

Faculté de Médecine

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

le 27 octobre 2023

Par Mathieu Yon né le 22/11/1993 à Angers

Étude de marqueurs moléculaires comme complément d'analyse dans le diagnostic des lymphomes non-Hodgkinien

Thèse dirigée par Madame le Docteur Anne GUYOT

Examineurs :

Mme. Le Professeur Karine DURAND, PU-PH, CHU de Limoges, Président et Juge

Mme. Le Professeur Mathilde DUCHESNE, PU-PH, CHU de Limoges, Juge

M. Le Docteur David RIZZO, MCU, CHU de Limoges, Juge

Mme. Le Docteur Anne GUYOT, PH, CHU de Limoges, Directrice de thèse et Juge

M. Le Professeur François LABROUSSE, PU-PH, CHU de Limoges, Juge

Mme. Le Docteur Julie ABRAHAM, PH, CHU de Limoges, Juge



Faculté de Médecine

Année 2023

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

Le 27 octobre 2023

Par Mathieu Yon né le 22/11/1993 à Angers

Étude de marqueurs moléculaires comme complément d'analyse dans le diagnostic des lymphomes non-Hodgkinien

Thèse dirigée par Madame le Docteur Anne GUYOT

Examineurs :

Mme. Le Professeur Karine DURAND, PU-PH, CHU de Limoges, Président et Juge

Mme. Le Professeur Mathilde DUCHESNE, PU-PH, CHU de Limoges, Juge

M. Le Docteur David RIZZO, MCU, CHU de Limoges, Juge

Mme. Le Docteur Anne GUYOT, PH, CHU de Limoges, Directrice de thèse et Juge

M. Le Professeur François LABROUSSE, PU-PH, CHU de Limoges, Juge

Mme. Le Docteur Julie ABRAHAM, PH, CHU de Limoges, Juge



DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **Pierre-Yves ROBERT**

ASSESEURS

Madame le Professeur **Marie-Cécile PLOY**

Monsieur le Professeur **Jacques MONTEIL**

Monsieur le Professeur **Laurent FOURCADE**

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
AUBRY Karine	O.R.L.
BALLOUHEY Quentin	CHIRURGIE INFANTILE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE D'ADULTES
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
DELUCHE Elise	CANCEROLOGIE
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL

DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FAVREAU Frédéric	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAUTHIER Tristan	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
HOUETO Jean-Luc	NEUROLOGIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JACQUES Jérémie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
JOUAN Jérôme	CHIRURGIE THORACIQUE ET VASCULAIRE
LABROUSSE François	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
LY Kim	MEDECINE INTERNE
MAGNE Julien	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARCHEIX Pierre-Sylvain	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
OLLIAC Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
ROUCHAUD Aymeric	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION
STURTZ Franck	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
TCHALLA Achille	GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES
TOURE Fatouma	NEPHROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE CHIRURGIE GENERALE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE
YERA Hélène	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE

**PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES
MEDICALES**

BRIE Joël	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE
KARAM Henri-Hani	MEDECINE D'URGENCE
MOREAU Stéphane	EPIDEMOLOGIE CLINIQUE
VANDROUX David	ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
COUVE-DEACON Elodie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
FAYE Pierre-Antoine	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
FREDON Fabien	ANATOMIE/CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
GEYL Sophie	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
LALOZE Jérôme	CHIRURGIE PLASTIQUE
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARGUERITTE François	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
PASCAL Virginie	IMMUNOLOGIE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
SALLE Henri	NEUROCHIRURGIE
SALLE Laurence	ENDOCRINOLOGIE
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO- VASCULAIRE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	----------------

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES ASSOCIES A MI-TEMPS

BELONI Pascale SCIENCES INFIRMIERES
(du 01-09-2021 au 31-08-2022)

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

DUMOITIER Nathalie (Responsable du département de Médecine
Générale)

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

RUDELLE Karen

PROFESSEURS ASSOCIES DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan du 01-09-2019 au 31-08-2025 (PA au 01-09-2022)

LAUCHET Nadège du 01-09-2020 au 31-08-2026 (PA au 01-09-2023)

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

BAUDOT Jean-Pierre du 01-09-2023 au 31-08-2026

BUREAU-YNIESTA Coralie du 01-09-2022 au 31-08-2025

SEVE Léa du 01-09-2021 au 31-08-2024

PROFESSEURS EMERITES

ALDIGIER Jean-Claude du 01.09.2022 au 31.08.2023

DARDE Marie-Laure du 01-09-2021 au 31-08-2023

MABIT Christian du 01-09-2022 au 31-08-2024

MERLE Louis du 01.09.2019 au 31.08.2023

NATHAN-DENIZOT Nathalie du 01-09-2022 au 31-08-2024

TREVES Richard du 01-09-2023 au 31-08-2024

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2023 au 31.08.2024

VIROT Patrice du 01.09.2021 au 31.08.2023

Assistants Hospitaliers Universitaires

APPOURCHAUX Evan	ANATOMIE CHIRURGIE DIGESTIVE
BUSQUET Clémence	HEMATOLOGIE
HAZELAS Pauline	BIOCHIMIE
DUPONT Marine	HEMATOLOGIE BIOLOGIQUE
DURIEUX Marie-Fleur	PARASITOLOGIE
LABRIFFE Marc	PHARMACOLOGIE
LADES Guillaume	BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE
LOPEZ Stéphanie	MEDECINE NUCLEAIRE
MARTIN ép. DE VAULX Laury	ANESTHESIE REANIMATION
MEYER Sylvain	BACTERIOLOGIE VIROLOGIE HYGIENE
MONTMAGNON Noëlie	ANESTHESIE REANIMATION
PASCAL Virginie	IMMUNOLOGIE CLINIQUE
PLATEKER Olivier	ANESTHESIE REANIMATION
ROUX-DAVID Alexia	ANATOMIE CHIRURGIE DIGESTIVE

Chefs de Clinique – Assistants des Hôpitaux

ALBOUYS Jérémie	HEPATO GASTRO ENTEROLOGIE
ARGOULON Nicolas	PNEUMOLOGIE
ASLANBEKOVA Natella	MEDECINE INTERNE
AVRAM Ioan	NEUROLOGIE VASCULAIRE
BEAUJOUAN Florent	CHIRURGIE UROLOGIQUE
BERRAHAL Insaf	NEPHROLOGIE
BLANQUART Anne-Laure	PEDIATRIE (REA)
BOGEY Clément	RADIOLOGIE
BONILLA Anthony	PSYCHIATRIE

BOSCHER Julien	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CAUDRON Sébastien	RADIOLOGIE
CAYLAR Etienne	PSYCHIATRIE ADULTE
CENRAUD Marie	NEUROLOGIE
CHAUBARD Sammara	HEMATOLOGIE
CHAUVET Romain	CHIRURGIE VASCULAIRE
CHROSCIANY Sacha	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE
CURUMTHAULEE Faiz	OPHTALMOLOGIE
DARBAS Tiffany	ONCOLOGIE MEDICALE
DESCHAMPS Nathalie	NEUROLOGIE
DESCLEE de MAREDSOUS Romain	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
DOUSSET Benjamin	CARDIOLOGIE
DUPIRE Nicolas	CARDIOLOGIE
FESTOU Benjamin	MALADIES INFECTIEUSES ET TROPICALES
FIKANI Amine	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE
FORESTIER Géraud	RADIOLOGIE
GEYL Sophie	GASTROENTEROLOGIE
GIOVARA Robin	CHIRURGIE INFANTILE
GUILLAIN Lucie	RHUMATOLOGIE
LAGOUEYTE Benoit	ORL
LAUVRAY Thomas	PEDIATRIE
LEMNOS Leslie	NEUROCHIRURGIE
MAURIANGE TURPIN Gladys	RADIOTHERAPIE
MOHAND O'AMAR ép. DARI Nadia	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
PARREAU Simon	MEDECINE INTERNE

PIRAS Rafaela	MEDECINE D'URGENCE
RATTI Nina	MEDECINE INTERNE
ROCHER Maxime	OPHTALMOLOGIE
SALLEE Camille	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
SANCHEZ Florence	CARDIOLOGIE
SEGUY ép. REBIERE Marion	MEDECINE GERIATRIQUE
SERY Arnaud	ORL
TARDIEU Antoine	GYNECOLOGIE OBSTETRIQUE
THEVENOT Bertrand	PEDOPSYCHIATRIE
TORDJMAN Alix	GYNECOLOGIE MEDICALE
TRICARD Jérémy	CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE MEDECINE VASCULAIRE
VAIDIE Julien	HEMATOLOGIE CLINIQUE
VERNAT-TABARLY Odile	OPHTALMOLOGIE

Chefs de Clinique – Médecine Générale

BOURGAIN Clément

HERAULT Kévin

RUDELLE Karen

Praticiens Hospitaliers Universitaires

CHRISTOU Niki CHIRURGIE VISCERALE ET DIGESTIVE

COMPAGNAT Maxence MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION

HARDY Jérémie CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE

LAFON Thomas MEDECINE D'URGENCE

SALLE Henri NEUROCHIRURGIE

« Chaque parent vient au monde en même temps que son premier enfant » (Ernst Kramer),

à Elio.

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions durant mes recherches.

Je souhaite remercier le **Professeur Karine DURAND** de me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse. Merci en particulier de m'avoir initié à la biologie moléculaire. J'espère que ce travail saura susciter ton intérêt.

Je remercie le **Professeur Mathilde DUCHESNE** d'avoir accepté de juger ce travail. Merci infiniment d'avoir été une coordinatrice bienveillante et accomplie, auprès de laquelle j'apprécie travailler.

Je remercie le **Pr François LABROUSSE** d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de m'avoir enseigné avec bienveillance les bases fondamentales indispensables à ma future pratique.

Je remercie le **Docteur David RIZZO** d'avoir accepté de juger ce travail. Merci d'avoir été à l'initiative de ce projet. Merci spécialement de m'avoir fait découvrir avec enthousiasme l'hématologie biologique. J'espère que ce travail vous donnera satisfaction.

Je remercie également le **Docteur Julie ABRAHAM** d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de vous être rendue disponible l'espace d'une brève réunion, afin de discuter sur ce sujet de thèse, sur lequel nous avons finalement planché pendant deux ans. Merci d'apporter à ce travail un éclairage et une perspective clinique.

Je tiens enfin à remercier tout particulièrement le **Docteur Anne GUYOT**, directrice de ma thèse. Merci d'avoir toujours été disponible pour me guider dans la rédaction de ce travail. Merci pour ton engagement constant auprès des internes. Merci de m'avoir fait découvrir avec passion, dévouement et humanité le métier d'anatomopathologiste. J'ai beaucoup appris, et je suis impatient d'en apprendre encore davantage. Avec toute mon amitié.

A ceux qui ont contribué à mon apprentissage,

Le service d'anatomie pathologique de Limoges. En commençant évidemment par mes co-internes. A **Émeline L.** et **Camille**, avec qui j'ai la frustration de n'avoir pu partager qu'un seul petit semestre, mais dont je garde de très bons souvenirs. A **Antonio**, pour ses « MEMEs » personnalisés. A **Raphaël**, pour sa sortie pêche au lac de Saint-Pardoux (et pour m'avoir confondu avec un cheval), et **Maxence**, qui rigole plus vite (et surtout plus fort) que son ombre, deux figures exemplaires dont ma pratique aspire chaque jour à s'approcher de la leur. J'ai évidemment pris beaucoup de plaisir à travailler avec vous, et je suis impatient de vous retrouver pour cette prochaine année de DJ. A **Amélie**, « ma » co-interne Limougeaude toujours disponible pour m'aider, merci de m'avoir accompagné tout au long de cet internat. A mes co-internes plus jeunes : à **Sébastien**, à **Laura S.**, à **Loïc**. Merci à tous les médecins du service, qui m'ont partagé leur savoir : aux **Dr Aurélie CHARISSOUX**, **Dr Manuella DELAGE CORRE**, **Dr Valère BELLE MBOU**, **Dr Véronique FERMEAUX**, **Dr Isabelle POMMEPUY**. Merci au **Dr Bertrand HERMINAUD**, dont j'ai pu profiter son expérience au cours de son passage en tant qu'assistant. Merci aux techniciens du laboratoire, tout particulièrement ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler en macro : à **Geoffroy**, la petite teigne lyonnaise (dédicace spéciale à la soirée PeakY Blinders), à **Laura**, pour sa douceur, à **Karine G.**, pour

son expérience et sa patience, à **Angèle**, pour ses patés, à **Elodie**, pour sa bonne humeur, à **Marie, Mathieu, Benjamin et Chantale**. Je n'oublie pas le reste de l'équipe, des techniciens aux secrétaires. Une pensée pour **Dan** le pâtissier qui continue d'espérer que le PSG remportera un jour la LDC.

Le laboratoire d'hématologie biologique. A mes co-internes biologistes d'un semestre, à **Sarah** pour sa joie de vivre, à **Nicolas V-M** et son humour pince-sans-rire, à **Fifamè** pour m'avoir offert des cuillères en bois nocives pour la santé, à **Léa V.** qu'on oubliait tout le temps en partant manger, à **Marie-Mathilde** l'hématologue parfait, à **Maxime** le gymnaste aguerri et au petit **Emilien** tout juste thésé.

La Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers. Merci à toute l'équipe d'avoir rendu mon passage plaisant en biologie moléculaire. A **Léa D.**, tata lélé, la DJ à l'accent ensoleillé avec qui j'ai vraisemblablement le plus rigolé. A **Murat**, sans qui ce travail n'aurait probablement pas existé. Merci pour tout le temps que tu as consacré pour m'aider. Merci aussi à **Maeva**, attentionnée. Et enfin merci à **Sophie** et à **Sylvain**, toujours disponibles pour répondre à une question ou relire un travail.

Le laboratoire de Brive-la-gaillarde. Aux **Dr Laura MESTUROUX, Dr Caroline LAVIGNAC et Dr Alexandra LASSERRE**, merci pour votre enseignement et votre disponibilité. Merci de m'avoir fait découvrir toute l'exigence de la pratique libérale. Merci également à tout le reste de l'équipe pour son accueil chaleureuse.

Le département de pathologie de l'Oncopole de Toulouse. Merci tout d'abord à tous mes co-internes : à **Vincent** le philosophe, **Marine C.** la traileuse, **Jessie** la culturiste, **Axelle** enfermée en biomol, **Marie F.** au rire communicatif, **Thomas V.** le bodybuiler, **Ronan** toujours partant pour une bière, **François** l'oncologue parfait, **Thomas P.** le néphrologue parfait, **Zoé** toujours de bonne humeur, **Simon** toujours souriant, **Ophélie** la bodybildeuse, au novice **Romain**, et aux FFI **Aya, Béatrice, Myriam et Safaa**. Merci de votre accueil à Toulouse. Aux hématopathologistes, merci infiniment de tout le savoir que vous m'avait partagé aux cours de ce semestre d'été : au **Pr Pierre BROUSSET**, au **Pr Camille LAURENT** et au **Dr Charlotte SYRYKH**. Merci enfin aux chefs qui ont été en binômes avec moi : aux **Pr Anne GOMEZ-MASCARD, Dr Camille FRANCHET et Dr Philippe ROCHAIX**.

A mes amis,

Mes amis de la faculté de médecine de Toulouse. A toutes nos soirées passées et futures. A **Émeline N.**, ma troisième mamie. A **Marine M.** et **Dave**, dont c'est toujours un plaisir de passer du temps en leur compagnie. A **Léa L.** et **Seb**, le couple modèle d'amour inconditionnel. A **Pauline**, pour son dévouement exemplaire. A **Jastana**, ma sœur née d'une autre mère (et d'un autre père), la valeure sûre. A **Noémie**, toujours occupée, toujours appréciée. A **Maylis**, qui ne se souvient plus de la dernière fois où il a plu à Marseille. Aux 2 ennemies purpanaises **Elora**, calme, et **Louise**, un peu moins calme.

Mes deuxièmes amis de la faculté de médecine de Toulouse. A **Béné** et **Stouph**, pour Denis Brogniart (évidemment), et pour le rôle inestimable qu'ils ont eu au cours de cette année si difficile. Merci de votre amitié. Au reste de la bande, tous devenu malheureusement chirurgiens : à **Julie** (Marguerite) et **Clémentine** (toujours bien sapée), qui ont égayé cette deuxième 6^{ème} année. Je n'oublie pas **Florian** et **Romain**.

A mes amis d'enfance,

A **Marc**, passionné monsieur météo et **Nicolas**, kinésithérapeute dévoué, qui m'ont accompagné pendant ces deux années de première et terminale en européenne Espagnol, alors que je ne savais pas aligné 2 mots. Tout a commencé par le baccalauréat, et c'est en partie grâce à vous que je l'ai réussi.

Mes 2 potes **Martin** et **Quentin**, pour le TFC, Elmander, l'USP, tous les foots faits à VT/les city à Vigoulet, les PDK, Rosas, Maltes, Barcelone, Majorque, et le très récent et douloureux souvenir d'Aix-en-Provence. C'est si facile de se retrouver parfois après des mois sans se parler. J'ai beaucoup de chance de pouvoir compter sur votre amitié.

A ma belle-famille,

A toute ma belle-famille malgache dont je ne peux citer individuellement tous les membres tant elle est grande.

A mes beaux-parents, **Charly** et **Gabrielle**, merci de tout le soutien et de tout l'amour que vous avez pu m'offrir depuis ces longues années.

A **Yann** et **Julia**. A tous les week-end passés ensemble, et à toutes ces discussions qui se sont étirées jusqu'au bout de la nuit.

A ma famille « lointaine »,

que je vois peu mais dont je conserve de précieux souvenirs.

A toute ma famille normande, inévitablement liée au Mont-Saint-Michel dans mon esprit : à papy **Roger** et à mamie **Jacqueline**, aux deux indépendantistes corses **Francine** et **Christian**, mais aussi **Laura**, **Alice**, **Émilie**, **Maryline**, **Jean-Luc**, **Margot**, **Thomas**, **Camille** et **Mathilde**.

A toute ma famille bretonne, inévitablement liée à la pluie (mais aussi à la mer, à la voile, à mes premiers Noël, aux photos dans l'escalier, à mes premières soirées) : à mamie **Angèle**, à **Sophie**, **Yves**, **Quentin**, **Maxime**, **Adrien**, **Jeanne**, **Jean-Luc**, **Pierrick** et **Claudie**, mais aussi au Mauricien **Tristan** dont je jalouse sa nouvelle vie au soleil.

A ma famille proche,

A mon père et à ma mère, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour l'encouragement inestimable que vous m'avez apporté tout au long de mon parcours. Je suis profondément reconnaissant de tout ce que vous avez fait pour moi. Avec tout mon amour.

*A mes frères, qui m'inspirent secrètement. A **Vincent**. Je suis heureux de te voir entouré de toute ta petite famille : à **Anaïs**, **Lucas** et **Hugo**. A **Thibault**, je suis admiratif du kinésithérapeute bienveillant et passionné que tu es devenu. Merci pour avoir été à mes côtés tout au long de cette aventure.*

Aux personnes qui me sont les plus précieuses,

A Elio, mon bouboutch.

A Carole,

ma Bidoche, je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien sans faille et ce depuis tant d'années. Merci de m'avoir suivi jusqu'à Limoges (au bout du monde !). Merci d'être mon premier public, une discrète confidente, et la merveilleuse mère que tu es. Pour tout l'amour que tu as pu m'offrir, à tout le bonheur que tu m'apportes chaque jour, et à toutes ces belles choses qui restent à venir. Je t'aime.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

ABVD : Doxorubicine, Bléomycine, Vinblastine et Dacarbazine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : Adénopathie

AEG : Altération de l'état général

ATCD : Antécédent

Ag : Antigène

AI : Auto-immun

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BCR : B-cell receptor

BEACOPP : Bléomycine, Étoposide, Doxorubicine, Cyclophosphamide, Vincristine, Procarbazine et Prednisone

Béta2mG : Béta2microglobuline

BOM : Biopsie ostéo-médullaire

BV-CHP : Brentixumab, Vedotin, Cyclophosphamide, Hydroxyadriamycine, Prednisone

CCAM : Classification Commune des Actes Médicaux

CFG : champs au fort grossissement

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CNS IPI : *Central Nervous System International Prognostic Index*

COO : *Cell of origin*

Dc : Diagnostic

DGOS : Direction Générale de l'Offre de Soins

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate quelconque

DTT : dithiothréitol

EPI : Tazémétostat

FDC : cellules folliculaires dendritiques

FISH : *Fluorescence In Situ Hybridization*

FLIPI : *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*

FNAC : *Fine Needle Aspiration Cytology*

HCL : *Hairy cell leukemia*

HES : Hémalun Eosine Safran

HSMG : Hépatosplénomégalie
Ig : Immunoglobuline
IGVH : Gène de région variable de chaîne lourde d'immunoglobuline
IHC : Immunohistochimie
INCa : Institut National du Cancer
IPI : *International Prognostic Index*
IPIaa : IPI ajusté à l'âge
LAGC : Lymphome anaplasique à grandes cellules
LBDGC : Lymphome B diffus à grandes cellules
LBDGC non GC : Lymphome B diffus à grandes cellules de profil non centro-germinatif
(= LBDGC ABC = lymphome B diffus à grandes cellules de profil cellule B activée)
LBDGC GC : Lymphome B diffus à grandes cellules de profil centro-germinatif
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LDH : Lactate déshydrogénase
LF : Lymphome folliculaire
LH : Lymphome de Hodgkin
LLC : Leucémie lymphoïde chronique
LLP : Lymphome lymphoplasmocytaire
LM : Lymphome du manteau
LNH : Lymphome non-Hodgkinien
LT : Lymphome T
LTAI : Lymphome T angio-immunoblastique
LT GLG : Leucémie T à grands lymphocytes granuleux
LTNK : Lymphome T natural killer
LTP : Lymphome T périphérique
LYSA : *the lymphoma study association*
LZM : Lymphome de la zone marginale
MCD : *MYD88L265P CD79B*
MIPI : *Mantle cell lymphoma International Prognostic Index*
NFS : Numération Formule Sanguine
NGS : Séquençage de nouvelle génération (*next generation sequencing*)
NK : *Natural killer*
OMS : Organisation mondiale de la Santé
ORL : Otorhinolaryngologie

PCR : *Polymerase Chain reaction*

PS : *Performans Status*

PMBL : lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B

R-CHOP : Rituximab, Cyclophosphamide, Hydroxyadriamycine, Vincristine, Prednisone

R-COP : Rituximab, Cyclophosphamide Vincristine, Prednisone

R-COPADM : Rituximab, Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisone, Doxorubicine, Méthotrexate

RIHN2022 : Référentiel des Actes Innovants Hors Nomenclatures de 2022

R-MPV : Rituximab, Méthotrexate, Procarbazine, Vincristine

RT-PCR : *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain reaction*

Sd : Syndrome

SNC : Système nerveux central

SNS : Survie Nette Standardisée

TCR : *T-cell receptor*

TEP-TDM : Tomographie par Emission de Positons – Tomodensitométrie

L TFH : Lymphome T *Follicular helper*

TTT : Traitement

UMI : *Unique Molecular Identifier*

VS : Variations structurelles

Table des matières

Introduction	26
I. Contexte scientifique général	27
I.1. Prérequis	27
I.1.1. Lymphopoïèse	27
I.1.2. De l'acide désoxyribonucléique (ADN) à la protéine	28
I.1.3. Mutations	28
I.1.4. Voies de signalisation	29
I.1.5. Réarrangements de gènes	29
I.2. Généralités sur les lymphomes	30
I.2.1. Épidémiologie	30
I.2.2. Clinique	31
I.2.3. Diagnostic	31
I.2.3.1. Analyse anatomopathologique	31
I.2.3.2. Analyse biologique	35
I.2.3.2.1. Altérations génétiques	35
I.2.3.2.2. Cellule d'origine (COO)	35
I.2.3.2.3. Profil d'expression	37
I.2.3.3. Cas particuliers des LH	38
I.2.4. Pronostic	38
I.2.5. Traitement	38
I.3. Problématique clinique	39
I.4. États des lieux au laboratoire d'anatomie pathologique et motivations du projet	39
I.5. Objectifs de l'étude	40
II. Matériel et méthode	41
II.1. Schéma d'étude	41
II.2. Population d'étude	41
II.3. Critère d'évaluation	41
II.4. Techniques utilisées	41
II.4.1. Technique anatomopathologique standardisée	41
II.4.2. Test Lymphosign	41
II.4.2.1. Mécanisme	41
II.4.2.2. Réalisation technique	42
II.4.2.3. Critères de qualité	44
II.4.2.3.1. Témoins internes	44
II.4.2.3.2. Nombre de <i>read</i>	44
II.4.2.3.3. Score de qualité et nombre d' <i>Unique Molecular Identifier</i> (UMI)	44
II.4.2.4. Rendu des résultats	44
II.5. Recueil des données	46
II.6. Analyse statistique	47
III. Résultats	48
III.1. Caractéristiques de la population	48
III.1.1. Données cliniques	48
III.1.2. Données anatomopathologiques	49
III.2. Résultats du test Lymphosign	49
III.2.1. Comparaison des cas concordants et discordants	52

III.2.2. Comparaison des cas avec une alerte « Attention : score bas » et les autres.....	52
III.2.3. Calculs de la spécificité du test.....	58
III.2.4. Comparaison de la cellule d'origine avec le diagnostic anatomopathologique	58
III.2.5. Comparaison du grade avec le diagnostic anatomopathologique	59
III.2.6. Corrélation entre l'IHC et l'expression génique du <i>Ki67</i>	59
III.2.7. Étude des marqueurs exprimés par les LBDGC et les lymphomes B à petites cellules	60
III.2.8. Étude des marqueurs exprimés par les LF	62
III.3. Étude des cas discordants	64
IV. Discussion.....	65
IV.1. Forces de l'étude	65
IV.2. Limites de l'étude.....	67
IV.3. Perspectives	68
IV.3.1. Place du test dans le paysage des études moléculaires algorithmiques	68
IV.3.2. Utilisation du test en pratique quotidienne	69
Conclusion	71
Références bibliographiques	72
Annexes	77
Serment d'Hippocrate.....	91

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma résumant les étapes de la synthèse d'une protéine.	28
Figure 2 : Schéma résumant les principales voies de signalisation connues.	29
Figure 3 : Schéma expliquant la corrélation entre la différenciation du lymphocyte originel et le lymphome correspondant.	30
Figure 4 : Répartition des sous-types d'hémopathies lymphoïdes à cellules B (A) et T (B) matures.	31
Figure 5 : Exemples d'une architecture nodulaire (A) et d'une architecture diffuse (B).....	32
Figure 6 : Exemples de petites cellules (A) et de grandes cellules (B).....	33
Figure 7 : Exemple d'un LH classique scléro-nodulaire.....	34
Figure 8 : Exemple d'interprétation de plusieurs IHC dans le cadre d'un LF	34
Figure 9 : Algorithme de Hans permettant une classification du phénotype GC ou non GC d'un LBDGC en se basant sur l'analyse IHC du CD10, BCL6 et MUM1.....	35
Figure 10 : Récapitulatif de l'ensemble des gènes analysés par le test Lymphosign.	37
Figure 11 : Schéma expliquant le mécanisme du test Lymphosign.....	42
Figure 12 : Exemple de rendu de résultat Lymphosign : probabilité de cellules B/T, COO, grade, classement principal et classement différentiel.	45
Figure 13 : Exemple d'un rendu de résultat Lymphosign sur la plateforme Artemis : les 30 marqueurs les plus discriminants (significatifs) entre le classement principal et le classement différentiel.....	46
Figure 14 : Répartition des différents sous-types de lymphomes diagnostiqués par l'anatomopathologie dans notre étude.....	50
Figure 15 : Résultats du classement par le test Lymphosign réalisé dans notre étude.	50
Figure 16 : Diagramme de flux représentant les résultats du test Lymphosign par rapport au diagnostic anatomopathologique.	51
Figure 17 : Comparaison de la cellule d'origine donnée par le test Lymphosign, avec le diagnostic anatomopathologique pour les lymphomes B.	58
Figure 18 : Probabilité de classement en lymphome de haut grade par le test Lymphosign selon les diagnostics réalisés en anatomopathologie.	59
Figure 19 : Corrélation entre l'index de prolifération estimé par l'anatomopathologiste et l'expression du Ki67 évaluée par le test Lymphosign.....	60
Figure 20 : Comparaison des profils d'expressions observés pour les LBDGC et les lymphomes B à petites cellules.	61
Figure 21 : Comparaison de la probabilité de classement en lymphome de haut grade et de l'expression du Ki67 entre les LF et les LBDGC diagnostiqués en anatomopathologie.....	62
Figure 22 : Comparaison de l'expression du <i>CD10</i> , du <i>BCL6 exon3-4</i> et du <i>BCL6 exon 1-2</i> entre les LF et les lymphomes B à petites cellules non LF diagnostiqués en anatomopathologie.	63

Figure 23 : Proposition d'un algorithme décisionnel intégrant le test Lymphosign dans la prise de décision de l'anatomopathologiste au cours d'un prélèvement suspect de lymphome.69

Figure 24 : Comparaison du marquage IHC avec l'expression génique détectée par le test Lymphosign pour les marqueurs CD23, CD10, CD30, BCL2, BCL6 et Cycline D1.81

Figure 25 : Premier cas de LF classé en LZM par le test Lymphosign.....82

Figure 26 : Second cas de LF classé en LZM par le test Lymphosign.82

Table des tableaux

Tableau 1 : Résumé des principales altérations génétiques détectées dans les lymphomes les plus fréquents.	36
Tableau 2 : Nombre et épaisseur des copeaux selon la surface tumorale.	43
Tableau 3 : Caractéristiques démographiques des patients évalués dans notre étude.	53
Tableau 4 : Caractéristiques cliniques (1/2) des patients évalués dans notre étude.	53
Tableau 5 : Caractéristiques cliniques (2/2) des patients évalués dans notre étude.	54
Tableau 6 : Caractéristiques biologiques des patients évalués dans notre étude.	54
Tableau 7 : Caractéristiques anatomopathologiques (1/2) des patients évalués dans notre étude.	55
Tableau 8 : Caractéristiques anatomopathologiques (2/2) des patients évalués dans notre étude.	56
Tableau 9 : Caractéristiques des résultats du test Lymphosign évalués dans le cadre de notre étude.	57
Tableau 10 : Sensibilité et spécificité du test Lymphosign.	58
Tableau 11 : Résumé du classement définitif des cas discordants, obtenue après réinterprétation des données Lymphosign et deuxième lecture anatomopathologique.	64

Introduction

Les lymphomes sont des tumeurs du système lymphoïde dont le diagnostic nécessite une approche multiparamétrique complexe (clinique, imagerie, morphologie, immunophénotypage, génétique), et dont l'analyse anatomopathologique est l'examen de référence.

