

Les nouvelles classifications moléculaires des lymphomes diffus à grandes cellules

Fabrice Jardin, Département d'hématologie clinique et Inserm U1245, Centre Henri Becquerel, 76038, Rouen

Tirés à part : F. Jardin
fabrice.jardin@chhb.unicancer.fr

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec cet article.

New molecular classifications of diffuse large cell lymphomas

Lymphome diffus à grandes cellules, classification, biologie moléculaire
Diffuse large cell lymphoma, classification, molecular biology

Résumé

Les lymphomes diffus à grandes cellules (DLBCL) constituent les lymphomes non hodgkiniens (LNH) les plus fréquents dans les pays occidentaux. Plus de la moitié d'entre eux peuvent être guéris par les traitements standard d'immunochimiothérapie. Environ 30 à 40 % se révèlent en revanche réfractaires ou rechutent, suggérant une grande hétérogénéité biologique sous-jacente. Les profils d'expression ont permis d'appréhender cette hétérogénéité en définissant les sous-types *germinal center B-cell* (GCB)/*activated B-cell* (ABC). Toutefois, vingt ans après sa définition, le concept séparant ces sous-types s'avère encore inopérant pour les cliniciens, les essais thérapeutiques visant à améliorer l'efficacité du R-CHOP en ciblant des altérations plus spécifiques du sous-type ABC s'étant, à ce jour, tous révélés négatifs. De nouvelles classifications intégrant des données moléculaires sont proposées et viennent enrichir notre compréhension de l'hétérogénéité des DLBCL et des lymphomes de haut grade. Elles pourraient constituer de nouvelles pistes pour stratifier les patients et établir des stratégies thérapeutiques.

Abstract

Diffuse large cell lymphoma (DLBCL) is the most common non-Hodgkin's lymphoma (NHL) in Western countries. More than half of its can be cured by standard immunochemotherapy treatments. About 30 to 40% will be refractory or relapsed, suggesting a high underlying biological heterogeneity. The expression profiles made it possible to understand this heterogeneity by defining the GCB/ABC subtypes. However, twenty years after its definition, the concept separating these subtypes is still ineffective for clinicians, since therapeutic trials to improve the efficacy of R-CHOP by targeting more specific alterations of the ABC subtype have all been negative to date. New classifications integrating molecular data are proposed and enrich our understanding of the heterogeneity of DLBCLs and high-grade lymphomas. They could form the basis for new approaches to stratify patients and establish therapeutic strategies.

Les lymphomes diffus à grandes cellules (DLBCL) sont les lymphomes non hodgkiniens (LNH) les plus fréquents (30 à 40 %) dans les pays occidentaux. Plus de la moitié d'entre eux peuvent être guéris par des approches combinant des anticorps monoclonaux (anti-CD20) et une chimiothérapie comprenant le plus souvent des anthracyclines. Environ 30 à 40 % se révèlent en revanche réfractaires ou rechutent, suggérant une grande hétérogénéité biologique sous-jacente. Le travail *princeps* publié par Alizadeh *et al.* il y a près de vingt ans, utilisant pour la première fois en oncologie des « puces » à ADN, a permis d'identifier deux grands sous-types de DLBCL en se basant sur l'expression de gènes reflétant l'origine cellulaire (COO, pour *cell of origin*) supposée de la cellule tumorale : le sous-type GCB (pour



germinal-center B-cell like), faisant référence à une origine centroblastique, et le sous-type ABC (pour *activated B-cell like*), en rapport avec des cellules ayant acquis une maturation post-centre germinatif (GC) [1]. Les sous-types GCB et ABC sont maintenant reconnus par la classification 2016 et révisée 2017 de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (*tableau 1*), qui préconise leur détermination par des techniques de biologie moléculaire, ou, à défaut, par immunohistochimie [2, 3].

Tableau 1

Lymphomes agressifs de phénotype B dans la classification révisée OMS 2017 (adapté de [2, 3]).

Entités anatomocliniques et moléculaires

DLBCL, NOS

- type GCB (*germinal center B-cell type*)
- type ABC (*activated B-cell type*)

Lymphome B à grandes cellules riche en lymphocytes T/histiocytes

DLBCL primitif du système nerveux central

DLBCL primitif cutané, type jambe

Lymphome primitif du médiastin (thymique)

DLBCL, EBV⁺ NOS

Ulcère cutanéomuqueux EBV⁺

DLBCL associé à une inflammation chronique

Granulomatose lymphomatoïde

DLBCL intravasculaire

DLBCL ALK⁺

Lymphome plasmablastique

Lymphome primitif des séreuses

DLBCL HHV8⁺, NOS

Lymphome de Burkitt

Lymphome *Burkitt-like* avec anomalies 11q

Lymphome de haut grade avec réarrangements de MYC et de BCL2 et/ou de BCL6

Lymphome de haut grade, NOS

Lymphome B non classable avec caractéristiques intermédiaires entre DLBCL et lymphome de Hodgkin classique

Lymphome B à grandes cellules avec translocation d'IRF4

DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules de phénotype B ; EBV : virus d'Epstein-Barr ; HHV8 : Herpèsvirus humain 8 ; IRF4 : *interferon regulatory factor 4* ; NOS : *not otherwise specified*

Suite à cette publication, de nombreux travaux ont précisé la valeur pronostique de ces sous-types et les différences biologiques qui les caractérisent, telles que la prévalence des réarrangements de *MYC*, de *BCL2* ou de *BCL6*, leur expression protéique, les profils mutationnels, les altérations du nombre de copies (CNV), la signalisation ou encore la structure du récepteur du lymphocyte (BCR).

