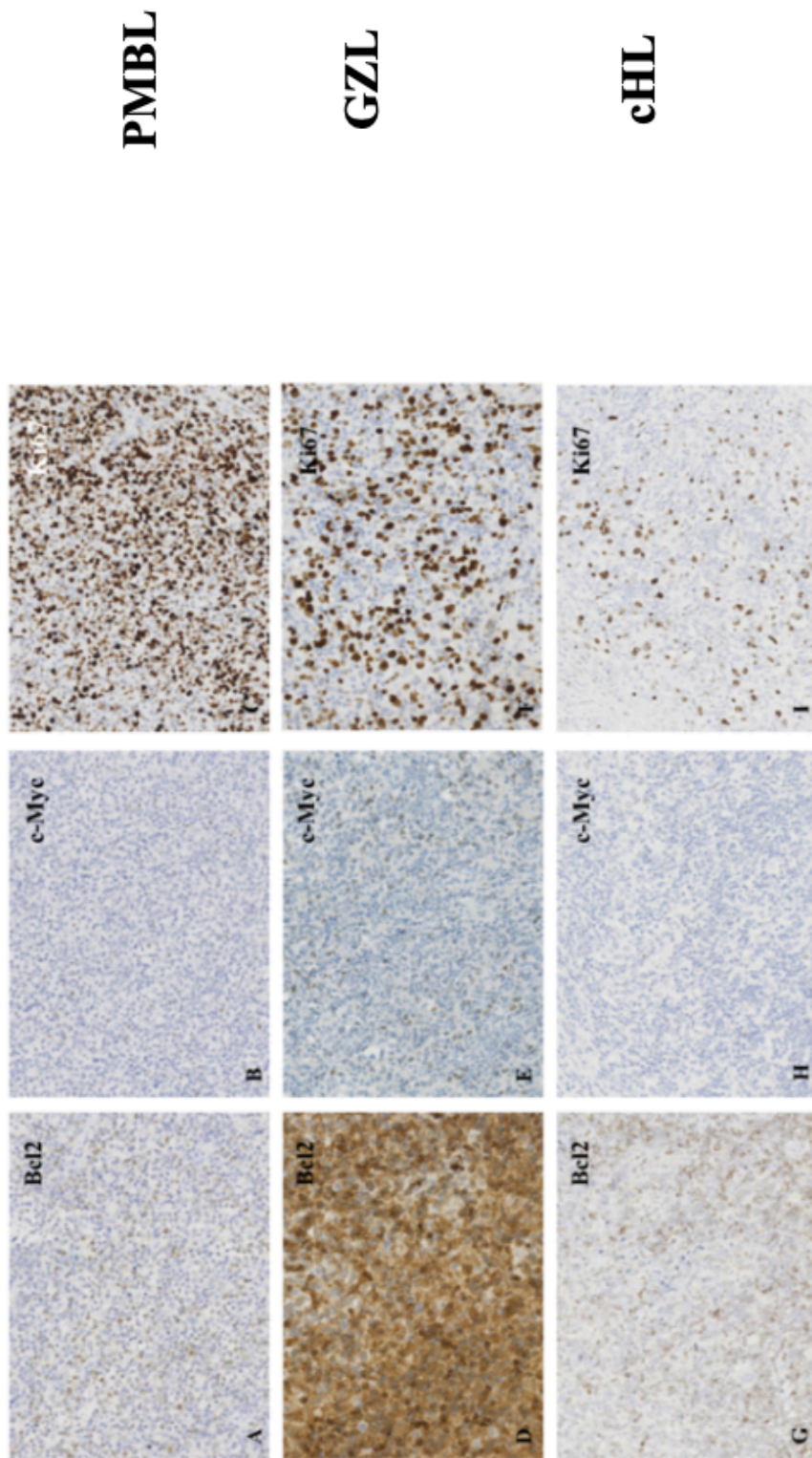


Figure 5. Caractéristiques immunohistochimiques des marqueurs BCL2 (anti-apoptotique), cMYC et Ki67 des PMBL (A-C), GZL (D-E) et cHL (G-I). A-C. Les cellules tumorales des PMBL expriment faiblement BCL2 et cMYC. L'index de prolifération tumoral (Ki67) est de 80%. D-E. Les cellules tumorales des GZL expriment fortement BCL2 alors que cMYC est faiblement exprimé (moins de 5%). L'index de prolifération est de 50-60%. G-I. Les cellules de HRS des cHL n'expriment ni BCL2 (expression par les lymphocytes T du microenvironnement), ni cMYC. L'index de prolifération tumoral est proche de 100%.

