

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLAB BLIDA -1-

FACULTE DE MEDECINE



THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES MEDICALES

---

# **Rôle du virus Epstein-Barr dans la lymphomagenèse et le microenvironnement tumoral des Lymphomes Diffus à Grandes Cellules B NOS**

---

**Présentée et soutenue par le Docteur Nabila MOULAÏ-KHELIF**

*Maitre Assistante en Anatomie Pathologique*

**Directrice de thèse : Professeur Wahiba OUAHIOUNE**

*Chef de service d'Anatomie Pathologique*

*Faculté de Médecine de Blida*

## **Jury**

**Présidente :** Professeur Zine –Charaf AMIR

*Faculté de médecine d'Alger*

**Membres :** Professeur Ayed BELARBI

*Faculté de médecine de Blida*

Professeur Mohamed BRADAI

*Faculté de médecine de Blida*

Professeur Ghania BENKHEDDA

*Faculté de médecine d'Alger*

**Année : 2019**

*A la mémoire de mes grands-parents*

## Dédicaces

*Je dédie cette thèse à mes chers parents, Mouloud et Hamida, aucun mot ne saurait exprimer ma gratitude, mon amour et ma considération pour tous vos sacrifices, votre dévouement et éducation. C'est à vous que je dois ma réussite, et je suis fière de vous dédier ce modeste travail de thèse.*

*Vous espérez toujours que ce jour arrive enfin !! J'espère être à la hauteur de vos espérances.*

*Merci d'être tout simplement mes parents.....*

*Que Dieu le tout puissant vous accorde santé, bonheur et longue vie.*

*A mon époux Tayeb, merci d'exister dans ma vie et d'autant me soutenir et supporter mon stress. Tu es ma force, j'ai de la chance de t'avoir et je vous souhaite tout le bonheur du monde avec nos deux petits chéris.*

*A mes deux adorables enfants : Lydia et Nadjib qui donnent sens à ma vie et le courage de continuer.*

*A mes sœurs : Amel, Amina et Feryal Kamila, les trois meilleures sœurs au monde ! Je vous exprime tout l'amour et l'affection que je vous porte, merci de votre soutien sans faille.*

*A mes neveux et nièces : Cyrine, Sabri, Lylia, Khalil, Sarah, Abdeldjallil, Sully Adel et Anouk Farah. Que dieu le tout puissant vous garde à vos parents ! Vous êtes les rayons de soleil de notre famille.*

*A mes beaux frères : Kheireddine, Nabil et Jérôme. Merci Kh d'être toujours là pour mes parents.*

*A toute ma famille : oncles, tantes, cousins et cousines.*

*A Khalou Ali, tu es pour moi un exemple à suivre ! Merci d'être toujours présent dans ma vie.*

*A ma belle famille pour leurs encouragements !*

*A tous mes amis.*

*A tous les pathologistes Algériens.*

# **Remerciements**

## *A ma directrice de thèse*

### *Madame le Professeur Wahiba OUAHIOUNE*

Chef de service d'Anatomie –Pathologique du CHU de Blida. Je tiens à vous remercier madame, de m'avoir encadrée, conseillée, aidée et encouragée au cours de l'élaboration de cette thèse. C'est une chance et un privilège de travailler sous votre direction. Merci aussi, d'avoir été là pour guider mes pas, tout au long de ma modeste carrière, ainsi que votre soutien sans faille dans les moments difficiles et dans les moments heureux. Les dix années passées avec vous ont été pour moi bénéfiques sur les plans, scientifique, professionnel et humain. J'espère que les générations futures profiteront autant que moi de toutes vos qualités qui valent l'admiration et le respect.

Veillez trouver ici l'expression de ma gratitude, ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

## *A la présidente du jury*

### *Madame le Professeur Zine –Charaf AMIR*

Chef de service d'Anatomie –Pathologique du CHU de Mustapha. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider mon jury. Votre expertise en hématopathologie, et en bien d'autres domaines ainsi que votre générosité scientifique et modestie ont toujours suscité en moi de l'admiration et du respect. Merci également de tout ce que vous faites pour la pérennité de notre comité de lecture des lymphomes et de nous accueillir dans votre service à bras ouverts.

Veillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

## *Aux membres du jury*

### *Monsieur le Professeur Ayed BELARBI*

Chef de service d'Anatomie –Pathologique du CHU de Douéra. C'est un grand honneur pour moi de vous avoir dans mon jury. Les mots ne sauront pas exprimer la grande estime que j'ai pour vous.

C'est un plaisir et un immense honneur pour moi de travailler à vos côtés et bénéficier de votre expérience, à chaque comité de lecture. Merci également pour tout ce que vous faites pour la pérennité de ce comité.

Veillez trouver en ce travail ma plus profonde reconnaissance, et respect.

***Monsieur le Professeur Mohamed BRADAI***

Chef de service d'Hématologie du CLCC Blida. Votre compétence et votre esprit scientifique sont incontestables. C'est pour moi, un immense honneur de vous avoir dans mon jury. Je vous remercie d'apporter votre jugement d'expert sur mon travail, et votre point de vue en qualité de clinicien.

Veillez trouver ici l'expression de ma plus haute considération et de mon profond respect.

***Madame le Professeur Ghania BENKHEDDA***

Chef de service d'Anatomie –Pathologique du CPMC d'Alger. C'est un grand honneur, de vous avoir dans mon jury. Vous m'avez soutenue et conseillé tout au long de l'élaboration de ce travail et je vous en remercie. Votre esprit scientifique, votre humilité et disponibilité m'ont marqués. Nos discussions sur les marqueurs me manquent ! Je ne vous oublierai jamais.

Veillez recevoir l'expression de ma reconnaissance et de mon respect les plus profonds.

A tous mes collègues pathologistes du service d'Anatomie Pathologique du CHU de Blida, mon intégration au sein de l'équipe a été salubre pour moi, j'ai rencontré des collègues bosseurs et solidaires. Votre esprit d'équipe est exemplaire, je vous remercie de m'avoir adopté et encouragé.

J'adresse particulièrement mes plus chaleureux remerciements au **Dr Mohammed GUERMI**, plus qu'un collègue, un ami sur qui je peux compter. Merci de ton soutien et de ton aide. Je te souhaite une belle carrière ainsi qu'un avenir radieux.

Merci également au **Dr Wissam ABDELLAH**, pour sa précieuse collaboration.

A tous les biologistes du service particulièrement **Amel MERIEM** et **Radia TOUDJI**, pour leur dévouement, et leur bravoure. Merci, à vous deux, sans vous ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Je remercie vivement mes collaborateurs cliniciens, **Pr Salima OUKID** et le **Dr Lamia CHERIF OUEZZANI** pour leur disponibilité et leur étroite collaboration. Votre dévouement pour vos patients est exemplaire. Veuillez trouver en ce travail ma plus profonde reconnaissance.

J'adresse mes vifs remerciements au **Pr Yamina YOUSFI**, pour ses précieux conseils, nos coups de fils le long de la route, ont été fructueux. Merci Mina, pour tout le temps que tu as consacré à m'écouter et à me prodiguer des conseils. Que notre amitié soit éternelle !

Un grand merci à **Nora KARICHE**, biologiste hors paire, pour son aide et sur toutes nos discussions autour du microenvironnement, merci Nora pour la technique de l'IL-6, et la lecture des lames d'IHC pour les marqueurs cytokines. Je te souhaite une grande réussite professionnelle, tu le mérites tant.

Je remercie également, **Dr Abdelmalik AMIMER**, **Dr Ayman MELZI**, **Pr Abderrezak BOUAMRA** et **Dr Nourredine BOUTAGHENE** pour l'étude statistique, sans vous ce travail n'aurait pas pu aboutir.

Un grand merci au **Dr Nourredine BOUTAGHENE**, pour tout le temps que tu m'as consacré pour l'étude multivariée ainsi que la mise page, tes qualités humaines sont remarquables, je n'oublierai jamais ton aide et je t'en suis reconnaissante.

Mes vifs remerciements s'adressent au **Pr Souad TAOUSSI**, pour sa collaboration dans la lecture des lames FISH, ainsi que tous les conseils qu'elle nous a apportés pour la technique. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Merci à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à l'élaboration de ce travail !

# Sommaire

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>19</b>
<b>II</b>	<b>DONNEES RECENTES DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>24</b>
II.1	Lymphome B diffus à grandes cellules NOS.....	25
II.1.1	Définition/ généralités .....	25
II.1.2	Classification OMS 2016 des LBDGC .....	25
II.1.3	Présentation clinique .....	26
II.1.4	Morphologie .....	27
II.1.4.1	Variante centroblastique.....	27
II.1.4.2	Variante Immunoblastique .....	28
II.1.4.3	Variante anaplasique .....	28
II.1.4.4	Autres variantes rares .....	29
II.1.5	Immunophénotype : .....	29
II.1.6	Classification des LBDGC NOS selon la cellule d'origine « COO ».....	32
II.1.6.1	Classification moléculaire des LBDGC NOS par la GEP.....	32
II.1.6.2	Classification immunophénotypique des LBDGC NOS par étude IHC .....	32
II.1.7	Lymphomagenèse.....	33
II.1.7.1	Les LBDGC-GC.....	33
II.1.7.2	Les LBDGC –ABC .....	34
II.1.7.3	Profil mutationnel.....	35
II.1.8	Microenvironnement tumoral.....	37
II.2	Le lymphome B diffus à grandes cellules B EBV+ NOS.....	37
II.2.1	Définition/ généralités .....	37
II.2.2	Epidémiologie .....	37
II.2.3	Présentation clinique .....	37
II.2.4	Morphologie .....	38
II.2.5	Immunophénotype.....	39
II.2.6	Diagnostic différentiel.....	39
II.3	Rôle de l'EBV dans la lymphomagenèse des LBDGC.....	39
II.3.1	Rappel sur le cycle biologique de l'EBV .....	40
II.3.1.1	Historique .....	40
II.3.1.2	Structure virale et génomique .....	40
II.3.1.2.1	Structure du virion .....	40
II.3.1.2.2	Le génome.....	41
II.3.1.2.3	Les phases du cycle viral .....	43

•	Phase de latence .....	43
→	Les types de latence.....	43
→	Les protéines EBNA et les protéines membranaires LMP .....	43
•	La phase lytique .....	44
→	Les ARN non codants.....	45
II.3.1.3	Physiopathologie de l'infection par l'EBV .....	46
II.3.1.3.1	Cellules-cibles de l'EBV.....	46
•	Cibles conventionnelles.....	46
→	Les lymphocytes B .....	46
→	Les cellules épithéliales.....	47
•	Cibles non conventionnelles.....	48
→	Les lymphocytes T .....	48
→	Les cellules NK .....	48
→	Les monocytes.....	48
II.3.1.3.2	Infection par l'EBV in vivo et persistance virale.....	48
II.3.2	Lymphomagenèse.....	50
II.3.2.1	Activation de la voie NF- $\kappa$ B .....	50
II.3.2.1.1	Les sous-unités NF- $\kappa$ B.....	50
II.3.2.1.2	Les inhibiteurs I $\kappa$ B.....	51
II.3.2.1.3	Voies de signalisation NF- $\kappa$ B .....	52
•	La voie d'activation classique (canonique).....	52
•	La voie d'activation alternative (non canonique).....	53
•	NF- $\kappa$ B et transformation par LMP-1 .....	54
II.3.2.2	c-MYC.....	55
II.3.2.3	La voie de signalisation PI3K/AKT .....	57
II.3.2.4	La voie de signalisation JNK .....	58
II.3.2.5	La voie de signalisation JAK/STAT .....	58
II.3.2.6	La voie de signalisation P38/MAPK .....	59
II.3.2.7	La voie de signalisation IL-6.....	59
II.3.3	Rôle du microenvironnement tumoral.....	61
II.3.3.1	Contrôle de l'infection par le système immunitaire .....	61
II.3.3.2	Le concept de cancer immunoediting.....	62
II.3.3.3	Les cellules immunitaires infiltrant le microenvironnement tumoral .....	65
II.3.3.4	Les Treg dans les LBDGC .....	69

II.3.3.5	Les immune-checkpoints.....	70
II.3.3.5.1	Mécanisme à l'origine de l'expression de PDL-1 dans les LBDGC EBV+ NOS.....	72
II.3.3.5.2	Expression du PDL-1 dans les LBDGC EBV+ NOS .....	74
II.3.3.5.3	Impact pronostic de l'expression de PD-1 et PDL-1 .....	74
II.4	Facteurs pronostiques .....	74
II.5	Facteurs histo-pronostiques .....	74
II.6	Traitement.....	74
<b>III</b>	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>75</b>
III.1	Matériel.....	76
III.2	Méthodes :.....	76
III.2.1	Source et recueil des données.....	76
III.2.1.1	Données cliniques .....	76
III.2.1.2	Données anatomopathologiques .....	77
III.2.2	Paramètres d'évaluation .....	77
III.2.2.1	Démographiques .....	77
III.2.2.2	Cliniques .....	77
III.2.2.3	Anatomopathologiques .....	78
III.2.2.3.1	Phase pré-analytique.....	78
•	Etude macroscopique : .....	78
•	Préparation des prélèvements tissulaires.....	78
III.2.2.3.2	Phase analytique .....	78
•	Etude de la prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS .....	78
→	Etude histopathologique .....	78
→	Etude immunohistochimique.....	79
→	Hybridation in situ chromogénique (CISH) .....	79
•	Rôle de l'EBV dans la lymphomagenèse et le microenvironnement tumoral des LBDGC EBV+, NOS et comparaison des deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- .....	79
→	Etude histopathologique .....	79
→	Phénotype B des cellules lymphoïdes tumorales.....	79
→	Sous type moléculaire GCB ou ABC .....	79
→	% d'EBERs.....	79
→	Profil de latence II ou III .....	80
→	Les voies de la lymphomagenèse .....	80

→ Hybridation in situ en fluorescence (FISH).....	81
III.2.3 Analyse statistique : .....	82
<b>IV RESULTATS .....</b>	<b>83</b>
IV.1 Volet 1 : Profil épidémiologique des LBDGC NOS / Etude descriptive des LBDGC EBV+ .....	84
IV.1.1 Profil épidémiologique des LBDGC NOS .....	84
IV.1.1.1 Démographiques .....	84
IV.1.1.1.1 Répartition selon l'âge.....	84
IV.1.1.1.2 Répartition selon le sexe.....	85
IV.1.1.1.3 Répartition selon la localisation .....	86
IV.1.1.2 Anatomopathologiques .....	87
IV.1.2 Répartition selon le sous type moléculaire.....	87
IV.1.3 Prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS.....	88
IV.1.4 Etude descriptive des LBDGC EBV+.....	90
IV.1.4.1 Démographiques .....	90
IV.1.4.1.1 Répartition selon l'âge.....	90
IV.1.4.1.2 Répartition selon le sexe.....	91
IV.1.4.1.3 Répartition selon la catégorie d'âge .....	92
IV.1.4.1.4 Répartition selon la localisation .....	93
IV.1.4.2 Anatomopathologiques .....	94
IV.1.4.2.1 Répartition selon le sous type histologique.....	94
IV.1.4.2.2 Phénotype des cellules lymphoïdes tumorales .....	99
IV.1.4.2.3 Répartition selon le sous type moléculaire.....	102
IV.1.4.2.4 Pourcentage D'EBERs .....	103
IV.1.4.2.5 Répartition selon le profil de latence II et III .....	105
IV.1.4.2.6 Expression du CD15.....	109
IV.2 Volet 2 : Comparaison du profil clinique, l'expression de CD30, les voies de lymphomagenèse et les TIL du ME ainsi que les facteurs histopronostiques des deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- .....	110
IV.2.1 Profil Clinique.....	111
IV.2.1.1 Caractéristiques cliniques des LBDGC EBV+ .....	111
IV.2.1.2 Sérologie EBV .....	121
IV.2.2 Expression du CD30.....	122
IV.2.3 Voies de lymphomagenèse.....	126
IV.2.3.1 Expression du CD40 .....	127
IV.2.3.2 Voie de signalisation NF-κB.....	127

IV.2.3.3	STAT3.....	129
IV.2.3.4	Voie de signalisation IL-6.....	131
IV.2.4	Profil du microenvironnement tumoral.....	133
IV.2.4.1	Expression du CD3 et CD5.....	135
IV.2.4.2	Profil cytotoxique.....	138
IV.2.4.3	Profil immunomodulateur.....	143
IV.2.4.4	Immune-checkpoints.....	147
IV.2.5	Facteurs histo-pronostiques.....	151
IV.2.6	Hybridation in situ par fluorescence FISH.....	155
IV.2.7	Analyse multivariée par régression.....	155
IV.2.8	Courbes de survie (variables indépendantes).....	158
IV.2.8.1	Réponse au traitement.....	158
IV.2.8.2	CD30.....	159
IV.2.8.3	CD8.....	160
<b>V</b>	<b>DISCUSSION.....</b>	<b>161</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>189</b>
<b>VII</b>	<b>RECOMMANDATIONS.....</b>	<b>193</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>.....</b>	<b>195</b>