Si cette dichotomie a largement dominé le débat concernant l'hétérogénéité des DLBCL, elle reste paradoxalement à peu près inopérante en clinique aujourd'hui, avec un impact très marginal ou inexistant dans la stratégie thérapeutique. De plus, 10 à 20 % des DLBCL restent non classés dans ce modèle qui, de ce fait, ne reflète que partiellement la complexité des DLBCL. De nouvelles technologies (principalement le séquençage de nouvelle génération, [NGS]) et des analyses intégrées bio-informatiques permettent aujourd'hui d'établir de nouvelles classifications moléculaires, décrivant de manière plus précise le *substratum* biologique des DLBCL. L'une des autres évolutions majeures proposée par la classification OMS 2016 est l'individualisation des lymphomes B de haut grade (HGBL, pour *high grade B-cell lymphoma*), caractérisés par une présentation clinique agressive, un pronostic défavorable et la présence d'une translocation de *MYC* et de *BCL2* et/ou de *BCL6*. Là encore, des travaux récents ont précisé les contours moléculaires de ce sous-type. Cet article se propose de passer en revue ces nouvelles classifications et leur potentielle répercussion clinique.

La pertinence clinique de la dichotomie GCB/ABC remise en cause

Compte tenu du manque de robustesse et de reproductibilité des techniques immunohistochimiques (IHC), les techniques moléculaires (donnant des profils d'expression géniques [GEP]) sont actuellement recommandées pour faire le diagnostic des phénotypes GCB/ABC. Cependant, les travaux rapportant une détermination moléculaire des sous-types GCB/ABC dans de grandes cohortes de patients inclus dans des essais prospectifs sont relativement peu nombreux.

Dans une étude réalisée par le German High-Grade Lymphoma Study Group (GHGLSG), le profil GCB/ABC a été établi à l'aide de la puce Lymph2Cx (développé par Nanostring), se basant sur l'expression différentielle d'une vingtaine de gènes [4]. Les réarrangements de *MYC/BCL2/BCL6* ont été identifiés par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). L'expression protéique de *MYC* (seuil de +40%) et de *BCL2* (seuil de +50%) a également été établie afin d'identifier les patients « double expresseurs » (DE). Les sujets atteints de DLBCL en première ligne étaient inclus dans l'essai RICOVER60 (> 60 ans, tout IPI [pour *international prognostic index*], randomisation entre R-CHOP21 ou R-CHOP14¹) et l'essai R-MegaCHOEP (< 60 ans, IPI ajusté à l'âge = 2-3, randomisation entre R-CHOP14 + étoposide (E) ou RCHOEP intensifié). Sur les 452 échantillons conservés en bloc paraffine (FFPE) disponibles, 414 ont pu être analysés avec succès. Dans aucun de ces deux essais le profil GCB/ABC n'est prédictif des survies sans événement (SSE), sans progression (SSP) ou globale (SG), que ce soit en analyse univariée ou en analyse multivariée intégrant l'IPI. Soulignons toutefois que la cohorte MegaCHOEP était de taille relativement limitée (n = 88) et n'avait probablement pas la puissance suffisante pour mettre en évidence une différence, contrairement à la cohorte RICOVER (n = 326). En revanche, les auteurs montrent que les patients DE constituent un groupe de mauvais pronostic, mais uniquement pour le sous-groupe GCB, ce statut perdant sa valeur pronostique dans le sous-type ABC.

Compte tenu des caractéristiques biologiques distinctes entre les sous-types GCB et ABC, plusieurs essais ont étudié l'intérêt d'associer au R-CHOP une drogue X ciblant plus spécifiquement une des voies métaboliques associées à un sous-type. À ce titre, deux essais prospectifs randomisés rapportent des résultats décevants concernant la valeur prédictive (théranostique) du phénotype GCB/ABC. L'essai prospectif multicentrique de phase III REMoDL-B a évalué l'intérêt de l'association



R-CHOP + bortézomib (RB-CHOP). Cet essai montre tout d'abord qu'une détermination par biologie moléculaire « en temps réel » du statut GCB/ABC est possible à partir de FFPE [5]. Parmi les 1 128 patients relevant de l'essai, 918 (81 %) ont été effectivement classés selon leur COO : 244 (27 %) étaient ABC, 475 (52 %) GCB et 199 (22 %) non classés. Les patients phénotypés étaient ensuite randomisés après le premier cycle du R-CHOP pour recevoir soit R-CHOP soit RB-CHOP. Les conclusions de cet essai sont que l'ajout du bortézomib n'apporte aucun avantage en termes de SSP, que ce soit pour l'ensemble de la population (SSP à trente mois : 70-1 % [95%IC : 65,0-74,7] avec R-CHOP contre 74-3 % [69,3-78,7] avec RB-CHOP ; HR = 0,84 ; IC95% : 0,64-1,11 ; p = 0,23), ou les sous-groupes moléculaires, notamment les ABC. Toutefois, Davis *et al.* soulignent l'intérêt potentiel de l'association pour les patients atteints d'un lymphome *double-hits* ou DE, bien que cet avantage ne soit pas significatif en SSP ou SG (*cf. infra*). Au total, ces résultats indiquent que, malgré la surexpression de la voie NF-κB dans les DLBCL ABC, l'ajout du bortézomib ne procure aucun avantage par rapport au R-CHOP. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer ces résultats finalement décevants : sous-représentation relative du sous-type ABC, patients ABC plus âgés, utilisation du bortézomib à partir du deuxième cycle seulement, et à dose relativement faible, ainsi, en fin, qu'une distinction GCB/ABC probablement trop simpliste pour identifier des patients susceptibles de bénéficier d'une telle combinaison [5, 6].