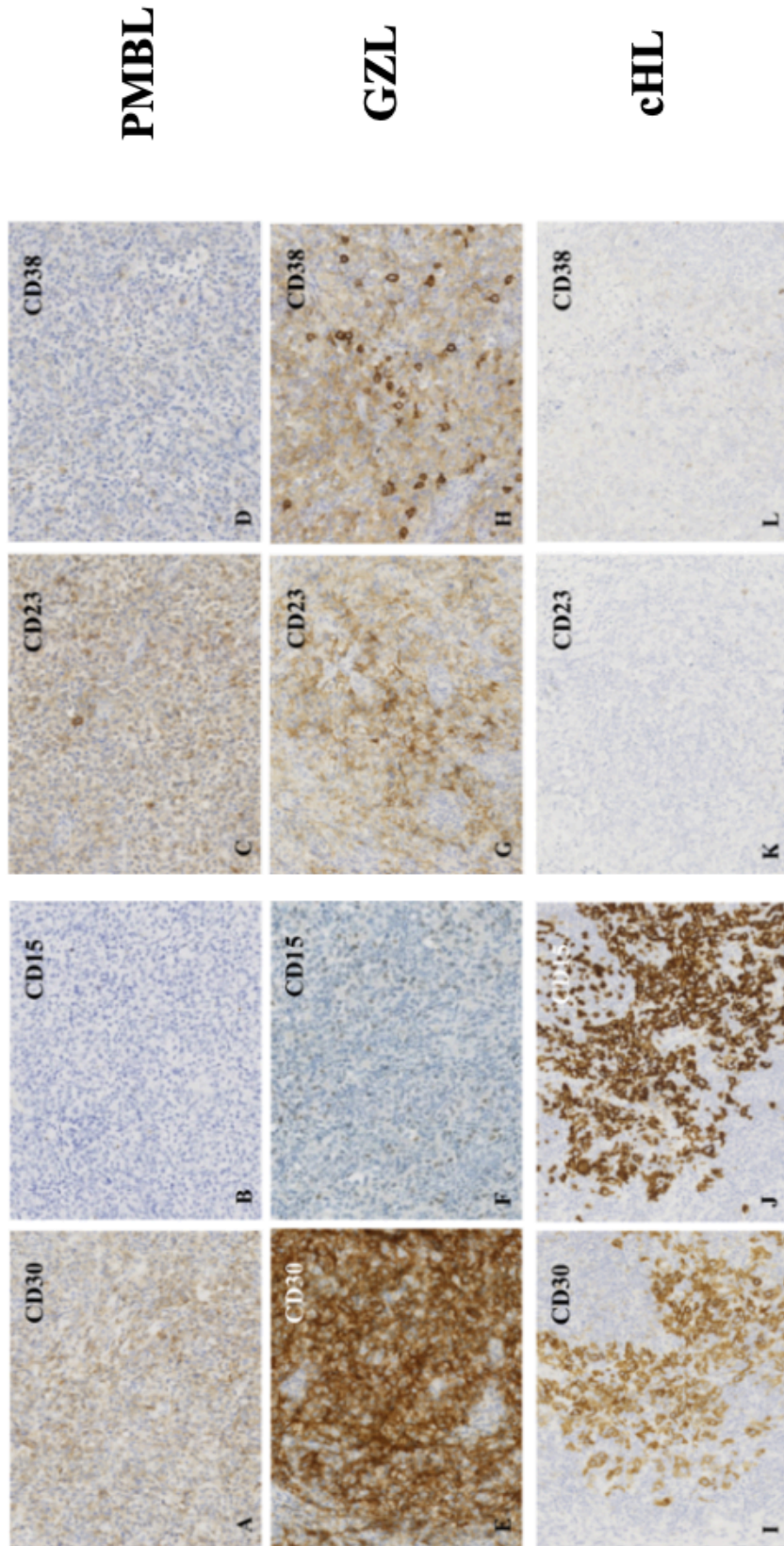
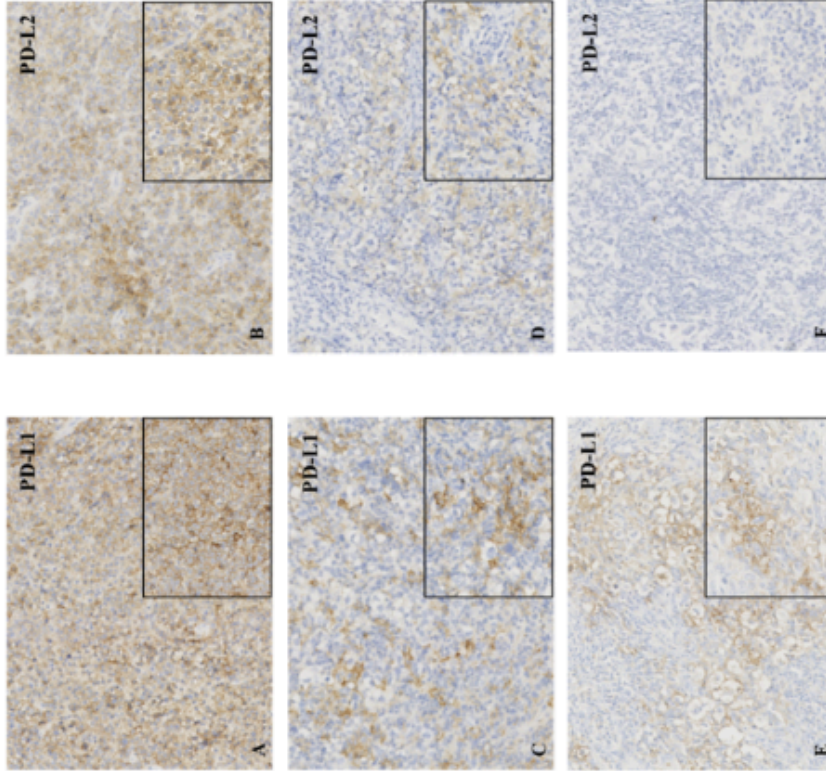