## Liste des figures

Figure 1 : LBDGC variante centroblastique .....	27
Figure 2 : LBDGC variante immunoblastique .....	28
Figure 3 : LBDGC variante anaplasique .....	29
Figure 4 : Algorithme de Hans4 .....	32
Figure 5 : Principaux sous types moléculaires des LBDGC .....	36
Figure 6 : Dérégulation de BCL6 dans les LBDGC .....	36
Figure 7 : LBDGC EBV+ NOS selon Montes-Moreno <sup>29</sup> .....	38
Figure 8 : Structure commune des Herpes viridae .....	41
Figure 9 : Représentation schématique du génome de l'EBV sous sa forme linéaire .....	41
Figure 10 : Localisation des promoteurs Cp, Wp, Fp et Qp au sein du génome de l'EBV .....	42
Figure 11 : Localisation des promoteurs Cp, Wp, Fp et Qp au sein du génome de l'EBV .....	42
Figure 12 : Passage de la phase de latence au cycle lytique par la protéine ZEBRA .....	45
Figure 13: Représentation schématique de la cinétique d'infection des lymphocytes B par l'EBV in vitro .....	47
Figure 14 : Infection primaire et persistante par l'EBV in vivo chez des individus immunocompétents. ....	49
Figure 15 : Représentation schématique de la famille NF-κB .....	51
Figure 16 : Représentation schématique des inhibiteurs de la famille IκB (Inhibitor of NF-κB) .....	52
Figure 17 : Voie d'activation classique de NF-κB.....	53
Figure 18 : Voie d'activation alternative de NF-κB .....	54
Figure 19 : Mimétisme de CD40 par LMP1 et activation de la voie NF-κB .....	55
Figure 20 : Mécanismes cellulaires contrôlés par MYC dans des conditions normales et lors de la tumorigenèse.....	56
Figure 21 : Détournement de la voie PI3K/Akt par LMP1 .....	57
Figure 22 : Mécanismes d'activation de STAT3 par LMP1 .....	58
Figure 23 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation pouvant être induite par LMP1 .....	59
Figure 24 : La signalisation de l'IL-6 via la voie classique (a) et la voie trans-signaling (b) ..	60
Figure 25 : Mécanisme d'action de STAT3 et IL-6.....	60
Figure 26 : Les effets immunomodulateurs de LMP1.....	62
Figure 27 : Le concept d'immunoediting.....	64
Figure 28 : Rôle des cellules immunitaires et les cytokines produites dans l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil pro-ou anti-tumoral.....	64
Figure 29 : Les cellules Th17 et l'immunité anti-tumorale.....	66
Figure 30 : Recrutement et induction des Treg dans le microenvironnement tumoral.....	67
Figure 31 : L'induction des Treg par le TGF-β et son effet immunosuppresseur sur les cellules immunitaires.....	68
Figure 32 : Les différents mécanismes immunosuppresseurs des cellules T régulatrices dans le microenvironnement tumoral.....	69
Figure 33 : Les différentes fonctions des Treg dans les lymphomes.....	69
Figure 34 : Représentation schématique des principaux checkpoints immunitaires.....	70
Figure 35 : Les points de contrôle de l'immunité, équilibre entre activation et inhibition.....	71
Figure 36 : Schéma des mécanismes de résistance au système immunitaire des cellules tumorales .....	72

Figure 37 : Différents mécanismes d'expression de PD-L1/PD-L2 par la cellule lymphomateuse.....	73
Figure 38 : Répartition des patients en fonction de l'âge .....	85
Figure 39 : Fréquence de répartition des patients présentant un LBDGC NOS selon le sexe .	86
Figure 40 : Répartition des LBDGC NOS selon la localisation.....	87
Figure 41 : Répartition des LBDGC NOS selon le sous type moléculaire .....	88
Figure 42 : Prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS .....	88
Figure 43 : Schéma récapitulatif de l'étude .....	89
Figure 44 : Répartition selon l'âge des LBDGC EBV+ NOS .....	90
Figure 45 : Fréquence de répartition des LBDGC EBV+ selon le sexe.....	91
Figure 46 : Répartition par catégorie d'âge selon le sexe .....	92
Figure 47 : Fréquence de répartition des LBDGC EBV+ NOS selon la localisation .....	93
Figure 48 : Fréquence de répartition de la localisation des LBDGC EBV+ selon la catégorie d'âge.....	94
Figure 49 : Répartition des LBDGC EBV+ selon le sous type histologique .....	95
Figure 50 : Fréquence de répartition du sous type histologique selon la catégorie d'âge .....	96
Figure 51 : Sous type histologique polymorphe LBDGC like .....	97
Figure 52 : Sous type histologique polymorphe Hodgkin-like .....	98
Figure 53 : Sous type histologique monomorphe.....	99
Figure 54 : Phénotype B des cellules lymphoïdes tumorales.....	101
Figure 55 : Expression des marqueurs du sous type moléculaire .....	102
Figure 56 : Répartition du % de transcrits EBERs dans les LBDGC EBV+ .....	103
Figure 57 : % de transcrits EBER .....	104
Figure 58 : Positivité de l'EBER dans la variante LBDGC-like .....	105
Figure 59 : Latence de type III .....	107
Figure 60 : Latence de type II .....	108
Figure 61 : Fréquence de répartition des latences II et III selon la catégorie d'âge.....	109
Figure 62 : Négativité de l'expression du CD15 GX40 .....	109
Figure 63 : Répartition des symptômes B dans les LBDGC EBV+.....	112
Figure 64 : Répartition de la fréquence du stade clinique LBDGC EBV+ .....	113
Figure 65 : Répartition de la fréquence de l'IPI .....	114
Figure 66 : Fréquence du taux de réponse au traitement.....	115
Figure 67 : Répartition du taux de survie .....	116
Figure 68 : Fréquence du score de l'Index Pronostic International .....	117
Figure 69 : Fréquence de la réponse au traitement R-CHOP .....	118
Figure 70 : Analyse du taux de survie.....	119
Figure 71 : Répartition de la fréquence d'expression du CD30 dans les LBDGC EBV+ .....	123
Figure 72 : Fréquence d'expression de CD30.....	124
Figure 73 : Expression du CD30 dans les LBDGC EBV+ .....	125
Figure 74 : Expression du CD40 .....	127
Figure 75 : Voie de signalisation NF-kB .....	128
Figure 76 : Expression du STAT3.....	130
Figure 77 : Test de Mann-Whitney IL-6 .....	131
Figure 78 : Expression d'IL-6 .....	132
Figure 79 : Test de Mann-Whitney CD3 et.....	135
Figure 80 : Expression du CD3 .....	136
Figure 81 : Expression du CD5 .....	137

Figure 82 : Test de Mann-Whitney profil cytotoxique .....	138
Figure 83 : Expression du CD8 .....	139
Figure 84 : Expression de la Granzyme B.....	140
Figure 85 : Expression de la Tia1.....	141
Figure 86 : Expression de la perforine .....	142
Figure 87 : Test de Mann-Whitney profil immunomodulateur.....	143
Figure 88 : Expression du CD4 .....	144
Figure 89 : Expression du CD25 .....	144
Figure 90 : Expression du FOXP3 .....	145
Figure 91 : Expression de la TGF $\beta$ .....	146
Figure 92 : Test de Mann-Whitney PD-1 microenvironnement .....	146
Figure 93 : Corrélation linéaire PD-1me et FOXP3.....	147
Figure 94 : Expression du PD-1 .....	149
Figure 95 : Expression du PD-L1 .....	150
Figure 96 : Expression du BCL2.....	152
Figure 97 : Expression du c-MYC .....	153
Figure 98 : Expression du Ki67.....	153
Figure 99 : Expression de la P53.....	154
Figure 100 : Résultats de la technique FISH.....	155
Figure 101 : Taux de survie en fonction de la réponse au traitement .....	158
Figure 102 : Taux de survie en fonction de l'expression de CD30 .....	159
Figure 103 : Taux de survie en fonction de l'expression du CD8 .....	160
Figure 104 : Principe de l'hybridation in situ CISH.....	206
Figure 105 : Principe de l'hybridation in situ FISH .....	211
Figure 106 : Arbre décisionnel dans les LBDGC NOS .....	214

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification OMS 2016 des LBDGC, variantes et sous types .....	26
Tableau 2 : Expression des différents marqueurs dans les LBDGC NOS .....	31
Tableau 3 : Différents groupes de Herpes viridae chez l'homme <sup>90,91</sup> .....	40
Tableau 4 : Les protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions.....	44
Tableau 5 : Répartition des LBDGC NOS selon l'âge .....	84
Tableau 6 : Fréquence des patients présentant un LBDGC NOS selon le sexe .....	85
Tableau 7 : Moyenne d'âge selon le sexe des LBDGC NOS.....	86
Tableau 8 : Fréquence des LBDGC NOS selon la localisation.....	86
Tableau 9 : Fréquence des LBDGC NOS selon le sous type moléculaire .....	87
Tableau 10 : Prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS .....	88
Tableau 11 : Moyenne d'âge des LBDGC EBV+ NOS .....	90
Tableau 12 : Répartition des LBDGC EBV+ selon le sexe .....	91
Tableau 13 : Moyenne d'âge selon le sexe .....	91
Tableau 14 : Répartition des LBDGC EBV+ NOS selon la catégorie d'âge .....	92
Tableau 15 : Répartition par catégorie d'âge selon le sexe .....	92
Tableau 16 : Répartition des LBDGC EBV+NOS selon la localisation .....	93
Tableau 17 : Répartition de la localisation des LBDGC EBV+ selon la catégorie d'âge.....	93
Tableau 18 : Répartition des LBDGC EBV+ selon le sous type histologique.....	95
Tableau 19 : Répartition du sous type histologique, selon la catégorie d'âge .....	95
Tableau 20 : Fréquence de la positivité de PAX5 .....	100
Tableau 21 : Fréquence de la positivité de CD79 .....	100
Tableau 22 : Répartition des LBDGC EBV+ NOS selon le sous type moléculaire.....	102
Tableau 23 : % de transcrits EBERs Dans les LBDGC EBV+ .....	103
Tableau 24 : Répartition des LBDGC EBV+ NOS selon le profil de latence II et III.....	106
Tableau 25 : Répartition des latences II et III selon la catégorie d'âge .....	106
Tableau 26 : Caractéristiques démographiques et anatomopathologiques des LBDGC EBV+ .....	110
Tableau 27 : Caractéristiques cliniques des LBDGC EBV+.....	111
Tableau 28 : Fréquence des symptômes B LBDGC EBV+ .....	112
Tableau 29 : Fréquence du stade clinique LBDGC EBV+ .....	112
Tableau 30 : Fréquence de l'IPI LBDGC EBV+ .....	113
Tableau 31 : Taux de réponse au traitement .....	114
Tableau 32 : Taux de survie .....	115
Tableau 33 : Analyse bivariée du profil clinique des LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- .....	117
Tableau 34 : Fréquence du profil de latence par rapport à la réponse au traitement.....	120
Tableau 35 : Analyse de la survie par rapport au profil de latence .....	121
Tableau 36 : Sérologie EBV.....	121
Tableau 37 : % d'expression du CD30 dans les LBDGC EBV+.....	122
Tableau 38 : Fréquence d'expression du CD30 par les LBDGC EBV+.....	122
Tableau 39 : Analyse bivariée de l'expression du CD30.....	123
Tableau 40 : Corrélation bivariée entre l'expression du CD30 et le statut EBV, test de Pearson .....	124
Tableau 41 : Tableau récapitulatif des marqueurs des voies de lymphomagenèse des LBDGC EBV+ .....	126
Tableau 42 : Fréquence d'induction de la voie de signalisation NF-κB P50.....	126

Tableau 43 : Fréquence d'induction de la voie de signalisation NF-κB P65.....	126
Tableau 44 : Analyse bivariée de la voie de signalisation NF-κB .....	127
Tableau 45 : Corrélation bivariée de l'expression du NF-κB et c-MYC .....	129
Tableau 46 : Analyse bivariée de la voie de signalisation JAK-STAT3.....	129
Tableau 47 : Corrélation bivariée de l'expression du STAT3 et IL-6 .....	133
Tableau 48 : Profil d'expression des différents marqueurs du microenvironnement .....	134
Tableau 49 : Fréquence d'expression du PDL-1 dans les LBDGC EBV+ .....	134
Tableau 50 : Fréquence d'expression du PD1 dans les LBDGC EBV+.....	134
Tableau 51 : Analyse bivariée des immune-checkpoints .....	147
Tableau 52 : Corrélation bivariée de l'expression du STAT3 et du PD-L1 .....	148
Tableau 53 : Analyse bivariée des facteurs histopronostiques.....	151
Tableau 54 : Analyse multivariée par régression .....	156
Tableau 55 : Etudes comparatives des différentes prévalences selon les variations géographiques avec cut off d'Eber .....	164
Tableau 56 : Différentes études comparatives des caractéristiques cliniques des LBDGC EBV+ et EBV- .....	172
Tableau 57 : Classification d'Ann Arbor modifiée Classification d'Ann Arbor modifiée. ....	202
Tableau 58 : Echelle d'activité selon l'ECOG .....	202
Tableau 59 : IPI standard .....	202
Tableau 60 : Protocole de déshydratation et inclusion en paraffine des tissus Automate ST404 .....	203
Tableau 61 : Protocole de coloration à l'Hématoxyline-Eosine des coupes histologiques ....	204
Tableau 62 : Principaux anticorps utilisés dans les LBDGC NOS .....	205
Tableau 63 : Protocole de technique d'hybridation in situ EBER sur automate Ventana Benchmark Ultra .....	206
Tableau 64 : Marqueurs du profil de latence.....	207
Tableau 65 : Principaux marqueurs des voies de la lymphomagenèse .....	207
Tableau 66 : Principaux marqueurs du phénotype du microenvironnement tumoral .....	208
Tableau 67 : Marqueurs histopronostiques .....	209
Tableau 68 : CD15 et CD30 .....	209
Tableau 69 : Protocole de technique d'hybridation in situ FISH.....	210
Tableau 70 : Tissus de contrôles négatifs et positifs .....	212

## Abréviations

<b>ABC</b> : Activated B-cell	<b>EBNA2</b> : Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 2
<b>ADN</b> : Acide Desoxyribonucleique	<b>EBV</b> : Virus Epstein-Barr
<b>AP1</b> : Activator Protein 1	<b>FGF</b> : Fibroblast Growth Factor
<b>ARN</b> : Acide Ribonucléique	<b>FISH</b> : hybridation in situ fluorescente
<b>BAFF</b> : B cell Activating Factor	<b>FOXP1</b> : Forkhead box protein P1
<b>BARTs</b> : BamHI A Rightward Transcripts	<b>FOXP3</b> : Forkhead box protein P3
<b>BCL2</b> : B-cell lymphoma 2	<b>GAS</b> : interferon-Gamma Activation Site
<b>BCL6</b> : B-cell lymphoma 6	<b>GC</b> : germinal center
<b>BCR</b> : B-cell receptor signalling	<b>GCB</b> : Germinal-Center B cell-like
<b>BOB-1</b> : B-lymphocyte-specific transcriptional co-activator 1	<b>GCET</b> : Germinal centre B-cell expressed transcript
<b>BTK</b> : Bruton Tyrosine Kinase	<b>GCET1</b> : Germinal centre B-cell expressed transcript 1
<b>BV</b> : Brentuximab vedotin	<b>GEP</b> : profil d'expression génique
<b>CCL-22</b> : C-C motif chemokine 22	<b>HHV-1</b> : Herpès Virus Simplex type 1
<b>CD</b> : Cluster of differentiation	<b>HHV-2</b> : Herpès Virus Simplex type 2
<b>CD10</b> : Cluster of differentiation 10	<b>HHV-4</b> : Human Herpes-Virus 4
<b>CD15</b> : Cluster of differentiation 15	<b>HHV-6</b> : Herpès Virus Humain de type 6
<b>CD19</b> : Cluster of differentiation 19	<b>HHV-7</b> : Herpès Virus Humain de type 7
<b>CD20</b> : Cluster of differentiation 20	<b>HHV-8</b> : Herpès Virus Humain de type 8
<b>CD21</b> : Cluster of differentiation 21	<b>HIS</b> : Hybridation in situ
<b>CD22</b> : Cluster of differentiation 22	<b>HSV</b> : Herpès Simplex Virus
<b>CD3</b> : Cluster of differentiation 3	<b>IDO</b> : indoléamine 2,3-dioxygénase
<b>CD30</b> : Ki1 Tumor necrosis factor	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> : Interféron gamma
<b>CD4</b> : Cluster of Differentiation 4	<b>Ig</b> : Immunoglobuline
<b>CD40</b> : TNF receptor superfamily member 5	<b>IGF</b> : Insuline-like Growth Factor
<b>CD45</b> : Common Leukocyte Antigen	<b>IHC</b> : immunohistochimie
<b>CD5</b> : Cluster of differentiation 5	<b>IL-1</b> : Interleukine 1
<b>CD71</b> : Cluster of Differentiation 71	<b>IL-13</b> : Interleukine13
<b>CD79</b> : Cluster of differentiation 79	<b>IL-17</b> : Interleukin 17
<b>CD8</b> : Cluster of Differentiation 8	<b>IL-2</b> : Interleukine 2
<b>CG</b> : Centre germinatif	<b>IL-4</b> : Interleukine 4
<b>CGH</b> : Comparative Genomic Hybridization	<b>IL-5</b> : Interleukine5
<b>cIAP</b> : cellular Inhibitor of Apoptosis	<b>IL-6</b> : interleukine-6
<b>CMF</b> : Cytométrie en Flux	<b>IPI</b> : Index International Pronostic
<b>CMV</b> : Cytomégalovirus	<b>IR</b> : Répétition interne
<b>c-MYC</b> : c-Myelocytomatosis Oncogene Cellular Homolog	<b>IRF4</b> : Interferon regulatory factor 4
<b>COO</b> : Cell Of Origin	<b>ISRE</b> : Interferon-Stimulated Response Element
<b>CPA</b> : cellules présentatrices d'antigène	<b>IWG</b> : International Working Group
<b>CTLA-4</b> : Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4	<b>JAK</b> : Janus Activated Kinase
<b>EBER</b> : EBV Encoded RNAs	<b>JAK/STAT3</b> : Janus Activated Kinase /Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
<b>EBERs</b> : EBV-Encoded small non polyadenylated RNAs	<b>JNK</b> : kinase c-Jun-N-terminale
<b>EBNA</b> : Epstein-Barr Nuclear Antigen	<b>Ki67</b> : Index de prolifération