L'impact du diagnostic initial sur le pronostic et la prise en charge des patients a rendu nécessaire l'établissement du réseau LYMPHOPATH, réseau national de double lecture par l'Institut National du Cancer (INCa), dont fait partie le laboratoire d'anatomie pathologique du centre hospitalier universitaire (CHU) de Limoges. Récemment, l'essor de la biologie moléculaire avec le séquençage très haut débit (NGS) a permis une actualisation de la classification des lymphomes, un ajustement de leur pronostic et une ouverture à la médecine personnalisée. Devant l'importance d'un diagnostic précis et l'augmentation croissante des données génétiques, le *Lymphoma Study Association* (LYSA), principal groupe national de coopérateurs dans le lymphome, a appuyé la mise en place d'un test de biologie moléculaire, le test Lymphosign, au sein des Plateformes de Génétique Moléculaire des Cancers (PGMC). Ce test est directement issu du transfert de la recherche vers l'industrialisation, et étudie le profil d'expression de 137 gènes, automatiquement interprété par un algorithme. Le résultat de ce test renseigne sur le grade du lymphome, la cellule d'origine (COO), et conclue en calculant une probabilité de classement parmi 12 lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) les plus fréquemment identifiés.

Actuellement au sein du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Limoges, les analyses génétiques des lymphomes sont réalisées par techniques ciblées : *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH), étude du réarrangement des gènes du *T-cell receptor* (TCR) et des immunoglobulines (Ig). L'utilisation de certaines techniques de biologie moléculaire, recommandées par les instances scientifiques, nécessite parfois l'appui de plateformes extérieures au CHU de Limoges, afin que les patients puissent bénéficier des récentes avancées diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques de la médecine personnalisée.

L'intérêt de ce projet est l'internalisation de ces techniques au sein de la PGMC du CHU de Limoges, ce qui permettra d'optimiser l'efficacité médico-économique du parcours de soin en apportant des résultats supplémentaires sur des caractéristiques génétiques encore non étudiées au CHU. L'analyse du transcriptome par le test Lymphosign présente un angle d'étude idéal car il est l'élément de convergence de l'ensemble des altérations génétiques, génomiques ou épigénétiques significatives d'un lymphome. Notre étude encadrera sa mise en place et consistera à réaliser cette technique sur 30 LNH sélectionnés à partir des archives disponibles au CRBioLim. L'objectif principal de cette étude est de comparer les résultats du test Lymphosign avec les diagnostics posés par l'examen anatomopathologique. Nos objectifs secondaires consistent en l'étude de tous les marqueurs diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques apportés par le test Lymphosign.

I. Contexte scientifique général

I.1. Prérequis

I.1.1. Lymphopoïèse

Un lymphocyte est une cellule immunitaire spécialisée jouant un rôle central dans le système immunitaire adaptatif. Les lymphocytes sont produits dans les organes lymphoïdes primaires, tels que la moelle osseuse et le thymus, et circulent ensuite dans tout le corps, surveillant et participant à la réponse immunitaire. Ces lymphocytes subissent des processus de différenciation, leurs permettant l'acquisition d'une structure et d'une fonction propre à un type cellulaire spécifique (lymphocyte B mémoire, lymphocyte T helper...). Il existe principalement trois types de lymphocytes : les lymphocytes B, les lymphocytes T et lymphocytes *natural killer* (NK), que nous n'aborderons pas ici (1).

- Lymphopoïèse B

Les lymphocytes B sont responsables de la production d'anticorps, des protéines spécifiques qui se lient aux antigènes (Ag) pour les neutraliser. La première étape de la vie d'un lymphocyte B se déroule dans la moelle osseuse : c'est la différenciation indépendante de l'Ag, avec notamment les mécanismes de réarrangements des immunoglobulines, qui a pour finalité la production du *B-cell receptor* (BCR) à la surface de la cellule. Ensuite, les lymphocytes B naïfs migrent au sein des follicules primaires pour initier la différenciation dépendante de l'Ag. Ils vont reconnaître un Ag présenté par les cellules folliculaires dendritiques. Une partie de ces lymphocytes B activés prolifère pour initier la réaction du centre germinatif. Le centre germinatif est divisé en deux compartiments : la zone sombre et la zone claire. Dans la zone sombre, les centroblastes sont soumis à des hypermutations somatiques au niveau des régions variables des chaînes lourdes et légères de l'Ig, ceci afin d'augmenter leur affinité pour l'Ag. Une fois dans la zone claire, les centrocytes expriment un nouveau BCR modifié par les mutations. Ils rentrent en compétition pour la sélection clonale et seuls ceux avec un BCR de forte affinité survivent. A ce stade les cellules vont subir une commutation de classe pour produire un isotype différent afin d'acquérir de nouvelles fonctions effectrices. Les centrocytes quittent ensuite le centre germinatif pour se différencier en immunoblastes ou en lymphocytes B mémoire.

- Lymphopoïèse T

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans la coordination de la réponse immunitaire. La lymphopoïèse T commence par la migration de cellules souches hématopoïétiques à partir de la moelle osseuse vers le thymus. Dans le thymus, ces cellules souches subissent plusieurs étapes de différenciation et de maturation pour devenir des lymphocytes T fonctionnels. Les cellules souches qui atteignent le thymus sont d'abord appelées lymphocytes T « double-négatifs » en raison de l'absence d'expression des marqueurs CD4 et CD8, qui sont des protéines de surfaces spécifiques. Pendant cette phase, les cellules subissent une série de réarrangements génétiques pour former un récepteur d'Ag unique, appelé TCR. Celles qui réussissent à produire un TCR fonctionnel passent à la phase double-positif, au cours de laquelle elles expriment à la fois les marqueurs CD4 et CD8. Les cellules T survivantes après les sélections positive et négative deviennent ensuite soit des cellules CD4+ soit des cellules CD8+. Les cellules CD4+ sont appelées lymphocytes T helper. Ils reconnaissent les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) présentes sur les cellules

présentatrices d'Ag. Les cellules CD8+ sont appelées lymphocytes T cytotoxiques. Ils reconnaissent les molécules du CMH I présentes sur toutes les cellules de l'organisme. Les cellules T matures quittent ensuite le thymus et entrent dans la circulation sanguine pour atteindre les tissus lymphoïdes périphériques, tels que les ganglions lymphatiques, la rate et les amygdales. Là, elles deviennent des acteurs clés de la réponse immunitaire adaptative, aidant à reconnaître et à combattre les agents pathogènes.

1.1.2. De l'acide désoxyribonucléique (ADN) à la protéine

L'ADN et l'acide ribonucléique (ARN) sont des molécules qui présentent des différences au niveau de leur structure et de leur fonction dans la cellule. L'ADN représente la matrice de toutes les cellules d'un organisme et comporte le cryptage des gènes. Ces gènes permettent la synthèse de protéines (figure 1). Ces dernières sont essentielles à l'organisme, elles y jouent un rôle structural (au niveau musculaire ou encore cutané) mais sont également impliquées dans de très nombreux processus tels que la réponse immunitaire (anticorps), le transport de l'oxygène dans l'organisme (hémoglobine), ou encore la digestion (enzymes digestives). Ainsi, une cellule, selon sa fonction, n'aura besoin que de certaines protéines. C'est pourquoi seuls quelques gènes sont exprimés au sein d'une cellule, en fonction de la différenciation et du rôle de cette dernière dans l'organisme. Dans le processus d'expression génique, encore appelé transcription, les gènes codés sur l'ADN sont recopiés et transcrits en molécules d'ARN. Ce sont ces molécules d'ARN qui permettront la formation des protéines au cours de la traduction.

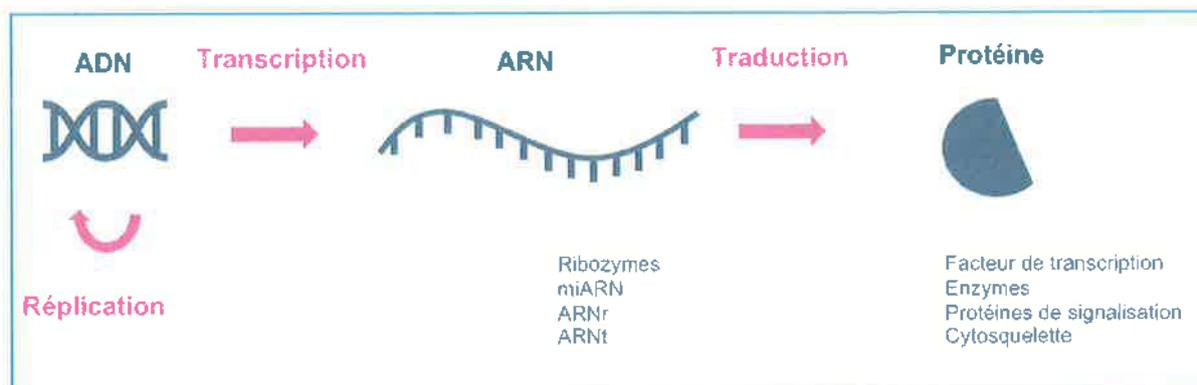


Figure 1 : Schéma résumant les étapes de la synthèse d'une protéine.

Source : Adaptation de « Du gène aux ARNs et aux protéines » [illustration], dans *Contrôle de la transcription*, sur le site <https://bcgdevelop.fr/contrôle-de-la-transcription/> consulté le 21/08/2023

Contrairement à l'ADN, qui est défini à la naissance et change peu au cours de la vie, l'ARN est en constante évolution, reflétant l'état de santé général de la cellule, de l'organe et de l'organisme auquel il appartient. Il s'agit ainsi d'un très bon marqueur biologique pour apprécier la physiologie d'une cellule cancéreuse, par exemple les voies de signalisation préférentiellement utilisées.

1.1.3. Mutations

Une mutation est définie comme une modification permanente de la séquence de l'ADN. Les altérations génétiques constitutionnelles, héritées d'un parent, également appelées mutations germinales, sont présentes dans toutes les cellules d'un organisme, et se différencient des altérations génétiques acquises ou somatiques, qui surviennent à un moment donné de la vie et ne sont présentes que dans certaines cellules (par exemple au sein d'une tumeur, comme un lymphome). Ces altérations peuvent être causées par des facteurs environnementaux, ou

peuvent se produire si une erreur est commise lors de la réplication de l'ADN. L'impact d'une mutation sur le fonctionnement d'une cellule diffère selon la région touchée.

1.1.4. Voies de signalisation

La signalisation cellulaire est un système complexe de communication qui régit les processus fondamentaux des cellules et coordonne leur activité. Ainsi, de nombreux récepteurs situés à la surface de la cellule, vont interagir avec un ligand. Une fois activé par cette interaction ligand-récepteur, le récepteur interagit avec d'autres protéines au sein de la cellule avant que l'effet physiologique du ligand sur le comportement de la cellule ne se manifeste. Il arrive fréquemment que le fonctionnement d'une chaîne de plusieurs protéines cellulaires en interaction soit modifié à la suite de l'activation du récepteur. L'ensemble des modifications cellulaires induites par l'activation du récepteur est appelé voie ou mécanisme de transduction du signal.

La figure 2 résume les grandes voies de signalisation connues (Notch, ERK/MAP kinase, Jak/Stat, PI3K, Hedgehog, mTOR et NF-κB).

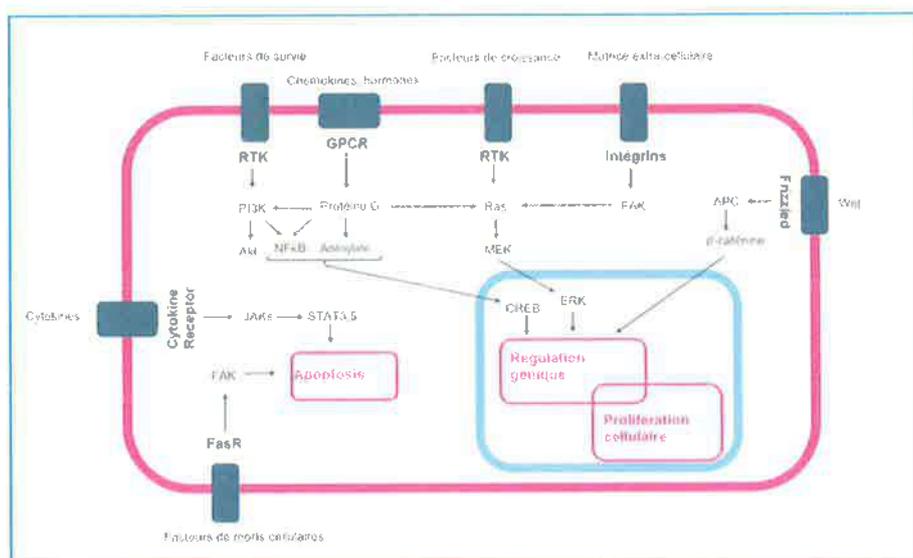


Figure 2 : Schéma résumant les principales voies de signalisation connues.

Source : Adaptation de Toussiroit Eric (2010). *Réflexions rhumatologiques*. Paris : JBH Santé, 47 pages.

1.1.5. Réarrangements de gènes

Un réarrangement de gène est un élément dynamique parfois physiologique (par exemple le réarrangement des gènes des Ig pendant la différenciation indépendante de l'Ag), au cours duquel un génome voit son organisation générale modifiée. Ces réarrangements peuvent se voir à l'échelle génique (inversion, délétion, duplication de séquences, fusion de gènes) ou à l'échelle chromosomique (duplication et perte de chromosome, fusion de deux chromosomes, translocations entre deux chromosomes).

I.2. Généralités sur les lymphomes

Les lymphomes sont des tumeurs du système lymphoïde qui résultent d'une prolifération d'un clone lymphocytaire. Un clone lymphocytaire correspond à un groupe de lymphocytes présentant un même patrimoine génétique, issus d'un lymphocyte originel, obtenu par mitoses successives. Ce clone est caractérisé par le stade de différenciation du lymphocyte originel, mais aussi par l'ensemble de ses altérations moléculaires acquises (mutations, réarrangements...).

La classification de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) des tissus lymphoïdes et hématopoïétiques de 2020 (2) est basée sur de multiples paramètres, incluant la présentation clinique, l'imagerie, l'aspect morphologique, l'immunophénotypage et la génétique. Le diagnostic est ainsi rendu complexe par le nombre d'entités décrites (> 90) et la diversité des analyses disponibles (2,3). Schématiquement, les lymphomes sont classés selon le stade de différenciation du lymphocyte à l'origine du clone lymphocytaire. Par exemple, comme le montre la figure 3, les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) sont issues d'un lymphocyte B naïf tout juste sorti de la moelle osseuse et n'ayant pas encore été activé au sein du centre germinatif d'un follicule ganglionnaire, alors que les lymphomes de la zone marginale (LZM) sont issus d'un lymphocyte B mémoire activé.

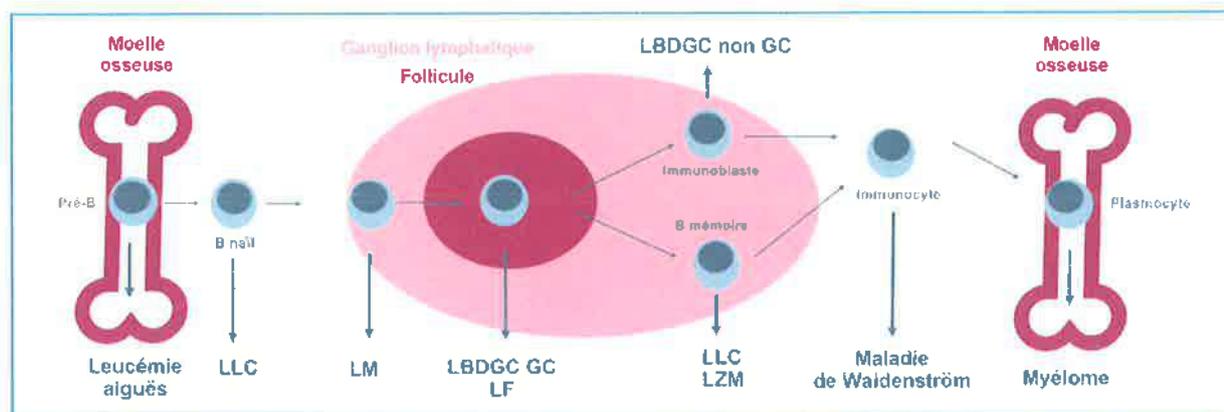


Figure 3 : Schéma expliquant la corrélation entre la différenciation du lymphocyte originel et le lymphome correspondant.

Source : Adaptation de Garban Frédéric (2001). Guide pratique des hémopathies malignes. Paris : Mmi, 255 p.

I.2.1. Épidémiologie

En 2018, le nombre de nouveaux cas d'hémopathies malignes en France métropolitaine est estimé à 45 000 (25 000 chez l'homme et 20 000 chez la femme), représentant près de 12 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancer (5). Environ deux tiers des cas sont des hémopathies lymphoïdes.

Selon la classification de l'OMS, les hémopathies lymphoïdes regroupent les hémopathies lymphoïdes à cellules B matures, les hémopathies à cellules T matures et NK, le lymphome de Hodgkin (LH), les maladies lymphoprolifératives post transplantation d'organe et les tumeurs à cellules histiocytaires et dendritiques. Les hémopathies lymphoïdes à cellules B matures représentent à elles seules plus de 90 % des hémopathies lymphoïdes, et regroupent 34 entités différentes : les plus fréquentes sont le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) et le lymphome folliculaire (LF) (figure 4).

Les hémopathies lymphoïdes à cellules T matures sont moins fréquentes et regroupent le lymphome T périphérique (LTP), le lymphome T de type *Follicular Helper* (LTFH) dont le lymphome T angio-immunoblastique (LTAI), le lymphome anaplasique à grandes cellules (LAGC) ALK+, le LAGC ALK-, la lymphoprolifération à cellules NK (LTNK) et le lymphomes T associé aux entéropathies (figure 4).

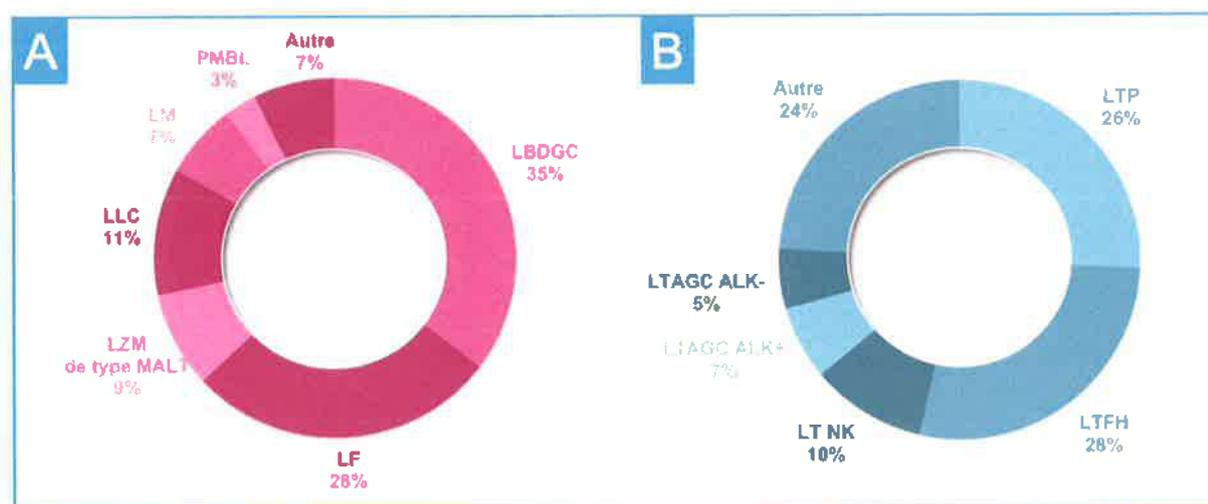


Figure 4 : Répartition des sous-types d'hémopathies lymphoïdes à cellules B (A) et T (B) matures. MALT = tissu lymphoïde associé aux muqueuses.

Source : Adaptation de WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Haematolymphoid tumours*. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer ; (WHO classification of tumours series, 5th ed., vol. 11).

I.2.2. Clinique

Les lymphomes se manifestent typiquement par des adénopathies (ADP) douloureuses associées à une altération de l'état général (AEG) avec notamment la présence de « signes B » : fièvre, perte de poids et sueurs nocturnes (6).

I.2.3. Diagnostic

I.2.3.1. Analyse anatomopathologique

L'analyse anatomopathologique d'une cible accessible à une biopsie (par exemple une ADP) est l'examen de référence. Une approche multiparamétrique a été adoptée dans la classification OMS 2020 : la morphologie (par une coloration standard à l'hémalun éosine safran - HES), l'immunophénotypage par technique immunohistochimique (IHC) et les caractéristiques génétiques sont autant d'aspects qui doivent être pris en compte pour un diagnostic précis.

De manière simplifiée, l'anatomopathologiste, devant un cas suspect de lymphome, évalue l'architecture de la prolifération tumorale, la taille et l'aspect des cellules tumorales, le fond ou stroma tumoral accompagnant les cellules tumorales puis analyse l'étude immunophénotypique de ces cellules.

- Analyse de l'architecture

On distingue deux grands types d'architecture qui peuvent être mêlés et sont représentés par la figure 5 : l'architecture nodulaire (souligné par les follicules du LF, ou encore par les centres

de proliférations décrits dans les LLC), et l'architecture diffuse (orientant vers un LBDGC, une LLC, un LZM ou un lymphome du manteau (LM) entre autres).

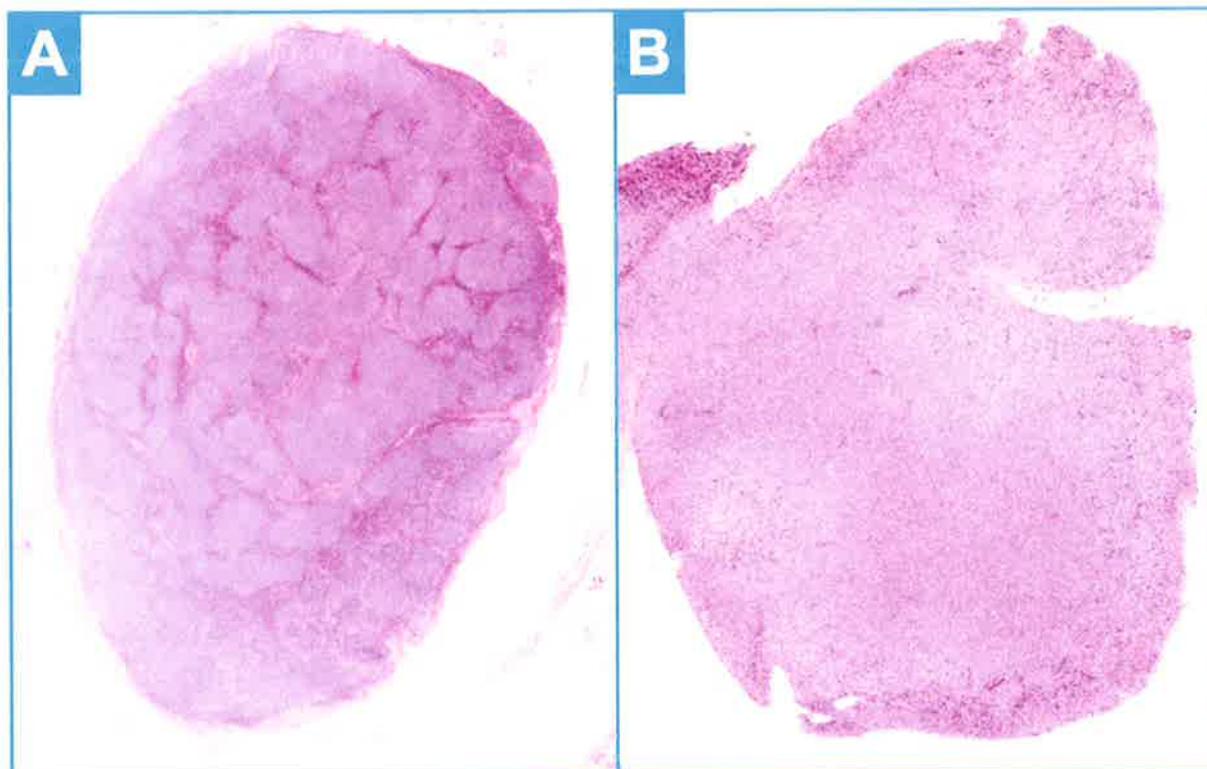


Figure 5 : Exemples d'une architecture nodulaire (A) et d'une architecture diffuse (B).

Source : images fournies par le laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Labrousse.

- Analyse de la taille des cellules

L'analyse de la taille des cellules est fondamentale dans l'orientation du diagnostic (figure 6). Des petites cellules orientent vers les lymphomes B à petites cellules (LF, LM, LLC, LZM, lymphome lymphoplasmocytaire (LLP)). Des grandes cellules orientent vers une pathologie de haut grade : le LBDGC (la plus fréquente), le lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B (PMBL), le lymphome de Burkitt ou encore le LAGC.

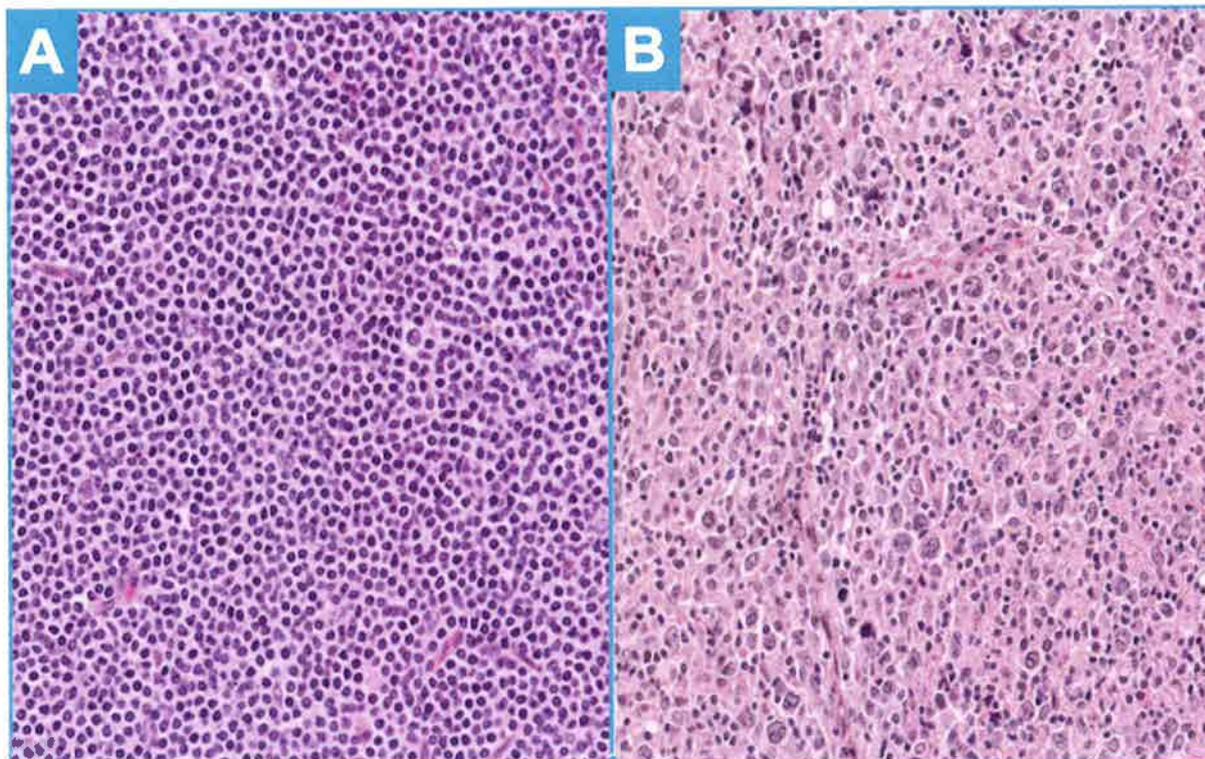


Figure 6 : Exemples de petites cellules (A) et de grandes cellules (B).