Figure 6. Caractéristiques immunohistochimiques des marqueurs d'activation des cellules B (CD30-CD38), marqueur myéloïde (CD15) et du CD23 des PMBL (A-D), GZL (E-H) et cHL (I-L). A-D. Dans les PMBL, l'expression de CD30 est diffuse et de faible intensité et est associée à l'expression de CD23. Les cellules tumorales n'expriment pas CD15 et CD38. E-H. Les GZL présentent des caractéristiques intermédiaires avec une expression intense et diffuse de CD30 associée à une expression faible et focale de CD15. CD23 est largement exprimé par les cellules tumorales. CD38 est exprimé intensément avec une intensité variable (modérée à intense) par les cellules tumorales. I-L. Les cellules HRS des cHL expriment diffusément CD30 et CD15. Il n'est pas mis en évidence d'expression de CD23 et de CD38.

Figure 7. Caractéristiques immunohistochimiques des checkpoints inhibiteurs de la synapse immunologique des lymphocytes T des PMBL (A-B), GZL (C-D) et cHL (E-F).

A-B. Les cellules tumorales des PMBL co-expriment de manière diffuse et intense PDL1 et PDL2. **C-D.** Les cellules tumorales des GZL présentent une expression focale et intense de PDL1 et focale mais faible de PDL2. **E-F.** Les cellules HRS des cHL présentent un marquage diffus mais de faible intensité de PDL1, sans expression de PDL2.