**LBDGC** : lymphomes B diffus à grandes cellules  
**LCL** : Lymphoblastoid Cell Lines  
**LDH** : Lactate deshydrogénase  
**LHC** : Lymphome de Hodgkin Classique  
**LMO2**: LIM domain only 2  
**LMP** : Latent Membrane Protein  
**LMP1** : Latent Membrane Protein 1  
**LT** : Lymphocyte T  
**MAPK** : Mitogen Activated Protein Kinase  
**MDSC** : cellules suppressives dérivées des myéloïdes  
**ME** : microenvironnement tumoral  
**MUM1** : Multiple Myeloma Oncogene 1  
**MYD88** : myeloid differentiation primary response 88  
**NF-κB** : Nuclear Factor κB  
**NGC** : Next Generation Sequencing  
**NK** : Natural killer  
**NOS** : Not Otherwise Specified  
**OCT-2** : Octamer-binding transcription factor 2  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**OriLyt** : origine de réplication latente  
**Orip** : Origine de réplication latente  
**P53** : tumor protein 53  
**PAX5** : paired box 5  
**PD-1** : Programmed Death-1  
**PDGF** : Platelet Derived Growth Factor  
**PD-L1** : Programmed Cell Death Ligand 1  
**PD-L2** : Programmed Cell Death Ligand 2  
**PI3K** : phosphatidylinositol 3-kinase  
**PTLD** : syndromes lymphoprolifératifs post-greffe  
**R-ACVBP** : rituximab-adriamycine[hydroxydaunorubicine]-cyclophosphamide-vindésine-bléomycine-prednisone  
**RC** : réponse complète  
**R-CHOP** : rituximab-cyclophosphamide-hydroxydaunorubicine- Oncovin® [vincristine]-prednisone)  
**RG** : réponse globale  
**RHD** : Rel Homology Domain  
**RP** : réponse partielle  
**RT-MLPA** : Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification  
**SG** : survie globale  
**STAT** : Signal Transducers Activators of Transcription  
**STAT3** : Signal Transducer And Activator Of Transcription 3  
**TAM** : macrophages associés aux tumeurs  
**TCR** : T Cell Receptor  
**Th**: T helper  
**Th1**: T helper 1  
**Th17** : T helper 17  
**Th2** : T helper 2  
**Th3** : T helper 3  
**TIL** : lymphocytes infiltrant la tumeur  
**TR** : répartition terminale  
**Treg** : T régulateurs  
**U** : Région unique  
**UL** : Unique Long  
**US** : Unique Short  
**VCA** : Viral Capside Antigen  
**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine  
**VZV** : Herpès Virus Varicellae  
**ZEBRA** : Epstein-Barr Replication Activator

# I INTRODUCTION

Le Virus Epstein-Barr (EBV) a été découvert en 1964, par microscopie électronique dans des lymphomes de Burkitt par Epstein, Achong et Barr<sup>1</sup>. Il est aussi appelé HHV-4 (*Human Herpes-Virus 4*), et appartient à la famille des *Herpes viridae*, à la sous famille des *Gamma herpes virinae* et au genre *Lymphocryptovirus*.

Plus de 90% de la population mondiale est séropositive pour l'EBV. Il est essentiellement transmis par la salive et sa cible privilégiée est le lymphocyte B, mais, il peut aussi infecter les cellules T, NK (Natural Killer) et les cellules épithéliales.

C'est un virus oncogène, reconnu par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à l'origine de plusieurs pathologies lymphoïdes de gravité variable, selon le statut immunitaire du patient ; comme le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les lymphoproliférations T ou B des déficits immunitaires primitifs ou acquis, les lymphoproliférations T EBV+ de l'enfant, le lymphome angioimmunoblastique, le lymphome NK/T de type extra-ganglionnaire de type nasal, le lymphome plasmablastique et le lymphome B diffus à grandes cellules.

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) NOS (Not Otherwise Specified) définis selon la dernière classification révisée de l'OMS 2016 éditée en 2017<sup>2</sup>, représentent un groupe hétérogène sur le plan clinique, morphologique, phénotypique et moléculaire. Le profil d'expression génique (GEP) a permis de les classer en deux sous-groupes moléculaires :

- le type centro-folliculaire (germinal center, GC-like, GCB) dont la signature transcriptionnelle est comparable à celle des cellules B centro-folliculaires (expression de CD10, BCL6, LMO2...)
- les LBDGC de type activé périphérique (activated B-cell, ABC-like) dont la signature est comparable à celle des lymphocytes B activés périphériques (expression de MUM1/IRF4, Cycline D2, FOXP1, ...)<sup>3</sup>.

Cette distinction moléculaire en deux types GCB et ABC peut être réalisée par technique d'immunohistochimie (IHC), selon l'algorithme de Hans<sup>4</sup>, en utilisant les anticorps CD10, BCL6 et MUM1. Cet algorithme est le plus communément utilisé en pratique et a démontré un taux de concordance de 71% ainsi qu'une meilleure valeur prédictive par rapport à la GEP<sup>4,5</sup>. Il a été établi que les types GCB sont de meilleur pronostic<sup>4,6,7</sup>

Dans cette classification révisée, la plupart des modifications moléculaires, cytogénétiques et phénotypiques ont mis l'accent sur « la cellule d'origine » (COO/ Cell Of Origin) : cellule normale dont serait dérivée la tumeur. La précision de la cellule d'origine (GCB ou ABC) dans les LBDGC NOS, passe du statut « optionnel » à « requis »<sup>2,8</sup>.

Le LBDGC EBV+ NOS, est une entité clinico-pathologique reconnue dans la 4<sup>ème</sup> édition de la classification révisée 2016 de l'OMS<sup>9</sup>. Il a été décrit pour la première fois par Oyama et al, chez des adultes de plus de 50 ans, sans déficit immunitaire et sans antécédent de lymphome<sup>10</sup>. Il a été introduit dans la classification OMS 2008<sup>11</sup> comme entité provisoire sous le terme de LBDGC EBV+ du sujet âgé. Les patients avaient un tableau clinique défavorable, un stade avancé, une localisation extra-ganglionnaire plus fréquente, un Index

International Pronostic (IPI) élevé, et des symptômes B plus fréquents par rapport aux patients avec un LBDGC EBV<sup>-10</sup>.

Les dernières publications avant la révision de la classification OMS des lymphomes, ont démontré que l'âge n'est pas un critère majeur dans les LBDGC EBV+ chez les sujets immunocompétents. Celui-ci peut survenir à n'importe quel âge, même chez l'enfant<sup>12-14</sup> : d'où la définition de l'entité LBDGC EBV + NOS dans cette dernière révision de la classification<sup>2,13,15</sup>. Il a été également démontré, que le pronostic et la réponse thérapeutique sont meilleurs chez les sujets jeunes. Les sujets de plus de 50 ans, ont une survie plus courte après un traitement conventionnel par R-CHOP (rituximab-cyclophosphamide-hydroxydaunorubicine- Oncovin® [vincristine]-prednisone)<sup>12,16</sup>.

L'EBV est endémique au Maghreb, mais, à l'heure actuelle aucune étude sur la prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS n'a été réalisée. De petites études et des séries de cas ont donné des résultats disparates. La prévalence varie de 5% dans les pays développés<sup>17</sup> à 10% et 15% dans les séries Asiatiques et Sud Américaines<sup>13,14,18,19</sup>.

Le rôle du virus EBV dans la lymphomagenèse des LBDGC est considéré comme capital. Les aspects morphologiques (nécrose fréquente, pléomorphisme de la population cellulaire avec cellules à différenciation plasmocytaire) et phénotypiques (présence d'assez nombreuses cellules lymphoïdes T réactionnelles cytotoxiques de taille moyenne à grande dans le stroma) les rapprochent des lymphoproliférations EBV sur le plan histopathologique, phénotypique et nosologique<sup>15,16</sup>.

Ce polymorphisme histologique, avec un continuum allant d'une prolifération polymorphe à une prolifération diffuse de grandes cellules, représente un challenge pour le pathologiste. Les LBDGC EBV+, présentent de nombreux diagnostics différentiels ; hormis les lymphoproliférations bénignes liées à l'EBV, la distinction d'un Lymphome de Hodgkin peut être particulièrement problématique, ainsi que les lymphoproliférations liées à l'EBV tel que le lymphome plasmablastique, et la granulomatose lymphomatoïde. Il est donc nécessaire d'intégrer les données cliniques, et d'interpréter le profil immunohistochimique dans son contexte<sup>20,21</sup>.

Sur le plan immunohistochimique, les cellules du LBDGC EBV+ sont de phénotype B, elles expriment le CD20, CD19, CD22, PAX5, BOB-1 et OCT-2. Cependant, il y'a perte d'expression du CD79a et PAX5<sup>2,20</sup>. L'expression de CD30 varie selon les séries, elle est de 50% à 100%<sup>15,20,22</sup>. Le CD15 est généralement négatif. La plupart des LBDGC EBV + sont de phénotype ABC<sup>2,13-15,18</sup>. L'expression de la protéine de latence LMP1 (Latent Membrane Protein 1) est positive dans la plupart des cas. La recherche de transcrits EBVs (EBV-ENCODED RNA) dans les cellules tumorales est plus spécifique et la technique gold standard est l'hybridation in situ (HIS)<sup>10</sup>. Cependant le cut off de l'EBVs n'a toujours pas été établi.

Parmi les facteurs histopronostiques, les LBDGC EBV+ ont un index de prolifération Ki67 élevé, une forte expression de P53, c-MYC et BCL2<sup>23,24</sup>. Dans les LBDGC EBV+ du sujet âgé ; la sénescence du système immunitaire lors du processus de vieillissement jouerait un rôle majeur dans la lymphomagenèse<sup>17,25</sup>. Plusieurs mécanismes de lymphomagenèse dus à EBV ont été décrits.

Dans la plupart des LBDGC EBV+, il existe une activation de la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor  $\kappa$ B) et JAK/STAT3 (Janus Activated Kinase/Signal Transducer And Activator Of Transcription 3), principalement dues à LMP1<sup>26,27</sup>.

LMP1 intervient dans différentes fonctions cellulaires par l'intermédiaire de l'activation des complexes NF- $\kappa$ B induisant le processus de transformation, en favorisant la protection contre l'apoptose, la prolifération, l'inflammation et l'instabilité génétique. Dans les proliférations lymphoïdes liées à l'EBV, après l'infection de la cellule B, l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) du virus EBV se circularise et persiste à l'état épisomal dans le noyau des cellules infectées<sup>26</sup>. Episodiquement, le virus peut aussi entrer en cycle lytique et produire ainsi de nouveaux virions, causant la mort de la cellule infectée et le relargage de particules virales. Lors de l'infection latente, seuls quelques gènes viraux, appelés gènes de latence, sont transcrits :

- les protéines EBNA (Epstein-Barr virus Nuclear Antigen),
- les protéines LMP (Latent Membrane Protein),
- les ARN (Acide Ribonucléique) EBERs (EBV-Encoded small non polyadenylated RNAs) et
- les BARTs (BamHI A Rightward Transcripts).

On distingue quatre types de latence (0, I, II et III), en fonction de l'expression de ces gènes, qui sont typiquement retrouvés dans certaines pathologies malignes associées à l'EBV<sup>28</sup>.

Les LBDGC EBV+ expriment LMP1 et l'antigène nucléaire 2 (EBNA2) et une latence de type II ou III<sup>18,21,29,30</sup>. L'activation de la voie NF- $\kappa$ B se fait essentiellement sur la voie classique (canonique) p50 (induite par activation d'un certain nombre de récepteurs comme ceux des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  (tumor Necrosis Factor Alpha) et IL1 (Interleukine 1). De plus, la protéine LMP1, imite le récepteur CD40, ce qui va induire une activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B / IRF4<sup>31</sup>, conduisant à une régulation négative du BCL6. Ceci explique le phénotype prédominant non GC, ABC présenté par ces lymphomes. LMP1 stimule également les voies MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), JNK (Akt et les voies kinase c-Jun-N-terminale (JNK) / AP1 (Activator Protein1) et c-MYC (c-Myelocytomatosis Oncogene Cellular Homolog)<sup>32,33</sup>. L'activation de toutes ces voies favorisera la prolifération et la survie cellulaire.

Sur le plan cytogénétique, les études par technique FISH (hybridation in situ fluorescente) utilisant les sondes c-MYC, BCL2, BCL6 et IgH (Immunoglobulin Heavy) ont montré essentiellement des gains, et un réarrangement du gène BCL6. Il existe également, un réarrangement des gènes des immunoglobulines (Ig) dans 60% des cas et un réarrangement du récepteur TCR (récepteur T, T Cell Receptor) dans 30% des cas<sup>29,34</sup>.

Dans les LBDGC EBV+, le microenvironnement tumoral (ME) est composé à 30% de cellules stromales, de facteurs solubles, de cellules T cytotoxiques, et d'autres cellules du tissu lymphoïde qui régulent en permanence le développement et la prolifération des cellules B. Ces cellules sont impliquées dans la résistance au traitement. Il a été également démontré que LMP1 régulait l'expression de PD-L1 (Programmed Cell Death Ligand 1) par les voies STAT3, AP-1 et NF- $\kappa$ B, au niveau des cellules tumorales et dans le ME des cellules

histiocytaires/dendritiques<sup>35-39</sup>. Ce ME tolérogène a été bien établi, mais, on en sait peu sur les caractéristiques immunomodulatrices induites par le virus EBV.

Les progrès dans la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la lymphomagenèse du LBDGC EBV+ ont permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui sont en cours d'évaluation suggérant de nouvelles possibilités d'améliorer le pronostic de ces patients<sup>29</sup>. A titre d'exemple, nous citerons les thérapies ciblant l'EBV, le ME (immunothérapie) et celles dirigées contre la voie NF-κB, et anti CD30<sup>31,40,41</sup>.

## **OBJECTIFS**

### **1. Principal objectif:**

Estimer la prévalence et le rôle de l'EBV dans la lymphomagenèse et le microenvironnement tumoral des LBDGC NOS de novo. Cette détermination se fera par l'étude :

- de la voie NF-κB par l'Anticorps NF-κB p50, et la voie JAK/STAT3 par l'Anticorps STAT3 thyr 705.
- du phénotype du microenvironnement des cellules tumorales.

La recherche de l'EBV se fera par technique d'hybridation in situ.

### **2. Objectifs secondaires :**

- Classer les LBDGC selon la COO, en sous-groupe GCB, et ABC selon les recommandations OMS 2016 par l'algorithme de Hans en utilisant les anticorps CD10, Bcl6 et MUM1
- Définir le sous type histologique, monomorphe ou polymorphe et établir les principaux diagnostics différentiels en s'aidant de l'immunohistochimie.
- Etablir un Cut off de l'EBERs.
- Corréler l'expression du CD30 avec l'EBER et la courbe de survie.
- Etudier les facteurs histopronostiques Ki67, P53, BCL2 et c MYC liés à ce type de lymphome et leur corrélation avec le stade clinique et la survie.
- Définir les aspects anatomo-cliniques des LBDGC EBV+ : âge de survenue, sexe, symptomatologie clinique B, siège ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, IPI, stade clinique, réponse thérapeutique, et survie.

## **II DONNEES RECENTES DE LA LITTERATURE**

## II.1 Lymphome B diffus à grandes cellules NOS

### II.1.1 Définition/ généralités

Les LBDGC représentent la variété la plus fréquente des lymphomes de l'adulte, soit près de 30% à 40 % des lymphomes B non hodgkiniens, dans le monde <sup>2,42</sup>. Ils sont définis par l'OMS par deux critères histopathologiques : d'une part, l'architecture diffuse de la population tumorale et d'autre part la grande taille des cellules tumorales qui sont des cellules lymphoïdes B mûres. Le critère à grandes cellules B repose sur la taille du noyau cellulaire, supérieure ou égale au noyau de l'histiocyte ou supérieur à deux fois la taille du lymphocyte normal<sup>2</sup>. Ils sont dits de « novo » lorsqu'ils sont diagnostiqués sans antécédent connu de lymphome ou d'association à un lymphome.

Le LBDGC NOS est le sous type le plus fréquent, représente 80 % à 85% des LBDGC. C'est un groupe hétérogène sur le plan clinique, génétique, réponse thérapeutique et pronostic. Les données du GEP, du séquençage par NGC (Next Generation Sequencing), les anomalies chromosomiques, les voies de signalisation et les réponses au traitement ont permis de les classer en deux sous-groupes moléculaires :

- le type centro-folliculaire (germinal center, GC-like, GCB)
- les LBDGC de type activé périphérique (activated B-cell, ABC-like)<sup>3</sup>.