Source : images fournies par le laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Labrousse.

- Aspect morphologique des cellules, des noyaux et du fond

Ensuite, l'interprétation anatomopathologique se concentre sur l'aspect morphologique des cellules : des cellules monocytoïdes sont décrites dans les LZM, des lympho-plasmocytes sont observés dans les LLP, des cellules avec un cytoplasme abondant présentant des projections « chevelues » sont classiques dans les *hairy cell leukemia* (HCL).

L'analyse des noyaux tumoraux permet d'orienter le diagnostic vers un LF (noyau anguleux), un LM (noyau clivé ou incisuré), un LH (volumineuses cellules tumorales nucléolées en faveur de cellules de Hodgkin).

Le fond est parfois fibreux (en faveur d'un LH scléro-nodulaire, d'un PMBL), ou présente un aspect de ciel étoilé (présence de macrophages à corps tingibles, orientant vers un lymphome de Burkitt). La présence d'un fond granulomateux avec des polynucléaires éosinophiles oriente vers un LH classique ou vers un LTAI, comme on peut le voir dans la figure 7. Une population d'accompagnement riche en histiocytes appuiera le diagnostic de LBDGC riche en lymphocyte T/histiocytes.

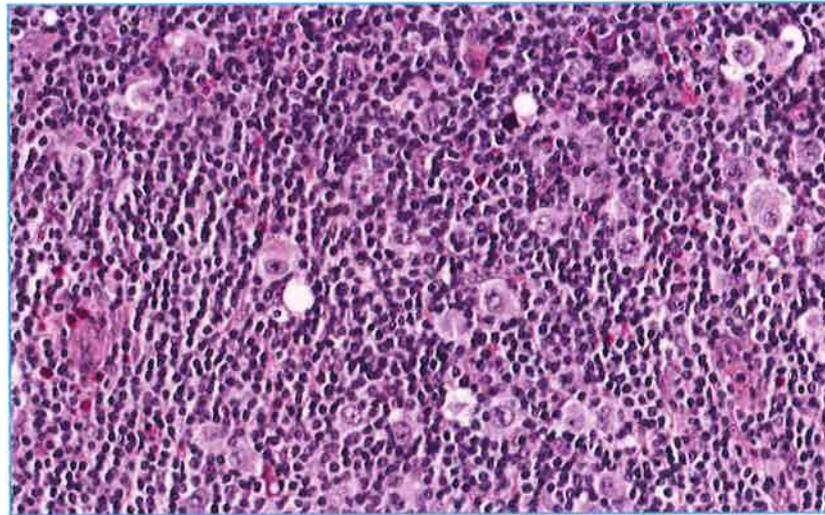


Figure 7 : Exemple d'un LH classique scléro-nodulaire.
 Notez la présence de polynucléaires éosinophiles dans le fond.

Source : image fournie par le laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Labrousse.

- Analyse IHC

Ce temps d'analyse permet de préciser l'immunophénotype des cellules tumorales, et de poser le diagnostic le plus précis possible. Une analyse comparative entre la lame colorée à l'HES et les différentes techniques IHC est primordiale (figure 8) : l'interprétation du marquage doit tenir compte de la localisation des cellules au sein du ganglion.

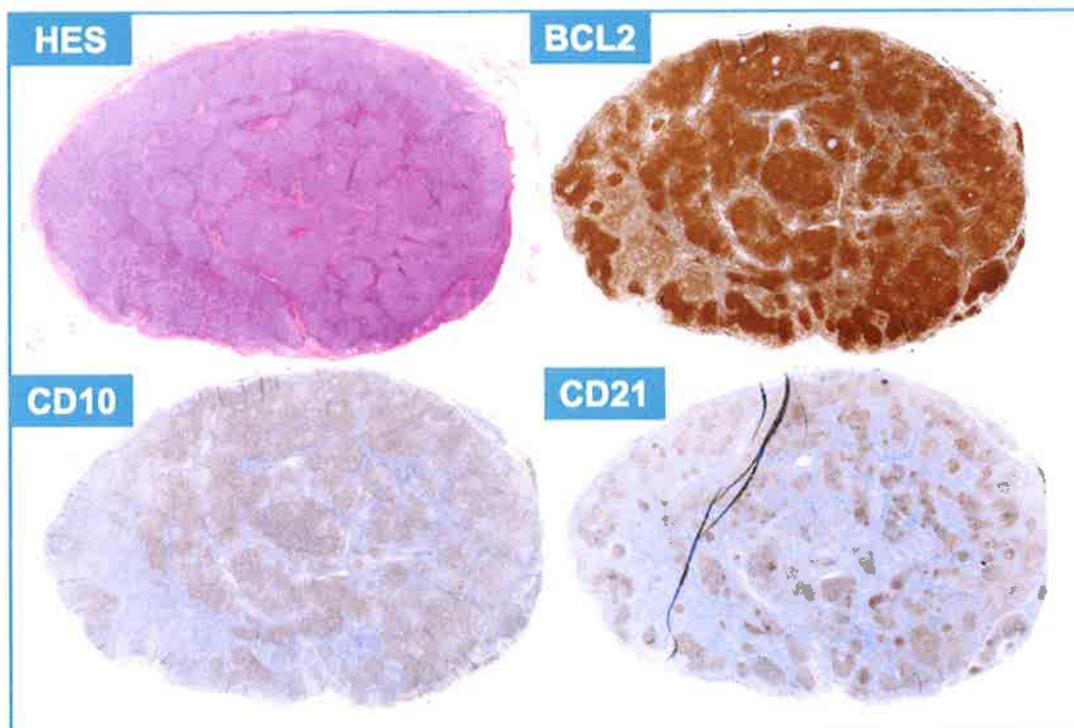


Figure 8 : Exemple d'interprétation de plusieurs IHC dans le cadre d'un LF (BCL2 +, CD10 +, réseau hyperplasique de cellules folliculaires dendritiques (FDC) qui sont CD21+).

Source : images fournies par le laboratoire d'anatomie pathologique du Pr Labrousse.

I.2.3.2. Analyse biologique

Récemment, l'essor de la biologie moléculaire avec le NGS a permis une actualisation de la classification des lymphomes, un ajustement de leur pronostic et une ouverture à la médecine personnalisée. La classification OMS 2020 précise que certaines altérations génétiques sont caractéristiques, mais non spécifiques, d'un lymphome.

I.2.3.2.1. Altérations génétiques

Le tableau 1 résume les altérations génétiques (mutations, voies de signalisation et réarrangements) détectées dans les principaux lymphomes. Une description des biomarqueurs pronostiques et thérapeutiques est disponible en annexes 1 et 2.

I.2.3.2.2. Cellule d'origine (COO)

De récentes études se sont attachées à analyser l'ARN présent au sein des cellules tumorales des lymphomes. L'analyse de l'ARN permet d'étudier le profil d'expression de certains gènes, et d'en déduire les voies de signalisation préférentiellement utilisées ou encore les mécanismes épigénétiques actionnés.

La première application pratique de ce profil d'expression a été la description de deux sous-types moléculaires de LBDGC : environ 80 % des LBDGC présentent une COO ayant les mêmes caractéristiques moléculaires que les cellules du centre germinatif. Ces cas ont été appelés LBDGC de type centro-germinatif (LBDGC GC). Les autres LBDGC présentent une COO avec les caractéristiques moléculaires de cellules ayant déjà été activées par un passage préalable par le centre germinatif. Ces cas ont été appelés LBDGC de type B activé (LBDGC ABC), que l'on peut aussi nommer LBDGC non GC (7). Un peu plus tard, un troisième sous-type de COO de LBDGC a été décrit (comme ayant pour origine une dérégulation des cellules thymiques), correspondant aux PMBL (8).

Cette classification explique une partie de l'hétérogénéité des résultats cliniques des LBDGC après une chimiothérapie R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone) (9). L'étude de la COO par le profilage génomique a été extrapolée à l'IHC. Ainsi, la COO est déterminée par les anatomopathologistes à l'aide de l'algorithme de Hans, basé sur l'étude IHC des protéines CD10, BCL6 et MUM1 (figure 9).

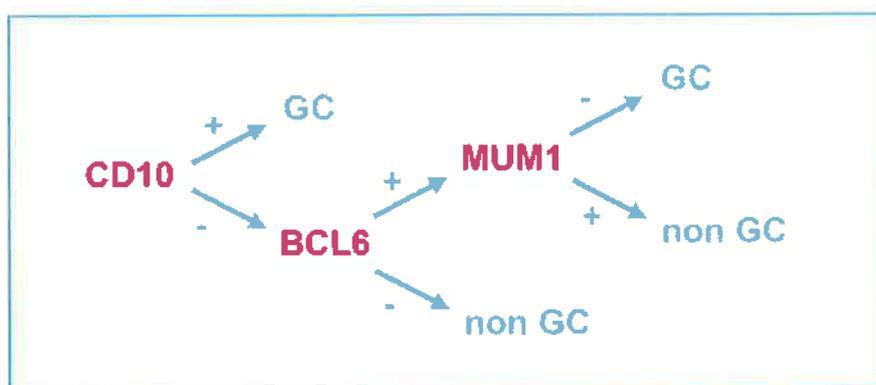


Figure 9 : Algorithme de Hans permettant une classification du phénotype GC ou non GC d'un LBDGC en se basant sur l'analyse IHC du CD10, BCL6 et MUM1.

Source : Adaptation de Hans CP, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray, Blood, 2004, vol. 103 1 (pg. 275 -282)

Tableau 1 : Résumé des principales altérations génétiques détectées dans les lymphomes les plus fréquents.

Lymphome	Mutation	Voies de signalisation	Réarrangement	Réf.
LTAI	<i>IDH2 R172K/T, RHOA, TET2, DNMT3A</i>			(10)
L TFH folliculaires			<i>SYK-ITK</i>	(11)
LTP	Deux sous-types moléculaires : <i>GATA3 et TBX21</i>		Caryotypes complexes	(12) (13)
PMBL	<i>XPO1 E571K, STAT6, TNFAIP3, SOCS1, CIITA, GNA13, B2M, CD58, ITPKB, MFHAS1, KMT2D</i>	JAK2		(14) (2) (15)
LLP	<i>MYD88 L265P</i> <i>CXCR4</i>			(16)
LBDGC non GC	<i>MYD88, KMT2D, PIM1, CD79B, PRDM1, TP53, TNFAIP3, IRF4, CARD11</i>	NF-κB,		(17)
LBDGC GC	<i>KMT2D, CREBBP, BCL2, MEF2B, B2M, EZH2, TP53, SOCS1, ITPKB, STAT6, FOXO1, GNA13, NOTCH2</i>	Épigénétique		
L. de haut grade			<i>MYC, BCL2, BCL6</i>	(18)
L. de Burkitt			<i>MYC, ID3, DDX3X, CDKN2A</i>	(19)
LF	<i>STAT6</i> (LF inguinal diffus) Score FLIPI (<i>EP300, EZH2, CARD11, CREBBP, MEF2B, FOXO1, ARID1A</i>)	mTOR, NF-κB, JAK/STAT	<i>BCL2 (85 %)</i> <i>BCL6 (10 %)</i>	(20) (21) (22) (23)
LZM	<i>TNFAIP3</i> (LZM de type MALT)	NOTCH	<i>MALT1, BIRC3, IGH</i>	(25)
LAGC ALK-			<i>DUSP22-IRF4</i> <i>TP63</i>	(26) (27) (28)
LAGC ALK+			<i>ALK</i>	(29)
LLC	<i>IGHV</i>			
LM	<i>ATM, TP53, CCND1, KMT2D, NSD2, SMARCA4, UBR5, BIRC3, NOTCH1, S1PR1, CARD11</i>		<i>BCL1, CCND2, CCND3</i>	(30) (2)

Par extension, on peut généralement différencier les LF des autres lymphomes B à petites cellules, la cellule d'origine des LF étant classiquement centro-germinative (31). Ainsi, les LF sont caractérisés par un profil GC (*BCL6*, *MYBL1*, *CD10* et *LMO2*) associé à une expression augmentée de cellules T (*CD28*, *ICOS*). Les autres lymphomes B à petites cellules (LLC, LZM, LM, LLP) sont caractérisés par de nombreux marqueurs de lymphocytes B activés (*LIMD1*, *TACI*, *SH3BP5*, *CCDC50*, *IRF4* et *FOXP1*), cohérents avec l'origine tardive GC ou mémoire des lymphocytes B (31).

La cellule d'origine des lymphomes T permet de distinguer les lymphomes T cytotoxiques (englobant les LAGC ALK+ et ALK-) des lymphomes T helper (comprenant les lymphomes TFH) (32).

1.2.3.2.3. Profil d'expression

Au regard du nombre croissant de marqueurs étudiés et de la complexité à interpréter ces données, plusieurs études ont évalué l'intérêt d'un séquençage haut débit associé à l'utilisation d'algorithme informatique dans la prise en charge des lymphomes (33,34). Ces études ne se limitent plus à la description de la COO, mais plus largement à un classement en un lymphome spécifique.

Le LYSA, a appuyé la mise en place du test Lymphosign. Ce test est directement issu du transfert de la recherche vers l'industrialisation et a déjà fait l'objet de publications (31,35). Développé par la société Genexpath, il utilise une méthode de *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain reaction* (RT-PCR) dépendante de ligation. Cette technique semi-quantitative permet d'évaluer simultanément le transcriptome (c'est-à-dire le profil d'expression génétique) de 137 gènes (figure 10).

ABC markers	GCB markers	PMBL markers	Double Expressors	Other markers
<i>TACI</i>	<i>CD10</i>	<i>IL4II1</i>	<i>BCL2 #1 (exon1-2)</i>	<i>EBER1</i>
<i>FOXP1</i>	<i>LMO2</i>	<i>CD28</i>	<i>BCL2 #2 (exon2-3)</i>	<i>HTLV1</i>
<i>LIMD1</i>	<i>ASB13</i>	<i>CD30</i>	<i>MYC #1 (exon1-2)</i>	<i>KI67</i>
<i>IRF4</i>	<i>NEK6</i>	<i>MAL</i>	<i>MYC #2 (exon2-3)</i>	<i>CD68</i>
<i>PIM2</i>	<i>MYB11</i>	<i>CD95</i>		<i>CD163</i>
<i>CCDC50</i>	<i>MAML3</i>	<i>CD71</i>	T cell	<i>CCND1</i>
<i>CREB3L2</i>	<i>ITPKB</i>	<i>PGPR1</i>	<i>TCRa</i>	<i>CCND2</i>
<i>CYBBR2</i>	<i>SERPINA9</i>	<i>JAK2</i>	<i>TCR δ</i>	<i>ZAP70</i>
<i>SH3BP5</i>	<i>SIPR2</i>	<i>TRAF1</i>	<i>TCRγ</i>	<i>ANKA1</i>
<i>RAB7L1</i>	<i>BCL6#1 (exon1-2)</i>	<i>STAT6</i>	<i>TCR δ</i>	<i>CRBN</i>
	<i>BCL6#2 (exon3-4)</i>	<i>PD-L1</i>	<i>CD3</i>	<i>STAT6</i>
		<i>PD-L2</i>	<i>CD5</i>	<i>APRIL</i>
			<i>CD4</i>	<i>BAFF</i>
			<i>CD8</i>	<i>BCMA</i>
B cell	Ig genes	Gene fusions	<i>TBET</i>	<i>CCR4</i>
<i>CD19</i>	<i>Iα-Cα</i>	<i>BCL6-Cα</i>	<i>INF γ</i>	<i>CCR7</i>
<i>MS4A1 (CD20)</i>	<i>Iα-Cϵ</i>	<i>BCL6-Cϵ</i>	<i>GRB</i>	<i>CD56</i>
<i>CD22</i>	<i>Iα-Cγ</i>	<i>BCL6-Cγ</i>	<i>PRF</i>	<i>CD70</i>
<i>CD27</i>	<i>Iα-Cμ</i>	<i>BCL6-Cμ</i>	<i>CD45RO</i>	<i>DUSP22</i>
<i>CD38</i>	<i>Iϵ-Cα</i>	<i>Iν-BCL6</i>	<i>CXCR5</i>	<i>MEF2B</i>
<i>CD138</i>	<i>Iϵ-Cϵ</i>	<i>Iϵ-BCL6</i>	<i>CXCL13</i>	<i>PRDM1</i>
<i>CD86</i>	<i>Iϵ-Cγ</i>	<i>Iα-BCL6</i>	<i>GATA3</i>	<i>XBP1</i>
<i>CD80</i>	<i>Iϵ-Cμ</i>	<i>Iμ-BCL6</i>	<i>CD28</i>	<i>CARD11</i>
<i>CTLA4</i>	<i>Iν-Cα</i>	<i>Iμ-BCL6</i>	<i>ICOS</i>	<i>TCL1A</i>
<i>B2M</i>	<i>Iν-Cϵ</i>		<i>FOXP3</i>	<i>RANK</i>
	<i>Iν-Cγ</i>		<i>PD1</i>	
CSR / SHM	<i>Iν-Cμ</i>	Mutations	<i>LAG3</i>	
<i>AID#1 (exon2-3)</i>	<i>IGHD</i>	<i>XPO1 E571K</i>	<i>ALK</i>	
<i>AID#2 (exon4-5)</i>	<i>IGHM</i>	<i>MYD88 L265P</i>		
<i>CD40</i>	<i>Iμ-Cα</i>	<i>BRAF V600E</i>		
<i>CD40L#1 (exon2-3)</i>	<i>Iν-Cϵ</i>	<i>IDH2 R172K</i>		
<i>CD40L#2 (exon4-5)</i>	<i>Iν-Cγ</i>	<i>RHOA G17V</i>		
	<i>Iν-Cμ</i>	<i>MYD88 (exon3-4)</i>		
	<i>Iμ-Cα</i>	<i>XPOWT</i>		
	<i>Iμ-Cϵ</i>			
	<i>Iμ-Cγ</i>			
	<i>Iμ-Cμ</i>			

Figure 10 : Récapitulatif de l'ensemble des gènes analysés par le test Lymphosign.

Source : Protocole Genexpath Lymphosign. Version 1 – Juillet 2021, Rouen, 23 pages.

Il s'y ajoute la détection de 5 mutations : *ID2 R172K* et *IDH2 R172T* pour le diagnostic des LTAI (10), *MYD88 L265P* que l'on détecte surtout dans les LLP mais aussi dans d'autres entités dont les LBDGC non GC (17), la mutation *RHOA G17V* présente dans les LTP (36), et la mutation *XPO1 E571K* décrite dans les PMBL (14). L'ensemble des résultats est analysé par un algorithme diagnostique permettant une classification en 12 LNH : LBDGC non GC, LBDGC GC, PMBL, LF, LM, LLC, LZM, LTAI, LTP, LAGC ALK-, LAGC ALK+ ou LTNK.

I.2.3.3. Cas particuliers des LH

Les lymphomes de Hodgkin sont caractérisés par des cellules tumorales de Hodgkin ou de Reed-Sternberg, souvent peu nombreuses, dispersées dans un microenvironnement inflammatoire abondant. Cette particularité explique la distinction initiale de ces lymphomes avec les autres lymphomes appelés non-Hodgkiniens. Les études moléculaires des LH sont délicates, étant donné la dilution de l'information (l'ADN et l'ARN présents dans le noyau des cellules tumorales) au sein du microenvironnement. Le test Lymphosign ne permet pas d'analyser ce type de lymphome.

I.2.4. Pronostic

L'impact du diagnostic sur le pronostic est très variable selon les différentes formes histologiques. Ainsi selon les données de Santé Publique France, la survie nette standardisée (SNS) à 5 ans des personnes diagnostiquées entre 2010 et 2015 varie de 89 % pour les LLC à 43 % pour les LTNK (37).

I.2.5. Traitement

Le choix du traitement dépend principalement du type de lymphome, du stade, de la taille des ganglions, de certains paramètres biologiques, de l'état de santé général du patient, de son âge et de son pronostic. Une abstention thérapeutique et une surveillance peuvent être réalisées pour les lymphomes indolents. Les LNH agressifs sont traités par chimiothérapie CHOP plus ou moins associée à un anti-CD20 comme le Rituximab (R-CHOP), de la Bendamustine ou encore du Lénalidomide. Les LH sont eux traités par chimiothérapie ABVD (Doxorubicine, Bléomycine, Vinblastine et Dacarbazine) ou BEACOPP (Bléomycine, Étoposide, Doxorubicine, Cyclophosphamide, Vincristine, Procarbazine et Prednisone) en association avec de la radiothérapie (6).

I.3. Problématique clinique

Des études réalisées de manière rétrospective ont mis en évidence un taux de discordance de diagnostic des hémopathies lymphoïdes entre pathologistes experts et non experts de 13 % à 18 % (38,39). Étant donné l'impact du diagnostic sur la prise en charge, l'INCa a mis en place un réseau national de double lecture (réseau LYMPHOPATH) depuis 2010, dont fait partie le laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Limoges. Ce réseau ne se limite pas à la relecture des cas envoyés, mais parfois à l'utilisation d'IHC ou de techniques complémentaires (étude de clonalité, NGS).

Laurent C. et son équipe ont étudié l'impact de la mise en place de ce réseau de 2010 à 2018, et ont montré qu'il a permis de modifier le diagnostic chez près de 20 % des patients avec une incidence potentielle sur le type de soins délivrés de 17 % selon les recommandations médicales (40).

Cette étude souligne l'intérêt du réseau LYMPHOPATH, composé de pathologistes formés à l'hématopathologie, exerçants au sein de centres experts disposant de techniques complémentaires spécifiques (IHC, biologie moléculaire).

I.4. États des lieux au laboratoire d'anatomie pathologique et motivations du projet

En prenant la moyenne des années 2020 et 2021, le laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Limoges établit 216 nouveaux diagnostics de LNH par an ; 88 sont des cas internes au CHU et 128 proviennent d'établissements extérieurs (relecture et enregistrement dans le cadre du réseau LYMPHOPATH).

Une analyse morphologique sur coloration HES est systématiquement effectuée, et la prescription d'examen complémentaire est réalisée au cas par cas par l'hématopathologiste. De nombreuses techniques immunohistochimiques sont disponibles, et la prescription d'un panel d'IHC variera en fonction des situations rencontrées. La première étape de la réflexion diagnostique est d'évaluer la taille des cellules. Devant des plages de cellules de grande taille, on s'oriente vers un LBDGC, et le panel suivant est prescrit : CD20, CD79A, CD3, CD5, BCL2, CD10, BCL6, MUM1, MYC, CD30, Ki67. En cas de prolifération à petites cellules, on se dirige vers les hémopathies lymphoïde B à petites cellules (par argument de fréquence), avec ce panel : CD20, CD79A, CD3, CD5, BCL2, CD10, BCL6, CD23, CD21, Cycline D1, Ki67. Enfin en cas de suspicion de lymphome T, on utilise le panel suivant : CD20, CD79A, CD3, CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD30, BCL6, CD10, CXCL13, ICOS, PD1, Ki67, EBER. Ainsi dans la très grande majorité des cas, un panel d'au minimum 11 IHC est réalisé.

Les techniques analysant les caractéristiques génétiques actuellement disponibles au CHU comprennent la FISH, l'étude du réarrangement des gènes du TCR et des Ig.

La plupart des patients ne bénéficient donc pas directement des récentes avancées diagnostiques, pronostiques et théranostiques de la médecine personnalisée, alors même que l'utilisation de la biologie moléculaire est recommandée par les instances scientifiques (3). Lorsque cela est nécessaire, les dossiers sont transférés à des centres disposant de ces techniques de biologie moléculaire.

I.5. Objectifs de l'étude

Devant l'importance d'un diagnostic précis, l'augmentation croissante des données moléculaires et les recommandations des instances scientifiques, l'intérêt de ce projet est la mise en place d'une nouvelle analyse génétique au sein de la Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers du CHU de Limoges. L'analyse du transcriptome par le test Lymphosign, appuyé par le LYSA, présente un angle d'étude idéal car il est l'élément de convergence de l'ensemble des altérations génétiques, génomiques ou épigénétiques significatives d'un lymphome.

L'objectif principal de cette étude est de comparer les résultats du test Lymphosign avec les diagnostics posés par l'examen anatomopathologique.

Nos objectifs secondaires sont l'étude de tous les marqueurs diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques apportés par le test Lymphosign. Ils seront analysés en fonction des données cliniques disponibles dans le service d'Hématologie.

II. Matériel et méthode

II.1. Schéma d'étude

Une analyse, de type transversal, a été menée à partir des données recueillies sur 30 prélèvements issus de la tumorotheque du CRBioLim, au sein du laboratoire d'Anatomie pathologique du CHU de Limoges, de juin 2022 à avril 2023.

II.2. Population d'étude

Il a été retenu comme critère d'inclusion, le diagnostic de lymphome posé par un examen anatomopathologique.

Deux critères d'exclusion ont été arrêtés : le diagnostic de LH de type classique, ainsi que le diagnostic de LH nodulaire à prédominance lymphocytaire.

II.3. Critère d'évaluation

La conclusion émise par le logiciel Artemis mis à disposition par la société Genexpath, a été comparée avec le diagnostic réalisé en anatomopathologie.

II.4. Techniques utilisées

II.4.1. Technique anatomopathologique standardisée

Après réception et enregistrement au secrétariat, le prélèvement est pris en charge en macroscopie avec relevé du poids, de la taille et de l'aspect. Il est ensuite fixé au formol, déshydraté dans les automates EMTP de Leica puis inclus en paraffine.

Une coupe de 4 μm d'épaisseur est réalisée à l'aide d'un microtome HistoCore Multicut de Leica. Une coloration HES et le montage d'une lamelle sont ensuite effectués par l'automate Tissue-Tek Film de Sakura. L'automate BenchMark Ultra de Roche est utilisé pour les techniques IHC.

Le pathologiste effectue son analyse, le diagnostic est rendu et le matériel archivé.

Pour les cas sélectionnés, les blocs et lames sont désarchivés. Le bloc d'intérêt qui sera utilisé pour la technique Lymphosign est identifié à l'aide des lames colorées à l'HES.

II.4.2. Test Lymphosign

II.4.2.1. Mécanisme

Le test Lymphosign est une technique de biologie moléculaire permettant d'analyser l'expression de plusieurs gènes simultanément, en particulier en analysant l'ARN (figure 11).

La première étape du test consiste à effectuer une transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'une enzyme appelée transcriptase inverse. Les sondes spécifiquement conçues sont mélangées avec l'ADNc et se lient aux séquences complémentaires présentes. Ensuite, une enzyme appelée ligase est utilisée pour lier les sondes à l'ADNc. Les fragments d'ADNc liés aux sondes sont amplifiés à l'aide d'une réaction PCR. Cela permet d'obtenir des quantités plus importantes de l'ADNc spécifique. Les produits de PCR obtenus sont analysés pour déterminer la quantité d'ADNc amplifiée.