PMBL

GZL

cHL

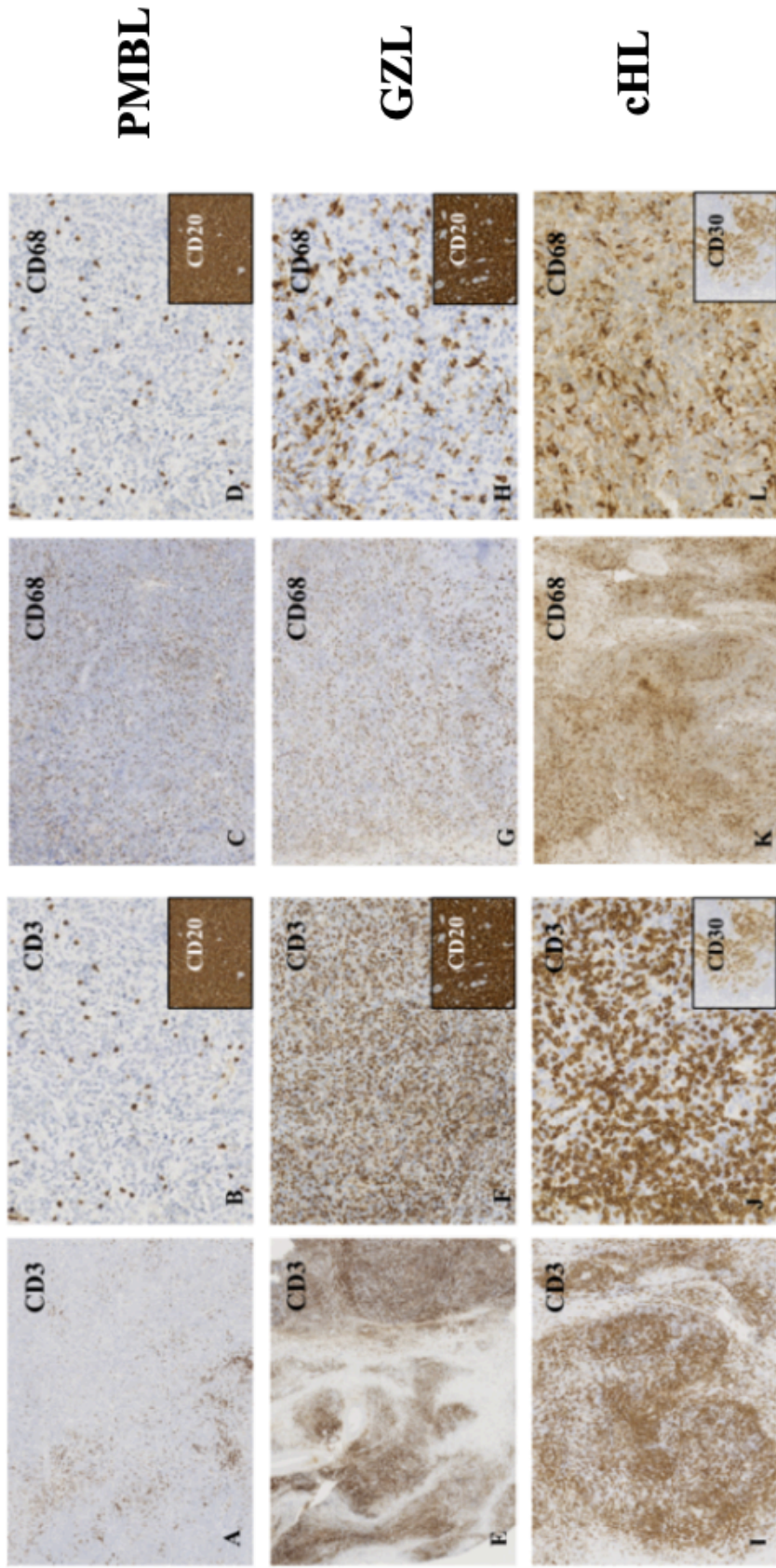
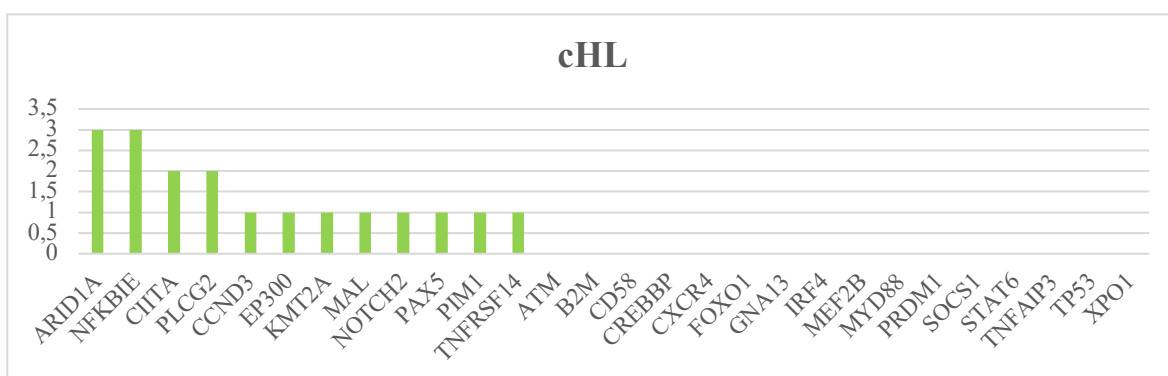