L'essai de phase III randomisé en double aveugle Phoenix (NCT01855750) avait quant à lui pour objectif d'améliorer l'efficacité du R-CHOP en le combinant à l'ibrutinib chez les patients atteints d'un DLBCL de type non-GCB ou ABC [7]. Huit cent trente-huit (838) patients non-GCB ont été inclus sur les critères immunohistochimiques de Hans. L'objectif principal, évalué par la SSE, n'est pas atteint, montrant une SSE en intention de traiter similaire pour les deux bras de traitement. Il n'a pas été montré non plus de bénéfice pour les 567 patients classés ABC par biologie moléculaire. Toutefois, et c'est peut-être un signal encourageant, dans une analyse préspecifiée du sous-groupe de patients âgés de moins de 60 ans, le régime R-CHOP + ibrutinib apporte un avantage en SSP et en SG (HR : 0,330, (95%CI : 0,162-0,673). En effet, la toxicité de cette association chez les patients âgés de plus de 60 ans est probablement en partie responsable de la conclusion globalement négative de l'essai, puisqu'elle a conduit à réduire significativement la dose-intensité du R-CHOP. L'analyse des profils mutationnels des patients susceptibles de bénéficier d'une telle association est en cours dans cette cohorte. Ajoutons enfin que les résultats de l'essai ROBUST (phase III randomisée, NCT02285062), qui seront présentés à l'édition 2019 du congrès de l'American Society of Clinical Oncology, sont également négatifs, ne montrant pas d'intérêt à l'adjonction de lénalidomide au R-CHOP (R2CHOP) dans les DLBCL de sous-type ABC, comparativement au placebo.

Plus encourageantes, les données de l'essai de phase II CAVALLI (NCT02055820) suggèrent, par comparaison à la cohorte GOYA, une plus grande efficacité du R-CHOP combiné au vénétoclax, un BH3 (pour *BCL2 homology 3*) mimétique, chez les patients BCL2 positifs (seuil en IHC à 50 %), quel que soit leur sous-type moléculaire.

Ces trois essais négatifs posent la question du choix de la molécule et du biomarqueur (GCB/ABC) utilisé, et suggèrent qu'un seul biomarqueur (expression de BCL2 quantifiée par IHC) pourrait être plus pertinent que la COO pour la sélection des patients et l'amélioration des résultats du R-CHOP.

Mille et un exomes

L'équipe de Dave rapporte l'analyse de plus de 1 000 cas de DLBCL (1 001 exactement !) par des approches de type *whole exome sequencing* (WES), séquençage de l'ARN (RNAseq), SNP (pour *single nucleotide polymorphism*) array

et profils d'expressions géniques (GEP, technologie Nanostring) [8]. Avec cet effectif impressionnant, le paysage moléculaire est ainsi décrit de manière très précise, venant compléter les données déjà publiées de plus de 500 cas de WES. Il faut noter toutefois que, dans ce travail, seuls 502 échantillons ont pu être comparés à leur contrepartie constitutionnelle.

Des notions connues sont confirmées : ainsi, vingt gènes sont mutés de manière différentielle en fonction de leur phénotype, incluant *EZH2*, *SGK1*, *GNA13*, *SOCS1*, *STAT6*, et *TNFRSF14* dans les GCB et *ETV6*, *MYD88*, *PIM1*, ou *TBL1XR1* pour les ABC. En revanche, 150 gènes mutés de manière récurrente sont mis en évidence et considérés comme *drivers*, dont certains jusqu'alors peu rapportés (par exemple *BTK*, *SPEN*, *CDKN2A*, *RB1* ou encore *CD70*). En moyenne, les DLBCL sont ciblés par 7,75 mutations portant sur ces gènes *drivers*. Leur rôle de *driver* est démontré par des approches d'*editing* génomique de type CRISPR-Cas9 (pour *clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated protein 9*) à l'aide de six lignées cellulaires (trois ABC, deux GCB et une lignée de Burkitt). Ainsi, des gènes essentiels pour la croissance cellulaire de la majorité des lignées sont identifiés et considérés comme oncogènes : *MYC*, *RHOA*, *SF3B1*, *MTOR* ou *BCL2*. Cette approche permet également d'identifier des gènes se comportant comme suppresseurs de tumeur : *TP53*, *MGA*, *PTEN*, *NFKBIE*, *RB1* ou *NCOR1*. De manière intéressante, parmi les gènes *drivers* ainsi pointés, neuf sont spécifiques d'un sous-type moléculaire : l'inactivation d'*EBF1*, d'*IRF4*, de *CARD11*, de *MYD88* ou d'*IKBKB* sont ainsi létales pour les lignées ABC tandis que l'inactivation des gènes *ZBTB7A*, *XPO1*, *TGFB2* et *PTPN6* le sont pour les lignées GCB, offrant de ce fait des opportunités thérapeutiques distinctes.

Concernant les données d'expression obtenues par RNAseq, trente et un sets de gènes ont finalement été identifiés, définissant des sous-groupes moléculaires relativement homogènes. Parmi ces sous-groupes, celui défini par les altérations touchant *RHOA* est particulièrement intéressant, ces dernières ayant été validées *in vivo*. En effet celles-ci sont corrélées à une signature de type « prolifération » et à un plus mauvais pronostic. L'inactivation de *RHOA* par CRISPR-Cas9 est létale pour les cellules GCB et ABC. Les souris *knock-out* pour *RHO* présentent un nombre de lymphocyte B considérablement réduit, aux dépens des lymphocytes T, et on observe une modification de l'architecture des centres germinatifs, des altérations des filaments d'actine et de la migration cellulaire [35].