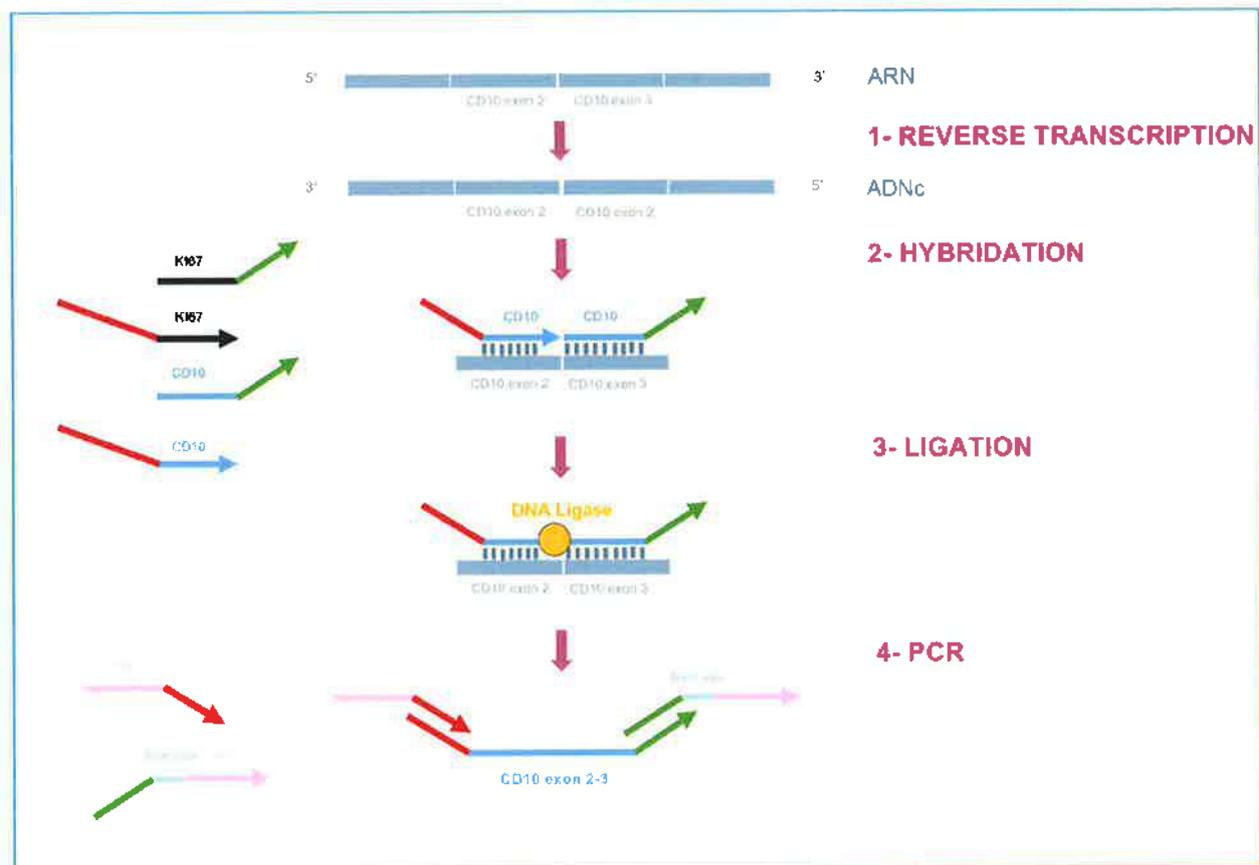


Figure 11 : Schéma expliquant le mécanisme du test Lymphosign.

Source : *Protocole Genexpath Lymphosign. Version 1 – Juillet 2021, Rouen, 23 pages.*

Le couple d'amorce étant unique pour toutes les sondes, la quantité finale de chaque produit PCR sera représentative de la quantité initiale d'ARNm du gène considéré. L'intensité du signal permet une quantification de la séquence cible. La quantification est relative, puisqu'elle est réalisée par rapport à celle d'un témoin.

II.4.2.2. Réalisation technique

L'ensemble de la procédure technique (sélection des cas, estimation du nombre, de l'épaisseur et coupe des copeaux au microtome, extraction de l'ARN, réalisation du test Lymphosign) a été effectuée par un interne en médecine, sous la supervision de l'équipe technique de la PGMC du CHU de Limoges.

Une extraction sur copeaux a systématiquement été réalisée. La surface du prélèvement tumorale est estimée afin d'évaluer le nombre et l'épaisseur des copeaux, selon les règles appliquées au sein du laboratoire (tableau 2).

Pour l'extraction, le kit Promega Maxwell 16 LEV RNA FFPE et l'extracteur Maxwell 16 IVD sont utilisés conformément aux directives du fournisseur. La concentration en ARN est quantifiée à l'aide du kit QuantiFluor RNA system et d'un Quantus Fluorometer. La plage de concentration d'ARN à analyser doit se situer entre 50 et 500 ng, dans un volume de 2 µL. Si les concentrations sont trop élevées, les ARN peuvent être dilués dans de l'eau nuclease free.

Tableau 2 : Nombre et épaisseur des copeaux selon la surface tumorale.

ORL = Otorhinolaryngologie ; SNC = Système nerveux central

Surface	Nombre de copeaux / lames blanches	Taille coupes / copeaux	Type de prélèvement dans notre étude
2 cm x 2 cm (400 mm ²)	1	5 µm	Pièce opératoire
1,5 cm x 1,5 cm (225 mm ²)	2	5 µm	Biopsie exérèse chirurgicale
1 cm x 1 cm (100 mm ²)	3	10 µm	Biopsie (ORL, SNC)
0,5 cm x 0,5 cm (25 mm ²)	5	10 µm	Biopsie filiforme

La première étape est la transcription inverse. Un tampon de transcription inverse, du dithiothréitol (DTT), du désoxyribonucléotide triphosphate quelconque (dNTP) et un hexamère sont mélangés avec 2 µL d'ARN et le programme 1a du thermocycleur est lancé. Ensuite, l'enzyme M-MLV RT est ajoutée et le programme 1b est lancé.

La deuxième étape correspond à l'hybridation des sondes, effectuée en utilisant un mélange de Salsa MLPA Buffer et de sondes développées par Genexpath, avec le programme 2 du thermocycleur.

La troisième étape est la ligation. Un mélange comprenant de l'eau nuclease free, de la Salsa Ligase Buffer A, de la Salsa Ligase Buffer B et de la Salsa Ligase 65 est placé dans le thermocycleur et le programme 3 est lancé.

Enfin, l'étape d'amplification et d'incorporation des barcodes et adaptateurs est réalisée avec un mélange comprenant de l'eau nuclease free, un Q5 Master MIX et des barcodes uniques développés par Genexpath (un pour chaque échantillon testé). Cette étape est également réalisée à l'aide du thermocycleur.

La librairie de séquençage obtenue est dosée avec le kit Qubit dsDNA HS Assay en utilisant le Qubit 4.0. Les amorces sont diluées dans du Tampon HT1 et déposées dans le puit 18 de la cartouche. Le séquençage est réalisé sur un séquenceur Illumina MiSeq en suivant les directives du guide Illumina du système MiSeq, avec une feuille d'injection pour générer les FASTQ, prévoyant 120 cycles en *read* 1.

Un *read* est défini comme une succession de bases lues par le séquenceur dans chaque puit, selon la technologie utilisée. Le séquenceur génère autant de *reads* qu'il y a de puits fonctionnels. Un nombre de *reads* minimum peut être exigé pour éliminer le bruit de fond inhérent à la technique.

Un *run* correspond à un passage sur un séquenceur. Le séquençage nécessitant l'utilisation de plusieurs échantillons à la fois, le terme de *run* est plus largement utilisé pour décrire l'exécution d'une même technique de biologie moléculaire sur une série de plusieurs échantillons (qui seront passés en même temps sur un séquenceur).

La puce Illumina MiSeq utilisée comme réactif de séquençage permet d'analyser 1 million de *read* par puce. Selon les préconisations du fournisseur, le test Lymphosign nécessite de

pouvoir analyser 10^5 séquences par échantillons. Il est donc possible de passer 10 échantillons par puce. Il a été choisi de réaliser 3 *runs* comportant chacun 10 échantillons, afin de pouvoir tester les 30 patients. Un des *runs* n'ayant pas été interprétable (voir discussion), 4 *runs* ont finalement été nécessaires.

II.4.2.3. Critères de qualité

II.4.2.3.1. Témoins internes

La composition de chacun des *runs* a été étudiée afin de placer des témoins positifs dans chacun des *runs*, pour une assurance qualité. Il s'agissait de cas de diagnostic anatomopathologique non équivoque. Le premier *run* a été réalisé avec plusieurs cas considérés comme classiques. Un LAGC ALK+ faisait partie du deuxième et du dernier *run*. Pour le troisième *run* un LTAI a été intégré.

II.4.2.3.2. Nombre de read

Le nombre de *reads* lus au cours d'une technique de biologie moléculaire est un marqueur de qualité.

II.4.2.3.3. Score de qualité et nombre d'Unique Molecular Identifier (UMI)

Le score de qualité est un indicateur important de réussite de l'analyse. Il correspond au nombre total de sondes liées lors de l'étape de ligation, soit le nombre de molécules d'ADNc détectées. Le seuil de 5000 ligations (UMI) correspond à la limite inférieure retenue pour constituer la base d'apprentissage de l'algorithme de classification.

En dessous de ce seuil, une alerte dans la conclusion « Attention : score bas » est ajoutée automatiquement. Les performances de l'algorithme baissent rapidement, et il convient d'être particulièrement vigilant concernant la détection de marqueurs quantitatifs soulignés dans la catégorie complémentaire « Caractéristiques complémentaires ». En effet, la présence de seulement quelques séquences peut entraîner des faux positifs.

II.4.2.4. Rendu des résultats

Les fichiers FASTQ générés sont téléchargés sur le logiciel Artemis mis à disposition par Genexpath.

Pour chaque analyse 2 tableurs Excel sont téléchargeables :

- un fichier csv sous le format date-référence interne-n° barcode-nom échantillon. Le tableau contient 5 colonnes : la liste des sondes détectées au cours de l'analyse, le comptage brut des *reads* et des UMI et le comptage des *reads* et des UMI après correction de l'index hopping ;
- un fichier csv sous format full_gene_set_counts. Le tableau regroupe tous les échantillons d'une même analyse avec les informations suivantes : le barcode utilisé, le nombre de *reads* total, l'informativité (pourcentage de séquences correspondant à celles recherchées), le facteur d'amplification, le score de qualité (nombre d'UMI détectés) ainsi que le niveau d'expression relative de chacun des marqueurs (données brutes de comptage divisées par la médiane des comptages d'une liste figée de marqueurs).

Pour un rendu simplifié, 2 fichiers PDF sont disponibles :

- le premier (figure 12) représente sous la forme de graphiques la probabilité de classement pour différentes caractéristiques : l'origine B ou T (*B/T Origin*), le grade (*LNH Grade*), la COO, et le classement principal (*LNH Classification*) ;
- le second (figure 13) liste les 30 marqueurs qui ont été les plus discriminants pour trancher entre le classement principal et le classement différentiel (ces 30 marqueurs ont été appelés « marqueurs significatifs »).

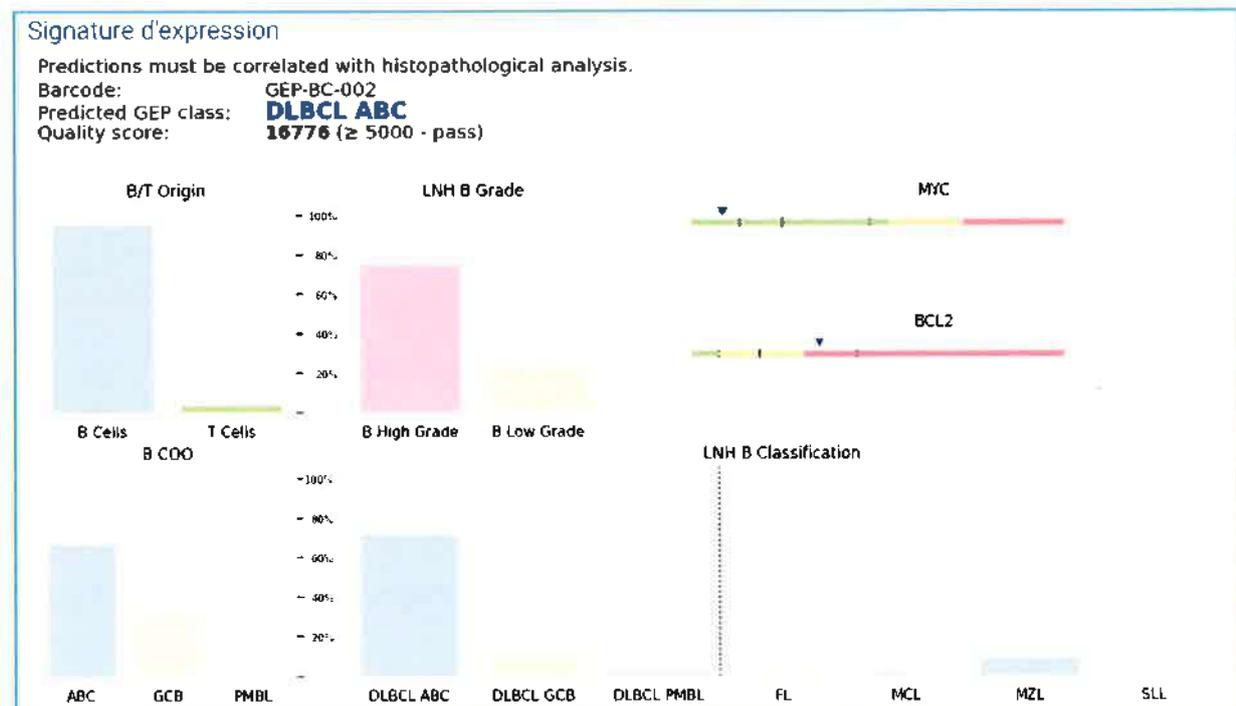


Figure 12 : Exemple de rendu de résultat Lymphosign : probabilité de cellules B/T, COO, grade, classement principal et classement différentiel.

Source : Capture d'écran réalisée sur la plateforme Artemis. <https://connect.genexpath.com/>

En cas de prolifération à cellules B, la probabilité de classement de la cellule d'origine concerne les phénotypes non GC, GC ou PMBL, et la probabilité de classement principal en LBDGC non GC, LBDGC GC, PMBL, LF, LM, LZM, et LLC.

Si la prolifération intéresse des cellules T, la probabilité de classement de la COO sera donnée en cellules Tfh ou Th1 cytotoxique, la probabilité de classement principal en LTAI, LTP, LAGC ALK-, LAGC ALK+ ou LTNK.

Concernant le résultat, l'algorithme retient les deux probabilités de classement les plus élevées. La probabilité de classement la plus élevée sera le classement principal et la deuxième probabilité de classement la plus élevée sera le classement différentiel. Dans le rendu des résultats, un p value est associé à chaque marqueur. Il correspond à la différence statistique entre les deux classements (principal et différentiel) pour un marqueur donné.

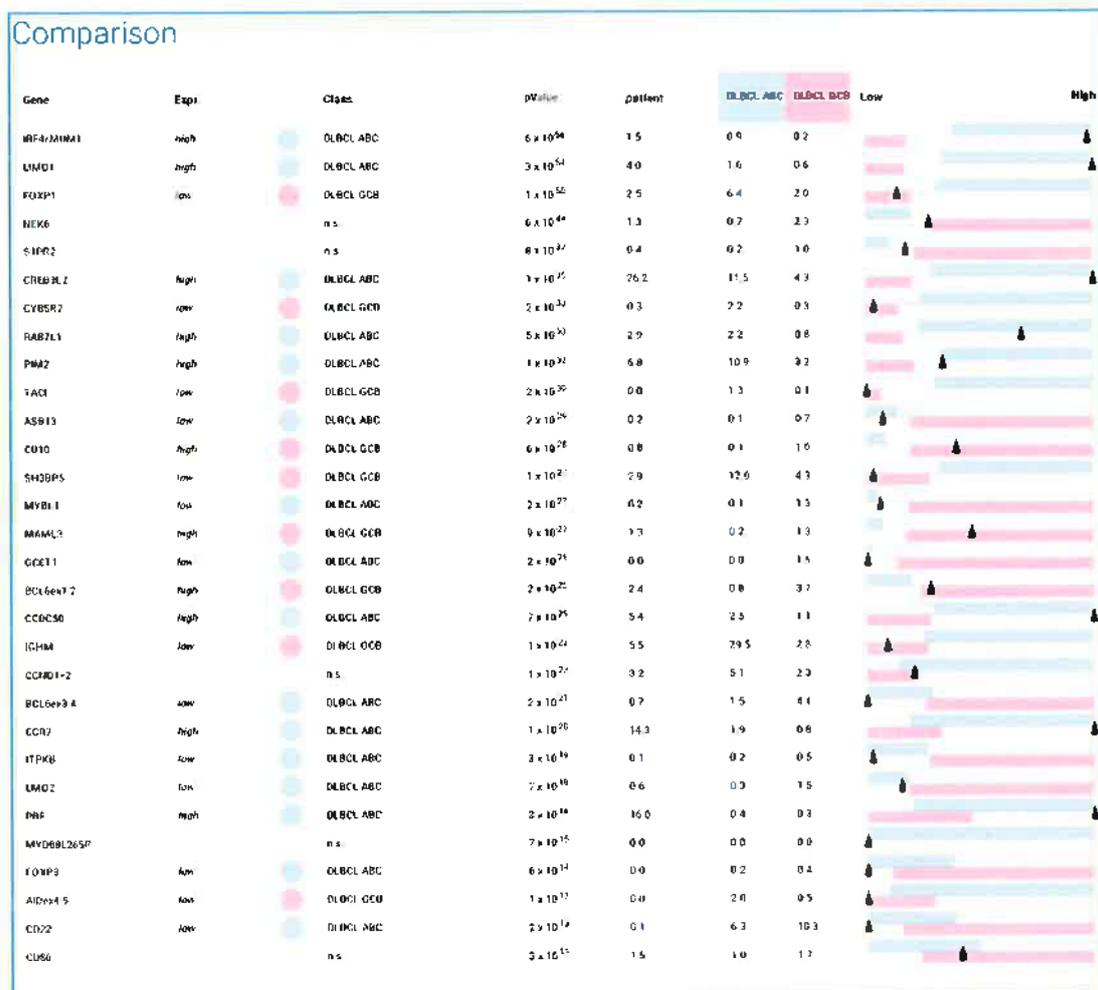


Figure 13 : Exemple d'un rendu de résultat Lymphosign sur la plateforme Artemis : les 30 marqueurs les plus discriminants (significatifs) entre le classement principal et le classement différentiel.

Source : Capture d'écran réalisée sur la plateforme Artemis, mise à disposition par la société Genexpath. <https://connect.genexpath.com/>

II.5. Recueil des données

Les données suivantes ont été recueillies en utilisant le compte rendu de la première consultation d'hématologie.

- Données administratives

Sexe (H/F), date de naissance, âge le jour du prélèvement, date de prélèvement, date de réception, date de validation du compte-rendu d'anatomopathologie, délai de validation (en j), congélation disponible.

- Données cliniques

PS, signes généraux au diagnostic, symptômes au diagnostic, antécédents (ATCD), présence ou non d'une hépatosplénomégalie (HSMG), stade clinique exact, présence d'un éventuel score clinique : *International Prognostic Index (IPI)*, *Follicular Lymphoma IPI (FLIPI)*, *Mantle cell lymphoma IPI (MIPI)*, *Central Nervous System IPI (CNS IPI)*, IPI ajusté à l'âge (IPIaa).

Site de prélèvement exact et proposition thérapeutique.

- Données de l'imagerie

Conclusion de la Tomographie par Émission de Positons – Tomodensitométrie (TEP-TDM) réalisée dans le bilan initial, si elle a eu lieu, et conclusion de la dernière TEP-TDM réalisée à distance (évaluation de la réponse métabolique).

- Données anatomopathologiques

Type de prélèvement (biopsies à l'aiguille/biopsie chirurgicale/autre), nombre, taille.

Présence d'artefacts d'écrasement, matériel exigü. Architecture : nodulaire, diffus, nodulaire et diffus, manchons périvasculaires, autre. Taille des cellules : petite, petite à moyenne, moyenne, moyenne à grande ou grande. Présence de grandes cellules éparses. Aspect des noyaux : régulier, irrégulier, incisuré/clivé/encoché, réniforme/anguleux, pycnotique, granuleux, plasmocytoïde, nucléolé. Présence de nombreuses mitoses, de remaniements fibreux, de granulomes, de plasmocytes, de polynucléaires neutrophiles, de polynucléaires éosinophiles, d'histiocytes, d'un réseau vasculaire, de nécrose.

Nombre de lames d'IHC, et interprétation. Le détail des techniques utilisées est disponible en annexe 3.

- Données du test Lymphosign

Étapes pré analytiques : nombre et épaisseur des copeaux, concentration ARN initialement extrait et concentration finale utilisée.

Les deux classements les plus probables proposés par la plateforme Artémis ont été relevés, en indiquant le classement principal (classement le plus probable) et le classement différentiel (2^{ème} classement le plus probable). Parmi les 30 marqueurs significatifs disponibles sur la version PDF, a été relevé le nombre de marqueurs significatifs en faveur du classement principal, le nombre de marqueurs en faveur du classement différentiel et le nombre de marqueurs avec une expression proche de 0 (« nombre de marqueurs à 0 »). Pour chaque résultat, une p value est précisée, renseignant sur le degré de la différence statistiquement significative.

II.6. Analyse statistique

L'analyse descriptive des variables qualitatives présente la fréquence de chaque modalité. Celle des variables quantitatives présente l'effectif, le nombre de données manquantes, la moyenne et l'écart-type. Les variables qualitatives sont comparées, selon leur distribution, à l'aide d'un test du Chi-2 ou de Fisher. Les variables quantitatives sont comparées à l'aide d'un test non paramétrique adéquat. Pour chaque test bilatéral réalisé, une valeur de $p < 0,05$ sera considérée comme statistiquement significative. Des analyses selon le type de traitement délivré ont été réalisées sur ce même principe.

La gestion et l'analyse des données ont été réalisées avec le logiciel SAS ® (SAS Institute, version 9.4, North Carolina, USA).

III. Résultats

III.1. Caractéristiques de la population

Sur les quatre manipulations (ou *runs*) réalisées, une seule a eu des résultats entièrement ininterprétables. La concentration des ARN extraits et des ADN amplifiés était semblable aux concentrations des autres manipulations.

Un cas a été classé en échec par le test Lymphosign. Il a été exclu des résultats et tests statistiques.

III.1.1. Données cliniques

Sur les 29 cas, 15 sujets (51,7 %) étaient des hommes et 14 sujets (48,3 %) étaient des femmes. L'âge médian le jour du prélèvement était de 69 ans (tableau 3).

Cliniquement (tableau 4), 12 patients (42,9 %) avaient un *Performans Status* (PS) à 0 ou 1, et 4 patients (14,3 %) avaient un PS à 2. Dix patients (34,5 %) présentaient des signes généraux au moment du diagnostic, dans 2 cas (6,9 %) ils étaient les seuls symptômes signalés. Au moment du diagnostic, il existait un syndrome tumoral chez 15 patients (51,7 %) et des lésions cutanées chez 4 patients (13,8 %). Il s'agissait d'une découverte fortuite dans 5 cas (2 cas lors d'une imagerie, et 2 cas sur une anomalie lors d'un bilan biologique de routine). A noter que 8 patients (28,6 %) présentaient une HSMG au diagnostic.

Six patients (20,7 %) avaient un contexte de pathologie chronique (1 cas de polyarthrite rhumatoïde, 1 cas d'hépatite B, 3 cas de diabète de type 2 dont l'un en insuffisance rénale chronique et un autre ayant subi une transplantation rénale, et enfin 1 cas d'hypothyroïdie). Huit patients (27,6 %) ne présentaient pas d'ATCD notables, ou des ATCD non pris en compte (principalement des ATCD cardiovasculaires).

Le site de prélèvement (tableau 4) intéressait une ADP dans 18 cas (62,1 %), un tissu localisé au niveau de la sphère ORL dans 3 cas (10,3 %) et un tissu non lymphoïde (thyroïde, SNC, méésentère, rein et tissus mous) dans 8 cas (27,6 %).

Concernant les propositions de traitement (tableau 5), 4 patients (14,3 %) ont été surveillés, 1 patient (3,6 %) a bénéficié d'une exérèse (localisation du lymphome au contact d'un lipome atypique). Deux patients (7,1 %) ont reçu une chimiothérapie et 3 (10,7 %) une immunothérapie (Ibrutinib). Enfin, 18 patients (64,3 %) ont bénéficié d'une immunothérapie associée à une chimiothérapie : 6 R-CHOP, 2 R-mini CHOP, 2 R-COP Aracytine, 1 R-MPV (Méthotrexate, Procarbazine, Vincristine) Aracytine, 1 EPI R-CHOP, 1 Rituximab Velcade Revlimid Dexaméthasone, 1 Rituximab Chloraminophène, 1 BV-CHP, 1 cas avec une pré-phase COP sans Oncovin et 2 cures de R- COPADM.

Concernant l'évolution clinique (tableau 5), au moment du recueil des données, 11 patients (39,3 %) étaient en rémission, 6 patients présentaient une régression de la maladie (21,4 %), et celle-ci était stable chez 7 patients (25 %). Il existait une progression pour 2 patients (7,1 %). Les données n'étaient pas disponibles pour 2 patients (7,1 %).

L'évaluation de la réponse sur l'imagerie à l'aide d'un TEP-TDM (tableau 5) était disponible dans 9 cas (31 %). Il existait une réponse partielle pour 5 cas (17,2 %), une réponse complète dans 14 cas (48,3 %) et une progression pour 1 cas (3,4 %).

Biologiquement (tableau 6), un dosage de LDH a été réalisé dans quasiment tous les cas.

III.1.2. Données anatomopathologiques

Le nombre moyen de techniques IHC réalisées a été de 13 par cas (de 8 à 21). Les anticorps anti-CD20, CD3, CD5 et l'index de prolifération Ki67 ont été les anticorps le plus souvent réalisés, effectués dans tous les cas. Sur les 29 patients, il s'agissait dans 26 cas (87 %) d'une hémopathie B, et dans 4 cas (13 %) d'une hémopathie T.

La répartition des sous-types de lymphome B est représentée par la figure 14 : parmi les hémopathies B, 17 cas (65 %) correspondaient à un lymphome B à petites cellules et 9 cas (35 %) à un lymphome B à grandes cellules. Parmi les lymphomes B à grandes cellules, 5 cas (56 %) étaient un LBDGC GC ou un LF de grade 3B, 2 cas (22 %) étaient un LBDGC non GC, 1 cas (11 %) était un lymphome de Burkitt et 1 cas (11 %) était un lymphome B à grandes cellules intravasculaire. Parmi les lymphomes B à petites cellules, 1 cas ne présentait pas de diagnostic précis, 7 cas (44 %) étaient un LF de grade 1-2 ou 3A, 2 cas (13 %) étaient une LLC, 4 cas (25 %) étaient un LZM, 2 cas (12 %) étaient un LM et 1 cas (6 %) était un LLP. Parmi les lymphomes T, 1 cas (25 %) correspondait à un LTAI, 2 cas (50 %) à un LAGC et 1 cas (25 %) à une leucémie à grands lymphocytes T granuleux (LT GLG).

III.2. Résultats du test Lymphosign

Sur les 29 cas analysés par l'algorithme (figure 15), 23 cas (79 %) ont été classés, et 6 cas (20 %) ont présenté une conclusion imprécise (ces cas ont été appelés « inclassés »). Parmi les 23 cas classés par l'algorithme, on recensait 8 cas (27 %) de LBDGC GC, 6 cas (20 %) de LZM, 1 cas (3 %) de LLC, 1 cas (3 %) de LM, 5 cas (17 %) de LBDGC non GC et 2 cas (7 %) de LAGC ALK+.

La figure 16 schématise le raisonnement qui nous a conduit à considérer 11 cas comme discordants avec le diagnostic anatomo-pathologique au sein de ces 23 cas classés par l'algorithme.

Parmi les 6 cas inclassés, 3 ont été considérés comme concordants avec les diagnostics anatomopathologiques :

- un L. de Burkitt qui a été classé par le test en LBDGC GC EBV+ (le classement en L. de Burkitt n'existe pas dans l'algorithme) ;
- un LTAI conclu par le test en LTAI / LTP-Tfh>Hodgkin (?), et dont le classement principal du test était LTAI ;
- une LLC conclue en LLC / LZM, et dont le classement principal du test était LLC.

Les 3 derniers cas inclassés, considérés comme non concordants, ont été répondus « LBDGC non GC / LM », « LTNK / LBDGC (if B) / LTP NOS / Hodgkin / TrichB ? / Autre ? » et « LTNK / Inclassé (si B) / LTP NOS / Hodgkin / TrichB ? / Autre ? / LM ? ».

Les différences entre les cas concordants et discordants, ainsi qu'entre les cas avec une alerte dans la conclusion et les autres cas ont été étudiées via un test statistique (tableaux 3 à 9).



Figure 14 : Répartition des différents sous-types de lymphomes diagnostiqués par l'anatomopathologie dans notre étude.

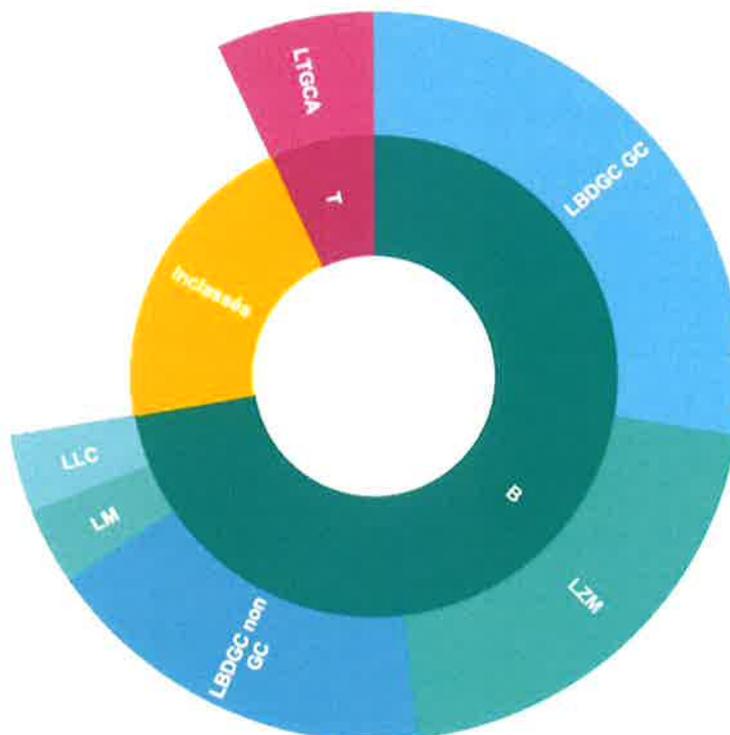


Figure 15 : Résultats du classement par le test Lymphosign réalisé dans notre étude.