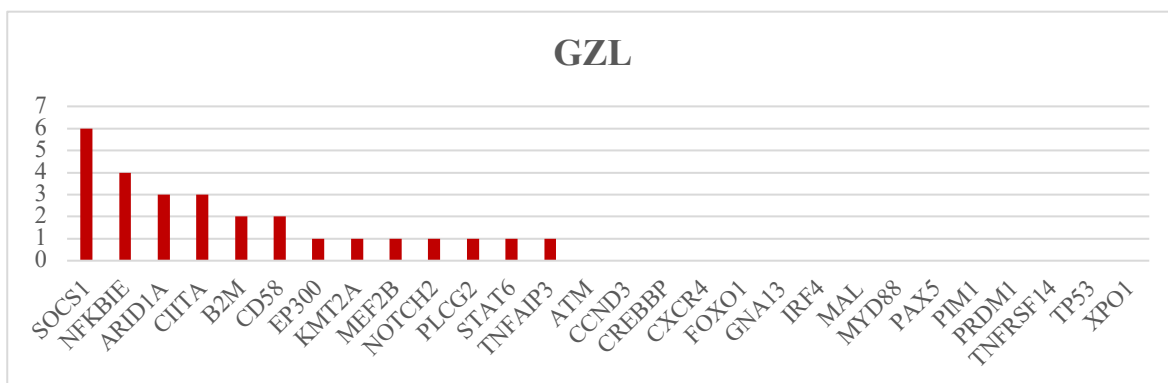
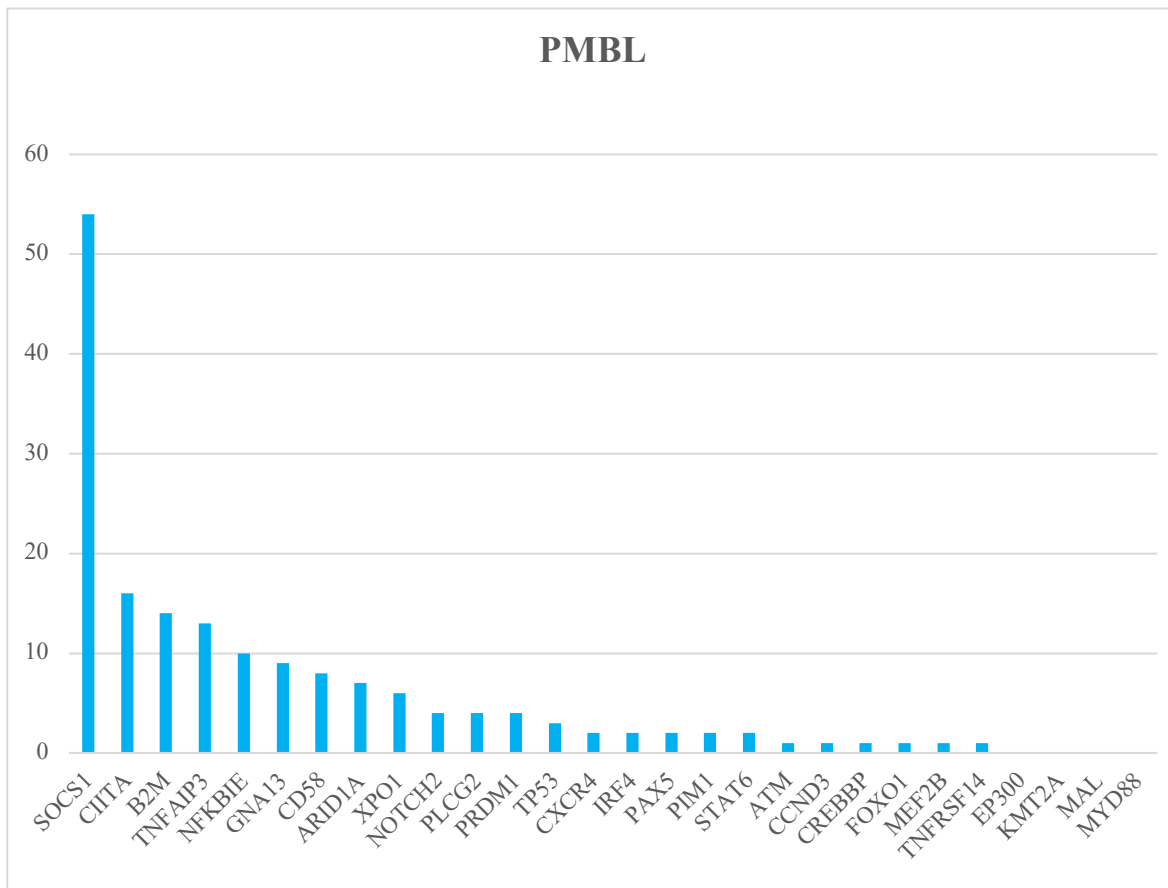