Finalement, les auteurs proposent un modèle pronostique relativement complexe comprenant les altérations génétiques des 150 gènes *drivers*, l'expression de *MYC/BCL2*, les réarrangements de *MYC* et le phénotype GCB/ABC. Dans ce modèle, le sous-groupe le plus péjoratif est représenté par les patients *MYC* réarrangés ou mutés ou surexprimant *MYC*. À l'opposé de ce spectre, les DLBCL *CD70* mutés de phénotype GCB sont considérés comme les lymphomes de plus faible risque. En définissant trois strates, Ce modèle pronostique apparaît comme plus performant que le phénotype COO, l'expression de *MYC* et *BCL2* ou encore que l'IPI.

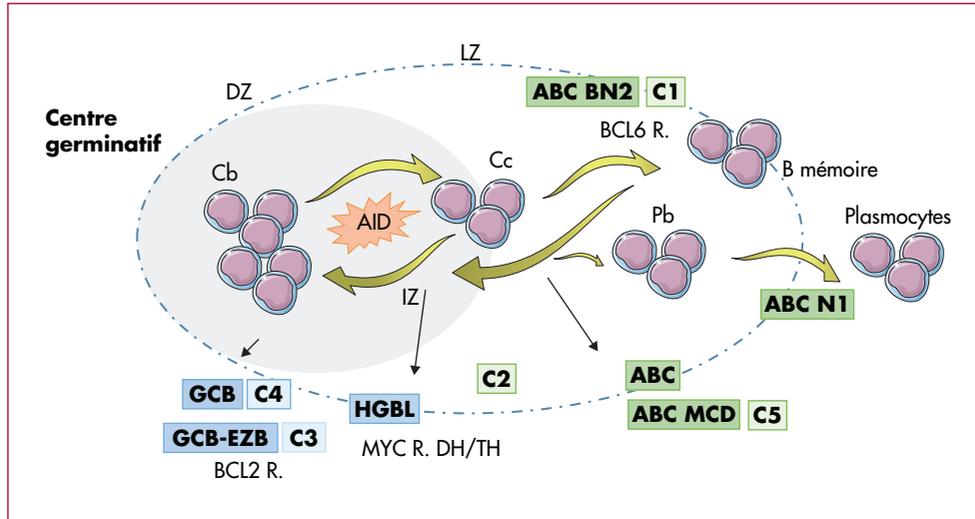
Ce travail marque un tournant dans l'analyse moléculaire des DLBCL en intégrant des analyses génomiques, transcriptomiques et fonctionnelles. Cependant, sa portée clinique reste encore incertaine, avec notamment un modèle pronostique qui semble difficilement transposable en routine.

De nouveaux sous-groupes moléculaires (figure 1)

Dans un travail publié dans le *New England Journal of Medicine*, Schmitz *et al.* proposent les bases d'une nouvelle classification moléculaire en intégrant des données du NGS et des GEP, à partir d'une cohorte de 574 DLBCL [9]. La cohorte est volontairement et significativement enrichie en sous-types ABC ou non classés



FIGURE 1



Vue schématique des nouvelles classifications moléculaires des DLBCL et HGBL (d'après [9, 13, 15, 16]). Les sous-groupes sont détaillés dans les [tableaux 1 et 2](#). Cb : centroblaste ; Cc : centrocyte ; DZ : zone sombre ; DH/TH : double hit/triple Hit ; IZ : zone intermédiaire ; LZ : zone claire ; Pb = plasmablaste ; R. : réarrangement.

([tableaux 2, 3](#)). À partir d'une analyse génomique très exhaustive, les auteurs proposent une classification en quatre sous-types homogènes ainsi définis :

- MCD : basé sur la co-occurrence des mutations de *MYD88* et de *CD79B*,
- BN2 : basé sur la fréquence élevée des fusions de *BCL6* et des mutations de *NOTCH2*,
- N1 : basé sur la présence des mutations de *NOTCH1*,
- EZB : basé sur la présence de mutations d'*EZH2* et les translocations de *BCL2*.

Ces sous-types se définissent par des pronostics distincts sous R-CHOP, avec un pronostic plus favorable pour les sous-types BN2 et EZB que pour MCD et N1, et ce indépendamment de l'IPI.

Malgré un nombre considérable de données rapportées dans ce travail, plusieurs limites doivent être soulignées. Ainsi, cette classification concerne seulement 45 % des DLBCL, laissant une vaste majorité d'entre eux encore non classés. À ce titre, le choix d'avoir enrichi la collection en sous-ABC et non classés ne constitue pas une représentation fidèle de la « vraie vie » des DLBCL observés en pratique courante. De manière intéressante, ce sont les anomalies du gène *TET2* qui constitueraient les anomalies génétiques les plus fréquentes (plus de 10 %) dans ce groupe (55 %) des non classés, suggérant que d'autres approches et cohortes sont nécessaires pour proposer une meilleure caractérisation de ce groupe. En l'absence d'analyse FISH, Les auteurs n'ont en outre pas tenu compte dans leur classification des réarrangements de *MYC*.

Les données cliniques et pronostiques de la classification de Schimtz *et al.* sont elles aussi préliminaires et méritent confirmation. Elles concernent un sous-groupe de 240 patients traités par R-CHOP avec des effectifs parfois très réduits pour certains sous-types. Certains biomarqueurs tels que les mutations de *MYD88*, rapportés dans cette étude comme ayant un impact pronostique péjoratif, ont fait l'objet de résultats contradictoires dans la littérature [10-12].