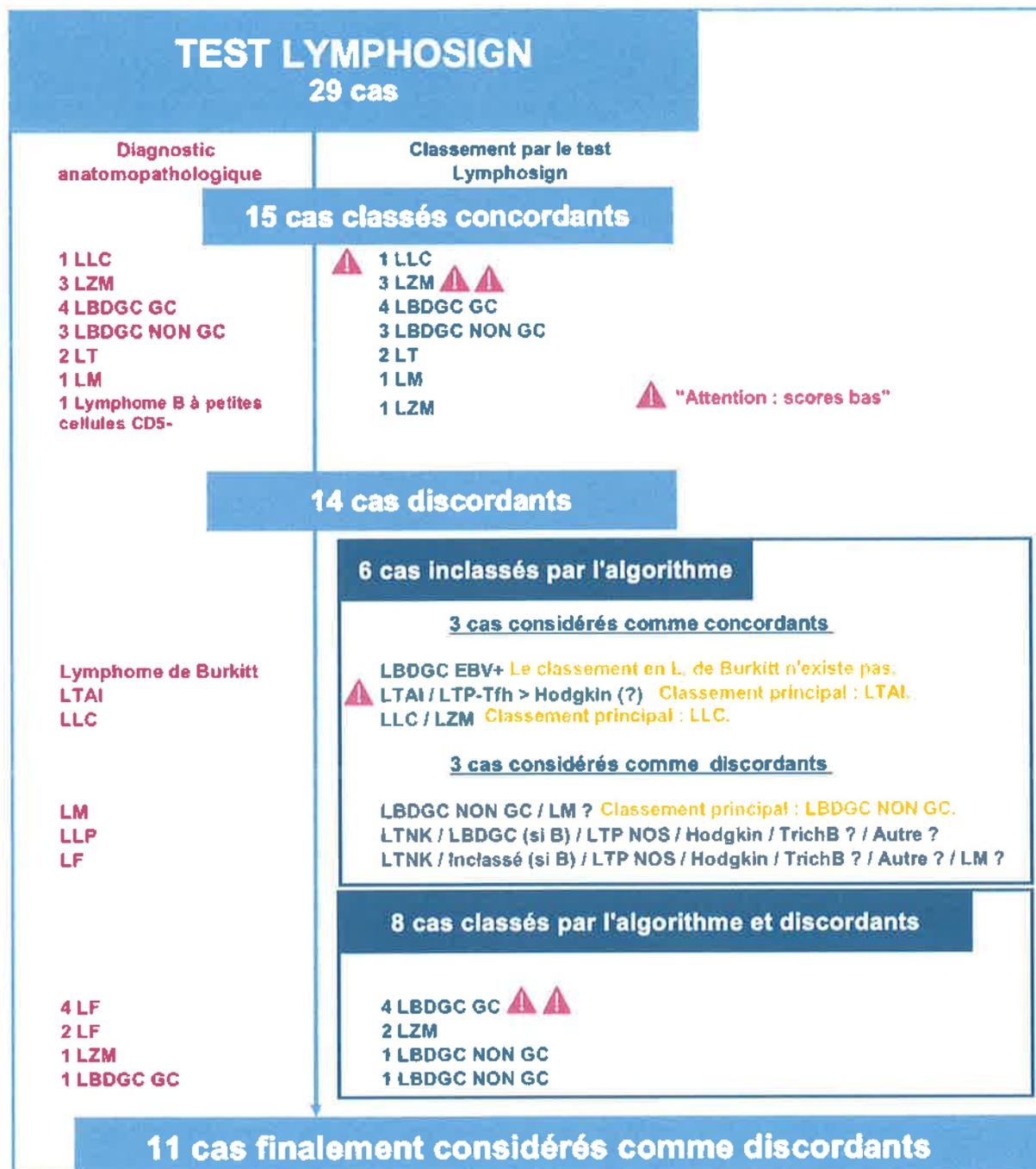


Figure 16 : Diagramme de flux représentant les résultats du test Lymphosign par rapport au diagnostic anatomopathologique.

III.2.1. Comparaison des cas concordants et discordants

Une architecture nodulaire ($p < 0,001$), l'absence de nucléole ($p = 0,013$), le classement en lymphome B à petites cellules ($p = 0,010$), notamment le classement en LF ($p = 0,036$), étaient plus fréquemment observés dans les cas discordants.

Il existait une légère différence non statistiquement significative sur le sexe ($p = 0,077$), le site de prélèvement ($p = 0,097$), le marquage IHC du CD10 ($p = 0,080$) et sur la médiane du Ki67 ($p = 0,052$).

Il n'existait pas de différence statistiquement significative au niveau des marqueurs de qualité, que ce soit pour le score de qualité ($p = 0,412$), le nombre de *read* ($p = 0,438$) ou le nombre de marqueurs à 0 ($p = 0,855$). De la même façon, la présence de nécrose n'entraînait pas de différence dans notre étude.

III.2.2. Comparaison des cas avec une alerte « Attention : score bas » et les autres

Les caractéristiques statistiquement significatives des cas présentant une alerte dans la conclusion étaient le score de qualité ($p < 0,001$), le nombre de *read* ($p < 0,001$) et le nombre de marqueur à 0 ($p = 0,020$).

La probabilité de classement en lymphome de bas grade était associée à la présence d'une alerte dans la conclusion ($p = 0,041$).

Il n'existait pas de différence statistiquement significative sur le numéro de *run* ($p = 0,538$) ni sur la présence de nécrose ($p = 0,921$).

Tableau 3 : Caractéristiques démographiques des patients évalués dans notre étude.

Variable	Total N = 29	Corrélation avec Dc Anapath			Cas avec une alerte dans la conclusion		
		Oui N = 18	Non N = 11	p-value ¹	Oui N = 6	Non N = 23	p-value ¹
Sexe, n (%)				0,077			0,390
Homme	15 (51,7)	7 (38,9)	8 (72,7)		2 (33,3)	13 (56,5)	
Femme	14 (48,3)	11 (61,1)	3 (27,3)		4 (66,7)	10 (43,5)	
Âge, Médiane [Q1- Q3]	69 [58 - 77]	68 [59 - 76]	74 [60 - 78]	0,605	68 [64 - 73]	69 [58 - 78]	0,936
Délai de validation, Médiane [Q1- Q3]	8 [6 - 14]	8 [6 - 16]	13 [8 - 14]	0,310	13 [8 - 23]	8 [6 - 14]	0,433

¹ Test du Chi-2 de Pearson; Test des rangs de Wilcoxon

Tableau 4 : Caractéristiques cliniques (1/2) des patients évalués dans notre étude.

Dc = diagnostic ; Sd = syndrome

Variable	Total N = 29	Corrélation avec Dc Anapath			Cas avec une alerte dans la conclusion		
		Oui N = 18	Non N = 11	p-value ¹	Oui N = 6	Non N = 23	p-value ¹
Performans status, n (%)				0,318			0,692
0	12 (42,9)	6 (33,3)	6 (60,0)		3 (50,0)	9 (40,9)	
1	12 (42,9)	8 (44,4)	4 (40,0)		3 (50,0)	9 (40,9)	
2	4 (14,3)	4 (22,2)	0 (0,0)		0 (0,0)	4 (18,2)	
Données manquantes	1	0	1		0	1	
Signes généraux au Dc, n (%)				0,978			0,633
Oui	10 (34,5)	6 (33,3)	4 (36,4)		1 (16,7)	9 (39,1)	
Non	19 (65,5)	12 (66,7)	7 (63,6)		5 (83,3)	14 (60,9)	
Symptômes au Dc, n (%)				0,663			0,842
Signes généraux non spécifiques	2 (6,9)	1 (5,6)	1 (9,1)		0 (0,0)	2 (8,7)	
Sd tumoral	15 (51,7)	8 (44,4)	7 (63,6)		3 (50,0)	12 (52,2)	
Lésions cutanées	4 (13,8)	3 (16,7)	1 (9,1)		1 (16,7)	3 (13,0)	
Découverte fortuite sur une imagerie	5 (17,2)	3 (16,7)	2 (18,2)		2 (33,3)	3 (13,0)	
Autre	3 (10,3)	3 (16,7)	0 (0,0)		0 (0,0)	3 (13,0)	
ATCD, n (%)				0,780			0,992
Hémopathie	7 (24,1)	4 (22,2)	3 (27,3)		1 (16,7)	6 (26,1)	
Tumeur solide	8 (27,6)	6 (33,3)	2 (18,2)		2 (33,3)	6 (26,1)	
Pathologie chronique	6 (20,7)	4 (22,2)	2 (18,2)		1 (16,7)	5 (21,7)	
Autre/aucuns	8 (27,6)	4 (22,2)	4 (36,4)		2 (33,3)	6 (26,1)	
Site de prélèvement, n (%)				0,097			0,376
ADP	18 (62,1)	12 (66,7)	6 (54,5)		3 (50,0)	15 (65,2)	
Végétations/ORL/Amygdale	3 (10,3)	0 (0,0)	3 (27,3)		0 (0,0)	3 (13,0)	
BOM	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)	
En dehors d'un tissu lymphoïde	8 (27,6)	6 (33,3)	2 (18,2)		3 (50,0)	5 (21,7)	

¹ Test exact de Fisher

Tableau 5 : Caractéristiques cliniques (2/2) des patients évalués dans notre étude.
TTT = traitement

Variable	Total N = 29	Corrélation avec Dc Anapath			Cas avec une alerte dans la conclusion		
		Oui N = 18	Non N = 11	p-value ¹	Oui N = 6	Non N = 23	p-value ¹
Proposition TTT, n (%)				0,273			0,678
Surveillance	4 (14,3)	1 (5,6)	3 (30,0)		1 (16,7)	3 (13,6)	
Exérèse	1 (3,6)	1 (5,6)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,5)	
Chimiothérapie seule	2 (7,1)	1 (5,6)	1 (10,0)		1 (16,7)	1 (4,5)	
Immunothérapie seule	3 (10,7)	3 (16,7)	0 (0,0)		1 (16,7)	2 (9,1)	
Chimio. + immunothérapie	18 (64,3)	12 (66,7)	6 (60,0)		3 (50,0)	15 (68,2)	
Données manquantes	1	0	1		0	1	
Évolution clinique, n (%)				0,598			0,853
Pas retrouvé	2 (7,1)	2 (11,1)	0 (0,0)		0 (0,0)	2 (9,1)	
Stabilité	7 (25,0)	3 (16,7)	4 (40,0)		2 (33,3)	5 (22,7)	
Progression	2 (7,1)	2 (11,1)	0 (0,0)		1 (16,7)	1 (4,5)	
Régression	6 (21,4)	4 (22,2)	2 (20,0)		1 (16,7)	5 (22,7)	
Rémission	11 (39,3)	7 (38,9)	4 (40,0)		2 (33,3)	9 (40,9)	
Données manquantes	1	0	1		0	1	
Réponse sur l'imagerie, n (%)				0,148			0,302
Pas de données retrouvée	9 (31,0)	7 (38,9)	2 (18,2)		2 (33,3)	7 (30,4)	
Réponse partielle	5 (17,2)	1 (5,6)	4 (36,4)		0 (0,0)	5 (21,7)	
Réponse complète	14 (48,3)	9 (50,0)	5 (45,5)		3 (50,0)	11 (47,8)	
Progression	1 (3,4)	1 (5,6)	0 (0,0)		1 (16,7)	0 (0,0)	

¹ Test exact de Fisher

Tableau 6 : Caractéristiques biologiques des patients évalués dans notre étude.

Variable	Total N = 29	Corrélation avec Dc Anapath			Cas avec une alerte dans la conclusion		
		Oui N = 16	Non N = 13	p-value ¹	Oui N = 7	Non N = 22	p-value ¹
NFS, n (%)				0,513			0,789
Non retrouvé	2 (6,9)	1 (5,6)	1 (9,1)		0 (0,0)	2 (8,7)	
Anormal	12 (41,4)	9 (50,0)	3 (27,3)		2 (33,3)	10 (43,5)	
Normal	15 (51,7)	8 (44,4)	7 (63,6)		4 (66,7)	11 (47,8)	
Béta2mG interprétation, n (%)				0,445			0,835
Non réalisée	16 (55,2)	10 (55,6)	6 (54,5)		4 (66,7)	12 (52,2)	
Augmenté	8 (27,6)	6 (33,3)	2 (18,2)		1 (16,7)	7 (30,4)	
Non augmenté	5 (17,2)	2 (11,1)	3 (27,3)		1 (16,7)	4 (17,4)	
LDH interprétation, n (%)				0,420			0,979
Non réalisée	1 (3,4)	0 (0,0)	1 (9,1)		0 (0,0)	1 (4,3)	
Augmenté	13 (44,8)	9 (50,0)	4 (36,4)		3 (50,0)	10 (43,5)	
Non augmenté	15 (51,7)	9 (50,0)	6 (54,5)		3 (50,0)	12 (52,2)	
HIS EBV, n (%)				0,327			0,233
Non réalisé	20 (71,4)	11 (61,1)	9 (90,0)		4 (80,0)	16 (69,6)	
Positif	2 (7,1)	2 (11,1)	0 (0,0)		1 (20,0)	1 (4,3)	
Négatif	6 (21,4)	5 (27,8)	1 (10,0)		0 (0,0)	6 (26,1)	

¹ Test exact de Fisher ; Test des rangs de Wilcoxon

Tableau 7 : Caractéristiques anatomopathologiques (1/2) des patients évalués dans notre étude.

Variable	Total N = 29	Corrélation avec Dc Anapath			Cas avec une alerte dans la conclusion		
		Oui N = 18	Non N = 11	p-value ¹	Oui N = 6	Non N = 23	p-value ¹
Type de prélèvement, n (%)				0,480			0,501
Biopsie filiforme	12 (41,4)	6 (33,3)	6 (54,5)		2 (33,3)	10 (43,5)	
Biopsie chirurgicale/pièce chirurgicale	12 (41,4)	9 (50,0)	3 (27,3)		4 (66,7)	8 (34,8)	
Biopsie	5 (17,2)	3 (16,7)	2 (18,2)		0 (0,0)	5 (21,7)	
BOM	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)	
Architecture, n (%)				< 0,001			0,781
Artefact d'écrasement/Matériau exigüe	4 (13,8)	1 (5,6)	3 (27,3)		1 (16,7)	3 (13,0)	
Nodulaire	5 (17,2)	0 (0,0)	5 (45,5)		0 (0,0)	5 (21,7)	
Diffus	18 (62,1)	16 (88,9)	2 (18,2)		5 (83,3)	13 (56,5)	
Autre	2 (6,9)	1 (5,6)	1 (9,1)		0 (0,0)	2 (8,7)	
Taille des cellules, n (%)				0,665			0,389
Artefact d'écrasement	1 (3,4)	1 (5,6)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,3)	
Petite	10 (34,5)	4 (22,2)	6 (54,5)		4 (66,7)	6 (26,1)	
Petite à moyenne	3 (10,3)	2 (11,1)	1 (9,1)		1 (16,7)	2 (8,7)	
Moyenne	6 (20,7)	4 (22,2)	2 (18,2)		1 (16,7)	5 (21,7)	
Moyenne à grande	2 (6,9)	2 (11,1)	0 (0,0)		0 (0,0)	2 (8,7)	
Grande	7 (24,1)	5 (27,8)	2 (18,2)		0 (0,0)	7 (30,4)	
Nucléole, n (%)				0,013			0,721
Oui	14 (48,3)	12 (66,7)	2 (18,2)		2 (33,3)	12 (52,2)	
Non	14 (48,3)	5 (27,8)	9 (81,8)		4 (66,7)	10 (43,5)	
Artefacts d'écrasement	1 (3,4)	1 (5,6)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,3)	
Nécrose, n (%)				0,512			0,921
Oui	2 (6,9)	2 (11,1)	0 (0,0)		0 (0,0)	2 (8,7)	
Non	27 (93,1)	16 (88,9)	11 (100,0)		6 (100,0)	21 (91,3)	
Aspect des noyaux, n (%)				0,107			0,964
Sans précision/régulier	9 (31,0)	8 (44,4)	1 (9,1)		2 (33,3)	7 (30,4)	
Irrégulier	18 (62,1)	9 (50,0)	9 (81,8)		4 (66,7)	14 (60,9)	
Autre	2 (6,9)	1 (5,6)	1 (9,1)		0 (0,0)	2 (8,7)	

¹ Test exact de Fisher

Tableau 8 : Caractéristiques anatomopathologiques (2/2) des patients évalués dans notre étude.

Variable	Total N = 29	Corrélation avec Dc Anapath			Cas avec une alerte dans la conclusion		
		Oui N = 18	Non N = 11	p-value ¹	Oui N = 6	Non N = 23	p-value ¹
Hémopathie B/T, n (%)				0,268			0,515
B	26 (89,7)	15 (83,3)	11 (100,0)		5 (83,3)	21 (91,3)	
T	3 (10,3)	3 (16,7)	0 (0,0)		1 (16,7)	2 (8,7)	
Sous-type de Lymphome B, n (%)				0,036			0,129
Lymphome B à grandes cellules	9 (34,6)	8 (53,3)	1 (9,1)		0 (0,0)	9 (42,9)	
Lymphome B à petites cellules	17 (65,4)	7 (46,7)	10 (90,9)		5 (100,0)	12 (57,1)	
Données manquantes	3	3	0		1	2	
Sous-type de Lymphome B à grandes cellules, n (%)				0,932			0,994
LBDGC GC	5 (55,6)	4 (50,0)	1 (100,0)		0 (0,0)	5 (55,6)	
LBDGC non GC	3 (33,3)	3 (37,5)	0 (0,0)		0 (0,0)	3 (33,3)	
Burkitt	1 (11,1)	1 (12,5)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (11,1)	
Données manquantes	20	10	10		6	14	
Sous-type de Lymphome B à petites cellules, n (%)				0,010			0,912
LF	7 (41,1)	0 (0,0)	7 (70,0)		2 (50,0)	5 (41,7)	
LLC	2 (11,7)	2 (28,5)	0 (0,0)		1 (25,0)	1 (8,3)	
LZM	5 (29)	4 (57,1)	1 (10,0)		1 (25,0)	4 (33,3)	
LM	2 (11,7)	1 (14,2)	1 (10,0)		0 (0,0)	1 (8,3)	
LLP	1 (5,8)	0 (0,0)	1 (10,0)		0 (0,0)	1 (8,3)	
Données manquantes	12	11	1		2	11	
Sous-type de lymphome T, n (%)				0,972			0,333
LTAI	1 (33,3)	1 (33,3)	0 (0,0)		1 (100,0)	0 (0,0)	
LAGC ALK+	2 (66,7)	2 (66,7)	0 (0,0)		0 (0,0)	2 (100,0)	
Données manquantes	26	15	11		5	21	
Nombre d'IHC réalisées, Médiane [Q1- Q3]	12 [11 - 15]	13 [11 - 17]	11 [11 - 13]	0,106	12 [11 - 14]	12 [11 - 15]	0,978
CD10, n (%)				0,080			0,488
Non réalisé	1 (3,4)	0 (0,0)	1 (9,1)		0 (0,0)	1 (4,3)	
Positif	11 (37,9)	5 (27,8)	6 (54,5)		1 (16,7)	10 (43,5)	
Négatif	17 (58,6)	13 (72,2)	4 (36,4)		5 (83,3)	12 (52,2)	
Ki67, Médiane [Q1- Q3]	30 [15 - 80]	70 [20 - 84]	20 [15 - 50]	0,052	20 [16 - 20]	60 [15 - 80]	0,291

¹ Test exact de Fisher ; Test des rangs de Wilcoxon

Tableau 9 : Caractéristiques des résultats du test Lymphosign évalués dans le cadre de notre étude.

Variable	Corrélation avec Dc Anapath				Cas avec une alerte dans la conclusion		p-value ¹
	Total N = 29	Oui N = 18	Non N = 11	p-value ¹	Oui N = 6	Non N = 23	
N° de RUIJ, n (%)				0,869			0,538
1	7 (24,1)	5 (27,8)	2 (18,2)		1 (16,7)	6 (26,1)	
2	8 (27,6)	4 (22,2)	4 (36,4)		1 (16,7)	7 (30,4)	
3	4 (13,8)	3 (16,7)	1 (9,1)		2 (33,3)	2 (8,7)	
4	10 (34,5)	6 (33,3)	4 (36,4)		2 (33,3)	8 (34,8)	
Conclusion du test, n (%)				0,536			0,356
LBDGC non GC	6 (20,7)	3 (16,7)	3 (27,3)		0 (0,0)	6 (26,1)	
LBDGC GC	9 (31,0)	5 (27,8)	4 (36,4)		2 (33,3)	7 (30,4)	
LZM	6 (20,7)	4 (22,2)	2 (18,2)		2 (33,3)	4 (17,4)	
LLC	2 (6,9)	2 (11,1)	0 (0,0)		1 (16,7)	1 (4,3)	
LAGC ALK+	2 (6,9)	2 (11,1)	0 (0,0)		0 (0,0)	2 (8,7)	
LTAI	1 (3,4)	1 (5,6)	0 (0,0)		1 (16,7)	0 (0,0)	
LM	1 (3,4)	1 (5,6)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (4,3)	
Inclassé	2 (6,9)	0 (0,0)	2 (18,2)		0 (0,0)	2 (8,7)	
Quality score, Médiane [Q1- Q3]	17,2 [7,2 - 23,1]	19,2 [7,1 - 24,7]	14,6 [8,0 - 20,4]	0,412	4,3 [3,7 - 4,4]	20,7 [15,8 - 24,6]	< 0,001
Nombre de reats, Médiane [Q1- Q3]	90,9 [57,7 - 161,5]	113,8 [58,3 - 190,1]	86,3 [56,7 - 133,4]	0,438	17,8 [11,1 - 27,6]	129,2 [72,7 - 192,6]	< 0,001
Fact d'amplification, Médiane [Q1- Q3]	6 [4 - 8]	6 [4 - 8]	4 [3 - 9]	0,515	5 [3 - 7]	6 [4 - 9]	0,294
Pourcentage de cellules B, Médiane [Q1- Q3]	95 [89 - 98]	98 [86 - 100]	95 [93 - 95]	0,152	95 [90 - 95]	98 [89 - 99]	0,485
Pourcentage de cellules T, Médiane [Q1- Q3]	5 [2 - 11]	2 [0 - 14]	5 [5 - 7]	0,152	5 [5 - 10]	2 [2 - 11]	0,485
B High Grade, Médiane [Q1- Q3]	75 [40 - 95]	79 [40 - 98]	75 [57 - 82]	0,559	40 [35 - 44]	80 [45 - 98]	0,041
B Low Grade, Médiane [Q1- Q3]	25 [5 - 60]	21 [2 - 60]	25 [16 - 43]	0,559	60 [56 - 65]	18 [2 - 55]	0,041
B COO, n (%)				0,968			0,932
non GC (=ABC)	16 (64,0)	10 (66,7)	6 (60,0)		3 (75,0)	13 (61,9)	
GC	9 (36,0)	5 (33,3)	4 (40,0)		1 (25,0)	8 (38,1)	
PMBL	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)	0 (0,0)	
Pourcentage de probabilité du diagnostic retenu, Médiane [Q1- Q3]	67 [50 - 83]	66 [50 - 84]	68 [54 - 76]	0,810	50 [42 - 63]	73 [53 - 85]	0,055
Nbre de marqueur à 0, Médiane [Q1- Q3]	2 [1 - 4]	2 [1 - 3]	2 [0 - 6]	0,855	5 [4 - 6]	2 [0 - 3]	0,020
Nombre de marqueurs en faveur du dc proposé par l'algorithme, Médiane [Q1- Q3]	16 [14 - 19]	16 [15 - 19]	16 [14 - 20]	0,856	15 [14 - 17]	16 [15 - 19]	0,244
p-value minimale, Médiane [Q1- Q3]	6.10 ⁻⁶⁶ [6.10 ⁻⁶⁶ ; 1.10 ⁻²⁷]	2.10 ⁻⁴⁴ [6.10 ⁻⁴⁸ ; 2.10 ⁻¹⁹]	6.10 ⁻⁸⁸ [5.10 ⁻⁹⁵ ; 2.10 ⁻³⁴]	0,065	6.10 ⁻⁴⁸ [2.10 ⁻⁴⁶ ; 2.10 ⁻⁴⁴]	6.10 ⁻⁴⁸ [3.10 ⁻⁴⁶ ; 1.10 ⁻²⁷]	0,428

¹ Test exact de Fisher ; Test des rangs de Wilcoxon

III.2.3. Calculs de la spécificité du test

La très bonne spécificité du test pour le diagnostic des lymphomes T ($Sp = 100$) est soulignée dans le tableau 10. Néanmoins, il existe une très mauvaise sensibilité pour le diagnostic des LF ($Se = 0$).

Tableau 10 : Sensibilité et spécificité du test Lymphosign.

	Sensibilité	Spécificité
Hémopathie B	100	100
Hémopathie T	100	100
LBDGC	100	67
LF	0	100
LLC	100	100
LZM	75	87
LM	50	100
LLP	-	100
LT	100	100
LTAI	100	100

III.2.4. Comparaison de la cellule d'origine avec le diagnostic anatomopathologique

Comme le montre la figure 17, l'estimation de la cellule d'origine fournie par le test est corrélée à celle proposée par le diagnostic anatomopathologique. A noter que 2 LF et 1 LBDGC GC ont une cellule d'origine estimée par le test non GC.

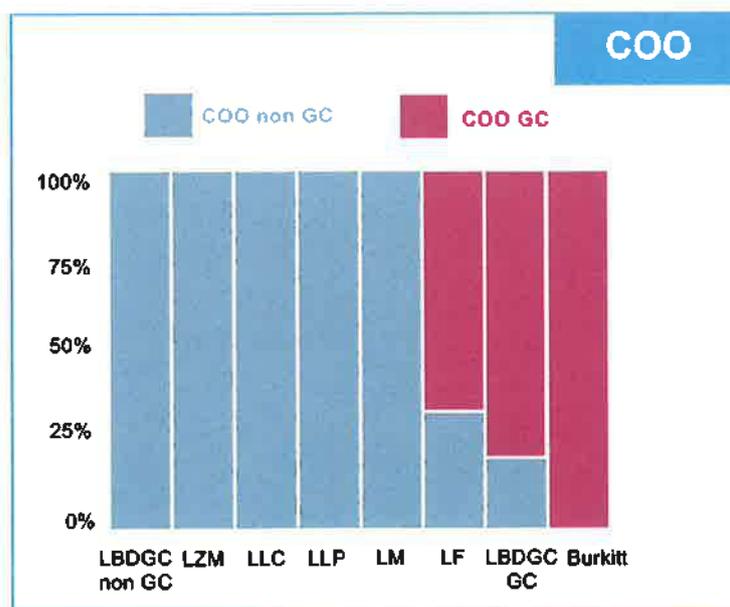


Figure 17 : Comparaison de la cellule d'origine donnée par le test Lymphosign, avec le diagnostic anatomopathologique pour les lymphomes B.

III.2.5. Comparaison du grade avec le diagnostic anatomopathologique

Comme le montre la figure 18, la probabilité de classement en lymphome de haut grade était corrélée au diagnostic anatomopathologique. Les lymphomes T n'ont pas été inclus dans ce graphique. Un LZM présentait une probabilité de lymphome de haut grade de 82 %.

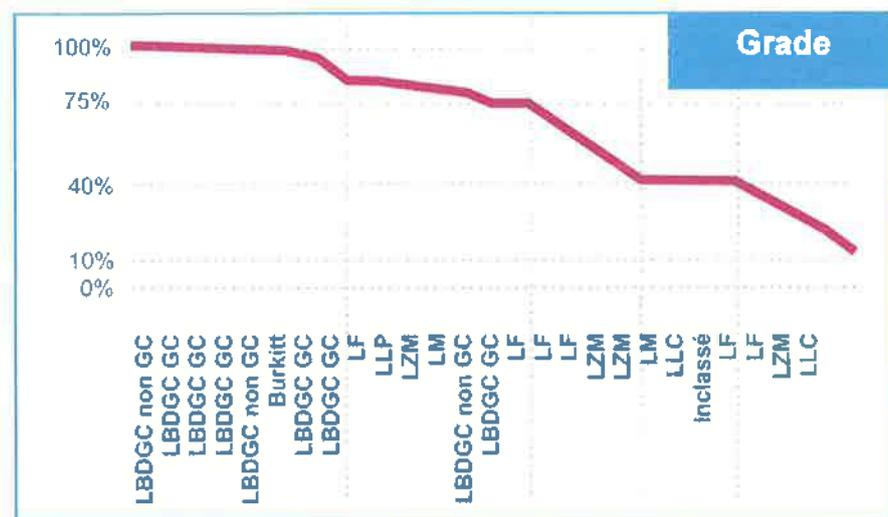


Figure 18 : Probabilité de classement en lymphome de haut grade par le test Lymphosign selon les diagnostics réalisés en anatomopathologie.