Figure 8. Microenvironnement lymphocytaire T et macrophage T et macrophage T analysé par étude immunohistochimique avec les anticorps anti-CD3 (lymphocytes T) et anti-CD68 (macrophages) des PMBL (A-D), GZL (E-H) et cHL (I-L). A-D. Le microenvironnement des PMBL se compose de quelques lymphocytes (intensité faible) et de macrophages (ratio macrophages/cellules tumorales = 0,2). E-H. Le microenvironnement des GZL se compose d'un plus grand nombre de lymphocytes (intensité modérée à forte) et de plus de macrophages (ratio macrophages/cellules tumorales = 0,3). I-L. Le microenvironnement des cHL se compose de nombreux lymphocytes et macrophages (ratio macrophages/cellules tumorales = 1).



Figures 9 à 11. Graphiques représentant le profil mutationnel de chacune des 3 pathologies.
 Nombre de mutations identifiées en ordonnée pour chacun des gènes en abscisse.

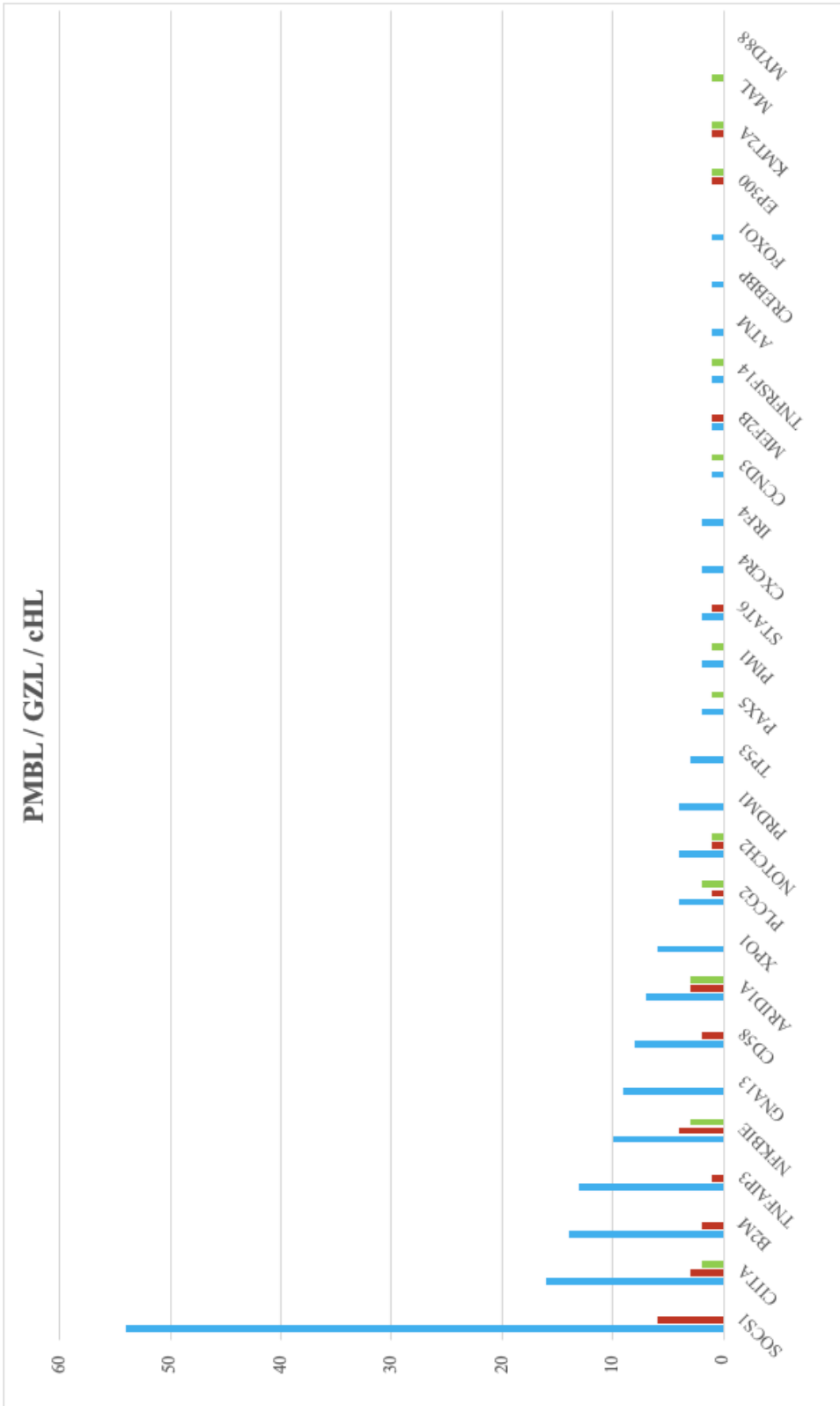


Figure 12. Graphique représentant les 3 profils mutationnels (PMBL —, GZL —, et cHL —). Nombre de mutations identifiées en ordonnée pour chacun des gènes en abscisse.