Dans le même temps, le groupe de Shipp propose un autre modèle, établi à partir de 304 DLBCL, et qui présente certaines analogies avec le modèle précédemment décrit ([tableaux 2, 3](#)) [13, 14]. Il se base sur les données de mutations et de CNV

Tableau 2

Publications rapportant de nouveaux modèles de classification moléculaire des DLBCL			
Références	Reddy <i>et al. Cell</i> 2017 [8]	Schmitz <i>et al. NEJM</i> 2018 [9]	Chapuy <i>et al. Nat Med</i> 2018 [13]
Nombre de DLBCL	1 001	574, enrichi en ABC et non classés	304
Méthodes utilisées	WES, RNAseq, SNP-array et profils d'expressions géniques (GEP, technologie Nanostring)	WES, séquençage ciblé de 372 gènes, RNAseq, analyse de CNV	WES, analyse de CNV, séquençage ciblé pour la détection des translocations
Sous-types identifiés	Identification de 150 gènes <i>drivers</i>	4 sous-types : MCD, EZB, BN2, N1	Six clusters : C0 à C5
Signification pronostique	Haut risque MYC + (réar. expression) Faible risque : CD70 muté-GCB ; gènes faible risque : <i>NF1, SGK1</i> ; gènes haut risque : <i>CD79B, ZFAT, MYC</i> (GCB ou ABC)	Haut risque : MCD, N1 Faible risque : EZB, BN2	Haut risque : C2, C3, C5 ABC haut risque : C1 ; ABC faible risque : C5
Limitations	Modèle complexe difficilement transposable en routine, pas de cohorte de validation	Pas de FISH MYC, enrichissement en sous-type ABC, 50 % des patients non classés ; pas de cohorte de validation et effectifs faibles pour les survies	Modèle complexe difficilement transposable en routine ; pas de cohorte de validation

WES : *whole exome sequencing* ; DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules B ; CNV : *copy number variation*

pour établir une classification en cinq clusters, de C1 à C5 (un groupe C0 sans anomalie récurrente et minoritaire étant également isolé et correspondant pour partie à des lymphomes B riches en cellules T) [13] :

- C1 = ABC, pronostic favorable, mutations de *NOTCH2*,
- C2 = sans lien avec les sous-types GCB/ABC, inactivation de *TP53* et de *CDKN2A*, instabilité génétique,
- C3 = GCB, pronostic défavorable, translocations de *BCL2*, altérations de *PTEN* et de gènes impliqués dans l'épigénétique (*MLL2, CREBBP, EZH2*),
- C4 = GCB, pronostic favorable, anomalies génétiques ciblant *BCR/PI3K, NFKB, RAS-JAK/STAT (BRAF, STAT3)* ou les histones,
- C5 = ABC, pronostic défavorable, gains de *BCL2*, mutations de *MYD88 (L265P)/CD79B/PIM1/PRDM1*.

Les lymphomes B de haut grade

À côté des DLBCL définis sur leur morphologie et les profils d'expression (GCB/ABC) la classification OMS identifie le sous-groupe des HGBL. Ils se définissent sur des critères morphologiques (morphologie *Burkitt-like* notamment) ou sur la présence d'un réarrangement de MYC et de BCL2 ou de BCL6 (dénommés double-hits/triple-hits [DH/TH]). Ces HGBL-DH/TH sont de mauvais pronostic et pourraient relever d'un traitement spécifique. Dans la majorité des cas, ces lymphomes expriment un profil GCB. Deux équipes ont récemment individualisé une signature propre à ces lymphomes [15, 16]. À partir d'une cohorte de 157 DLBCL GCB, incluant vingt-cinq HGBL-DH/TH BCL2 réarrangés, une signature (DHIT, pour *double hit signature*) de 104 gènes a été définie. Cette signature DHIT



est identifiée dans 27 % des DLBCL-GCB et s'associe à un pronostic défavorable, indépendamment du statut DH/TH puisqu'elle peut être présente en l'absence de ces translocations. Un profil mutationnel distinct est également identifié par comparaisons aux autres lymphomes GCB sans signature DHIT. Ainsi, les mutations ciblent notamment plus souvent les gènes *MYC*, *DDX3X*, *CREBBP*, *BCL2*, *EZH2* (*Y646*), *TP53* ou *MLL2* [15, 17]. Pour une application clinique en routine, cette signature de 194 gènes a pu être réduite à l'analyse de l'expression de trente gènes, déterminée par Nanostring et validée dans une cohorte indépendante (*DLBCL90 assay*). Ces lymphomes sont CD10⁺/MUM1⁻ et ont un profil d'expression correspondant à des cellules en transit/intermédiaires entre la zone sombre (DZ) et la zone claire (LZ), dite zone intermédiaire (IZ), récemment définis, suggérant que les HGBL sont issus de ces cellules [18]. La signature DHIT se caractérise

Tableau 3

Principales caractéristiques moléculaires des quatre sous-types selon la classification de Schmitz et al. [9].