III.2.6. Corrélation entre l'IHC et l'expression génique du Ki67

Les différents marqueurs utilisés en anatomie pathologique (à partir de l'analyse du marquage immunohistochimique) et inclus dans le panel de gènes du test Lymphosign sont présentés en annexe 4. Pour chaque graphique, l'abscisse représente l'expression obtenue par le test Lymphosign et l'ordonnée l'interprétation anatomopathologique. Il existait une bonne corrélation entre le marquage immunohistochimique et l'expression évaluée par le test.

La corrélation entre l'estimation de l'index de prolifération Ki67 donnée par l'anatomopathologiste et l'expression du Ki67 obtenue par le test Lymphosign est présentée dans la figure 19. A noter qu'un cas présente une discordance importante, avec une expression peu élevée à 0,25 (test Lymphosign) et une estimation du Ki67 élevée à 70 % (IHC).

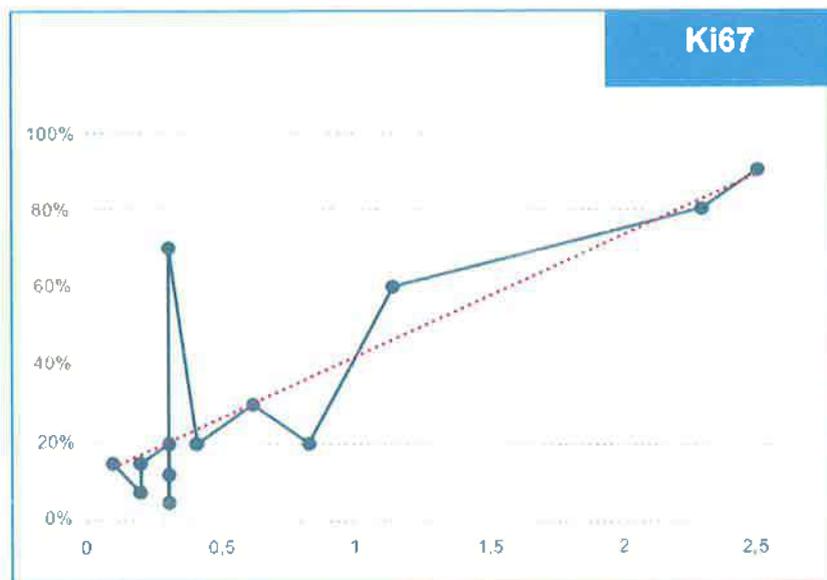


Figure 19 : Corrélation entre l'index de prolifération estimé par l'anatomopathologiste et l'expression du Ki67 évaluée par le test Lymphosign

III.2.7. Étude des marqueurs exprimés par les LBDGC et les lymphomes B à petites cellules

La figure 20 compare le profil d'expression des gènes observé dans les LBDGC avec celui identifié dans les lymphomes B à petites cellules. Il permet de mettre en évidence un ensemble de marqueurs augmentés dans les LBDGC dont :

- *Ki67* ;
- marqueurs impliqués dans l'origine GC d'une COO : *BCL6 ex1-BCL6e2*, *CARD11*, *ASB13*, *NEK6*, *CD10*, *MEF2B* ;
- marqueurs impliqués dans l'origine PMBL d'une COO : *CD71*, *IL411* ;
- marqueurs de lymphocytes B : *CD38*, *CD22* ;
- marqueur histiocytaire : *CD163* ;
- autres marqueurs : *MYCe1-MYCe2*, le *TCL1A*, l'*AIDe2-3* et le *CD70*.

Il existe un ensemble de marqueurs augmentés dans les lymphomes B à petites cellules. Parmi ces marqueurs :

- marqueurs de lymphocytes T : *ICOS*, *CD5*, *GATA3*, *FOXP3*, *CD28*, *CD45RO*, *CD3*, *TCR γ* , *CXCL13*, *TCR β* ;
- marqueurs de réarrangements des gènes des Ig : *JH-C μ* , *I δ -C δ* , *JH-C α* , *JH-C γ* , *I γ -C γ* ;
- marqueur exprimé par les cellules folliculaires dendritiques : *CD23* ;
- marqueurs impliqués dans l'origine PMBL d'une COO : *FGFR1*, *CCND1*, *MAL*, *CRBN* ;
- marqueur plasmocytaire : *CD138* ;
- autres marqueurs : *BCL2e1-BCL2e2* et le *CCR4*.

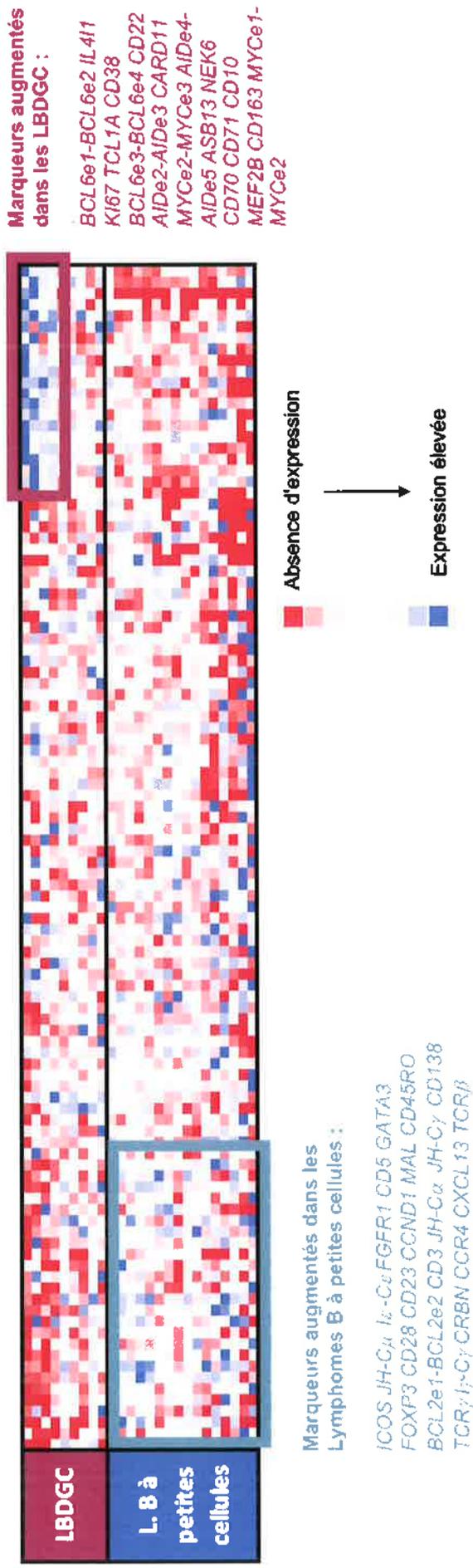


Figure 20 : Comparaison des profils d'expressions observés pour les LBDGC et les lymphomes B à petites cellules.

III.2.8. Étude des marqueurs exprimés par les LF

La plupart des LF diagnostiqués en anatomie pathologique ont été classés en LBDGC par le test Lymphosign. Si on prend les LF et les LBDGC diagnostiqués en anatomopathologie, et que l'on compare leur probabilité de classement en lymphome de haut grade, ainsi que l'expression du *Ki67* par le test Lymphosign, on obtient la figure 21. La probabilité de classement en lymphome de haut grade pour les LF varie de 30 à 85 %, avec une médiane à 57 %. Celle des LBDGC varie de 75 à 100 %, avec une moyenne à 97 %. L'expression du *Ki67* varie de 0 à 1,12 pour les LF, avec une médiane à 0,15. Celle des LBDGC varie de 0,83 à 9,4 avec une médiane à 2,3.

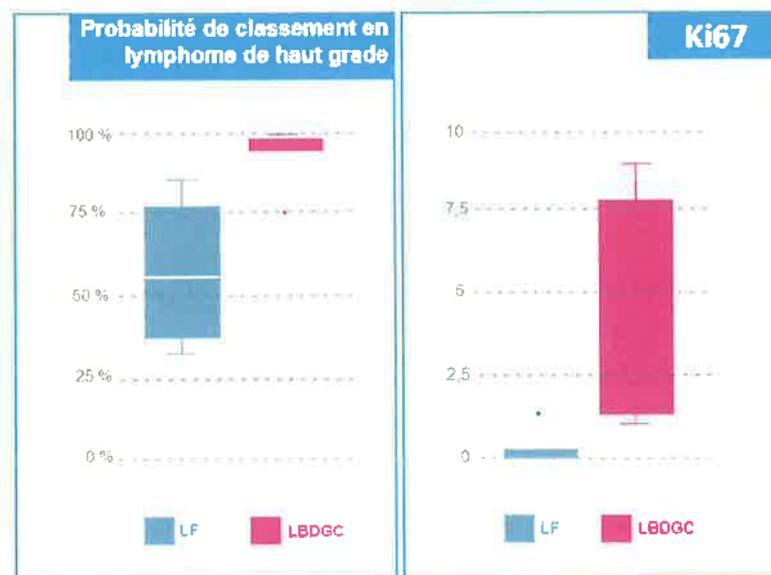


Figure 21 : Comparaison de la probabilité de classement en lymphome de haut grade et de l'expression du *Ki67* entre les LF et les LBDGC diagnostiqués en anatomopathologie.

Deux LF diagnostiqués en anatomie pathologique ont été classés en LZM. L'annexe 5 met en évidence que les 3 marqueurs les plus discriminants, permettant à l'algorithme de différencier un LZM avec un LF, sont le *BCL6 exon1-2*, le *BCL6 exon3-4* et le *CD10*.

La figure 22 compare l'expression du *CD10*, du *BCL6 exon3-4* et du *BCL6 exon1-2* entre les LF et les lymphomes B à petites cellules non LF.

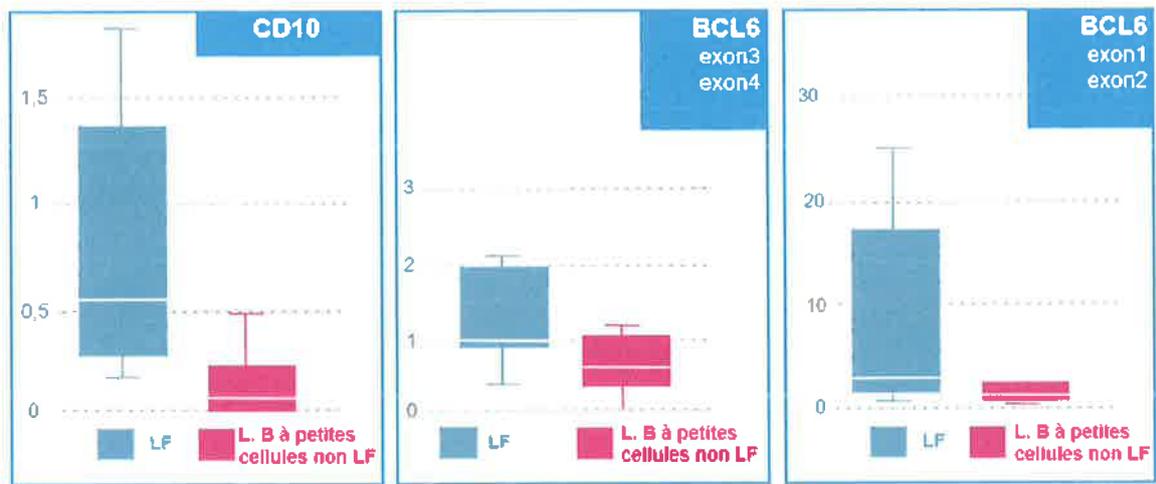


Figure 22 : Comparaison de l'expression du CD10, du BCL6 exon3-4 et du BCL6 exon 1-2 entre les LF et les lymphomes B à petites cellules non LF diagnostiqués en anatomopathologie.

III.3. Étude des cas discordants

Une étude et une réinterprétation des données brutes du test Lymphosign, associées à une relecture des lames anatomopathologiques ont été réalisées pour les 11 cas discordants. Les résultats sont résumés dans le tableau 11. L'analyse approfondie réalisée au cas par cas est disponible en annexe 6.

Tableau 11 : Résumé du classement définitif des cas discordants, obtenue après réinterprétation des données Lymphosign et deuxième lecture anatomopathologique.

Dc Anapath initial	Classement Lymphosign	Commentaires	Classement définitif
LM variant pléomorphe	LBDGC non GC / LM ?	23 marqueurs significatifs en faveur d'un LBDGC non GC contre 2 en faveur d'un LM. Grandes cellules, architecture diffuse. IHC : CD20+ CD5- BCL6+ CYCLINE D1+ SOX11-. Minime réseau de FDC résiduel dissocié. Ki67 élevé à 80%. Recherche mutation MYD88 L265P en cours.	LBDGC non GC
LLP	LTNK / LBDGC (si B) / LTP NOS / Hodgkin / TrichB ? / Autre	Nombre de marqueurs à 0 trop élevé : ininterprétable.	LLP
LF 3A	LTNK / Inclassé (si B) / LTP NOS / Hodgkin / TrichB ? / Autre ? / LM ?	Nombre de marqueurs à 0 trop élevé : ininterprétable.	LF 3A
Lymphome B à petites cellules difficile à classer, plutôt de type LF 1-2	LBDGC GC	Confirmation de la COO GC. Probabilité de classement en lymphome de haut grade de 55 %. Expression génique du Ki67 à 0,30.	LF 1-2
LF 1-2	LBDGC GC	Score de qualité trop bas : ininterprétable.	LF 1-2
LF 3A	LBDGC GC	Probabilité de classement en lymphome de haut grade de 85 %. Expression génique du Ki67 à 1,12. La relecture met en évidence de nombreux centroblastes susceptibles d'orienter vers un LF3B.	LF3B
LF 1-2	LBDGC GC	Probabilité de classement en lymphome de haut grade de 62 %. Expression génique du Ki67 à 0,19. La relecture confirme la petite taille des cellules et la présence d'un réseau de FDC non dissocié.	LF 1-2
LF 1-2	LZM	Marquage CD10 positif en IHC. Expression génique du CD10 à 0,2 ; du BCL6 exon 1-2 à 1,72 et du BCL6 exon 3-4 à 1.	LF 1-2
LF 1-2	LZM	Marquage CD10 positif en IHC. Expression génique du CD10 à 0,45 ; du BCL6 exon 1-2 à 1,12 et du BCL6 exon 3-4 à 0,9.	LF 1-2
LZM	LBDGC non GC	Probabilité de classement en lymphome de haut grade de 82 %. Expression génique du Ki67 à 0,8. La relecture confirme la petite taille des cellules, mais souligne un Ki67 élevé évalué à 70 %.	LZM. A noter la présence d'un Ki67 à 70%
LF 3B	LBDGC non GC	Probabilité de classement en lymphome de haut grade de 75 %. Expression génique du Ki67 à 0,9. La relecture confirme la présence d'un réseau de FDC hyperplasique non dissocié.	LF 3B

IV. Discussion

IV.1. Forces de l'étude

Les caractéristiques intrinsèques du test sont à mettre en avant. Cette technique ne nécessite pas de purification jusqu'à l'obtention des librairies, ce qui limite les pertes de matériel et assure une très bonne sensibilité. Les séquences génétiques ciblées par les sondes sont particulièrement courtes (entre 40 et 60 bases) ce qui assure une très bonne robustesse vis-à-vis de la dégradation des ARN. La technique est relativement simple à mettre en place et à réaliser dans un laboratoire disposant d'une plateforme de génétique moléculaire. Une brève réunion avec l'équipe technique du laboratoire développeur a été nécessaire. Comme pour la plupart des techniques de NGS, il est possible d'analyser plusieurs échantillons simultanément, permettant un gain de temps technique. Le matériel nécessaire était déjà disponible au sein du laboratoire, et le kit d'extraction d'ARN préconisé était déjà couramment utilisé, facilitant sa mise en place. La rapidité de rendu du résultat, en lien avec une réalisation technique courte (24 à 48h), et un classement instantané par le logiciel algorithmique, est tout à fait compatible avec les délais imposés pour une prise en charge optimale des patients. En effet, dans la majorité des cas, il n'y a pas d'étape d'interprétation à réaliser, et le résultat rendu à l'état brut peut être suffisant en lui-même.

Ce test présente l'intérêt de pouvoir être réalisé sur tout type d'échantillon : il n'a pas été démontré de différence statistiquement significative entre cas concordant et discordant sur le type de prélèvement (corrélé à la taille du prélèvement), sur la présence d'artefacts d'écrasement ni sur la présence de nécrose. Le nombre de copeaux réalisés pour les petits prélèvements (5 copeaux de 10 μm), nécessaire à la réalisation du test, est à peu près équivalent à la réalisation d'une quinzaine d'IHC (réalisées sur des coupes de 3 μm). Cela représente une quantité non négligeable de matériel et pourrait être un obstacle à la réalisation de ce test. Néanmoins, dans le cadre de notre étude, une quantité suffisante de matériel tumoral à extraire était disponible pour tous les cas, alors que les blocs avaient déjà été utilisés pour les techniques d'IHC.

Nous avons démontré que l'expression du *Ki67* évaluée par le test Lymphosign est fortement corrélée à l'analyse *Ki67* effectuée en anatomopathologie. Cet index de prolifération est connu comme un marqueur fiable dans le pronostic des lymphomes, notamment les LM, où il est intégré dans l'Index Pronostic International Combiné (41). Un seul cas de notre étude présentait une forte discordance entre le *Ki67* exprimé et le *Ki67* estimé : il s'agissait d'un LBDGC intravasculaire avec un très faible pourcentage de cellules tumorales sur la lame entière, ce qui peut expliquer ce décalage. La bonne correspondance du *Ki67* est à mettre en parallèle avec la bonne corrélation identifiée entre la probabilité de classement en lymphome de haut grade et le grade déduit du diagnostic anatomopathologique.

Les classements des témoins inclus dans les 4 *runs*, étaient corrélés avec les diagnostics anatomopathologiques. Sur l'ensemble des cas de notre étude, il existe une concordance du test Lymphosign avec 62 % des diagnostics établis par l'examen anatomopathologique. Cette correspondance avait déjà été mise en évidence par l'équipe de Bobée, spécifiquement pour les lymphomes B à petites cellules, ainsi que pour le classement du phénotype non GC, GC ou PMBL des lymphomes B à grandes cellules (31,35). Notre étude souligne la très bonne spécificité et sensibilité du test pour le classement des lymphomes T. Cela peut être expliqué par la détection des mutations spécifiques *RHOA* et *IDH*. Ces lymphomes représentent très souvent une difficulté diagnostic du point de vue des anatomopathologistes. En effet, en

analysant les données du réseau LYMPHOPATH, l'équipe de Laurent C. a souligné que les LTAI et les LAGC ALK- font partie des diagnostics les plus fréquemment erronés avant relecture par un centre expert (42).

Un des résultats importants de cette étude est la mauvaise sensibilité du test Lymphosign concernant le classement des LF (Se = 0). De ce fait, les caractéristiques des LF (architecture nodulaire, absence de nucléole, petites cellules) sont associées avec les cas discordants. La plupart des LF ont été classés en LBDGC. Dans la littérature, il existe peu de marqueurs moléculaires permettant de faire la distinction entre ces deux lymphomes. Nous avons pu décrire un ensemble de marqueurs élevés dans les LBDGC, dont des marqueurs histiocytaires, alors qu'il existe de nombreux marqueurs lymphocytaires T associés aux lymphomes B à petites cellules. La population cellulaire composant le stroma tumoral de ces lymphomes pourrait jouer un rôle important dans la distinction LBDGC/Lymphomes B à petites cellules. De nouvelles études devraient analyser l'impact de ces facteurs. L'apport de l'anatomopathologie reste essentiel pour le diagnostic des LF, s'appuyant notamment sur la taille des cellules et l'existence d'un réseau de FDC.

Les LF classés en LZM présentaient une expression faible considérée comme non significative, du *CD10*, du *BCL6* exon 3-4 et du *BCL6* exon 1-2. Ces 3 marqueurs sont classiquement augmentés dans les LF. Les seuils de valeurs permettant de déterminer si un marqueur est considéré comme élevé ou faible, et donc significatif pour un lymphome spécifique, ont été déterminés en se basant sur la moyenne d'expression mesurée sur une cohorte de chaque sous-type de lymphome (LF, LZM, LM...). On peut ainsi se poser la question de la représentativité de cette cohorte, et discuter le seuil de positivité utilisé par le test Lymphosign pour chaque lymphome.

La description du LM variant pléomorphe classé en LBDGC non GC / LM est disponible en annexe 6. La relecture de ce cas souligne la présence de cellules de grandes tailles, classiques dans les LBDGC, mais qui sont aussi décrites dans les variants pléomorphes de LM. La positivité du *BCL6* est rarement détectée dans les LM (43). La négativité du *CD5* et de *SOX11*, la présence d'un *Ki67* élevé et l'absence de réseau de FDC orientent plutôt vers un LBDGC, alors que la positivité de la Cycline D1 suppose la présence d'un réarrangement du gène *CCND1* traditionnellement associé au LM. Il s'agit donc d'un cas difficile d'interprétation, et la question d'une demande d'analyse complémentaire peut être soulevée. La positivité très focale du *CD5* associée à une positivité de la Cycline D1 a pu conforter le diagnostic de LM. La conclusion du test Lymphosign est LBDGC non GC / LM. Cependant, le classement principal retenu est LBDGC non GC, caractérisé par un nombre élevé de marqueurs significatifs en sa faveur (23). De plus, il existe une augmentation de l'expression de *CCND1* et de *MYD88 L265P*. La présence d'une mutation au sein du gène *CCND1* est classique dans les LM (41) et peut être identifié dans les lymphomes non GC (44). La mutation *MYD88 L265P* est reconnue dans 7 % de lymphomes B à petites cellules non LLP dont les LM (45)(46), alors qu'il n'est pas rare de la détecter dans les LBDGC non GC. Au vu de la relecture des lames et des données du test Lymphosign, un reclassement en LBDGC non GC apparaît approprié. Ce cas complexe met en évidence tout l'intérêt de la disponibilité d'un test rapide au sein de la PGMC, qui aurait peut-être permis au médecin d'accéder plus aisément à une technique d'analyse complémentaire, et ainsi réduire le risque d'erreur. A noter que ce patient est en rémission complète après 4 cures de R-COP Aracytine.

Au total, sur les 30 cas analysés, le test apporte une aide diagnostique importante dans 6 cas (20 %) :

- une prolifération B à petites cellules CD5-, pour laquelle le test Lymphosign confirme la COO non GC, et la classe en LZM. Cette concordance avec le diagnostic anatomopathologique est intéressante car il n'y a pas de marqueur IHC spécifique du LZM, ceci en fait donc souvent un diagnostic d'exclusion (notamment par la négativité du CD10 et du BCL6 en IHC). Le test Lymphosign apporte un argument supplémentaire pour ce lymphome ;
- un LTAI, pour lequel la biologie moléculaire réalisée avait montré une monoclonalité du TCR avec un délai de résultat élevé. Le test apporte pour ce cas un diagnostic précis et rapide ;
- un LM pourrait éventuellement être reclassé en LBDGC non GC ;
- une prolifération B à petites cellules plutôt de type centro-folliculaire, dont l'origine centro-germinative a été confirmée par le test Lymphosign ;
- un LF3A pour lequel le test a souligné un grade élevé, et la relecture du cas un reclassement en LF3B ;
- un LZM pour lequel le test a souligné un grade élevé. La relecture de ce cas a montré un Ki67 élevé, ce qui pourrait être souligné dans la conclusion.

IV.2. Limites de l'étude

Le coût de la technique a été un frein à cette étude. Le coût d'un examen anatomopathologique, avec l'utilisation en moyenne de plus de 10 anticorps pour le diagnostic d'un lymphome, correspond à un tarif de 160,00 € selon la cotation de la classification commune des actes médicaux (CCAM) (annexe 7). Le coût total du test Lymphosign, est évalué à 204,00 € par patient (annexe 8). Le coût du test est donc supérieur au coût d'un examen anatomopathologique.

Parmi les événements imprévus, il est à noter la présence d'un problème technique au cours du troisième *run*. Le séquençage n'a généré aucun FASTQ. Les concentrations d'ARN initialement extraits, et les concentrations d'ADNc finalement amplifiés ne présentaient pas de différence avec les deux premiers *runs*. Après concertation avec l'équipe technique du laboratoire fabriquant et commercialisant le kit, l'inexpérience technique du manipulateur (interne), qui n'était pas secondé par un technicien au cours de cette manipulation, a été retenue comme la probable cause des résultats défectueux. La dernière manipulation s'est déroulée sans difficulté.

Les critères de qualité du test sont peu satisfaisants. Tous les cas discordants ne présentent pas une alerte « Attention : score bas » dans la conclusion, et certains résultats sont aberrants sans qu'il n'y ait de message d'erreur incitant à la prudence. En plus du nombre de *read* et du score de qualité, nous avons pu décrire une troisième variable qui est corrélée aux cas présentant une alerte dans la conclusion : il s'agit du nombre de marqueurs significatifs avec une expression proche de 0.

Un cas a été conclu en échec. Il s'agissait d'une biopsie ostéo-médullaire (BOM), ayant nécessité une étape pré-analytique de décalcifiant au TBD2, qui dégrade l'ADN et l'ARN. Ce résultat était prévisible et atteste de l'importance de bonnes étapes pré-analytiques. On peut signaler que pour ce cas, la conclusion du test était « échec (DLBCL non GC) ». Il peut donc

y avoir une source de confusion, car si le test insiste sur le terme « échec », il propose quand même un classement en LBDGC non GC. Ce classement est ici totalement aberrant car il s'agissait d'un LT GLG.

La limite de l'utilisation d'un algorithme est une des problématiques rencontrées dans cette étude. En cas de discordance avec l'anatomopathologie, le nombre de marqueurs étudiés et le manque de transparence concernant l'algorithme rendent les réponses complexes à interpréter. La transparence fait partie intégrante de l'interprétabilité qui, selon Tim Miller, se définit comme « le degré à quel point un humain peut expliquer de manière cohérente les prédictions du modèle ». Ici, notre manque d'expérience dans ce domaine peut aussi expliquer nos difficultés à assimiler les résultats.

Le résumé des biomarqueurs pronostiques et théranostiques analysés est présenté dans l'annexe 9. Peu de biomarqueurs ont été relevés.

Parmi les critiques de ce travail, nous aurions pu étudier le test Lymphosign sur certains cas bénins dépourvus de lymphome. Cependant l'algorithme classe automatiquement l'échantillon en un lymphome donné, quel que soit le profil d'expression identifié. Cette précision nous avait été apportée dès le début par le laboratoire commercialisant le test, et nous avons décidé qu'il n'était pas informatif de tester des prélèvements bénins.

IV.3. Perspectives

IV.3.1. Place du test dans le paysage des études moléculaires algorithmiques

L'équipe de Scott a mis en évidence un taux de concordance supérieur à 95 % dans le classement de la COO des LBDGC, à l'aide du test Lymph2Cx analysant le profil d'expression de 20 gènes (47).

Une étude réalisée par le LYSA et l'équipe de Dubois a analysé un panel NGS de 34 gènes (Lymphopanel). Ils ont mis en évidence l'hétérogénéité moléculaire des sous-types GC et non GC, et ont identifié des mutations somatiques ayant un impact thérapeutique et pronostique. Notamment, les mutations de *TNFAIP3* et *GNA13* chez les patients avec un LBDGC non GC traités par R-CHOP, qui seraient associés à un pronostic significativement moins favorable (33).

L'équipe de Chapuy a mis au point un panel classant les LBDGC, dont les résultats sont indépendants de l'IPI clinique et suggèrent de nouvelles stratégies thérapeutiques (48). Ce panel, qui analyse les mutations récurrentes de 96 gènes (panel MutSig2CV), le nombre de copies somatiques et les variations structurelles (VS), permet de classer les LBDGC en 5 sous-types moléculaires : un LBDGC non GC avec les caractéristiques génétiques *PTEN* d'une origine de zone extra-folliculaire (C1) ; un LBDGC GC avec des VS de *BCL2* et des altérations épigénétiques (C3) ; ou des altérations des histones (C4) ; et un groupe de tumeurs indépendantes de la COO avec un inactivation bi allélique de *TP53* et de *CDKN2A* (C2).