Cependant, 10 % à 15% des LBDGC NOS restent inclassables par les données du transcriptome et le NGS. Ils peuvent être classés selon leur phénotype centro-germinatif (GC) ou non (non GC, ABC) par technique IHC, d'après l'algorithme de Hans, défini à partir de l'expression différentielle de CD10, BCL6, MUM-1<sup>4</sup>.

### II.1.2 Classification OMS 2016 des LBDGC

Dans cette quatrième édition révisée de l'OMS<sup>2,9</sup>, on note peu de changements dans la classification des LBDGC par rapport à 2008 (**Tableau 1**). Les modifications suivantes ont été faites :

- La précision de la cellule d'origine (GCB ou ABC) dans les LBDGC NOS, passe du statut « optionnel » à « requis ».

-L'expression de CD5 semble avoir une valeur pronostique et doit être évaluée.

-Le phénotype double expresseur MYC+ et BCL2+ détecté par IHC doit être isolé et a une valeur pronostique.

-Le lymphome inclassable entre un LBDGC et un lymphome de Burkitt, entité provisoire de la classification OMS 2008 a été supprimée et remplacée par deux nouvelles entités :

1. Lymphome B de haut grade avec réarrangement de MYC et BCL2 et /ou BCL6 (appelé double hit ou triple hit)
2. Lymphome de haut grade NOS, lorsqu'il n'y a pas de réarrangement de MYC et BCL2 et ou/ BCL6, et si la cytologie est intermédiaire entre Burkitt et LBDGC.

Tableau 1 : Classification OMS 2016 des LBDGC, variantes et sous types

*LBDGC NOS*

- Variantes morphologiques :
  - **Centroblastique**
  - **Immunoblastique**
  - **Anaplasique**
  - **Autres variantes**
- Sous type moléculaires
  - **de type B du Centre Germinatif \***
  - **de type Activé B \***

*Sous types de LBDGC*

- **LBDGC riche en lymphocytes T/histiocytes**
- **LBDGC primitif du système nerveux central**
- **LBDGC primitif cutané, de type jambe**
- **LBDGC EBV+, NOS \***

*Autres lymphomes à grandes cellules B*

- **LBDGC associé à une inflammation chronique**
- **Granulomatose lymphomatoïde**
- **Lymphome médiastinal (thymique) primitif à grandes cellules B**
- **Lymphome à grandes cellules B intravasculaire**
- **Lymphome à grandes cellules B, ALK+**
- **Lymphome plasmablastique**
- **Lymphome des séreuses**
- **LBDGC HHV8+, sans autre spécificité**

*Lymphomes B de haut grade*

**Lymphome B de haut grade, avec réarrangement de *MYC* et *BCL2* et/ou *BCL6* \***

**Lymphome B de haut grade, NOS \***

*Lymphome B inclassable*

**Lymphome B inclassable, avec des aspects intermédiaires entre un DLBCL et un lymphome de Hodgkin classique**

### II.1.3 Présentation clinique

Le LBDGC est plus fréquent chez les sujets âgés avec une médiane d'âge de 70 ans ; il peut aussi survenir chez l'adulte jeune et rarement l'enfant. Il existe une légère prédominance masculine. Cliniquement, la plupart des patients présentent un syndrome tumoral périphérique ganglionnaire, touchant un ou plusieurs ganglions et une atteinte extra-ganglionnaire dans 40% des cas<sup>9,42</sup>. Dans un tiers des cas, les patients présentent des symptômes de type B (fièvre, amaigrissement et sueurs nocturnes), et certains présentent une symptomatologie liée à l'organe atteint. Le sérum lactate déshydrogénase (LDH) et la beta-2- microglobuline sont souvent augmentés. Approximativement, la moitié des patients est diagnostiquée au stade I-II et l'autre moitié, au stade III-IV. La fréquence de l'atteinte de la moelle osseuse est d'environ 10 à 20 %<sup>43</sup>.

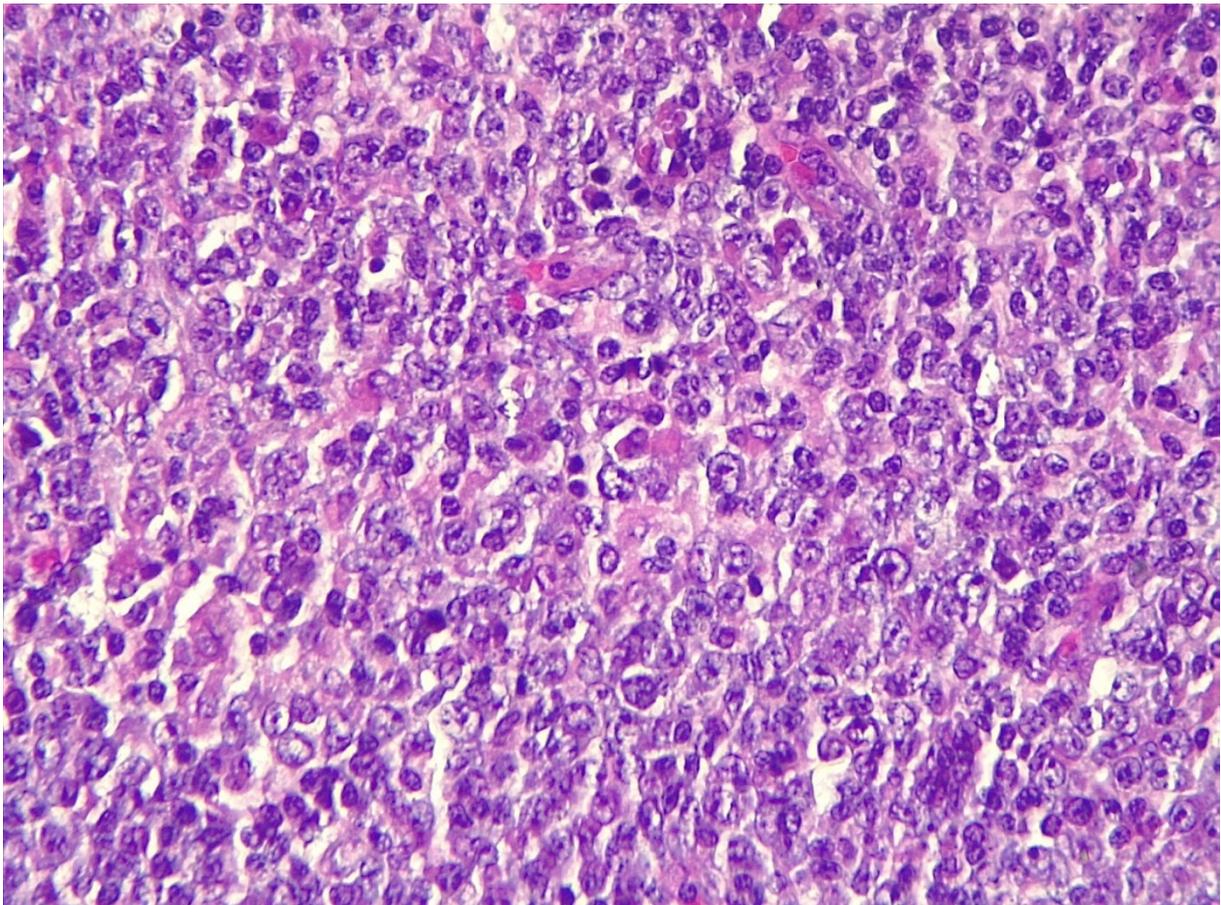
#### II.1.4 Morphologie

L'architecture ganglionnaire, ou extra ganglionnaire du tissu atteint est partiellement ou totalement effacée par une prolifération lymphoïde de grandes cellules agencées en nappes diffuses<sup>44</sup>. De la fibrose peut être notée ainsi que des plages de nécrose géographique. L'index mitotique est élevé, ainsi que les figures apoptotiques. Dans 10% des cas, un aspect en ciel étoilé est observé. De petits lymphocytes T et d'histiocytes réactionnels sont notés en nombre variable dans la plupart des LBDGC NOS.

De nombreuses variantes cytologiques ont été décrites dont les plus communes sont :

##### II.1.4.1 Variante centroblastique

C'est la plus fréquente des variantes morphologiques, elle représente 80% de tous les LBDGC, NOS. Les centroblastes sont des cellules de grande taille, au cytoplasme modéré. Le noyau est arrondi, vésiculeux, à chromatine fine, contenant deux ou trois nucléoles accolés à la membrane nucléaire. Cette variante peut également montrer un spectre de cellules monomorphes composées principalement de centroblastes (> 90%), ou polymorphes présentant un mélange de centroblastes (<90%), de centrocytes et d'immunoblastes (**Figure 1**).

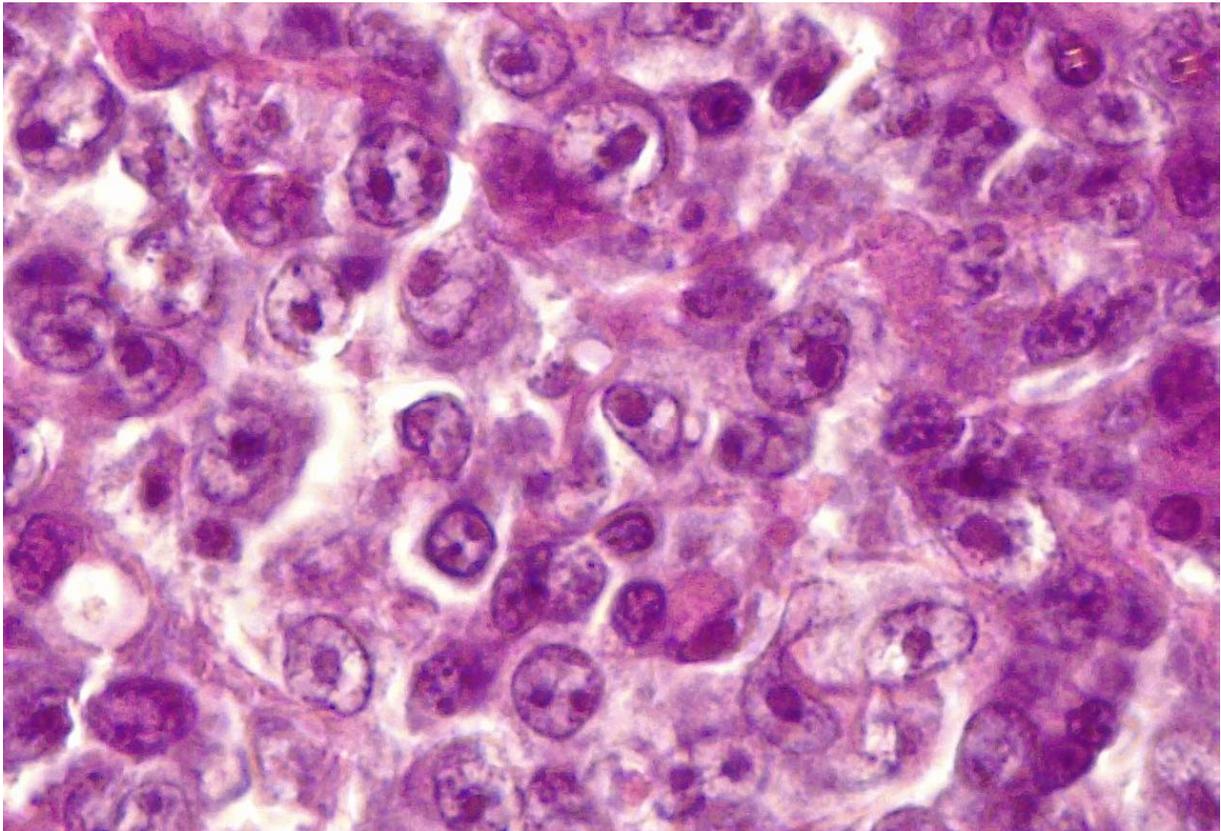


*Microphotographie Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 1 : LBDGC variante centroblastique**

#### II.1.4.2 Variante Immunoblastique

Elle représente 8-10% des LBDGC NOS. Elle est définie par la présence de plus de 90% d'immunoblastes. Les immunoblastes sont des cellules de grande taille, au noyau arrondi, avec un seul nucléole central proéminent. Leur cytoplasme est assez abondant, basophile. Une différenciation plasmocytoïde peut se voir dans certains cas et doit être différenciée d'un lymphome plasmablastique et d'un myélome plasmocytaire par les données cliniques et immunophénotypiques <sup>9</sup> (**Figure 2**).

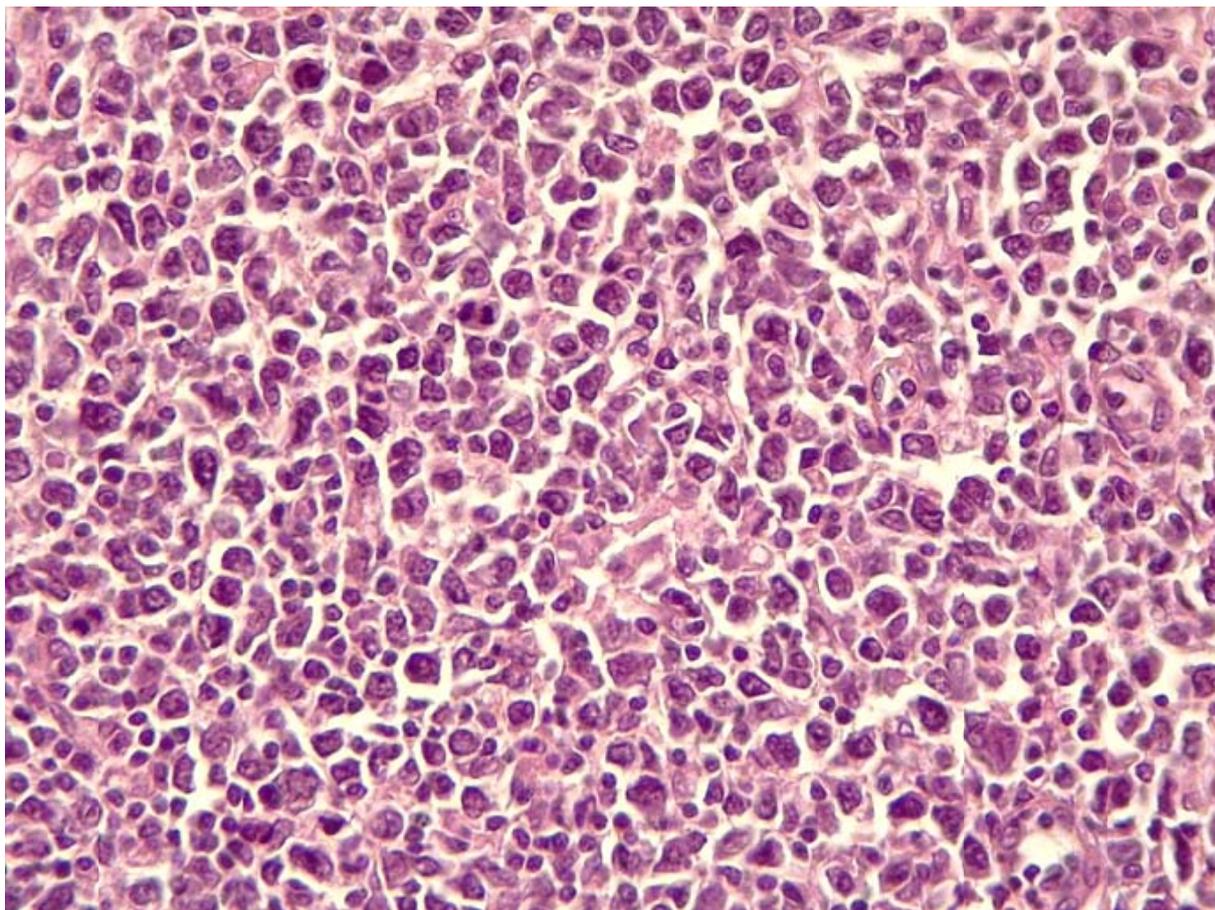


*Microphotographie Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 2 : LBDGC variante immunoblastique**

#### II.1.4.3 Variante anaplasique

Cette variante morphologique est rare, et représente 3% de tous les LBDGC NOS. Elle est caractérisée par des cellules de grande taille, pléomorphes, ou à noyau bizarre. Elles peuvent avoir un aspect Hodgkin et Reed Sternberg-like et anaplasique like. Une topographie intra-sinusale est notée (**Figure 3**).



*Microphotographie Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 3 : LBDGC variante anaplasique**

#### II.1.4.4 Autres variantes rares

Les aspects cytologiques peuvent varier, allant de petits centroblastes à des cellules en bague à chaton, ou des cellules fusiformes. Des granules ou des projections cytoplasmiques peuvent se voir ainsi que des jonctions inter-cellulaires en microscopie électronique. Un abondant stroma myxoïde ou une matrice fibrillaire, ainsi que des pseudo-rosettes sont observés dans de rares cas.

#### II.1.5 Immunophénotype :

Les LBDGC NOS, expriment habituellement le CD45 et les marqueurs B : CD20, CD19 et CD22 ainsi que les facteurs de transcription B, PAX5, BOB-1 et OCT-2<sup>44,45</sup> (**Tableau 2**). Ils expriment dans 50-70% des cas une Ig de surface ou cytoplasmique, généralement une IgM, suivie de IgG et IgA. Cependant, dans un tiers des cas, il existe une perte d'expression d'un ou plusieurs de ces marqueurs B.