	MCD	BN2	N1	EZB	Non classés
Distribution	8 %	14,80 %	2,10 %	21,80 %	54,40 %
Altérations génétiques récurrentes	<i>MYD88, CD79B, ETV6, TBL1XR1, CDKN2A, SPIB, BLIMP1</i>	<i>BCL6, NOCTH2, SPEN, DTX1, A20, TNIP1, CCND3, BCL10, PRKCB</i>	<i>NOCTH1, A20, IRF4, BCOR, ID3</i>	<i>EZH2, BCL2, TNFSFR14, CREBBP, KMT2D, GNA13, S1PR2, SOCS1, STAT6, SOCS1, REL</i>	<i>TET2</i>
Profil d'expressions géniques (GEP)	Blocage de la différenciation plasmocytaire, signature proliférative associée à MYC	Transformation d'un LZM ? Signature proliférative associée à MYC, signature stromal-1	Phénotype plasmocytaire, signature de cellules quiescentes	GCB, signature stromal-1	NA
Mécanismes d'évasion immunitaire	Mutation/délétion de CD58, HLA classe I	Inactivation de CD70	NA	CIITA, HLA-DMA	NA
Voies impliquées	Activation chronique du BCR, voie NF-κB BCR-dépendante	Voie NF-κB dépendante de NOTCH et de BCR	NF-κB-IRF4	JAK-STAT	NA
Pronostic	Défavorable dans les ABC	Favorable dans les ABC	Défavorable dans les ABC	Tendance à un pronostic défavorable dans les GCB	NA
Répartition selon le phénotype GCB/ABC	ABC (96 %)	ABC (41 %), GCB (1,9 %) ou non classés (40 %)	ABC (95 %)	GCB (88 %)	ABC (34 %), GCB (53 %) ou non classés (12 %)
Correspondances avec la classification de Chapuy et al. [13]	C5	C1	NA	C3	NA
Options thérapeutiques potentielles	Inhibiteurs de la voie du BCR ou des TLR	Inhibiteurs de BCL2, NOTCH ou BCR	Inhibiteurs de NOTCH ou de CKI	Inhibiteurs d'EZH2 ou de BCL2	NA

BCR : récepteur pour le lymphocyte B ; CKI : inhibiteur de check-point ; TLR : *Toll-like receptor* ; DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules ; NA : non applicable ; LZM : lymphome des zones marginales.

notamment par une surexpression des gènes *MYC* et *E2F*, *MTORC1*, ou de gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative. À l'inverse, les HGBL ont une faible expression du HLA I-II et une faible infiltration par des lymphocytes T CD4⁺. De manière intéressante, toutes les lignées de lymphomes DLBCL-GCB testées expriment ce profil DHIT. Un travail similaire a été réalisé à partir d'une cohorte de 928 patients inclus dans l'essai RemoDEL-B (*cf. supra*). Les auteurs se sont basés sur une signature définie précédemment, de type Burkitt (signature moléculaire de haut grade, MHG), et l'ont appliqué à cette cohorte [19]. Quatre-vingt-trois patients (9 % de la cohorte) ont ainsi été isolés. Un peu moins de la moitié d'entre eux ont un réarrangement de *MYC* (48,6 %) ou sont DH/TH (36,1 %). Le profil d'expression se caractérise par une signature proliférative et un profil « centroblastique ». Cette signature n'est observée que dans les GCB et, de manière intéressante, les DLBCL-DH-GCB sans signature MHG ont un pronostic favorable et identique aux autres GCB. La signature MHG est plus proche des DLBCL-GCB que celle des lymphomes de Burkitt (BL). Toutefois, les MHG et les BL ont en commun une surexpression de *MYC*, des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, des cibles de TCF3 et des gènes ribosomiaux, ainsi qu'un profil expression de type « centroblaste » (DZ) et une forte expression de *FOXP1*. L'addition de bortézomib pourrait améliorer le pronostic des MHG. Comme dans le travail précédemment cité, il est observé dans le sous-type MHG une faible expression des molécules HLA et des gènes de la réponse immune. Le profil mutationnel MHG est caractéristique des DLBCL-GCB et comprend également les mutations de *MYC*. Les mutations de *TCF3* et de *ID3* sont en revanche moins fréquentes que dans les BL, suggérant des mécanismes moléculaires distincts entre les deux entités. S'il existe une bonne corrélation entre l'expression de *MYC/BCL2* en mRNA et l'expression protéique estimée en IHC, le groupe MHG identifie un groupe de mauvais pronostic, indépendamment du statut DE [16]. Ces travaux suggèrent l'importance d'une définition moléculaire précise des HGBL, dépassant l'entité des lymphomes DH/TH défini par FISH.

Conclusion

Vingt ans après sa définition, le concept séparant les sous-types GCB et ABC s'avère encore inopérant pour les cliniciens. Les essais thérapeutiques visant à améliorer l'efficacité du R-CHOP standard en ciblant des altérations plus spécifiques du sous-type ABC sont à ce jour tous négatifs, questionnant de ce fait la pertinence de cette dichotomie pour la stratification des patients. De nouvelles classifications intégrant des données moléculaires sont proposées et viennent enrichir notre compréhension de l'hétérogénéité des DLBCL. Pour autant, ces nouvelles classifications, complexes, intégrant des technologies peu accessibles sont-elles applicables en routine pour stratifier les patients ? Comment intégrer les données de FISH concernant *MYC* – cette technique étant recommandée par l'OMS 2016 pour identifier les double-hits ou les HGBL [20]. Quel sera l'impact réel de ces classifications sur la stratégie thérapeutique ? Autant de questions qui nécessiteront des analyses prospectives et rétrospectives complémentaires. À côté des classifications moléculaires, d'autres approches émergent et pourraient s'avérer plus pertinentes pour guider les traitements. Ainsi, un travail récent montre que l'expression de glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), une enzyme glycolytique, était prédictive de la réponse au R-CHOP [21]. En contrôlant les voies du métabolisme de la glutamine, de mTOR1, de la phosphorylation oxydative ou du métabolisme mitochondrial, GAPDH s'avère être un biomarqueur de l'hétérogénéité métabolique des DLBCL, mal appréhendée par ces classifications moléculaires et indépendante de la COO, de l'expression de BCL2 ou de *MYC*.