L'annexe 10 souligne la convergence des panels de gènes récemment décrits. Cependant, il est important de noter que le test Lymphosign ne partage que quelques gènes en commun avec les autres études. Il ne prend notamment pas en compte le nombre de copies somatiques ni les variations structurelles. Bien que l'algorithme développé par l'équipe de Chapuy soit disponible librement sur internet, les données limitées du test Lymphosign ne permettent pas de bénéficier de ces récentes avancées.

IV.3.2. Utilisation du test en pratique quotidienne

Une diminution de la taille des biopsies est attendue face aux progrès de la radiologie interventionnelle (biopsies à l'aiguille, appelées FNAC-Cytologie). Selon l'OMS, ce type de prélèvement est souvent inadéquat pour le diagnostic et la classification des lymphomes et n'est pas la procédure recommandée. Compte tenu de l'approche multiparamétrique nécessaire pour établir un diagnostic optimal de lymphome, il est essentiel d'avoir suffisamment de tissu. Cependant le caractère peu invasif de la biopsie à l'aiguille par rapport à une biopsie chirurgicale et sa disponibilité rendent cette technique de plus en plus fréquente.

La figure 23 propose l'intégration du test Lymphosign dans la pratique quotidienne de l'anatomopathologiste.

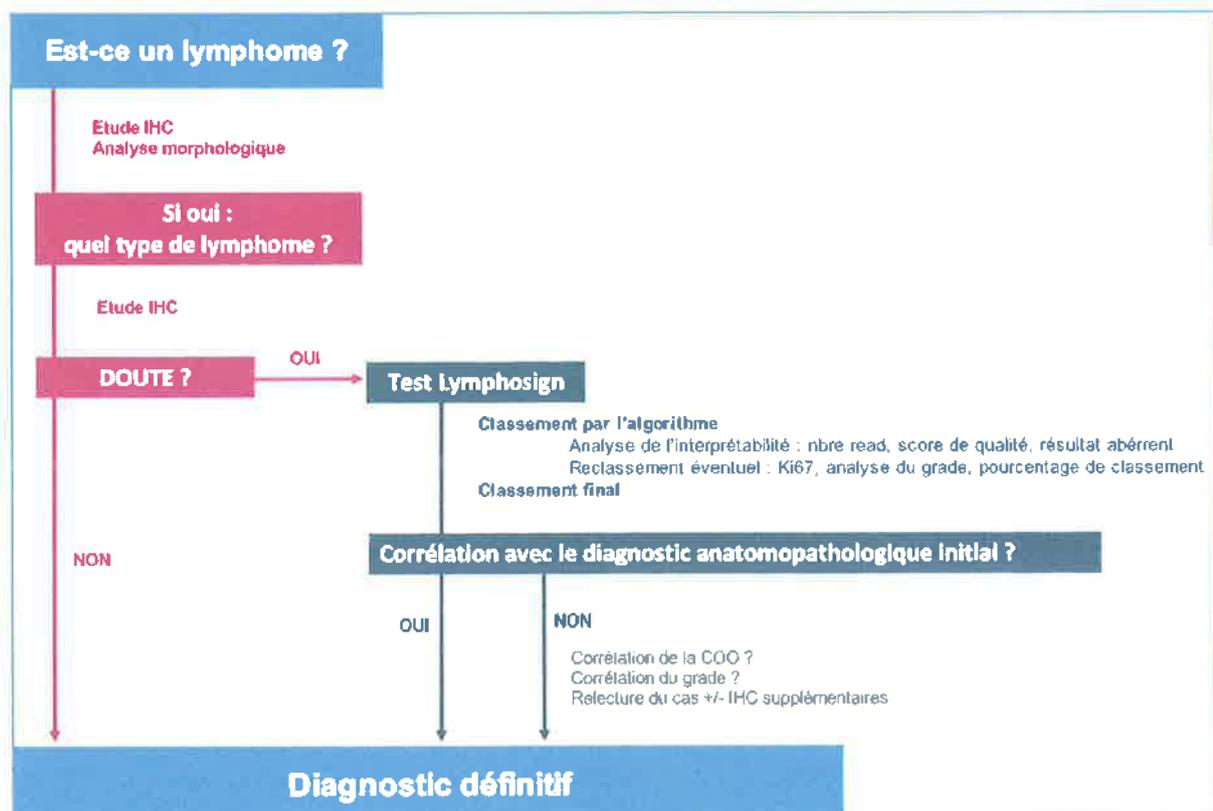


Figure 23 : Proposition d'un algorithme décisionnel intégrant le test Lymphosign dans la prise de décision de l'anatomopathologiste au cours d'un prélèvement suspect de lymphome.

Au vu du coût élevé du test, des indications précises doivent encadrer son utilisation. Nous proposons de l'utiliser dans les situations suivantes :

- en cas de suspicion de lymphome T (devant une suspicion clinique avec par exemple un rash cutané ou une localisation nasale ; ou devant une suspicion histologique par exemple face à un infiltrat polymorphe avec présence de polynucléaires éosinophiles) ;
- en cas de prélèvement de petite taille (pour conforter le diagnostic de l'anatomopathologiste) ;
- en cas de prélèvement altéré, présentant de la nécrose ou des artefacts d'écrasement rendant l'analyse morphologique et l'interprétation immunohistochimique difficile ;
- en cas de doute diagnostique.

La conclusion présente une bonne concordance avec le diagnostic anatomopathologique. Certains marqueurs sont néanmoins intéressants à analyser indépendamment de cette conclusion :

- la cellule d'origine ;
- l'expression du Ki67, corrélé au grade et notamment au LBDGC (surtout si > 1) ;
- la probabilité de classement en lymphome de haut grade, corrélé au grade et notamment au LBDGC (si $> 85\%$) ;
- le classement principal, souvent informatif dans les cas inclassés ;
- les caractéristiques additionnelles, notamment la présence d'une expression de *MYD88 L265P* ;
- une expression faible du *CD10*, du *BCL6* exon 3-4 et du *BCL6* exon 1-2 ne permet pas d'exclure un LF ; au contraire en cas de forte suspicion par l'anatomopathologiste, la présence d'une expression de ces marqueurs est plutôt en faveur d'un LF ;
- en cas de doute entre un LF et un LBDGC, la présence de nombreux marqueurs de lymphocytes T orienterait plutôt vers un LF ;
- un LBDGC associé à une expression élevée d'*EBER* et d'une COO GC est fortement suspect de lymphome de Burkitt ;

La conclusion doit être pondérée par un regard critique sur les résultats bruts. Nous avons ainsi relevé qu'avant toute réinterprétation des données, il faut être attentif aux variables suivantes :

- le score de qualité (nombre d'UMI), valide si suffisamment élevé (> 2000) ;
- le nombre de *reads* que l'on attend également suffisamment élevé ;
- le nombre de marqueurs significatifs avec une expression proche de 0 (être prudent dans l'interprétation des résultats si > 10) ;
- tout résultat totalement aberrant au vu de la présentation clinico-biologique.

Conclusion

Les lymphomes sont des tumeurs du système lymphoïde dont le diagnostic nécessite une approche multiparamétrique complexe (clinique, imagerie, morphologie, immunophénotypage, génétique). En accord avec les recommandations des instances scientifiques, nous avons réussi à mettre en place une nouvelle analyse génétique, le test Lymphosign, au sein de la Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers du CHU de Limoges. Ce test, rapide et simple à implanter, étudie le transcriptome. Un algorithme diagnostique calcule une probabilité de classement parmi les 12 LNH les plus fréquents.

Nous avons analysé 30 cas de lymphomes avec ce test. Il existe une concordance avec le diagnostic anatomopathologique dans 62 % des cas, avec une bonne corrélation pour la cellule d'origine et le grade histologique. Une réinterprétation de quelques données (critères de validité, nombre de marqueurs significatifs avec une expression proche de 0, classement principal, analyse de l'expression du *BC6*, du *CD10*, et du *Ki67*, probabilité de classement en lymphome de haut grade) permet d'améliorer la puissance du test. Les cas discordants intéressaient principalement les LF, fréquemment classés en LBDGC GC. La comparaison du profil d'expression génique entre les LBDGC et les lymphomes B à petites cellules a souligné le rôle important de la population cellulaire composant le stroma tumoral dans la distinction bas grade et haut grade. L'analyse de l'impact de ces marqueurs nécessite des études approfondies. Nous avons démontré la très bonne sensibilité et spécificité du test pour les lymphomes T, souvent considérés comme des diagnostics difficiles. Ceci permet de proposer des indicateurs fiables et utiles à l'anatomopathologiste dans le rendu de son résultat, particulièrement pour les prélèvements de petite taille, altérés (nécrosé ou présentant des artefacts d'écrasement), suspects de lymphome T ou présentant un doute diagnostique. Ce test est d'autant plus pertinent qu'il existe une diminution de la taille des biopsies face aux progrès de la radiologie interventionnelle. Au total, nous avons estimé que ce test a apporté une aide diagnostique dans 6 cas sur 30 (20 %).

Néanmoins, le coût élevé du test représente un frein à son installation en routine. La transparence de l'algorithme est complexe et limitée, et une formation préalable à son utilisation permettrait un rendu de résultat optimal.

Compte tenu de l'approche multiparamétrique nécessaire pour établir un diagnostic optimal de lymphome, ce test est un outil supplémentaire nécessaire mais il ne peut se substituer au diagnostic anatomopathologique. Son intégration dans la démarche diagnostique reste à clarifier par des études complémentaires à plus grande échelle.

Références bibliographiques

1. Cellular and Molecular Immunology - 10th Edition [Internet]. [cité 20 août 2023]. Disponible sur: <https://shop.elsevier.com/books/cellular-and-molecular-immunology/abbas/978-0-323-75748-5>
2. SH S, E C, NL H, ES J, SA P, H S, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues [Internet]. [cité 18 mai 2022]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2017>
3. SH S, E C, NL H, ES J, SA P, H S, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues [Internet]. [cité 20 avr 2021]. Disponible sur: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/WHO-Classification-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2017>
4. Synthèse_Survie_VERSION_FINALE_bis.pdf [Internet]. [cité 14 sept 2022]. Disponible sur: https://www.e-cancer.fr/content/download/317089/4542914/file/Synthèse_Survie_VERSION_FINALE_bis.pdf
5. Données globales d'épidémiologie des cancers - Epidémiologie des cancers [Internet]. [cité 14 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-chiffres-du-cancer-en-France/Epidemiologie-des-cancers/Donnees-globales>
6. Lewis WD, Lilly S, Jones KL. Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician*. 1 janv 2020;101(1):34-41.
7. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 3 févr 2000;403(6769):503-11.
8. Pon JR, Marra MA. Clinical impact of molecular features in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma. *Blood*. 14 janv 2016;127(2):181-6.
9. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 20 juin 2002;346(25):1937-47.
10. Lemonnier F, Cairns RA, Inoue S, Li WY, Dupuy A, Broutin S, et al. The IDH2 R172K mutation associated with angioimmunoblastic T-cell lymphoma produces 2HG in T cells and impacts lymphoid development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 déc 2016;113(52):15084-9.
11. Huang Y, Moreau A, Dupuis J, Streubel B, Petit B, Le Gouill S, et al. Peripheral T-cell lymphomas with a follicular growth pattern are derived from follicular helper T cells (TFH) and may show overlapping features with angioimmunoblastic T-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. mai 2009;33(5):682-90.
12. Thorns C, Bastian B, Pinkel D, Roydasgupta R, Fridlyand J, Merz H, et al. Chromosomal aberrations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma unspecified: A matrix-based CGH approach. *Genes Chromosomes Cancer*. janv 2007;46(1):37-44.
13. Zhang P, Zhang M. Epigenetic alterations and advancement of treatment in peripheral T-cell lymphoma. *Clin Epigenetics*. 7 nov 2020;12(1):169.
14. Miloudi H, Bohers É, Guillonneau F, Taly A, Gibouin VC, Vially PJ, et al. XPO1E571K Mutation Modifies Exportin 1 Localisation and Interactome in B-cell Lymphoma. *Cancers*. 30 sept 2020;12(10):E2829.
15. Spina V, Khiabani H, Messina M, Monti S, Cascione L, Brusca A, et al. The genetics of nodal marginal zone lymphoma. *Blood*. 8 sept 2016;128(10):1362-73.
16. Kaiser LM, Hunter ZR, Treon SP, Buske C. CXCR4 in Waldenström's

- Macroglobulinemia: chances and challenges. *Leukemia*. févr 2021;35(2):333-45.
17. Yu X, Li W, Deng Q, Li L, Hsi ED, Young KH, et al. MYD88 L265P Mutation in Lymphoid Malignancies. *Cancer Res*. 15 mai 2018;78(10):2457-62.
 18. Ali S, Rathore Z, Jahangir F, Rafique Z, Chughtai AS, Atiq A. Expression of c-Myc, Bcl2, Bcl6, and Cyclin D1 in High-Grade B-Cell Lymphoma. *Cureus*. sept 2022;14(9):e29527.
 19. Ramis-Zaldivar JE, Gonzalez-Farré B, Balagué O, Celis V, Nadeu F, Salmerón-Villalobos J, et al. Distinct molecular profile of IRF4-rearranged large B-cell lymphoma. *Blood*. 23 janv 2020;135(4):274-86.
 20. Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Müller-Hermelink HK, Ott MM. Cytogenetic Alterations Affecting BCL6 Are Predominantly Found in Follicular Lymphomas Grade 3B with a Diffuse Large B-Cell Component. *Am J Pathol*. août 2004;165(2):481-90.
 21. Siddiqi IN, Friedman J, Barry-Holson KQ, Ma C, Thodima V, Kang I, et al. Characterization of a variant of t(14;18) negative nodal diffuse follicular lymphoma with CD23 expression, 1p36/TNFRSF14 abnormalities, and STAT6 mutations. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. juin 2016;29(6):570-81.
 22. Okosun J, Bödör C, Wang J, Araf S, Yang CY, Pan C, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. *Nat Genet*. févr 2014;46(2):176-81.
 23. Gupta G, Garg V, Mallick S, Gogia A. Current trends in diagnosis and management of follicular lymphoma. *Am J Blood Res*. 15 août 2022;12(4):105-24.
 24. 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*. 19 mai 2016;127(20):2375-90.
 25. Rodríguez-Sevilla JJ, Salar A. Recent Advances in the Genetic of MALT Lymphomas. *Cancers*. 30 déc 2021;14(1):176.
 26. Pina-Oviedo S, Ortiz-Hidalgo C, Carballo-Zarate AA, Zarate-Osorno A. ALK-Negative Anaplastic Large Cell Lymphoma: Current Concepts and Molecular Pathogenesis of a Heterogeneous Group of Large T-Cell Lymphomas. *Cancers*. 17 sept 2021;13(18):4667.
 27. Wang M, Kibbi N, Ring N, Siddon A, Foss F, Totonchy M. DUSP22-IRF4 rearrangement in AIDS-associated ALK-negative anaplastic large cell lymphoma. *BMJ Case Rep*. 30 sept 2019;12(9):e230641.
 28. Magaki S, Satyadev R, Chen Z, Yung KS, Vinters HV, Kinney MC, et al. Central nervous system ALK-negative anaplastic large cell lymphoma with IRF4/DUSP22 rearrangement. *Brain Tumor Pathol*. janv 2022;39(1):25-34.
 29. Amin HM, Lai R. Pathobiology of ALK+ anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 1 oct 2007;110(7):2259-67.
 30. Aguilera NSI, Bijwaard KE, Duncan B, Krafft AE, Chu WS, Abbondanzo SL, et al. Differential Expression of Cyclin D1 in Mantle Cell Lymphoma and Other Non-Hodgkin's Lymphomas. *Am J Pathol*. 1 déc 1998;153(6):1969-76.
 31. Bobée V, Drieux F, Marchand V, Sater V, Veresezan L, Picquetot JM, et al. Combining gene expression profiling and machine learning to diagnose B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood Cancer J*. 22 mai 2020;10(5):1-13.
 32. M R, R AA, L TR, Sm RP, R MA, L C, et al. Peripheral T-cell lymphoma: molecular profiling recognizes subclasses and identifies prognostic markers. *Blood Adv [Internet]*. 28 déc 2021 [cité 4 juill 2023];5(24). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34592752/>
 33. Dubois S, Vially PJ, Mareschal S, Bohers E, Bertrand P, Ruminy P, et al. Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: a LYSA Study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*.

15 juin 2016;22(12):2919-28.

34. Zhang W, Ao Q, Guan Y, Zhu Z, Kuang D, Li MMQ, et al. A novel diagnostic approach for the classification of small B-cell lymphoid neoplasms based on the NanoString platform. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* mai 2022;35(5):632-9.
35. Bobée V, Ruminy P, Marchand V, Viailly PJ, Abdel Sater A, Veresezan L, et al. Determination of Molecular Subtypes of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Using a Reverse Transcriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Classifier: A CALYM Study. *J Mol Diagn.* 1 nov 2017;19(6):892-904.
36. Manso R, Sánchez-Beato M, Monsalvo S, Gómez S, Cereceda L, Llamas P, et al. The RHOA G17V gene mutation occurs frequently in peripheral T-cell lymphoma and is associated with a characteristic molecular signature. *Blood.* 1 mai 2014;123(18):2893-4.
37. Nouvelles données sur la survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine entre 1989 et 2018 : une amélioration de la survie pour la grande majorité des localisations cancéreuses étudiées [Internet]. [cité 14 sept 2022]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/presse/2021/nouvelles-donnees-sur-la-survie-des-personnes-atteintes-de-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1989-et-2018-une-amelioration-de-la-survie-pour>
38. Proctor IE, McNamara C, Rodriguez-Justo M, Isaacson PG, Ramsay A. Importance of expert central review in the diagnosis of lymphoid malignancies in a regional cancer network. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 avr 2011;29(11):1431-5.
39. Brousset P, Gaulard P, Laurent C. Expert central review in lymphoma diagnosis. Results and perspectives of a large-scale national study. 2018;(7):10.
40. Laurent C, Gaulard P, Brousset P. Expert central review in lymphoma diagnosis. Is there a need? *Oncotarget.* 17 déc 2017;8(70):114426-7.
41. Kumar A, Eyre TA, Lewis KL, Thompson MC, Cheah CY. New Directions for Mantle Cell Lymphoma in 2022. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet.* avr 2022;42:1-15.
42. 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.* 1 mai 2017;35(18):2008-17.
43. Gao J, Peterson L, Nelson B, Goolsby C, Chen YH. Immunophenotypic variations in mantle cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* nov 2009;132(5):699-706.
44. Ok CY, Xu-Monette ZY, Tzankov A, O'Malley DP, Montes-Moreno S, Visco C, et al. Prevalence and clinical implications of cyclin D1 expression in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) treated with immunochemotherapy: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Cancer.* 15 juin 2014;120(12):1818-29.
45. Swerdlow SH, Kuzu I, Dogan A, Dirnhofer S, Chan JKC, Sander B, et al. The many faces of small B cell lymphomas with plasmacytic differentiation and the contribution of MYD88 testing. *Virchows Arch.* 1 mars 2016;468(3):259-75.
46. Shekhar R, Naseem S, Binota J, Varma N, Malhotra P. Frequency of MYD88 L256P mutation and its correlation with clinico-hematological profile in mature B-cell neoplasm. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* sept 2021;14(3):231-9.
47. Scott DW, Mottok A, Ennishi D, Wright GW, Farinha P, Ben-Neriah S, et al. Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J Clin Oncol.* 3 août 2015;33(26):2848-56.
48. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, Kim J, Kamburov A, Redd RA, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med.* mai 2018;24(5):679-90.
49. Staiger AM, Ziepert M, Horn H, Scott DW, Barth TFE, Bernd HW, et al. Clinical

Impact of the Cell-of-Origin Classification and the MYC/BCL2 Dual Expresser Status in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated Within Prospective Clinical Trials of the German High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 19 mai 2017;35(22):2515-26.

50. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent Expression of MYC and BCL2 in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated With Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone. *J Clin Oncol*. 30 juill 2012;30(28):3452-9.
51. Ennishi D, Mottok A, Ben-Neriah S, Shulha HP, Farinha P, Chan FC, et al. Genetic profiling of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma determines cell-of-origin-specific clinical impact. *Blood*. 18 mai 2017;129(20):2760-70.
52. Qin Y, Chen H, Liu P, Zhang C, Yang J, Gui L, et al. Prognostic value of BCL2 and TP53 genetic alterations for diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP. *Cancer Biol Med*. 23 nov 2021;19(6):j.issn.2095-3941.2021.0193.
53. Chen R, Zhou D, Wang L, Zhu L, Ye X. MYD88L265P and CD79B double mutations type (MCD type) of diffuse large B-cell lymphoma: mechanism, clinical characteristics, and targeted therapy. *Ther Adv Hematol*. 2022;13:20406207211072839.
54. Gollub W, Stassek B, Huckhagel T, Bernd HW, Krokowski M, Merz H, et al. BCL6-translocations affect the phenotype of follicular lymphomas only in the absence of t(14;18)IgH/BCL2. *Anticancer Res*. nov 2009;29(11):4649-55.
55. Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood*. 23 juill 2009;114(4):826-34.
56. Sorrentino C, Cuneo A, Roti G. Therapeutic Targeting of Notch Signaling Pathway in Hematological Malignancies. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 1 juill 2019;11(1):e2019037.
57. Shin SJ, Roh J, Cha HJ, Choi YD, Kim JM, Min SK, et al. TCL1 expression predicts overall survival in patients with mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2015;95(6):583-94.
58. Eskelund CW, Dahl C, Hansen JW, Westman M, Kolstad A, Pedersen LB, et al. TP53 mutations identify younger mantle cell lymphoma patients who do not benefit from intensive chemoimmunotherapy. *Blood*. 26 oct 2017;130(17):1903-10.
59. Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas - PubMed [Internet]. [cité 14 sept 2022]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21324920/>
60. Zheng X, Ding N, Song Y, Feng L, Zhu J. Different sensitivity of germinal center B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells towards ibrutinib treatment. *Cancer Cell Int*. 3 avr 2014;14(1):32.
61. Lopez-Girona A, Heintel D, Zhang LH, Mendy D, Gaidarova S, Brady H, et al. Lenalidomide downregulates the cell survival factor, interferon regulatory factor-4, providing a potential mechanistic link for predicting response. *Br J Haematol*. août 2011;154(3):325-36.
62. Kuo HP, Ezell SA, Hsieh S, Schweighofer KJ, Cheung LW, Wu S, et al. The role of PIM1 in the ibrutinib-resistant ABC subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Cancer Res*. 2016;6(11):2489-501.
63. Gómez-Abad C, Pisonero H, Blanco-Aparicio C, Roncador G, González-Menchén A, Martínez-Climent JA, et al. PIM2 inhibition as a rational therapeutic approach in B-cell lymphoma. *Blood*. 17 nov 2011;118(20):5517-27.
64. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 mars 2012;109(10):3879-84.
65. Buhimschi AD, Armstrong HA, Toure M, Jaime-Figueroa S, Chen TL, Lehman AM, et al. Targeting the C481S Ibrutinib-Resistance Mutation in Bruton's Tyrosine Kinase Using

PROTAC-Mediated Degradation. *Biochemistry*. 3 juill 2018;57(26):3564-75.

66. Cymbalista F, Delmer A, Feugier P, Fornecker LM, Leblond V, Lévy V, et al. Prise en charge de la LLC en contexte épidémique SARS-Cov-2 Propositions du FILO LLC-MW • 4 Avril 2020. 2020;4.
67. Falini B, Martelli MP, Tiacci E. BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia: from bench to bedside. *Blood*. 13 oct 2016;128(15):1918-27.
68. Hatic H, Sampat D, Goyal G. Immune checkpoint inhibitors in lymphoma: challenges and opportunities. *Ann Transl Med*. juin 2021;9(12):1037-1037.
69. Wilson WH, Young RM, Schmitz R, Yang Y, Pittaluga S, Wright G, et al. Targeting B cell receptor signaling with ibrutinib in diffuse large B cell lymphoma. *Nat Med*. août 2015;21(8):922-6.
70. Camus V, Miloudi H, Taly A, Sola B, Jardin F. XPO1 in B cell hematological malignancies: from recurrent somatic mutations to targeted therapy. *J Hematol Oncol* *Hematol Oncol*. 14 févr 2017;10(1):47.
71. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 22 janv 2015;372(4):311-9.
72. Tomassetti S, Chen R, Dandapani S. The role of pembrolizumab in relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Ther Adv Hematol*. 2019;10:2040620719841591.
73. Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood*. 4 janv 2018;131(1):68-83.
74. Ameli F, Shajareh E, Mokhtari M, Kosari F. Expression of PD1 and PDL1 as immune-checkpoint inhibitors in mantle cell lymphoma. *BMC Cancer*. 3 août 2022;22(1):848.
75. Jalali S, Price-Troska T, Paludo J, Villasboas J, Kim HJ, Yang ZZ, et al. Soluble PD-1 ligands regulate T-cell function in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood Adv*. 14 août 2018;2(15):1985-97.
76. Wartewig T, Kurgys Z, Keppler S, Pechloff K, Hameister E, Öllinger R, et al. PD-1 is a haploinsufficient suppressor of T cell lymphomagenesis. *Nature*. 7 déc 2017;552(7683):121-5.

Annexes

Annexe 1. Exemples de biomarqueurs pronostiques décrits dans les lymphomes	78
Annexe 2. Exemples de biomarqueurs théranostiques décrits dans les lymphomes	79
Annexe 3. Détail des techniques utilisées	80
Annexe 4. Corrélation marquage IHC et expression génique	81
Annexe 5. Marqueurs significatifs permettant la discrimination entre LZM et LF par le test Lymphosign	82
Annexe 6. Étude des cas discordants avec le diagnostic anatomopathologique	83
Annexe 7. Extrait de la liste des Actes CCAM en vigueur pour la spécialité Anatomie et Cytologie Pathologiques	87
Annexe 8. Estimation du coût d'un test Lymphosign par patient.....	88
Annexe 9. Biomarqueurs pronostiques et théranostiques analysés au cours de l'étude....	89
Annexe 10. Description du paysage des études moléculaires algorithmiques	90

Annexe 1. Exemples de biomarqueurs pronostiques décrits dans les lymphomes

Biomarqueur	Altération	Caractéristique	Lymphome impacté	Réf.
Gènes lymphocytes B	Expression augmentée	Bon Pc	LTAI	(32)
BCL2, BCL6	Expression augmentée	Meilleurs Pc que les LBDGC non GC	LBDGC GC	(18)
BCL2, MYC	Co-expression	Mauvais Pc	LBDGC	(49–51)
TP53	Mutation	Mauvais Pc	LBDGC	(52)
MYD88L265P, CD79B	Double mutation	Mauvais Pc	LBDGC	(53)
BCL6	Translocations	Formes agressives	LF	(54)
BCL2, IGH	Absence de translocation	Augmentation du Ki67	LF	(55)
NOTCH1	Mutation	Mauvais Pc	LLC	(56)
TCL1A, CCDC50	Diminution expression	Mauvais Pc	LM	(57)09/10/2023 17:44:00
TP53	Mutation	Formes agressives, résistantes à la cytarabine, au rituximab et à l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	LM	(58)

Annexe 2. Exemples de biomarqueurs théranostiques décrits dans les lymphomes

Biomarqueur	Altération	Caractéristique	Lymphome impacté	Réf.
MYD88, CD79B	Mutation	Sensibilité ibrutinib	LBDGC	(53)
CARD11	Mutation	Moins bonne réponse à l'ibrutinib et au sotrastaurin	LBDGC	(59,60)
IRF4	Augmentation expression	Sensibilité lénalidomide	Lymphomes	(61)
PIM1	Augmentation expression	Resistance inhibiteur ALK	LAGC	(62)
		Resistance ibrutinib	LBDGC	
PIM2	Augmentation expression	Cible intéressante	LBDGC	(63)
BRAFV600E	Mutation	Cible intéressante	LBDGC	(64), (33)
BTKC481S	Mutation	Résistance ibrutinib Cible intéressante	LLC	(65)
TP53, IGVH	Mutation	Impacte le choix du traitement	LLC	(66)
BRAV600E/K	Mutation	Vemurafenib	HCL	(67)
PD1, PDL1, CTLA4	Augmentation expression	Immunothérapies ciblant les check-points immunitaires	PMBL, LT cutanés, lymphomes primitifs du SNC	(68)

Annexe 3. Détail des techniques utilisées

Interprétation des lames d'IHC : AE1/AE3 (clone AE1/AE3, Dako), EMA (clone E29, Roche), CD45 (clone RP2/18, Roche), CD2 (clone MRQ-11, Roche), CD3 (clone 2GV6, Roche), CD4 (clone SP35, Roche), CD5 (clone SP19, Roche), CD7 (clone SP94, Roche), CD8 (clone SP57, Roche), CD20 (clone L26, Roche), CD21 (clone EP3093, Roche), CD23 (clone SP23, Roche), CD30 (clone BER-H2, Roche), CD61 (clone 2F2, Roche), CD79A ((clone SP18, Roche), CD138 (clone B-A38, Roche), BCL2 (clone 124, Roche), BCL6 (clone GL191E/A8, Roche), CD10 (clone SP67, Roche), CXCL13 (polyclonal, Diagomics), PD1 (clone NAT, Diagomics), MPO (polyclonal, Roche), Glycophorine (clone RET40F, Dako), CD34 (clone QBEND/10, Roche), SOX11 (clone MRQ-58, Roche), Cycline D1 (clone SP4, Roche), Ki67 (clone 30.9, Roche), MUM1 (clone MRQ-43, Roche), CMYC (clone Y69, Roche), CD56 (clone123C3, Roche), CD15 (clone MMA, Roche), Granzyme (polyclonal, Diagomics), ICOS (polyclonal, Non GCam), ALK (clone 1A4, Diagomics), Kappa, (polyclonal, Roche) Lambda (polyclonal, Roche).