En plus de l'immunophénotype B pour le diagnostic de ces lymphomes, l'IHC joue un rôle dans la prédiction à la réponse thérapeutique et donc au pronostic. L'expression du CD20, est une indication au Rituximab (anti-CD20) associé à la chimiothérapie. D'autres thérapies ciblées anti-CD19 et anti-CD22 sont aussi disponibles<sup>8</sup>. L'expression de CD10, BCL6 et du MUM1/IRF4, FOXP1, GCET1 et LMO2 varie<sup>2</sup>. Le CD10 est positif dans 30-50% des cas, le BCL6 dans 60-90% et le MUM1/IRF4 dans 35-65%. L'expression de FOXP1 a été rapportée

dans 20% des LBDGC-GC.

Le GCET1, marqueur du centre germinatif est exprimé dans 40-50%, il est corrélé avec le sous type LBDGC-GC. L'expression de LMO2 est retrouvée dans 45% des LBDGC et est corrélée avec les marqueurs du CG (centre germinatif) : CD10, BCL6, et HGAL, mais pas avec MUM1/IRF4 ou BCL2. L'expression de BCL2 varie de 47-84% selon les séries. Cette variation dépend de l'anticorps utilisé en routine<sup>46</sup>.

Dans le sous type LBDGC-GC, son expression est corrélée à la présence de la translocation t(14 ; 18) (q32 ; q 21.3)<sup>34</sup>. Cependant, son expression est plus fréquente dans le sous groupe LBDGC-ABC, résultant de nombreux gains de copies et d'une régulation de la transcription<sup>2,34</sup>.

Environ 10-15% des LBDGC sont positifs au CD30<sup>47</sup>. Dans la majorité des études, l'expression de CD30 dans les LBDGC est corrélée à une meilleure survie par rapport aux LBDGC n'exprimant pas le CD30<sup>47</sup>. Les données du GEP ont montré que les LBDGC CD30+, ont une signature caractérisée par une dysrégulation de la voie NF-κB, du BCR (B-cell receptor signalling) et de la prolifération<sup>47</sup>. Un autre facteur expliquant le meilleur pronostic de ces patients exprimant le CD30 est le réarrangement de MYC dans ces LBDGC CD30+<sup>48,49</sup>.

Dans la classification révisée de l'OMS 2016, il est suggéré de réaliser le CD30 en routine devant toute suspicion d'un LBDGC<sup>2</sup>. Le CD30 représente également une cible thérapeutique dans les LBDGC résistants au traitement standard. Dans environ 20 à 25 % des cas, l'expression de PD-L1 et PD-L2 (Programmed Cell Death Ligand 2) dans les LBDGC NOS est corrélée à une amplification PD-L1/L2 au chromosome 9p24.1 et à une réponse aux inhibiteurs de PD1 (Programmed Death-1)<sup>50</sup>.

Le phénotype double expresseur MYC+ et BCL2+ doit être isolé dans la mesure où de nombreuses études, mais pas toutes, suggèrent son importance pronostique<sup>51</sup>. L'expression de MYC est observée dans 30 à 50% des cas et est concomitante avec BCL2 dans 20 à 35% des cas<sup>2,51</sup>. Le seuil pour MYC est de à 40% et 50% pour le BCL2<sup>2</sup>. Le CD5 est exprimé dans 5 à 10% des cas<sup>52,53</sup>. Les LBDGC CD5+ de novo, sont associés à un pronostic péjoratif comparé aux LBDGC CD5-<sup>2</sup>. Fait important, les LBDGC CD5+ doivent être distingués d'une transformation en grandes cellules d'un lymphome lymphocytaire B/LLC-B (syndrome de Richter) et d'un lymphome à cellules du manteau en particulier la variante blastoïde.

Pour toutes ces raisons, la classification OMS, recommande d'évaluer l'expression de CD5 devant tout nouveau cas de LBDGC<sup>2</sup>.

L'index de prolifération Ki67 est élevé, souvent supérieur à 40%, mais peut être supérieur à 90% dans certains cas<sup>54</sup>. Le BCL2 et le Ki67 sont également des marqueurs pronostiques dans les LBDGC NOS, leur co-expression constitue un groupe de faible survie dans le sous type LBDGC-GC<sup>55</sup>. L'expression du gène suppresseur des tumeurs P53 est retrouvée dans 20-60% des LBDGC ; elle est corrélée au profil mutationnel. Quand l'expression est intense et supérieure à 50%, elle est corrélée à un mauvais pronostic<sup>24</sup>.

*Tableau 2 : Expression des différents marqueurs dans les LBDGC NOS*

Marqueur	Fonction	Fréquence	Rôle
<b>CD19</b>	Régulateur crucial dans le développement, l'activation et la différenciation des lymphocytes B	Souvent	Diagnostic/thérapeutique
<b>CD20</b>	Activation et différenciation des lymphocytes B	Souvent	Diagnostic/thérapeutique
<b>CD22</b>	Différenciation des lymphocytes B	Souvent	Diagnostic/thérapeutique
<b>CD79a/CD79b</b>	Récepteur d'antigènes des lymphocytes B	Souvent	Diagnostic
<b>PAX5</b>	Facteur de transcription B	Souvent	Diagnostic
<b>sIg ou cyto Ig</b>	Immunoglobuline	50-75%, IgM++	Diagnostic
<b>CD5</b>	Membre de la famille des récepteurs, exprimé par les cellules T et un sous groupe de cellules B naïves	5-10%	Pronostic
<b>CD30</b>	Tumor necrosis factor TNF	5-10%	Pronostic, thérapeutique
<b>CD10</b>	Endopeptidase membranaire, exprimé dans le CG des follicules lymphoïdes secondaires	30-60%	Phénotype GC Vs ABC
<b>BCL6</b>	Protéine à doigt de zinc, exprimée dans le CG des follicules lymphoïdes secondaires et une population de lymphocytes CD4+ du CG et des zones inter-folliculaires	60-90%	Phénotype GC Vs ABC
<b>MUM1/IRF4</b>	Facteur de transcription d'IRF4, exprimé au stade final de la différenciation B	35-65%	Phénotype GC Vs ABC
<b>Ki67</b>	Index de prolifération	Expression variable > à 40%	Marqueur de prolifération
<b>MYC</b>	Proto-oncogène jouant un rôle important dans la régulation cellulaire B et la régulation de l'apoptose	20-40%	Co expression avec BCL2
<b>BCL2</b>	Protéine anti-apoptotique	Souvent	Pronostic, thérapeutique
<b>P53</b>	Gène suppresseur des tumeurs	Variable dépendant du cut off	Pronostic

## II.1.6 Classification des LBDGC NOS selon la cellule d'origine « COO »

### II.1.6.1 Classification moléculaire des LBDGC NOS par la GEP

Alizadeh et al, ont été les premiers à appliquer la GEP afin d'étudier le profil moléculaire des LBDGC<sup>56</sup>. Les études d'expression génique ont mis en évidence deux principaux profils sous moléculaires selon la COO, dans les LBDGC NOS :

- les profils GCB dont la signature transcriptionnelle est comparable à celle des cellules B centro-folliculaires (expression de CD10, BCL6, LMO2...) 40-50%,
- les profils ABC dont la signature est comparable à celle des lymphocytes B activés périphériques (expression de MUM-1/IRF4, Cycline D2, FOXP1..), 50-60%.

Toutefois, 15 à 30 % des LBDGC restent inclassables. Le sous groupe GCB a meilleur pronostic que le sous groupe ABC, traité par R-CHOP<sup>57</sup>. Il existe d'autres études utilisant la GEP<sup>58</sup>.

La GEP est considérée comme le «gold standard» pour la classification des LBDGC selon la COO, et comme une valeur prédictive pour le pronostic. Cependant, une étude récente a soulevé des doutes sur la valeur pronostique de la COO<sup>59</sup>.

### II.1.6.2 Classification immunophénotypique des LBDGC NOS par étude IHC

Les méthodes GEP traditionnelles n'étaient pas pratiques pour le diagnostic quotidien pour une multitude de raisons, y compris qu'elles ne conviennent pas aux tissus fixés au formol et inclus en paraffine. La classification selon la COO par IHC est considérée comme acceptable dans la mesure où les classifications moléculaires ne sont pas accessibles à tous les laboratoires.

L'algorithme de Hans (**Figure 4**) est le plus communément utilisé en pratique et a démontré un taux de concordance de 71% ainsi qu'une meilleure valeur prédictive par rapport à la GEP<sup>4,5</sup>. Il a été établi que les types GCB sont de meilleur pronostic<sup>4,6,7</sup>. Cet algorithme utilise l'expression de 3 marqueurs CD10, BCL6, et MUM1/IRF1, pour les classer en sous type GCB et ABC, avec un cut off de 30 % pour chaque marqueur.

D'autres algorithmes ont été développés dont Choi<sup>60</sup> et Visco<sup>61</sup>, utilisant en plus des 3 marqueurs que ceux de Hans, des marqueurs spécifiques aux cellules du CG comme GCET et LMO2 ou spécifiques des cellules post germinatives comme FOXP1 et BCL2.

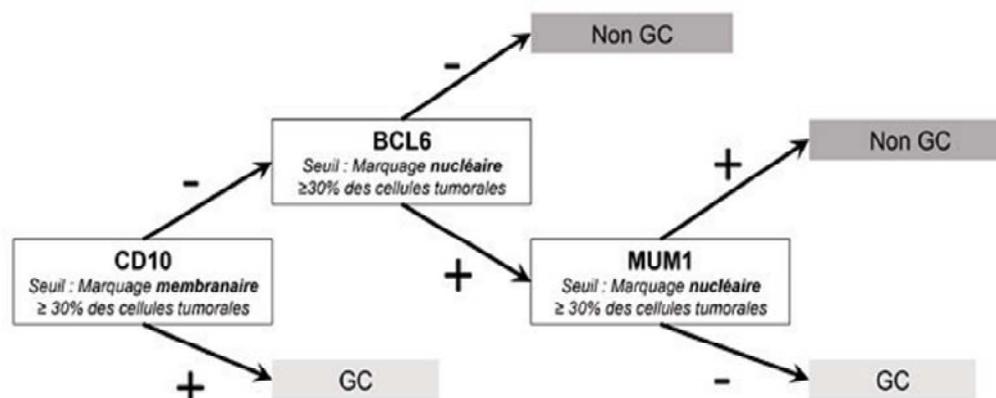


Figure 4 : Algorithme de Hans<sup>4</sup>

### II.1.7 Lymphomagenèse

L'IHC, la FISH sur coupes tissulaires, le profil d'expression de gènes ciblés (par Reverse Transcriptase-Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, RT-MLPA, ou NanoString) ou non (transcriptome), l'hybridation génomique comparative (Comparative Genomic Hybridization, CGH) et le séquençage d'ADN à haut débit NGS, permettent aujourd'hui de mieux préciser ces sous-groupes de LBDGC NOS ainsi que les principales voies oncogéniques impliquées pour un patient donné, avec pour perspective dans un futur proche, de proposer une thérapeutique ciblée et spécifique. Prendre en compte cette hétérogénéité dans l'approche diagnostique et thérapeutique et, évaluer son bénéfice par rapport aux approches thérapeutiques classiques constituent l'enjeu de ces prochaines années. Les LBDGC présentent un haut degré de complexité génomique identifié par CGH et NGS et ont 50 à 100 lésions par cas, avec une grande variabilité selon les patients. Ces anomalies sont des mutations ponctuelles, des amplifications ou des délétions de gènes et des translocations chromosomiques. Certaines anomalies sont observées dans plusieurs sous-types de profil d'expression génique alors que d'autres sont spécifiques (**Figure 5**).

Les grandes voies oncogéniques impliquées sont l'échappement immunitaire, les modifications de la chromatine/histones, la dérégulation du répresseur oncogénique BCL6, de la prolifération ou de l'apoptose, l'activation constitutive du BCR et de la voie NF- $\kappa$ B<sup>62,63</sup> (**Figure 6**). Il y a trois translocations majeures qui se produisent dans les LBDGC.

- La plus fréquente, observée dans environ 30% des cas, implique BCL6 au locus du chromosome 3q27<sup>46,64</sup>. BCL6 est le plus souvent juxtaposé avec IgH sur le chromosome 14q32, avec beaucoup de locus partenaires potentiels.
- La translocation t(14; 18) (q21; q32) / IgH-BCL2 est observée dans 20 à 30% des LBDGC<sup>46</sup>.
- Les translocations impliquant MYC au locus 8q24 aussi surviennent dans 10 à 15% des LBDGC et sont souvent associées à des caractéristiques morphologiques de haut grade et à un caryotype complexe.

D'autres translocations peu communes ont été également rapportées dans les LBDGC. En pratique courante, les tissus frais pour la cytogénétique conventionnelle ne sont pas souvent disponibles. À la place, la FISH peut être utilisée pour évaluer les réarrangements de BCL6, BCL2 et MYC dans des tissus fixés et inclus en paraffine. L'inconvénient de la FISH en général, est que ces tests sont très concentrés et le reste du profil cytogénétique ne peut pas être évalué. Le réarrangement du gène IgH est retrouvé dans pratiquement tous les cas de LBDGC. Les mutations somatiques aussi sont détectées dans plusieurs autres gènes, tels que MYC et PAX5, et sont observées dans plus de 50% des LBDGC<sup>62</sup>.

#### II.1.7.1 Les LBDGC-GC

Le profil GCB ressemble à celui des cellules B du centre germinatif et présente des hypermutations somatiques des gènes codants pour les Ig avec mutations en cours (ongoing) surexprimés dans LBDGC-GC<sup>65</sup>.

BCL6 est un répresseur transcriptionnel qui favorise la prolifération des cellules B dans le centre germinatif en modulant la transcription des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération, de l'activation, de la stimulation du BCR et qui conduit à la

phosphorylation de BCL6 par une MAP-kinase, favorisant sa dégradation par le protéasome. L'acétylation de BCL6, induite par l'histone acétyl-transférase P300, inhibe la fonction autorégulatrice de la transcription.

La répression transcriptionnelle induite par la surexpression de BCL6 est plus nette dans les LBDGC-GC que dans les LBDGC-ABC. Ces données suggèrent que la répression des transcrits induits par BCL6 dépend du contexte cellulaire et peut-être également du ME et de sa capacité à activer la voie NF- $\kappa$ B.

Enfin, les gènes partenaires « non immunoglobuline » de la translocation impliquant BCL6 sont souvent surexprimés, comme IL21R, CD71, et peuvent contribuer à la lymphomagenèse. Le rôle important de BCL6 dans celle-ci est confirmé par le développement d'un lymphome dont la morphologie est similaire à celle des LBDGC dans un modèle murin knockin pour la translocation IgH-BCL6. Ces souris développent vers 13 mois un lymphome B mature ressemblant dans 75 % des cas à un LBDGC<sup>66</sup>. De plus, des coopérations entre le réarrangement de BCL6 et des mutations/délétions de TRAF3 régulant la voie alterne de NF- $\kappa$ B semblent faciliter le développement et la croissance des LBDGC d'après des données obtenues dans des modèles animaux. Des mutations tronquées de TNFRSF14 et de GNA13 (protéine G impliquée dans la signalisation des Rho GTPases) sont constatées dans les LBDGC-GC<sup>63</sup>.

#### II.1.7.2 Les LBDGC –ABC

Le profil ABC est celui correspondant à des lymphocytes B activés via leur BCR, induisant une différenciation plasmoblastique MUM1/IRF4+. Les voies de signalisation de BCR et NF- $\kappa$ B sont particulièrement impliquées et le programme spécifique du CG est réprimé. La différenciation plasmoblastique anormale est liée notamment à la dérégulation de BCL6 et à l'inactivation de BLIMP1/PRDM1. Il n'y a pas d'hypermutation somatique en cours (ongoing) des gènes d'immunoglobulines. L'activation de la voie classique de NF- $\kappa$ B est associée aux sous-types ABC et pas GC<sup>67,68</sup>.

Les cibles de NF- $\kappa$ B (BCL2, BCL-XL, cFLIP, cIAP1/2) sont surexprimées dans les LBDGC-ABC. Des mutations somatiques de gènes dont les produits sont des régulateurs négatifs (A20) ou positifs (CARD11) de la voie classique de NF- $\kappa$ B sont décrits dans plus de 50 % des cas : tandis qu'une inactivation bi-allélique de A20 est observée dans 30 % des LBDGC-ABC.

Des délétions et/ou des mutations des domaines ITAM de CD79A et CD79B ont été également décrites, induisant une activité persistante des signaux transduits par le BCR et surtout, une modulation de la voie NF- $\kappa$ B par des antagonistes déclenche une mort cellulaire in vitro, démontrant ainsi l'intérêt du ciblage thérapeutique de cette voie.

Des thérapies ciblées visant une inhibition de BTK (Bruton Tyrosine Kinase) ont montré ex vivo une réponse préférentiellement sur des lignées ABC, notamment lorsqu'il y avait une mutation de CD79A, ou de CD79A associée à celle de MYD88. Cependant, la mutation isolée de MYD88 ne permet pas d'obtenir de réponse préférentielle aux inhibiteurs de BTK.

Par ailleurs des inhibiteurs de PI3K $\delta$  induisent une régression tumorale de lignées ABC dont le gène MYD88 est muté, résistantes à l'ibrutinib, suggérant un effet synergique des inhibiteurs des voies PI3K et BTK. Enfin, des molécules ciblant les cIAP (cellular Inhibitor of

Apopotosis), comme les SMAC-mimétiques qui favorisent l'auto-ubiquitination des cIAPs, bloquent la voie canonique de NF- $\kappa$ B et la croissance tumorale de lignées ABC<sup>69</sup>.