EZH2 et MYD88, deux gènes drivers dans les lymphomes diffus à grandes cellules

EZH2 et la régulation épigénétique

EZH2 (pour *enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*) appartient au complexe répresseur transcriptionnel PRC2. Son domaine catalytique permet la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3). La protéine est exprimée dans les lymphocytes B du centre germinatif (CG) et impliquée dans sa différenciation [22]. EZH2 peut également monométyler ROR α (pour *retinoic acid receptor related orphan receptor α*), une protéine induite par les altérations de l'ADN, favorisant l'activation de p53 et l'apoptose. EZH2 et le complexe PRC2 jouent un rôle crucial dans la formation du CG par répression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (tel que CDKN1A) et en altérant la réponse aux dommages de l'ADN [22]. EZH2 réprime également les gènes impliqués dans la différenciation plasmocytaire comme *IRF4* ou *PRDM1*, maintenant de ce fait un phénotype de type CG. Il a été récemment montré qu'EZH2 collaborait avec la protéine BCL6 (pour *B-cell lymphoma 6*) en permettant le recrutement d'un autre complexe répresseur, le complexe PRC1/BCOR (pour *polycomb repressive complex 2/BCL6 co-repressor*), et la protéine CBX8 (pour *chromobox 8*). Ces complexes protéiques PRC2 et PRC1/BCOR se lient, via CBX8, à des promoteurs « bivalents » contenant à la fois les états répresseurs (H3K27me3) et activateurs (H3K4me3) de la chromatine.

Les mutations *hot-spots* décrites dans les DLBCL et les lymphomes folliculaires (LF) augmentent l'activité catalytique d'EZH2 et conduisent à une plus grande répression des gènes cibles [23]. Les souris mutantes *EZH2*^{Y641} développent une hyperplasie des CG et accumulent les marques de répression chromatinière H3K27me3. La valeur pronostique favorable des mutations d'EZH2 a été soulignée par plusieurs études dans les LF [24]. En revanche, l'impact pronostique favorable est incertain dans les DLBCL avec des résultats contradictoires [8, 9]. Les mutations activatrices semblent conférer une plus grande sensibilité aux inhibiteurs d'EZH2 ciblant son domaine catalytique. Des molécules actuellement en développement visent également d'autres molécules du complexe PRC2, notamment le cofacteur EED (pour *embryonic ectoderm development*) [25].

MYD88 et la voie des Toll-like receptor

Les *Toll-like receptors* (TLR) font partie de la famille des PRR (pour *pattern recognition receptor*) et sont impliqués dans l'immunité innée en réponse à de nombreux pathogènes bactériens, viraux, fongiques, parasitaires ou endogènes. Les TLR sont des protéines transmembranaires comprenant un domaine extracellulaire riche en leucine et un domaine cytoplasmique homologue à celui de l'interleukine 1. Dix TLR sont décrits chez l'homme, permettant de reconnaître un nombre virtuellement illimité de pathogènes. Tous, à l'exception de TLR3, dépendent de *MYD88* [26].

Des mutations de *MYD88* sont observées dans ~30 % des DLBCL de type ABC, dans 70 % des lymphomes cutanés primitifs de type jambe, 44 % des lymphomes intravasculaires et 38-100 % des lymphomes primitifs du système nerveux central ou de localisation testiculaire [27-29]. Elles sont le plus souvent hétérozygotes mais peuvent s'associer à des anomalies de copies (gain). Dans près des deux tiers des cas, le *hot-spot* L265P touchant le domaine TIR est observé dans le sous-type ABC [30]. Des variants alternatifs sont décrits et se répartissent de manière égale dans les sous-types GCB et ABC. Dans un modèle murin reproduisant la mutation L265P, il est observé le développement d'un lymphome ayant les caractéristiques



des DLBCL de type ABC observés chez l'homme [31]. La valeur pronostique des mutations est controversée et semble surtout liée au phénotype ABC et à l'âge plus avancé des patients mutés. Toutefois, leur présence pourrait s'associer à un risque plus important de rechute neuroméningée et de localisation extraganglionnaire [30, 32, 33]. La mutation *hot-spot* peut être détectée dans l'ADN circulant contenu dans le plasma par PCR digitale [34]. La voie des TLR/MYD88 peut être ciblée de manière pharmacologique et fait l'objet de nombreuses investigations précliniques : inhibiteurs d'IRAK4/IRAK1 (pour *interleukin-1 receptor-associated kinase 1/4*), molécules bloquant l'homodimérisation de MYD88 ou l'hétérodimérisation des TLR sont des pistes actuellement explorées.