Recherche d'ARN d'EBV par hybridation in situ en utilisant le kit de détection ISH I View Blue (Ventana) et l'automate Benchmark XT.

Conclusion du compte-rendu d'anatomopathologie. Type d'hémopathie, B ou T. Lymphome B à grandes cellules ou à petites cellules. Sous-type de lymphome B à petites cellules.

Examens biologiques : Numération-Formule-Sanguine (NFS), frottis sanguin, cytoponction ganglionnaire, liquide céphalo-rachidien (LCR) et divers dosages comme la Béta2microglobuline (Béta2mG) et le taux de lactate déshydrogénase (LDH).

Cytométrie en flux, myélogramme et biologie moléculaire (recherche de réarrangements des gènes du TCR et des gènes des immunoglobulines, étude NGS, étude RT-MLPA).

Recherche d'un réarrangement au locus de certains gènes par FISH interphasique :

BCL2 : Hybridation de la sonde Dako *BCL2* IQFISH Break-Apart Probe, locus 18q21, sur coupe en paraffine. *BCL2* CY3 en 5' (O) et *BCL2* FITC en 3' (V).

BCL6 : Hybridation de la sonde Dako *BCL6* IQFISH Break-Apart Probe, locus 3q27, sur coupe en paraffine. *BCL6* FITC en 5' (V) et *BCL6* CY3 en 3' (O).

MALT : Hybridation de la sonde Dako *MALT* IQFISH Break-Apart Probe, locus 18q21, sur coupe en paraffine. *MALT* CY3 en 5' (O) et *MALT* FITC en 3' (V).

CCND1 : (réalisé sur le plateau technique du service de biologie des tumeurs du Site Groupe Hospitalier Haut-Lévêque - CHU de Bordeaux) : Type de sonde utilisée : *CCND1* IQFISH Break-Apart Probe, (G111622-2), Agilent, Locus 11q13. *CCND1* Spectrum Orange (5') = R. *CCND1* Fluorescéine (3') = V.

CCND2 : (réalisé sur le plateau technique du service de biologie des tumeurs du Site Groupe Hospitalier Haut-Lévêque - CHU de Bordeaux) : Type de sonde utilisée : *CCND2* Break Apart Probe Empire Genomics (Réf. : *CCND2BA-20ORGR*). 5'*CCND2*= Orange dUTP=R. 3'*CCND2*=Green dUTP=V.

Recherche d'une délétion du locus *1p36* par FISH interphasique (réalisée sur le plateau technique du service de biologie des tumeurs du Site Groupe Hospitalier Haut-Lévêque - CHU de Bordeaux, type de sonde utilisée : Vysis *1p36/1q25* FISH Probe Kit, Abbott Molecular).

Annexe 4. Corrélation marquage IHC et expression génique

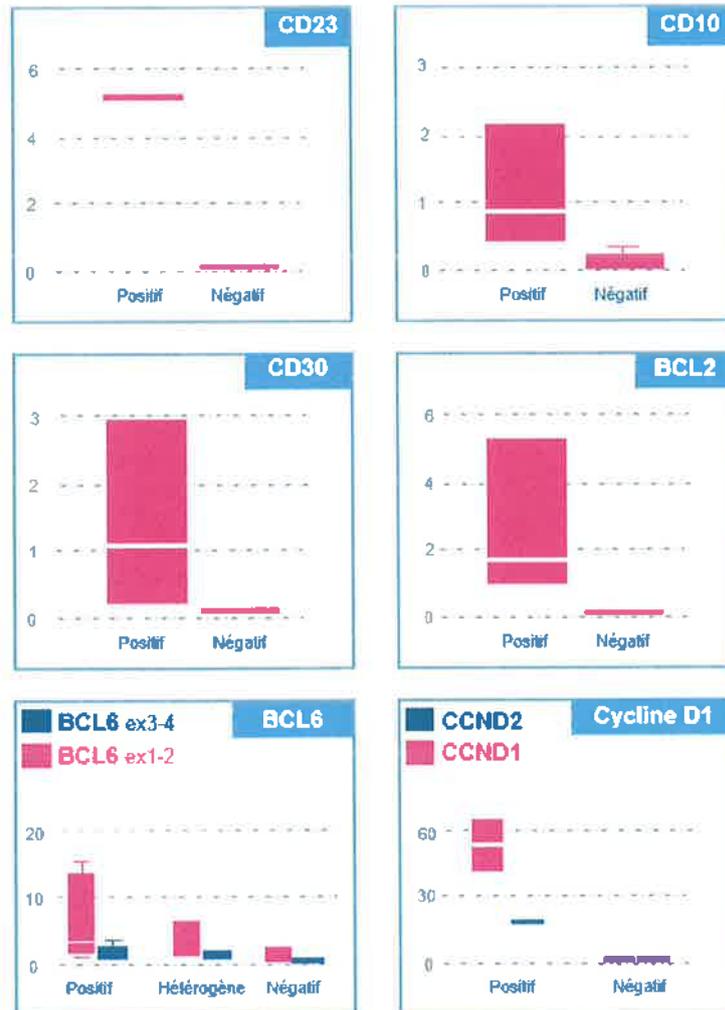


Figure 24 : Comparaison du marquage IHC avec l'expression génique détectée par le test Lymphosign pour les marqueurs CD23, CD10, CD30, BCL2, BCL6 et Cycline D1.

Annexe 5. Marqueurs significatifs permettant la discrimination entre L2M et LF par le test Lymphosign

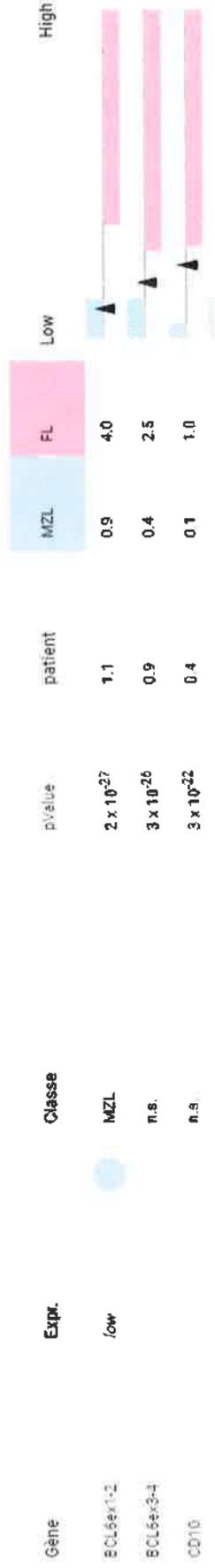


Figure 25 : Premier cas de LF classé en L2M par le test Lymphosign.

MZL = L2M ; FL = LF ; Low = faible ; High = élevé ; n.s. = non significatif



Figure 26 : Second cas de LF classé en L2M par le test Lymphosign.

Annexe 6. Étude des cas discordants avec le diagnostic anatomopathologique

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
LM variant pléomorphe	LBDGC NON GC / LM ?
Deuxième lecture	Données brutes
<p>Taille : moyenne à grande Architecture : plage diffuse IHC : CD20+ CD5- CYCLINE D1+ SOX11- BCL2+ MUM1+ CD10- BCL6+ MYC- EBER-. Pas de réseau FDC CD23+. Présence d'un minime réseau de FDC résiduel CD21+. Ki67 à 80 %.</p> <p>⇒ Plutôt LBDGC non GC</p>	<p>Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : 0. Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 80 %. Ki67 : 2,74. BCL6 : 6,5 (exon1exon2). CD10 : 0,15. Autre : 25 marqueurs significatifs ont été identifiés, dont 23 en faveur d'un LBDGC non GC et 2 en faveur d'un LM. Comme caractéristiques complémentaires, présence d'une expression élevée de <i>MYD88L265P</i> (à 0,3) et de <i>CCND1</i> (à 65).</p>

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
Infiltration ganglionnaire par une prolifération plasmocytoïde compatible avec un LLP. Mutation MYD88 L265P non détectée en biologie moléculaire.	LTNK / LBDGC (si B) / LTP NOS / Hodgkin / TrichB ? / Autre
Deuxième lecture	Données brutes
<p>Taille : moyenne. Architecture : diffuse. IHC : Prolifération CD20+/- CD79A+. Nbreux plasmocytes CD138+ CYCLINE D1- NCAM-. Présence d'une monotypie lambda. Le Ki67 est faible entre 5 et 10 % (présence de zone élevée à 30 %).</p> <p>⇒ LLP</p>	<p>Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : 15. Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 85 %. Ki67 : 0,5. BCL6 : 1,5 (exon1exon2) et 3,4 (exon3exon4). CD10 : 0. Autre : résultats aberrants avec beaucoup de classement proposé dans la conclusion. En cas de COO B : probabilité de classement en LBDGC non GC de 64 %. En cas de COO T : probabilité de classement en en LTAI de 35 %.</p>

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
LF 3A.	LTNK / Inclassé (si B) / LTP NOS / Hodgkin / TrichB ? / Autre ? / LM ?
Deuxième lecture	Données brutes
<p>Taille : petite, présence de quelques cellules de grande taille ne formant pas de plages. Architecture : folliculaire. IHC : CD20+ CD5- BCL6+ CD10+ BCL2+. Présence d'un réseau de FDC hyperplasique non dissocié CD21+. Le Ki67 est modéré (50 %) dans les follicules, et faible en dehors.</p> <p>⇒ LF 3A</p>	<p>Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : 12. Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 75 %. Ki67 : 0. BCL6 : 24,8 (exon1exon2) et 1 (exon3exon4). CD10 : 0,43. Autre : résultats aberrants avec beaucoup de classement proposé dans la conclusion. En cas de COO B : probabilité de classement en LBDGC non GC de 28 %. En cas de COO T : probabilité de classement en en LTNK de 30 %. Discordance entre la COO (GC) évalué à 42 % (contre 40 % pour COO non GC), et la probabilité de classement en LBDGC non GC de 28 % (contre 26 % pour LBDGC GC).</p>

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
Lymphome B à petites cellules difficile à classer, plutôt de type folliculaire de grade 1-2.	LBDGC GC
Deuxième lecture	Données brutes
Taille : petite à moyenne. Architecture : diffuse. IHC : CD20+ CD79A+ BCL6+ BCL2+ CD10- CYCLINE D1-. Présence focale d'un petit réseau de FDC CD21+ non dissocié. Ki67 faible 10-15 %. ⇐ LF 1-2	Score de qualité : présence d'une alerte dans la conclusion « Attention : score de qualité bas ». Nombre de marqueurs à 0 : Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 55 %. Ki67 : 0,30 BCL6 : 17 (exon1exon2) et 1,69 (exon3exon4). CD10 : 1,5 Autre : le test confirme la COO GC.

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
LF 1-2	LBDGC GC
Deuxième lecture	Données brutes
Taille : petite. Architecture : diffuse. IHC : CD20+CD79A+CD5- CD10+ BCL2- BCL6+ CD23- . Pas de réseau de FDC. Le Ki67 est modéré (25 %). ⇐ LF 1-2	Score de qualité : présence d'une alerte dans la conclusion « Attention : score de qualité bas ». Score de qualité trop bas pour obtenir un pourcentage de cellule B ou T, un score de probabilité en bas grade/haut grade, et un score de probabilité de classement en lymphome).

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
LF 3A	LBDGC GC
Deuxième lecture	Données brutes
Architecture : folliculaire. Taille : petite. Présence de quelques grandes cellules, sans formation de plages. IHC : CD20+ BCL2+ CD5- CD10+ CYCLINE D1- BCL6+. Présence d'un secteur avec de nombreux centroblastes (> 15 / CFG) susceptibles de reclasser ce lymphome en LF3B. ⇐ LF3B	Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 85 %. Ki67 : 1,12. BCL6 : 2,63 (exon1exon2) et 2,13 (exon3exon4). CD10 : 1,1.

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
LF 1-2	LBDGC GC
Deuxième lecture	Données brutes
<p>Taille : petite (noyaux hyperchromatiques). Pas d'architecture proprement dit (amas de petite taille). IHC : CD20+ CD5- CD10+ BCL6+. Pas de réseau de FDC CD23+ (mais prélèvement multi fragmenté). Le Ki67 est faible (10 %).</p> <p>⇐ LF 1-2</p>	<p>Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 62 %. Ki67 : 0,19. BCL6 : 6,53 (exon1exon2) et 0,4 (exon3exon4). CD10 : 0,84.</p>

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
LF 1-2	LZM
Deuxième lecture	Données brutes
<p>Taille : petite. Architecture : folliculaire. IHC : CD20+ BCL2+ CD5- CD10+ BCL6+. Réseau CD21+. Le Ki67 est faible (10 %).</p> <p>⇐ LF 1-2</p>	<p>Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : 0. Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 30 %. Ki67 : 0,14. BCL6 : 1,72 (exon1exon2) et 1 (exon3exon4). CD10 : 0,23.</p>

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
LF 1-2	LZM
Deuxième lecture	Données brutes
<p>Taille : petite. Architecture : diffuse. IHC : CD20+ CD5- CD10+ BCL2+ BCL6+ CYCLINE D1-. Réseau hyperplasique non dissocié de FDC CD21+. Le Ki67 est faible à 10 %.</p> <p>⇐ LF 1-2</p>	<p>Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : 1. Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 38 %. Ki67 : 0,32. BCL6 : 1,12 (exon1exon2) et 0,9 (exon3exon4). CD10 : à 0,45.</p>

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
LZM	LBDGC non GC
Deuxième lecture	Données brutes
<p>Taille : moyenne. Architecture : diffuse. IHC : CD20+ CD5+ CD79A+ MUM1+ BCL2+ BCL6- CD10- CYCLINE D1-. Réseau de FDC par place un peu dissocié. Présence de secteurs où le Ki67 est élevé, jusqu'à 70 %.</p> <p>⇒ LZM sans signe de transformation en lymphome de haut grade. A noter la présence d'un Ki67 élevé à 70 %.</p>	<p>Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : 4. Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 82 %. Ki67 : 0,8. BCL6 : 0,31 (exon1exon2) et 0,43 (exon3exon4). CD10 : 0,25. Autre : expression augmentée de MYD88 L265P à 4,44.</p>

Diagnostic anatomopathologique	Classement Lymphosign
Lymphome B d'architecture nodulaire pouvant correspondre à un lymphome B folliculaire de grade 3B malgré l'expression du CD5.	LBDGC non GC
Deuxième lecture	Données brutes
<p>Taille : petite a moyenne, avec quelques coulées de grandes cellules. Architecture : folliculaire. IHC : CD20+ CD79A+ CD10- BCL2+ BCL6+ CD5+/-. Présence d'un important réseau hyperplasique de FDC, non dissocié. Le Ki67 est élevé au niveau des coulées de grandes cellules avec des zones à 70 %.</p> <p>⇒ LF 3B</p>	<p>Score de qualité : suffisants. Nombre de marqueurs à 0 : 2. Probabilité de classement en lymphome de haut grade : 75 %. Ki67 : 0,9. BCL6 : 2 (exon1exon2) et 1,72 (exon3exon4). CD10 : 0.</p>

Annexe 7. Extrait de la liste des Actes CCAM en vigueur pour la spécialité Anatomie et Cytologie Pathologiques

ZZQX092	Examen immunocytochimique ou immunohistochimique de prélèvement cellulaire ou tissulaire fixé, avec 10 anticorps ou plus, sans quantification du signal	160,00 €
---------	---	----------

Annexe 8. Estimation du coût d'un test LymphoSign par patient

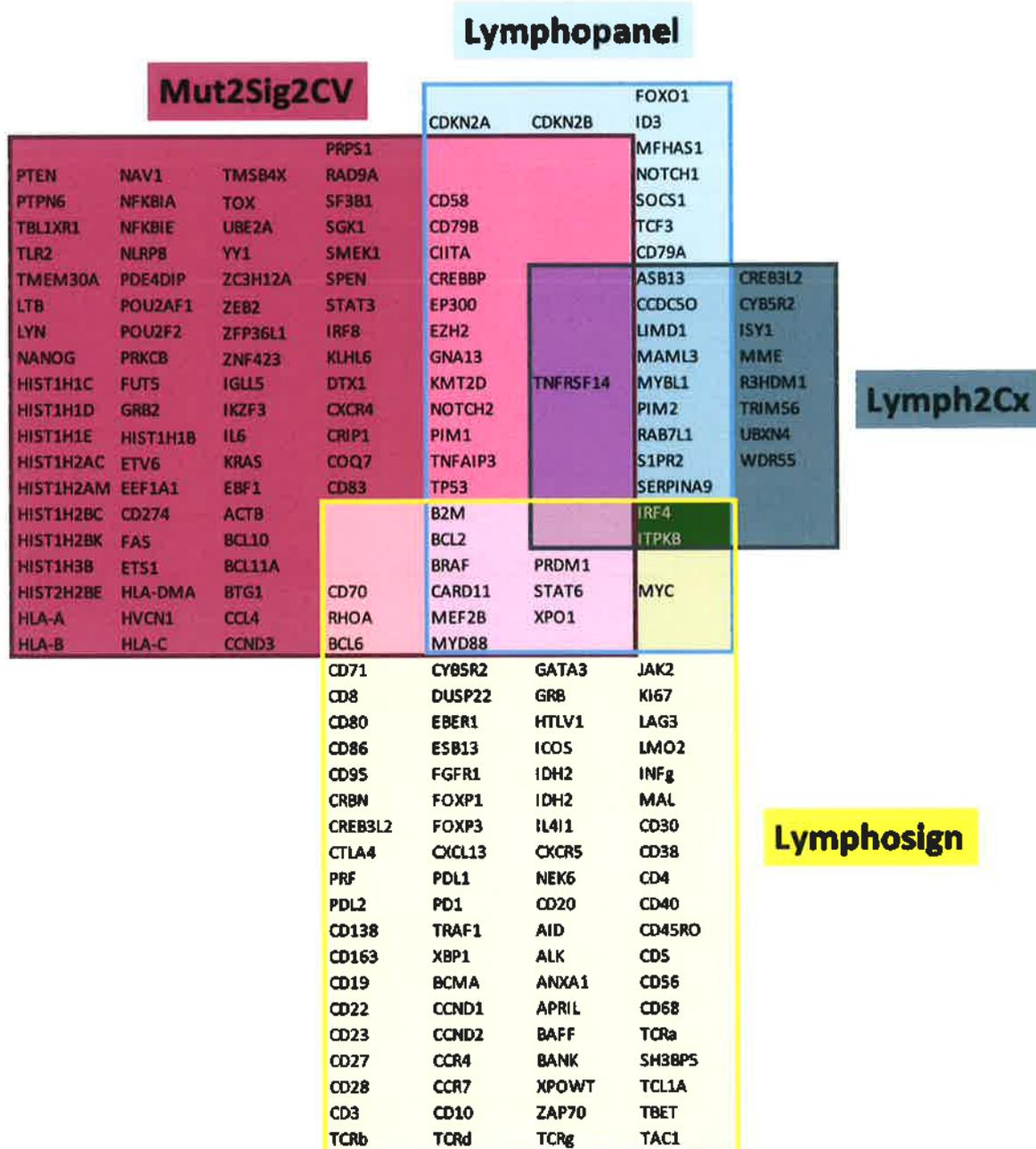
Réactifs et consommables	Détail	Coûts/patient	Coûts/an (calculé pour 88 analyses)
Kit LymphoSign			
Kit Genexpath LymphoSign 48 analyses incluant le kit de réactifs et l'accès informatique	7440 € pour un kit	155€/ patient	1 commandes de 48 analyses soit 7440€
Réactifs non fournis dans le kit LymphoSign			
Invitrogen™ M-MLV Reverse Transcriptase (200U/µL) Fisher Scientific, ref 10338842	378,00€ / 1 pièce de 200 µL 1,75µL /patient	3,3€/ patient	378,00€
Invitrogen™ dNTPs set (100mM) Fisher Scientific, ref 10063252	267,00€ / 4 pièces (1 pièce = 4x250 µL) 1 µL /patient	0,067€/ patient	267,00€
Invitrogen™ Random Primers Fisher Scientific, ref 10646313	203,00€ / 9 pièces Une pièce = 100µL (3 µg/µL) 1 µL /patient	0,225€/ patient	203,00€
SALSA MLPA Buffer (180 µL) MRC Holland, ref SMR33	37€/180µL 1,5 µL /patient	0,30€/ patient	37€
SALSA Ligase Buffer A (360 µL) MRC Holland, ref SMR12	19€/360µL 3 µL/patient	0,15€/ patient	19€
SALSA Ligase Buffer B (360 µL) MRC Holland, ref SMR13	19€/360µL 3 µL /patient	0,15€/ patient	19€
SALSA Ligase-65 (115 µL) MRC Holland, ref SMR20	106€/115µL 1 µL /patient	0,92€/ patient	106€
Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix New England Biolabs, ref M0494	180,00€ / 100 runs 1 run/patient	1,8€/ patient	180,00€
AMPure XP (Billes magnétiques) Beckman Coulter, ref A63880	250€ / 1 pièce (1 pièce = 5 mL) 45 µL /patient	2,25€/ patient	250€
Qubit® dsDNA HS Assay Kit Fisher Scientific, ref 10616763	112€ /100 pièces 1 pièce /patient	1,12€/ patient	112€
Réactifs de séquençage Illumina MiSeq Reagent Nano Kit, v2 (300 cycles), MS-103-1001, ref 15036522	311,04€ pour 1 million de reads 10 ⁵ séquences nécessaires/patient Maximum 10 patients séquencés/puce	34,5€/ patient	5 commandes passées soit 1555,2€
Tampon TE (10 mM Tris-Acetate pH 8.0, 1 mM EDTA) Variable	18,90€ / 100 mL 50 µL /patient	0,009€/ patient	18,90€
Ethanol 100% Variable	17,24€ / 1L Utilisation variable	variable	17,24€
NaOH 1 N Variable	43,40€ / 1L Utilisation variable	variable	43,40€
Tris Buffer 200 mM pH 7 Variable	141€ Utilisation variable	variable	141€
Eau Nuclease Free Variable	142€ / 1L 1,5 mL/patient	0,213€/ patient	142€
Extraction ARN Maxwell 16 LEV RNA FFPE (48 cartouches)	379€ / 48 cartouches 1 cartouche/ patient	7,9€/patient	379€
Extraction ARN Quantifluor RNA System E3310 (1mL)	364€ / 1mL de Dye/2000 patients 0,5µL de Dye/patient	0,182€/ patient	364€
Témoin positif ThermoFisher Total RNA Control (Human) Référence : 430728	123€ /100µL 2µL/ MANIPULATION 1 témoin/10 patients	0,27€/ patient	123€
TOTAL des réactifs non fournis dans le kit LymphoSign		53,4€/ patient	4354,77€
COÛT TOTAL D'UN TEST LYMPHOSIGN		209€/ patient	11794,77€

Annexe 9. Biomarqueurs pronostiques et théranostiques analysés au cours de l'étude

Parmi les marqueurs pronostiques, aucun des cas analysés n'a présenté de double expression *BCL2/MYC*, que ce soit en immunohistochimie ou sur le test Lymphosign. Pour le seul cas de LM, il n'a pas été mis en évidence de *CCDC50* ni de *TCL1A*. La diminution de leurs expression serait un facteur de mauvais pronostic dans les LM (57), ce qui peut être corrélé avec le mauvais pronostic des variants pléomorphe, et ce qui était le cas ici. Un cas de LBDGC non GC cérébral présentait un taux élevé de *MYD88L265P*. La présence d'une double mutation avec *CD79B* (on rappelle que le *CD79B* n'est pas inclus dans le test Lymphosign) constituerait un groupe particulier de LBDGC de type MCD (53), et serait un facteur de sensibilité à l'ibrutinib (69). Par ailleurs, un cas de LTAI présentait une augmentation de l'expression de *XPO1*. La mutation *XPO1 E571K* est décrite dans le PMBL, les LLC, et serait de mauvais pronostic au cours des LT, des LM et du MM (70).

Parmi les marqueurs théranostiques, aucun cas n'a présenté d'augmentation du marqueur *BRAF* pouvant éventuellement suggérer une mutation *BRAFV600E*. Le LBDGC non GC cérébral n'a pas mis en évidence d'augmentation des marqueurs check point potentiellement actionnables par des inhibiteurs (*PD1*, *PDL1*, *CTLA4*) (68). Dans notre étude, 3 lymphomes (10 %) présentent une augmentation de l'expression de *PD1* ; il s'agit d'un LM variant pléomorphe, d'un LLP et d'un LTAI. Les traitements inhibiteurs ciblant le point de contrôle immunitaire *PD-1* ont récemment démontré une efficacité clinique sans précédent dans le traitement des cancers avancés. Parmi les hémopathies malignes, son efficacité est prouvée dans les LH (71), intéressante dans les PMBL (72) et possède des résultats encourageants dans les LLC, les LF (73) et les LT cutanés (68). Néanmoins, les résultats concernant les LM ne concluent pas à une efficacité (74), alors qu'il existe peu de données sur le sujet concernant les LLP (75). Concernant le LTAI, *PD-1* joue un rôle important dans le développement et l'activité de Tfh. *PD-1* a présenté une cible candidate importante pour l'immunothérapie dans le LTAI. Néanmoins, certaines études ont montré que dans le LTP, *PD-1* lui-même pourrait être un suppresseur de tumeur (76) suggérant que l'anti-*PD-1* pourrait conduire exactement à l'opposé du résultat souhaité.

Annexe 10. Description du paysage des études moléculaires algorithmiques



Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

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

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Étude de marqueurs moléculaires comme complément d'analyse dans le diagnostic des lymphomes non-Hodgkiniens

CONTEXTE : Le diagnostic complexe des lymphomes nécessite une analyse multiparamétrique (morphologie, immunophénotypage, génétique). Malgré les recommandations des instances scientifiques, il n'existe que très peu d'analyses génétiques dédiées aux lymphomes au sein du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Limoges.

MATERIEL ET METHODES : Il s'agissait d'une étude transversale. Le test Lymphosign a été réalisé sur 30 prélèvements de lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) diagnostiqués entre juin 2022 et avril 2023, issus du CRBioLim. L'objectif principal était la comparaison entre le classement émis par le test Lymphosign, et le diagnostic réalisé en anatomopathologie.

RESULTATS : Il existe une concordance dans 62 % des cas, avec une bonne corrélation pour la cellule d'origine et le grade histologique. Le test présente un intérêt dans 20 % des cas, notamment pour les échantillons d'interprétation difficile (petite taille, nécrose). Une interprétation détaillée du BCL6, CD10, Ki67 et de la probabilité de classement en haut grade permet d'améliorer la puissance du test pour le diagnostic des lymphomes folliculaires.

CONCLUSION : Le test Lymphosign a été mis en place avec succès au sein du CHU de Limoges. Cette technique complémentaire permet de fournir une aide à l'anatomopathologiste pour porter le diagnostic de LNH, à condition de confronter les résultats rendus par l'algorithme aux données cliniques, biologiques, radiologiques et anatomo-pathologiques.

Mots-clés : lymphome, transcriptome, algorithme, diagnostic

Study of molecular markers as a supplementary analysis in the diagnosis of non-Hodgkin lymphomas

CONTEXT : *The complex diagnosis of lymphomas requires a multiparametric analysis (morphology, immunophenotyping, genetics). Despite the recommendations of scientific bodies, there are very few dedicated genetic analyses for lymphomas within Limoges university hospital.*

MATERIALS AND METHODS : *This was a cross-sectional study. The Lymphosign test was performed on 30 samples from non-Hodgkin lymphomas (NHL) cases diagnosed between June 2022 and April 2023, obtained from CRBioLim. The primary objective was to compare the classification provided by the Lymphosign test with the pathologic diagnosis.*

RESULTS : *Diagnostic agreement is present in 62% of cases, with a good correlation regarding the cell of origin and histological grade. The test is of interest in 20% of cases, particularly for samples that are difficult to interpret (small size, necrosis). A detailed interpretation of BCL6, CD10, Ki67, and the probability of classification as high-grade helps enhance the test's diagnostic power for follicular lymphoma.*

CONCLUSION : *The Lymphosign test has been successfully implemented at Limoges university hospital. This complementary technique helps the pathologist diagnosing NHL, provided that the algorithm's results are compared with clinical, biological, radiological, and anatomopathological data.*

Keywords : lymphoma, transcriptome, algorithm, diagnosis