Plusieurs groupes ont montré que les patients traités par R-CHOP avaient une moins bonne survie lorsque les LBDGC présentaient un profil transcriptionnel ABC plutôt que GC. Par rapport à une chimiothérapie classique (de type R-CHOP), il a été également constaté que certaines chimiothérapies intensives, comme celle par le R-ACVBP (rituximab-adriamycine[hydroxydaunorubicine]-cyclophosphamide-vindésine-bléomycine-prednisone) bénéficiaient plutôt aux patients ayant un LBDGC-ABC, alors que cela n'était pas le cas dans les LBDGC-GC<sup>70</sup>.

### II.1.7.3 Profil mutationnel

Les données combinées de séquençage d'ADN à haut débit et de déséquilibre génomique ont permis d'établir que chaque sous-type transcriptionnel est associé à un profil mutationnel quasi exclusif. Le profil GC est associé plus souvent à des mutations impliquant les protéines du cycle cellulaire ou de la régulation des mécanismes épigénétiques (CREBBP, EZH2, MLL2 et EP300), la voie de signalisation PI3K et JAK-STAT<sup>71-73</sup>.

Le sous-type ABC est associé à des mutations plus fréquentes des gènes régulant l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (CD79A/B, CARD11 et MYD88, notamment). Elles sont impliquées dans les résistances aux nouvelles thérapies ciblées. Par exemple, la mutation de CARD11 (régulateur positif de la voie NF- $\kappa$ B) est liée à la résistance à l'ibrutinib (alors que l'alliance des mutations de CD79B et MYD88 confère une sensibilité accrue à cet inhibiteur de l'enzyme BTK) et celles de TNFAIP3 (A20, régulateur négatif de la voie NF- $\kappa$ B) et de GNA13 à une résistance au traitement R-CHOP.

Ainsi, la détection par NGS de l'ensemble de ces mutations permettrait de proposer, pour chaque patient, un traitement ciblé et spécifique. La prise en compte des voies oncogéniques modifiées apparaît de plus en plus importante pour pronostiquer l'évolution du lymphome. C'est ainsi, que celle-ci est défavorable lorsque les voies Notch et suppresseur de tumeur (p16, p53) sont altérées<sup>71,73,74</sup>. Une mutation de P53 est observée dans 20% des LBDGC NOS. Elle est retrouvée à la fois dans les LBDGC-GC et ABC, à égale fréquence<sup>71,74,75</sup>.

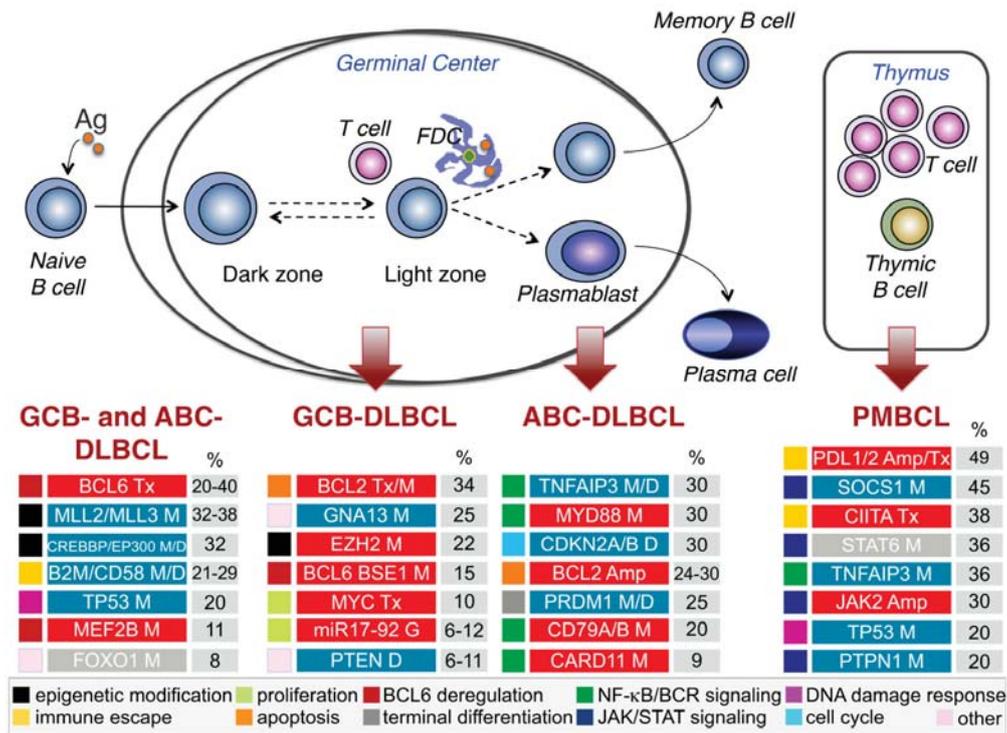


Figure 5 : Principaux sous types moléculaires des LBDGC

Altérations spécifiques et communes, en bleu : perte de fonction, en rouge : gain de fonction

D'après Pasqualucci et al<sup>63</sup>

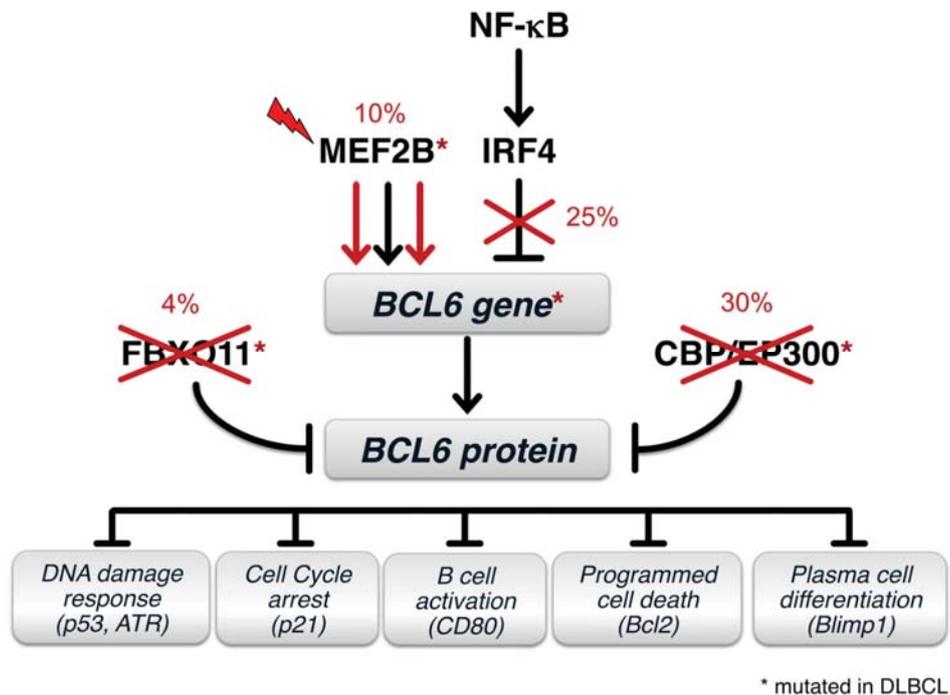


Figure 6 : Dérégulation de BCL6 dans les LBDGC

D'après Pasqualucci et al<sup>63</sup>

### II.1.8 **Microenvironnement tumoral**

Le ME du lymphome, autrement dit, l'interaction avec les cellules inflammatoires de l'hôte, est également important dans la lymphomagenèse. Lenz et al, ont permis d'identifier trois groupes principaux de signatures transcriptionnelles LBDGC : GC, non GC-ABC et médiastinal (LBDGC-M)<sup>76</sup>.

Des voies oncogéniques majeures associées à ces lymphomes, ont été identifiées, impliquant notamment BCL-6, NF-κB, IRF4 (**Figure 6**) contribuant à stimuler la prolifération cellulaire, à en limiter la mort, et représentant de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Toutefois, la physiopathologie du LBDGC ne se résume pas aux cellules lymphomateuses, le ME est déterminant pour le développement tumoral, en particulier la modulation de la réponse immunitaire et l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance notamment via l'interaction entre PD-1/PD-L1 ou PD-L2<sup>77</sup>. Ce chapitre est détaillé plus loin (voire chapitre Rôle du microenvironnement tumoral).

## II.2 **Le lymphome B diffus à grandes cellules B EBV+ NOS**

### II.2.1 **Définition/ généralités**

Le LBDGC EBV+NOS est une prolifération lymphoïde B clonale EBV positive. C'est une entité clinico-pathologique nouvellement reconnue dans la 4<sup>ème</sup> édition révisée de l'OMS 2016<sup>2</sup>. Il survient de novo, chez des patients immunocompétents. Il a été rapporté pour la première fois par Oyama et al chez 22 patients atteints de LBDGC exprimant l'EBER dans le noyau des cellules lymphoïdes tumorales<sup>10</sup>. Ces patients étaient âgés de plus de 50 ans, sans déficit immunitaire et sans antécédent de lymphome. Ils présentaient un tableau clinique défavorable, un stade avancé, une localisation extra-ganglionnaire plus fréquente, un IPI élevé, et des symptômes B plus fréquents par rapport aux patients avec un LBDGC EBV -. Il a été décrit récemment chez les sujets jeunes immunocompétents, avec cependant un pronostic différent<sup>78</sup>.

### II.2.2 **Epidémiologie**

L'infection à EBV est fréquente dans le monde entier, avec une prévalence variant de 80 à 95%, selon la zone géographique. La prévalence de l'EBV dans les LBDGC n'est pas encore connue, car aucune étude de grande envergure sur la population n'a été réalisée à ce jour. Cependant, de petites études et des séries de cas ont donné des résultats disparates en ce qui concerne des taux de prévalence de 5% dans les pays occidentaux, de 10%-15% en Asie et Amérique du Sud<sup>13,14,18,19,2,10,19,79</sup>.

Les raisons de cette différence ne sont pas claires, mais certains facteurs virologiques (Ex souche EBV) et génétiques (Ex HLA) joueraient un rôle<sup>2</sup>.

### II.2.3 **Présentation clinique**

La présentation clinique est variable<sup>2,10,19,79</sup> ; les patients sont généralement diagnostiqués à un âge avancé et plus de la moitié présentent un IPI élevé, une atteinte extra-ganglionnaire plus fréquente (poumon et tractus digestif)<sup>10,79</sup> et un taux élevé de LDH. Chez les patients jeunes (âgés < 45 ans), la localisation ganglionnaire est plus fréquente, l'extra- ganglionnaire

est observée dans 5-10%.<sup>12,15</sup>. La plupart des patients ont de l'ADN EBV détectable dans le sérum ou le sang total, mais on peut aussi le retrouver chez les patients EBV<sup>-2,80</sup>.

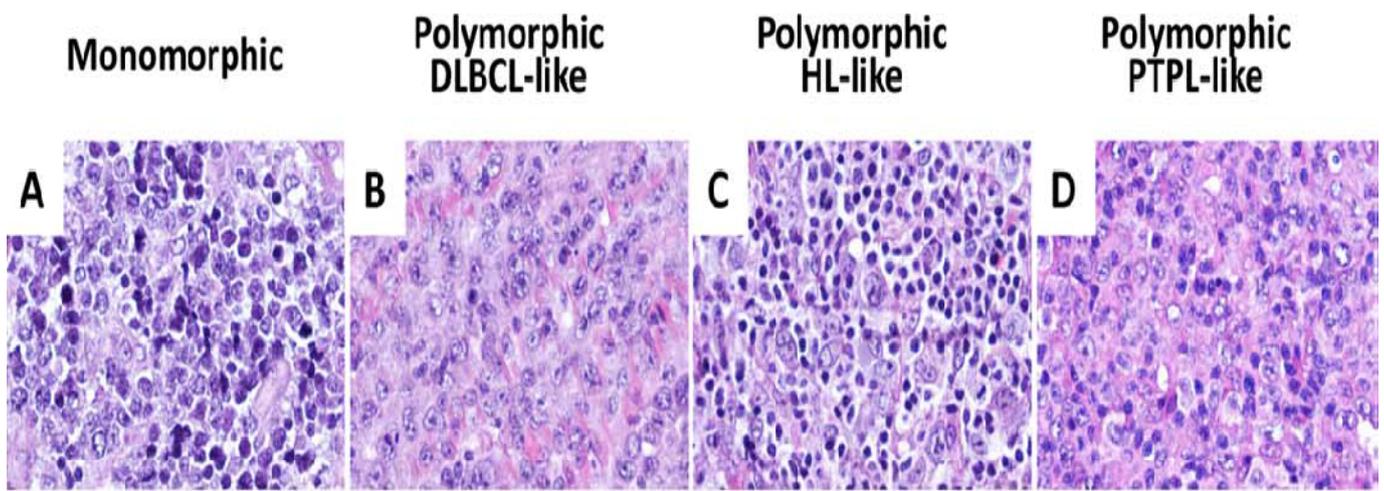
#### II.2.4 Morphologie

L'OMS reconnaît, qu'il existe un polymorphisme histologique, avec un continuum allant d'une prolifération polymorphe à une prolifération diffuse de grandes cellules<sup>81</sup>. Ils sont classés selon Montes-Moreno et al en deux sous types histologiques (**Figure7**) : monomorphe et polymorphe. Dans les deux sous types, on peut retrouver des cellules de Hodgkin et Reed Sternberg-like<sup>29</sup>.

- *Le type polymorphe*, plus fréquent, montre une proportion variable de centroblastes, immunoblastes et de nombreuses cellules réactionnelles, petits lymphocytes, plasmocytes, histiocytes pouvant former parfois des microgranulomes épithélioïdes. Il est subdivisé en 3 sous-groupes :

- un sous-groupe Grandes cellules (polymorphe LBDGC-like, avec nombreuses grandes cellules et quelques cellules de Reed Sternberg like),
- un deuxième sous-groupe Hodgkin-like avec prédominance de cellules Reed Sternberg like
- et un troisième sous-groupe lymphoprolifératif like avec cellules de Reed Sternberg-like rares ou absentes.

- *Le sous type monomorphe* est plus rare, il est composé de grandes cellules monomorphes centroblastiques ou immunoblastiques avec parfois quelques cellules de Hodgkin et Reed Sternberg like. Cependant, il n'existe pas de différence pronostique entre les deux sous types monomorphe et polymorphe. Des images de nécrose géographique peuvent être notées.



*Figure 7 : LBDGC EBV+ NOS selon Montes-Moreno<sup>29</sup>*

*De A-D Variantes cytologiques : monomorphe, polymorphe LBDGC like, Hodgkin like, lymphoprolifératif like.*

### II.2.5 Immunophénotype

Sur le plan immunohistochimique, les cellules sont de phénotype B, elles expriment le CD20, CD19, CD22, CD79a, PAX5 faiblement, BOB-1, et OCT-2. La plupart des LBDGC EBV + sont de type ABC<sup>2,14-16,18</sup>, exprimant le MUM1/IRF4 et sont négatifs aux CD10 et BCL6<sup>29</sup>. L'expression de CD30 varie selon les séries, elle est de 50 à 100%<sup>15,22</sup>. Le CD15 est rarement positif<sup>15,79</sup>. La protéine de latence LMP-1 est positive dans 2/3 des cas tandis que l'EBNA-2 est positif dans 1/3 des cas, définissant des profils de latence de type II ou III<sup>15,82</sup>. L'expression de NF-κB et de STAT3 phosphorylé est souvent observée dans les LBDGC EBV+ comparé aux LBDGC EBV-<sup>82,83</sup>. Les études de la GEP ont montré que les LBDGC EBV+ ont un profil moléculaire distinct des LBDGC EBV- avec une activation de la voie JAK –STAT<sup>17</sup>. Le réarrangement des gènes des Ig est observé dans 60% des cas<sup>29</sup>. Les cellules tumorales expriment souvent PDL-1 et PDL-2<sup>15,84</sup>. La recherche de transcrits EBERs dans les cellules tumorales est plus spécifique et la technique gold standard est l'HIS. Cependant le cut off de l'EBER n'est toujours pas standardisé.

### II.2.6 Diagnostic différentiel

Avant de poser le diagnostic de LBDGC EBV+, il faut éliminer une immunosuppression apparente<sup>85</sup>, telle qu'elle apparaît chez les patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs post-greffe (PTLD)<sup>2</sup>, les patients sous immunosuppresseurs, les patients infectés par le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine). En outre, il existe des entités associées à une infection à EBV, telles que la granulomatose lymphomatoïde caractérisée par des lésions angiocentriques impliquant la peau, les poumons ou le système nerveux central<sup>86</sup>, les LBDGC associés à une inflammation chronique, le lymphome des séreuses et le lymphome plasmablastique associé à une infection au VIH<sup>2</sup>. La distinction d'un lymphome de Hodgkin peut être aussi particulièrement problématique. Le lymphome de Hodgkin Classique (LHC) est caractérisé par un fond granulomateux composé, de petits lymphocytes, plasmocytes, éosinophiles et histiocytes. L'une des principales différences est que, dans le LHC les cellules néoplasiques représentent généralement environ 0.1%-10% de l'infiltrat cellulaire<sup>2</sup>. Ces cellules malignes co-expriment CD30 et fréquemment CD15. L'expression du CD15 est généralement négative dans le LBDGC EBV+. Le LHC peut également être associé à l'expression de l'EBV, bien que cette expression soit très variable en fonction du sous type histologique. Par exemple, le sous-type scléro-nodulaire montre une positivité à l'EBER dans 10 à 40%, tandis que le sous-type à cellularité est positif à l'EBER dans 75% des cas. D'où la nécessité d'intégrer les données cliniques, et d'interpréter le profil immunohistochimique dans son contexte.