Références

- [1] Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000 ; 403 (6769) : 503-11.
- [2] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon : IARC, 2008.
- [3] Grimm KE, O'Malley DP. Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Ann Diagn Pathol* 2019 ; 38 : 6-10.
- [4] Staiger AM, Ziepert M, Horn H, 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* 2017 ; 35 (22) : 2515-26.
- [5] Davies A, Cummin TE, Barrans S, et al. Gene-expression profiling of bortezomib added to standard chemioimmunotherapy for diffuse large B-cell lymphoma (REMoDL-B): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2019 ; 20 (5) : 649-62.
- [6] Jardin F. Improving R-CHOP in diffuse large B-cell lymphoma is still a challenge. *Lancet Oncol* 2019 ; 20 (5) : 605-6.
- [7] Younes A, Sehn LH, Johnson P, et al. Randomized phase III trial of ibrutinib and rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone in non-germinal center B-cell diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2019 ; 37 (15) : 1285-95.
- [8] Reddy A, Zhang J, Davis NS, et al. Genetic and functional drivers of diffuse large B cell lymphoma. *Cell* 2017 ; 171 (2) : 481-94 e15.
- [9] Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2018 ; 378 (15) : 1396-407.
- [10] Dubois S, Viailly PJ, Bohers E, et al. Biological and clinical relevance of associated genomic alterations in MYD88 L265P and non-L265P-mutated diffuse large B-cell lymphoma: analysis of 361 cases. *Clin Cancer Res* 2017 ; 23 (9) : 2232-44.
- [11] Lee YS, Liu J, Fricano KA, et al. Lack of a prognostic impact of the MyD88 L265P mutation for diffuse large B cell lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017 ; 23 (12) : 2199-204.
- [12] Yu S, Luo H, Pan M, et al. High frequency and prognostic value of MYD88 L265P mutation in diffuse large B-cell lymphoma with R-CHOP treatment. *Oncol Lett* 2018 ; 15 (2) : 1707-15.
- [13] Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat Med* 2018 ; 24 (5) : 679-90.
- [14] Dubois S, Jardin F. Novel molecular classifications of DLBCL. *Nat Rev Clin Oncol* 2018 ; 15 (8) : 474-6.
- [15] Ennishi D, Jiang A, Boyle M, et al. Double-hit gene expression signature defines a distinct subgroup of germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2019 ; 37 (3) : 190-201.
- [16] Sha C, Barrans S, Cucco F, et al. Molecular high-grade B-cell lymphoma: defining a poor-risk group that requires different approaches to therapy. *J Clin Oncol* 2019 ; 37 (3) : 202-12.
- [17] Evrard SM, Pericart S, Grand D, et al. Targeted next generation sequencing reveals high mutation frequency of CREBBP, BCL2 and KMT2D in high-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Haematologica* 2019 ; 104 (4) : e154-7.
- [18] Milpied P, Cervera-Marzal I, Mollicella ML, et al. Human germinal center transcriptional programs are de-synchronized in B cell lymphoma. *Nat Immunol* 2018 ; 19 (9) : 1013-24.
- [19] Sha C, Barrans S, Care MA, et al. Transferring genomics to the clinic: distinguishing Burkitt and diffuse large B cell lymphomas. *Genome Med* 2015 ; 7 (1) : 64.
- [20] Leonard JP, Martin P, Roboz GJ. Practical implications of the 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid and myeloid neoplasms and acute leukemia. *J Clin Oncol* 2017 ; 35 (23) : 2708-15.
- [21] Chiche J, Reverso-Meinetti J, Mouchotte A, et al. GAPDH expression predicts the response to R-CHOP, the tumor metabolic status, and the response of DLBCL patients to metabolic inhibitors. *Cell Metab* 2019 ; 29 (6) : 1243-57.
- [22] Beguelin W, Popovic R, Teater M, et al. EZH2 is required for germinal center formation and somatic EZH2 mutations promote lymphoid transformation. *Cancer Cell* 2013 ; 23 (5) : 677-92.
- [23] Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 2010 ; 42 (2) : 181-5.
- [24] Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol* 2015 ; 16 (9) : 1111-22.
- [25] Qi W, Zhao K, Gu J, et al. An allosteric PRC2 inhibitor targeting the H3K27me3 binding pocket of EED. *Nat Chem Biol* 2017 ; 13 (4) : 381-8.
- [26] Wang JQ, Jeelall YS, Ferguson LL, Horikawa K. Toll-like receptors and cancer: MYD88 mutation and inflammation. *Front Immunol* 2014 ; 5 : 367.



[27] Pham-Ledard A, Cappellen D, Martinez F, Vergier B, Beylot-Barry M, Merlio JP. MYD88 somatic mutation is a genetic feature of primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma, leg type. *J Invest Dermatol* 2012 ; 132 (8) : 2118-20.

[28] Kraan W, van Keimpema M, Horlings HM, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in primary testicular diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2014 ; 28 (3) : 719-20.

[29] Yamada S, Ishida Y, Matsuno A, Yamazaki K. Primary diffuse large B-cell lymphomas of central nervous system exhibit remarkably high prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations. *Leuk Lymphoma* 2015 ; 56 (7) : 2141-5.

[30] Dubois S, Vially PJ, Bohers E, et al. Biological and clinical relevance of associated genomic alterations in MYD88 L265P and non-L265P-mutated diffuse large B-cell lymphoma: analysis of 361 cases. *Clin Cancer Res* 2017 ; 23 (9) : 2232-44.

[31] Knittel G, Liedgens P, Korovkina D, et al. B-cell-specific conditional expression of Myd88p.L252P leads to the development of diffuse large B-cell lymphoma in mice. *Blood* 2016 ; 127 (22) : 2732-41.

[32] Taniguchi K, Takata K, Chuang SS, et al. Frequent MYD88 L265P and CD79B mutations in primary breast diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2016 ; 40 (3) : 324-34.

[33] Kraan W, Horlings HM, van Keimpema M, et al. High prevalence of oncogenic MYD88 and CD79B mutations in diffuse large B-cell lymphomas presenting at immune-privileged sites. *Blood Cancer J* 2013 ; 3 : e139.

[34] Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2016 ; 57 (9) : 2171-9.

[35] Zhang J, Davis N, Moffitt A, et al. Integrative Analysis of 1001 Diffuse Large B Cell Lymphoma Identifies Novel Oncogenic Roles for RhoA. *Blood* 2017 ; 130 (Suppl 1) : 37.

¹ Rituximab, cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisolone en cycles de vingt et un ou de quatorze jours (R-CHOP21/14).