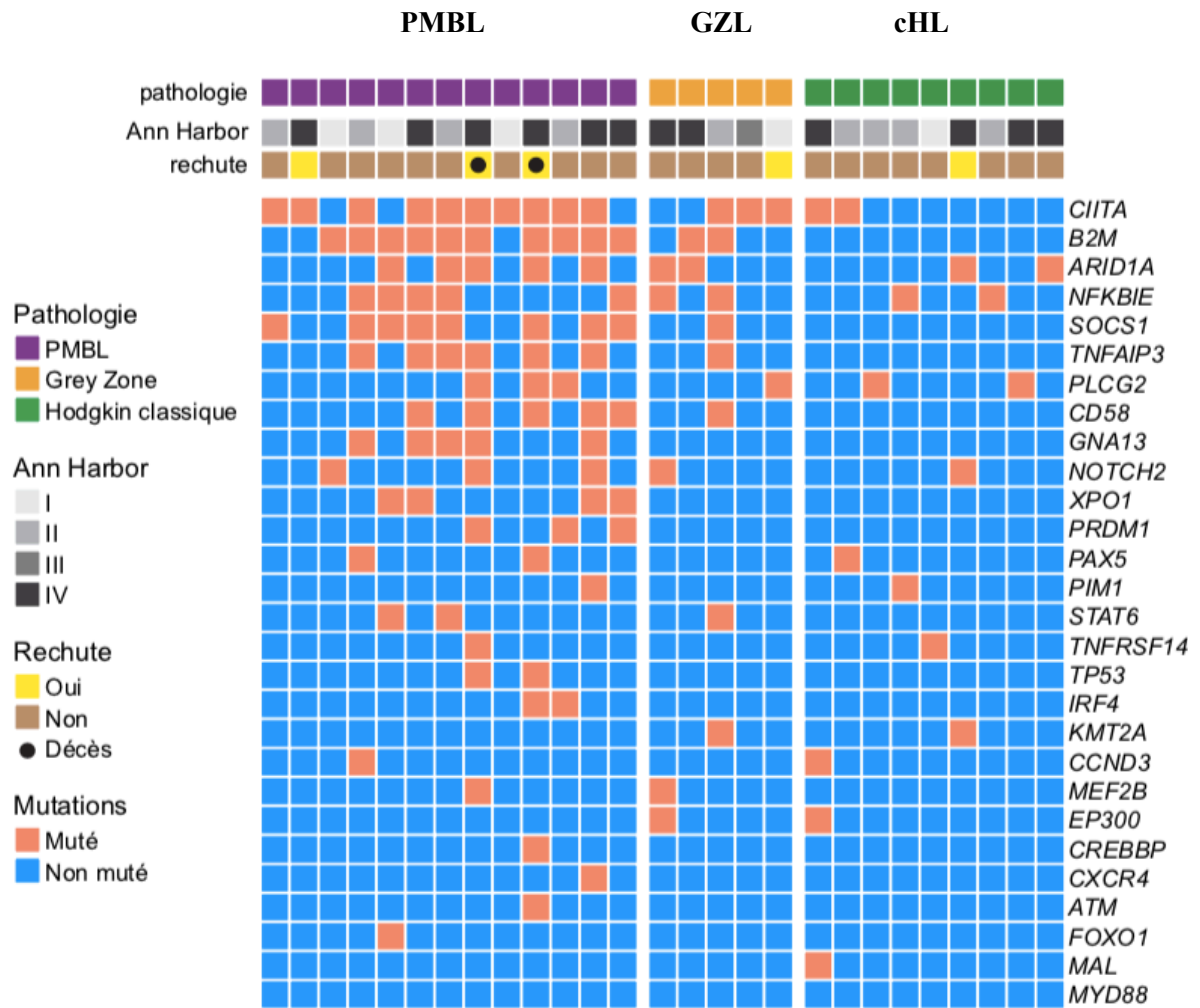
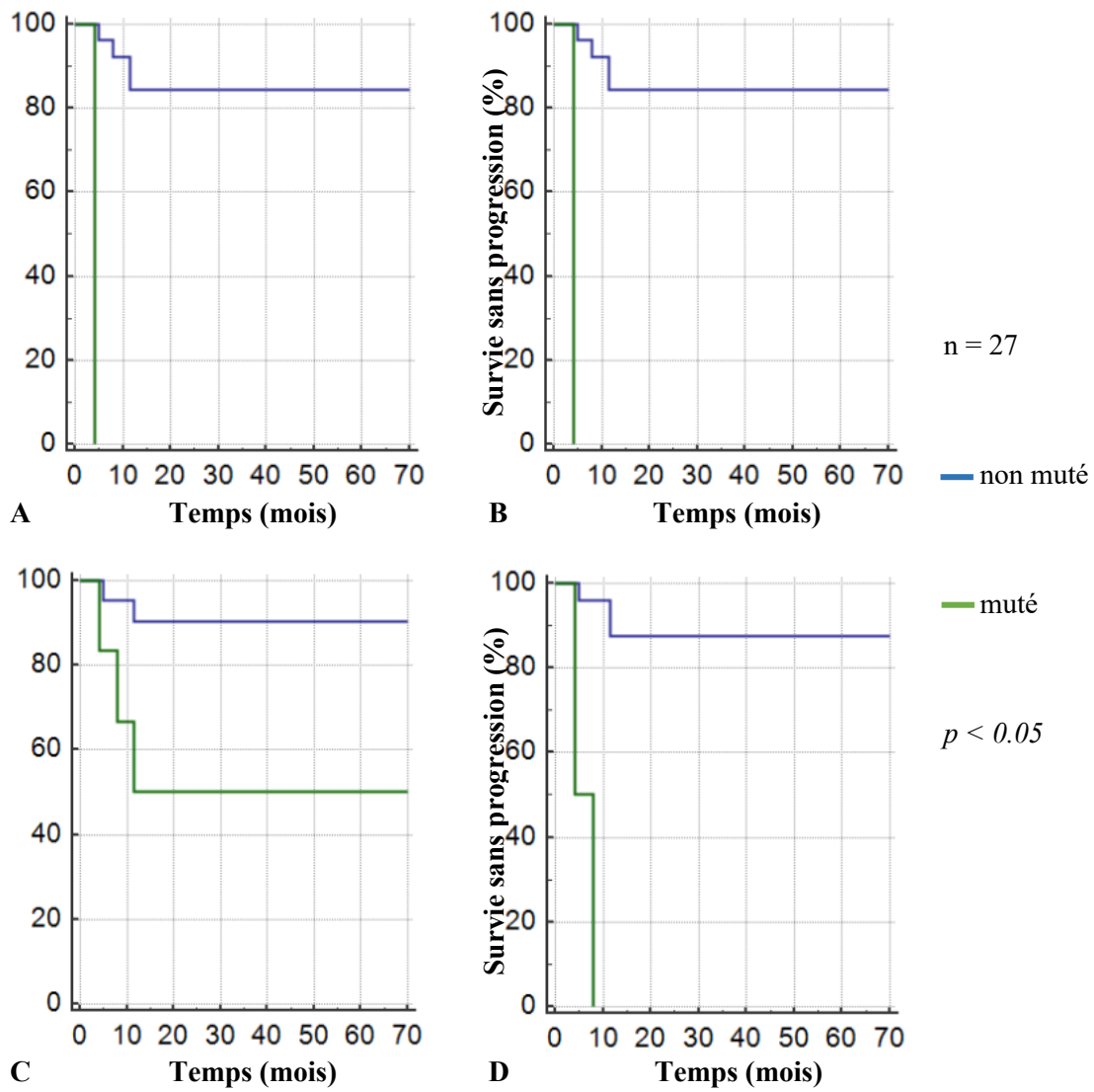