## II.3 **Rôle de l'EBV dans la lymphomagenèse des LBDGC**

L'EBV est le premier virus oncogène identifié, reconnu par l'OMS. Il est essentiellement transmis par la salive et sa cible privilégiée est le lymphocyte B, mais, il peut aussi infecter les cellules T, NK et les cellules épithéliales. Il est à l'origine de plusieurs pathologies lymphoïdes de gravité variable, selon le statut immunitaire du patient ; comme le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les lymphoproliférations T ou B des déficits immunitaires primitifs ou acquis, les lymphoproliférations T EBV+ de l'enfant, le lymphome angioimmunoblastique, le lymphome T/NK de type extra-ganglionnaire de type nasal, le lymphome plasmablastique et le LBDGC<sup>2,20</sup>.

## II.3.1 Rappel sur le cycle biologique de l'EBV

### II.3.1.1 Historique

L'EBV ou herpes virus humain de type 4 (HHV 4) a été découvert en 1964 dans des lignées de lymphomes de Burkitt établies à partir de tumeurs affectant des enfants d'Afrique subsaharienne, par les chercheurs Epstein, Barr et Achong<sup>1</sup>. Quelques années plus tard, des Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes ou LCL (Lymphoblastoid Cell Lines) sont obtenues après infection et immortalisation de lymphocytes B *in vitro* par l'EBV<sup>87</sup>. Par la suite, afin d'identifier les patients risquant de développer un lymphome de Burkitt, Gertrude et Werner Henlé mettent au point un test sérologique<sup>88</sup>.

L'EBV appartient à la famille des *Herpes viridae* qui regroupe huit virus strictement humains classés en trois sous-familles : *Gamma*, *Alpha* et *Beta-herpes virinae* ; et neufs genres (**Tableau 3**). L'EBV appartient à la famille des *Gamma-Herpes viridae* et au genre *Lymphocryptovirus*<sup>89</sup>.

À ce jour, neuf types d'herpès virus ont été identifiés chez l'Homme : le virus de l'herpès, ou Herpès Simplex Virus (HSV) de type 1 ou 2 (HSV-1 ; HSV-2), le virus de la varicelle et du zona ou Herpès Virus Varicellae (VZV), le Cytomégalovirus (CMV), l'EBV, et les 6<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup>, et 8<sup>ème</sup> Herpès Virus Humains (HHV-6, HHV-7 et HHV-8). La famille des Herpes viridae est sous-divisée en trois groupes : les alpha-, beta-, et gamma-herpès virus<sup>90,91</sup>.

*Tableau 3 : Différents groupes de Herpes viridae chez l'homme<sup>90,91</sup>*

<b>Sous famille</b>	<b>Espèce</b>	
$\alpha$ -herpès virus	Herpès Virus Simplex type 1	HHV-1
	Herpès Virus Simplex type 2	HHV-2
	Varicelle-zona	HHV-3
$\beta$ -herpès virus	Cytomégalovirus	HHV-5
	Herpès Virus Humain de type 6	HHV-6
	Herpès Virus Humain de type 7	HHV-7
$\gamma$ -herpès virus	Virus d'Epstein-Barr	HHV-4
	Herpès Virus Humain de type 8	HHV-8

Le réservoir viral de l'EBV est strictement humain. Il s'agit d'un virus ubiquitaire. Plus de 90% de la population mondiale est séropositive, quelle que soit la répartition géographique.

### II.3.1.2 Structure virale et génomique

#### II.3.1.2.1 Structure du virion

Le virion de l'EBV fait environ 120 à 200 nm et présente une structure commune à tous les herpès virus (**Figure 8**) :

- ✓ l'**enveloppe lipidique** est composée d'un double feuillet lipidique correspondant à des fragments de membrane plasmique de la cellule hôte au niveau de laquelle le virus exprime ses antigènes de membrane permettant sa fixation sur le récepteur cellulaire CD21 (récepteur pour la fraction C3d du complément),
- ✓ le **tégument** qui est composé de protéines virales d'aspect fibrillaire,
- ✓ la **nucléocapside** de forme icosaédrique,
- ✓ et le **nucléoïde** qui contient le génome du virus linéarisé sous forme d'ADN double brin enroulé autour d'une structure protéique appelé le *core*.

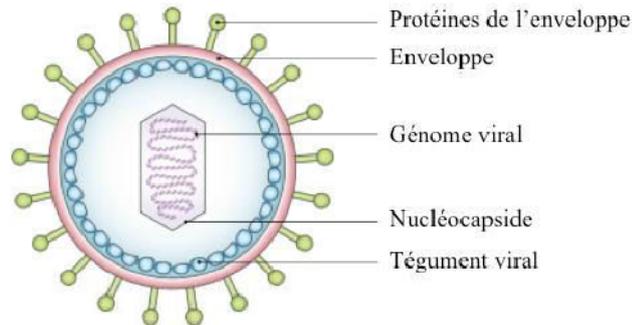


Figure 8 : Structure commune des Herpes viridae

D'après <http://www.boogordocor.com/cold-and-flu-prevention>

### II.3.1.2.2 Le génome

Le génome est constitué d'un ADN bicaténaire de 172 Kpb. Il est composé de séquences terminales répétées (TR) de 500 pb, ainsi que de quatre séquences internes répétées (IR1 à IR4)<sup>92</sup>. IR1 constitue une zone importante de répétitions internes, d'une taille de 3 Kpb. Cette séquence interne répétée sépare le génome de l'EBV en deux séquences distinctes : une séquence unique courte (US : Unique Short), comprenant la région U1, et une séquence unique longue (UL : Unique Long) de 150 Kpb, composée des régions U2 à U5. L'origine de réplication (OriP) est fonctionnelle durant la phase de latence, tandis que les deux origines de réplication lytiques (OriLyt) le sont durant le cycle lytique de l'EBV (Figure 9).

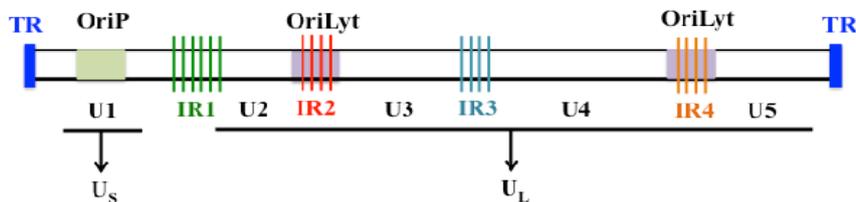
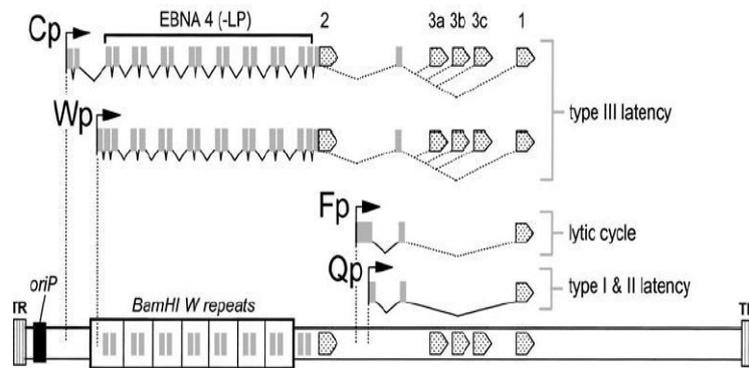


Figure 9 : Représentation schématique du génome de l'EBV sous sa forme linéaire

TR : répartition terminale ; IR : Répétition interne ; U : Région unique ; OriP : Origine de réplication latente ; OriLyt : origine de réplication latente

D'après Young et Rickinson<sup>92</sup>

Quatre promoteurs (Cp, Wp, Fp et Qp) régissent l'expression des protéines EBNA au niveau du génome de l'EBV. L'expression transcriptionnelle de ces protéines conditionne l'état du cycle (lytique, en latence) de l'EBV au sein des cellules immortalisées par le virus<sup>92</sup> (**Figure 10**).



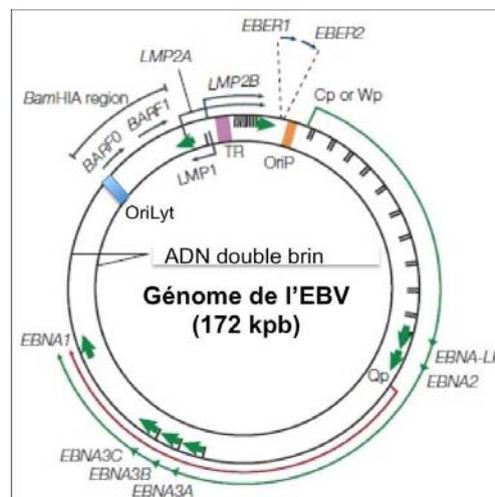
*Figure 10 : Localisation des promoteurs Cp, Wp, Fp et Qp au sein du génome de l'EBV*

**Structure des transcrits des protéines EBNA observées durant les différentes phases de l'EBV. La latence III de l'EBV inclue l'expression des six protéines EBNA (EBNA1, 2, 3a, 3b, 3c, LP), générées par l'épissage alternatif des longs transcrits primaires initiés à partir des promoteurs Cp et Wp. Durant les latences I et II (restreintes), seule la protéine EBNA1 est exprimée, elle est transcrite à partir du promoteur Qp. Fp est le promoteur du cycle lytique situé en amont de Qp.**

**BamHI W repeats correspond à la région IR1. OriP est l'origine de réplication épisomale associée au programme de latence. TR : Terminal Repeat.**

*D'après Paulson et al<sup>93</sup>*

Lorsque l'EBV infecte une cellule cible, son génome peut se circulariser sous forme d'épisome grâce aux séquences terminales TR. Cette forme épisomale circulaire peut persister dans les cellules cibles tout au long de la vie de l'hôte de manière constante (phase de latence). Le virus peut être réactivé et produire à nouveau des virions en réponse à des stimulations de l'environnement de la cellule infectée<sup>93</sup>.



*Figure 11: Localisation des promoteurs Cp, Wp, Fp et Qp au sein du génome de l'EBV*

*D'après Young et Rickinson<sup>92</sup>*

### II.3.1.2.3 Les phases du cycle viral

L'EBV passe la barrière oropharyngée constituée de cellules épithéliales, ce qui permet l'infection des cellules B naïves sous-jacentes. L'EBV peut alors se trouver dans deux états suite à l'infection des cellules hôtes : en cycle lytique ou en phase de latence. Le cycle lytique constitue la phase de réplication du virus.

- **Phase de latence**

Lors de l'obtention d'une LCL par infection *in vitro* des lymphocytes B par l'EBV, deux événements sont essentiels au maintien du virus : d'une part, l'inhibition du passage vers le cycle lytique et le maintien de la structure épisomale et d'autre part, l'expression des gènes dits de latence. Les produits des gènes de latence sont les protéines EBNA, les protéines LMP et les ARN EBER (EBV Encoded RNAs) et BART (BamHI A region's Rightward Transcripts). Les protéines de latence dérèglent les fonctions cellulaires en détournant la régulation transcriptionnelle et les différentes voies de signalisation cellulaires, aboutissant à l'immortalisation de la cellule hôte.

Six protéines nucléaires EBNA sont décrites : EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP. Toutes, sauf EBNA-3B, sont essentielles à l'immortalisation des lymphocytes B infectés *in vitro*. Les trois protéines membranaires sont LMP-1, LMP-2A et LMP-2B. LMP-1 est la protéine la plus abondante durant la phase de latence, et est nécessaire à l'immortalisation de la cellule infectée. Les ARN EBER sont des petits ARN non polyadénylés et non traduits, présents en grande quantité.

→ **Les types de latence**

La latence virale est caractérisée par l'expression d'un nombre réduit de gènes, permettant la persistance virale. Il existe différentes latences virales selon le jeu de gènes exprimés par l'EBV. Quelle que soit la latence, on observe l'expression des ARN EBER et BART.

□ La **latence de type I** est caractérisée par l'expression uniquement de la protéine EBNA-1, ce qui permet le maintien du génome viral dans la cellule. Cette latence est retrouvée dans le lymphome de Burkitt, lorsqu'il est associé à l'EBV.

□ La **latence de type II** est caractérisée par l'expression des protéines EBNA-1, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B. Les pathologies associées à ce type de latence sont notamment le carcinome du rhinopharynx, la maladie de Hodgkin et les lymphomes T/NK et les LBDGC EBV+

□ La **latence de type III** est établie lorsque le facteur de transcription EBNA-2 active l'expression de toutes les protéines de latence EBNA-1, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B. Elle est retrouvée *in vitro* dans les LCL et *in vivo* dans les lymphoproliférations B des sujets immunodéprimés.

□ La **latence de type 0** n'est décrite qu'*in vivo* dans les lymphocytes B au repos circulants infectés. Les ARN codants les protéines LMP-2A et EBNA-1 sont parfois détectés.

Il existe cinq types de latence : la latence 0, 1, 2, 3 et la latence atypique. Les différents états de latence de l'EBV sont caractérisés par des profils d'expression des gènes de latence.

→ **Les protéines EBNA et les protéines membranaires LMP**

Les principales fonctions de ces protéines sont résumées dans le **tableau 4** :

*Tableau 4 : Les protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions*

<b>Protéines</b>	<b>Latence</b>	<b>Localisation</b>	<b>Fonctions principales</b>
EBNA-1	I, II, III	Nucléaire	Immortalisation des lymphocytes B Maintien du génome viral sous forme épisomale
EBNA-2	III	Nucléaire	Immortalisation des lymphocytes B Activateur de transcription cellulaire et virale en se fixant à RBP-Jκ
EBNA -3A (EBNA-3)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA-2, se lie à RBP-Jκ, participe à l'immortalisation des lymphocytes
EBNA -3B (EBNA-4)	III	Nucléaire	Inconnue, se lie à RBJκ
EBNA -3C (EBNA-6)	III	Nucléaire	Répresseur de l'action d'EBNA2, agit sur le cycle cellulaire, se lie à RBP-Jκ, participe à l'immortalisation des lymphocytes B
EBNA-LP (EBNA-5)	III	Nucléaire	Co-facteur d'EBNA-2 Interagit avec P53 et pRb
LMP-1	II, III	Membranaire	Oncogène majeur Active les voies NF-κB
LMP-2A	II, III	Membranaire	Module le signal du BCR Prévient la réactivation virale
LMP-2B	II, III	Membranaire	Inconnue

- **La phase lytique**

La réactivation lytique intervient occasionnellement dans les lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV. Elle est étudiée *in vitro* dans les lignées cellulaires immortalisées par l'EBV<sup>94</sup>. Le passage de la phase de latence à la phase lytique peut-être influencé par l'environnement dans lequel se trouve la cellule qui devient alors permissive à la réplication virale. Le cycle lytique peut être induit par stimulation du BCR ou en utilisant des agents chimiques comme le butyrate de sodium et des esters de phorbol. Le cycle lytique permet, au final, l'amplification du génome viral d'un facteur 100 à 1000, aboutissant ainsi au maintien et à la diffusion de l'EBV.

L'expression des gènes aboutissant à l'amplification du génome viral se déroule de manière ordonnée (**Figure 12**). Après induction du programme lytique, les deux gènes lytiques très précoces (IE), *BZLF1* et *BRLF1*, sont exprimés. Ces gènes codent deux transactivateurs, la protéine Zta (ou ZEBRA : Z Epstein-Barr Replication Activator) et la protéine Rta respectivement. Elles ont pour rôles d'activer certains promoteurs viraux et cellulaires

conduisant à une cascade d'expression ordonnée de gènes viraux. On observe donc l'activation de l'expression des gènes précoces (E) impliqués dans la réplication de l'ADN et dans le métabolisme, suivie par l'expression des gènes tardifs (L) codants des protéines virales structurales pour la formation des virions<sup>95</sup>.

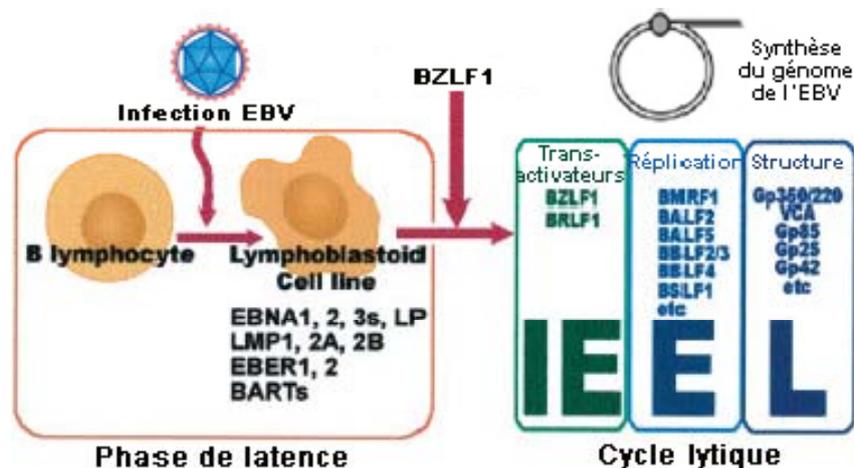


Figure 12 : Passage de la phase de latence au cycle lytique par la protéine ZEBRA

La protéine ZEBRA, codée par le gène BZLF1, permet la commutation de la phase de latence au cycle lytique. Elle permet l'expression des protéines précoces du cycle (EA : Early Antigens) et par la suite des protéines de la capsid virale (VCA : Viral Capsid Antigen). Le génome de l'EBV passe de la forme épisomale à la forme linéaire, permettant la production de virions et la lyse cellulaire.