Figure 13. *Heatmap* représentant les mutations des 28 gènes identifiées dans les lymphomes de notre cohorte. Chaque colonne représente un cas.



Figures 14 à 17. Courbes de PFS en fonction du statut mutationnel des gènes *ATM* (A), *CREBBP* (B), *PLCG2* (C) et *TP53* (D). Les cas mutés correspondent à des PMBL pour *ATM*, *CREBBP* et *TP53*. Pour *PLCG2*, ils correspondent à des PMBL, GZL et cHL.

TITRE DE LA THESE : Aspects histo-moléculaires d'une cohorte de 27 cas de lymphomes agressifs d'origine B du médiastin

AUTEUR : Nahina BEKMEZIAN

RESUME :

Introduction. Les lymphomes agressifs d'origine B du médiastin qui incluent les lymphomes primitifs du médiastin (PMBL), les lymphomes de Hodgkin classique (cHL) et les formes intermédiaires ou gray zone (GZL) ont des caractéristiques proches qui rendent parfois leurs diagnostics difficiles.

Objectif. Le but de ce travail rétrospectif est de préciser les caractéristiques, cliniques, métaboliques, histopathologiques, phénotypiques et moléculaires de ces 3 entités.

Matériels et méthodes. Les 27 cas analysés, diagnostiqués entre 2011 et 2017, incluaient 13 PMBL, 5 GZL et 9 cHL. Les données cliniques et métaboliques ont été collectées dans les dossiers. L'analyse des lames a précisé leurs aspects morphologiques et leurs phénotypes. Le profil mutationnel a été déterminé par technique de séquençage haut débit utilisant un panel de 30 gènes.

Résultats. Des mutations récurrentes, impliquées dans les voies de signalisation NF- κ B (*TNFAIP3*), JAK-STAT (*SOCS1*) et RhoA/ROCK (*GNAI3*), dans l'immunité (*B2M*, *CD58*, *CIITA*) et dans le transport nucléocytoplasmique (*XPO1*) ont été associées au PMBL ($p < 0,05$). Certaines d'entre elles (*CD58*, *SOCS1* et *XPO1*) étaient corrélées à l'expression de PDL1 ($p < 0,05$). D'autres mutations (*ATM*, *CREBBP*, *PLCG2*, *TP53* et *TNFRSF14*) ont été associées à une évolution défavorable des PMBL ($p < 0,05$). Aucune mutation n'a pu être liée aux 2 autres pathologies (GZL et cHL).

Conclusions. La détermination du profil mutationnel des lymphomes agressifs du médiastin paraît particulièrement intéressante pour les PMBL. Les mutations associées à cette pathologie (activation de voies de signalisation, échappement à l'immunité anti-tumorale, transport nucléocytoplasmique) sont probablement corrélées à sa lymphomagénèse et à la surexpression de PDL1.

MOTS-CLES : LYMPHOMES, MEDIASTIN, NF- κ B, JAK-STAT, ECHAPPEMENT IMMUNITAIRE, XPO1, FACTEURS PRONOSTIQUES, PDL1.