*D'après Tsurumi et al<sup>95</sup>*

→ Les ARN non codants

#### Les ARN EBER1 et EBER2

EBV Encoded RNAs sont de petits ARN non polyadénylés (166 et 172 nt) transcrits par l'ARN polymérase III qui synthétise les ARN de transfert cellulaires. En moyenne, un million de copies sont détectées dans la cellule infectée et ils présentent une structure secondaire en forme de trèfle. Ils sont retrouvés essentiellement dans le noyau au sein de complexes ribonucléoprotéiques. Ces ARN joueraient un rôle dans l'épissage des ARN des protéines EBNA et LMP et de façon plus générale, dans le maintien de l'EBV dans l'organisme hôte. En effet, ils sont impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques, suppriment l'effet antiviral des interférons  $\alpha$  et  $\gamma$  et induisent la production d'IL-10, cytokine immuno-suppressive<sup>96</sup>.

#### Les ARN de la région BamHI A BART

Ils ont été découverts initialement dans le carcinome du rhinopharynx, mais sont également retrouvés dans d'autres cancers associés à l'EBV comme le lymphome de Hodgkin et le lymphome de Burkitt. Ils présentent dans leur extrémité 5', un cadre de lecture ouvert, BARF0. L'expression de la protéine BARF0 n'est pas retrouvée in vivo du fait de sa durée de vie très courte. Un autre transcrite est généré à partir de la région BAMHI et code BARF1 retrouvée dans des tumeurs d'origines épithéliales<sup>96</sup>.

### II.3.1.3 Physiopathologie de l'infection par l'EBV

Au vue de la diversité des maladies associées à l'EBV, les cibles de ce virus sont multiples. Les lymphocytes B et les cellules épithéliales en constituent les cibles « conventionnelles ». L'EBV peut également infecter d'autres types cellulaires, « non conventionnels », tels que les lymphocytes T, les NK ou encore les monocytes.

#### II.3.1.3.1 Cellules-cibles de l'EBV

- **Cibles conventionnelles**

- **Les lymphocytes B**

Les lymphocytes B sont les principales cibles de l'EBV. Les glycoprotéines virales jouent un rôle central dans l'entrée et l'internalisation de l'EBV dans les cellules hôtes. Cinq glycoprotéines de l'enveloppe virale et trois protéines cellulaires sont nécessaires pour l'entrée efficace de l'EBV au sein des lymphocytes B<sup>97</sup>.

L'EBV se fixe au lymphocyte B grâce à la gp350/220, qui reconnaît spécifiquement le récepteur CD21/CR2<sup>98</sup>, avec une forte affinité<sup>99</sup>. Cette étape permet l'activation du lymphocyte B et l'endocytose du virus. Après endocytose du virus dans un compartiment au pH faible, la fusion des membranes virales et cellulaires se produit sous l'action d'un complexe de trois protéines.

Ce complexe est composé d'un homotrimère de la glycoprotéine gB et d'un hétérodimère des glycoprotéines gH et gL.

La cinquième glycoprotéine virale nécessaire pour l'entrée du virus est la protéine gp42, qui fonctionne plus efficacement sous sa forme clivée<sup>100</sup>.

La gp42 se lie directement à gH<sup>97</sup>, qui induit le passage de la forme dimérique gHgL au complexe trimérique ghgLgp42. La fusion entre le lymphocyte B et le virus est également déclenchée par l'interaction entre le CMH de classe II et la glycoprotéine gp42<sup>101</sup>.

Au cours de l'infection, il y a expression des différentes protéines nucléaires et membranaires de l'EBV membranaires de l'EBV. La **Figure 13** représente ces différentes étapes, avec l'expression des différentes protéines de latence virale au cours du temps.



cellules de l'épithélium. Ce processus est nommé transfert d'infection et se décline en trois étapes :

1. activation des molécules d'adhésion
2. liaison entre les lymphocytes B infectés par l'EBV et les cellules épithéliales via les molécules d'adhésion
3. interaction entre les glycoprotéines virales et les cellules épithéliales, entraînant la fusion et l'absorption des virions.

L'infection des cellules épithéliales par les lymphocytes B infectés nécessite les glycoprotéines gH et gL, la gp42 n'étant pas essentielle lors de ce processus<sup>103</sup>.

- ***Cibles non conventionnelles***

- ***Les lymphocytes T***

Selon Jones et al, l'EBV peut infecter les lymphocytes T et contribuer à la lymphomagenèse T chez certains patients atteints d'infection sévère par le virus<sup>103</sup>. Montpellier et al sont parvenus à obtenir des lignées cellulaires de lymphocytes T immortalisés par l'EBV in vitro. Les cellules de ces lignées expriment les gènes de latence EBNA1 et LMP1<sup>104</sup>. Groux et son équipe ont découvert que les lymphocytes T transformés expriment les marqueurs CD2, CD3, CD4 ou CD8. La plupart de ces cellules présentent un phénotype de cellules T naïves et un réarrangement complet du TCR<sup>105</sup>. Haverkos et al ont corrélé le taux élevé de copies d'ADN de l'EBV dans le sérum des patients atteints de lymphomes T périphériques et la mauvaise survie globale des sujets<sup>106</sup>.

- ***Les cellules NK***

Lors de l'infection précoce de l'EBV chez les patients, les cellules NK attaquent les lymphocytes B autologues infectés par l'EBV<sup>107</sup>. In vitro, les cellules NK acquièrent de manière transitoire le CD21 des lymphocytes B, par transfert synaptique de quelques molécules réceptrices sur leur propre membrane. En présence de particules virales, une liaison peut s'effectuer, permettant à l'EBV d'infecter les cellules NK. Ce modèle suggère une possible voie d'entrée du virus au sein des cellules NK<sup>107</sup>.

- ***Les monocytes***

Environ 20% des monocytes possèdent le CD21/CR2 à leur surface, ce qui peut constituer une voie d'entrée pour l'EBV<sup>108</sup>. L'EBV inhibe fortement la production de TNF- $\alpha$  au sein des lignées monocytaires. Il peut interagir directement avec les monocytes et les macrophages pour exercer son effet immunomodulateur<sup>108</sup>. L'infection des monocytes par l'EBV réduit significativement leur capacité phagocytaire. Ce qui démontre que l'infection par l'EBV des monocytes et l'altération de leurs fonctions biologiques favorise la propagation virale durant les premiers stades de l'infection<sup>109</sup>.

### ***II.3.1.3.2 Infection par l'EBV in vivo et persistance virale***

Après avoir infecté les cellules B sous jacentes aux cellules épithéliales de l'oropharynx, le génome de l'EBV se circularise sous forme d'épisome et le virus peut entrer en programme de latence III. Les lymphocytes B infectés de façon latente se développent rapidement dans les zones extra-folliculaires des tissus lymphoïdes oropharyngés tels que les amygdales. Ces

cellules B infectées peuvent être retrouvées dans le sang. Ces cellules migrent ensuite vers les centres germinatifs, où elles passent à un programme de transcription plus limité : le programme par défaut (latence I/II). Les cellules infectées se situent ensuite au niveau du compartiment des cellules B mémoires, où le virus peut persister tout au long de la vie de l'hôte en latence 0 à l'état quiescent ou en latence I lorsqu'elles se répliquent<sup>110</sup>. Les cellules B mémoires circulent entre le sang et les tissus lymphoïdes oropharyngés. La réactivation virale peut survenir lorsque ces cellules pénètrent dans les tissus lymphoïdes de l'oropharynx, entraînant une réplication virale et une exsudation du virus<sup>92,110</sup>. Ce cycle d'infection et l'état de repos dans les cellules B mémoires permettent une persistance durant toute la vie de l'hôte, de manière très stable<sup>110</sup>.

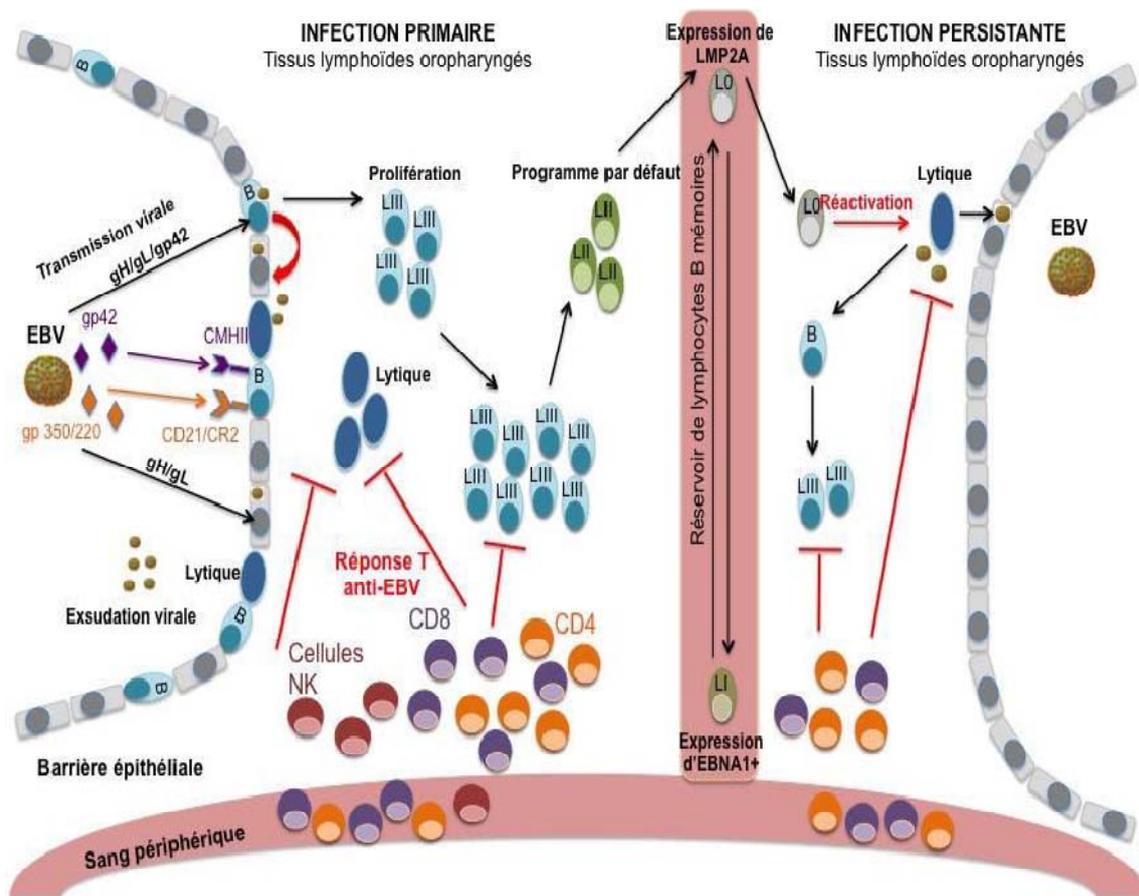


Figure 14 : Infection primaire et persistante par l'EBV in vivo chez des individus immunocompétents.

*D'après Tangye et al<sup>111</sup>*

*L'infection primaire par l'EBV est établie au niveau des tissus lymphoïdes oropharyngés. L'EBV infecte les lymphocytes B par la liaison entre la glycoprotéine gp42 du virus et le récepteur CD21/CR2 du lymphocyte B. La glycoprotéine gp42 se lie au CMH de classe II du lymphocyte B. La gp42 se lie au complexe gH/gL via une forte interaction avec la gH. Le complexe trimérique contribue à l'entrée du virus dans les lymphocytes B. Les cellules épithéliales sont infectées via le complexe gH/gL, et par un système de transfert du CD21*

*des lymphocytes B aux cellules épithéliales (Figure 14 : flèches rouges). Ensuite, le virus passe à une forme de latence III, qui correspond à la prolifération des lymphocytes B infectés par l'EBV. Ces cellules étant hautement immunogènes par l'expression de l'ensemble des protéines de latence exprimées, elles sont éliminées par les lymphocytes T anti-EBV, ainsi que par une activation des cellules NK chez les hôtes immunocompétents. Les lymphocytes B infectés régulent négativement l'expression de ces protéines immunogènes, permettant la pérennité virale (programme de latence II, ou programme par défaut). Ces cellules migrent ensuite vers le sang périphérique. La persistance virale est principalement obtenue par l'infection silencieuse des cellules B mémoires, où l'ADN viral est maintenu sous forme épisomale et où seulement EBNA1 est exprimée (programme de latence I), ou les transcrits de LMP2A (programme de latence 0). Certaines de ces cellules en latence 0 peuvent être réactivées et repasser en phase lytique. Cette réactivation peut conduire à la prolifération de cellules en programme de latence III, contrôlée par la réponse T anti-EBV CD4+ et CD8+. La production de nouvelles particules virales peut entraîner de nouveaux foyers infectieux qui peuvent conduire à la libération de virions au niveau de la gorge. La surveillance immunitaire continue pendant le cycle lytique et la latence est importante pour le contrôle viral.*

## II.3.2 Lymphomagenèse

### II.3.2.1 **Activation de la voie NF-κB**

NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires, comme la réponse immunitaire, la croissance cellulaire et l'apoptose. NF-κB est exprimé de façon ubiquitaire. Il est impliqué, *via* sa fixation au niveau de sites κB des régions régulatrices des gènes, dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'immunité, la réponse inflammatoire, la réponse au stress cellulaire, la prolifération et la survie cellulaire, l'angiogenèse et l'apoptose. L'activité NF-κB est régulée par la nature des complexes formés par les différentes sous unités NF-κB, les inhibiteurs impliqués, les voies de signalisation mises en jeu et les sites κB retrouvés au niveau des séquences promotrices des gènes cibles.

#### II.3.2.1.1 *Les sous-unités NF-κB*

La famille NF-κB comprend cinq membres structurellement proches et agissant sous forme homo ou hétérodimérique (**Figure 15**) : p50 et son précurseur p105 (NF-κB1), p52 et son précurseur p100 (NF-κB2), RelA (p65), RelB et c-Rel. Chacune de ces sous-unités est caractérisée par la présence d'un domaine RHD (*Rel Homology Domain*) amino-terminal, hautement conservé et responsable de la dimérisation et de la liaison à l'ADN<sup>112</sup>. RelA, c-Rel et RelB contiennent également un domaine TAD carboxy-terminal. Les membres p50 et p52 étant dépourvus du domaine TAD, ils activent la transcription grâce à leur interaction avec les autres sous-unités. Ils peuvent également réprimer la transcription en se fixant au niveau des sites Kb sous forme d'homodimères<sup>113</sup>. Les précurseurs p100 et p105 contiennent, dans leur partie carboxy-terminale, plusieurs répétitions ankyrines impliquées dans leur localisation cytoplasmique ce qui leur confèrent des propriétés inhibitrices.

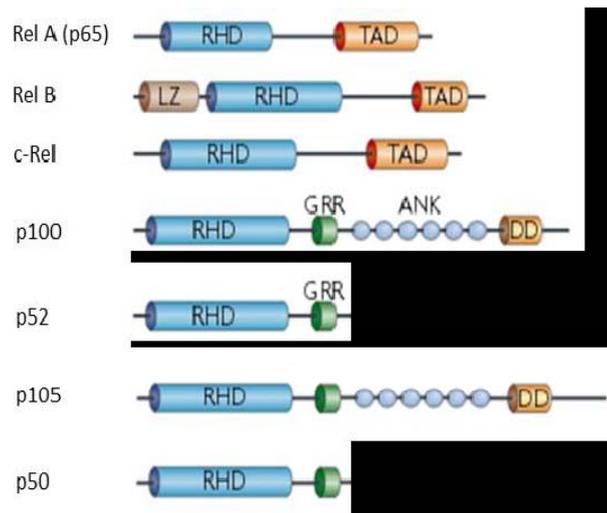


Figure 15: Représentation schématique de la famille NF-κB

*Les membres de la famille NF-κB sont caractérisés par la présence d'un domaine RHD. RelA, c-Rel et RelB contiennent un domaine de transactivation (TAD). RelB possède un domaine amino-terminal de type glissière à leucines (LZ). Les protéines précurseurs p100 et p105 possèdent des répétitions ankyrines (ANK) ainsi qu'une région riche en glycines (GRR).*

*D'après Ghosh and Hayden<sup>113</sup>*

Les sous-unités NF-κB forment des homodimères ou des hétérodimères, à l'exception de RelB qui n'est retrouvé que sous forme hétérodimérique. Elles sont transloquées dans le noyau grâce à leur séquence NLS. *In vivo*, la stabilité des dimères varie et ils présentent des affinités de liaison à l'ADN différentes. Les homodimères c-Rel/c-Rel sont plus stables que les homodimères RelA/RelA. Les sous-unités p50 et p52 se lient préférentiellement au niveau de la partie 5' des sites κB alors que RelA, c-Rel et RelB se lient sur la partie 3'<sup>113</sup>.

### II.3.2.1.2 Les inhibiteurs IκB

Des protéines particulièrement importantes dans la régulation de l'activité NF-κB interagissent avec les sous-unités NF-κB : il s'agit des protéines inhibitrices de la famille IκB, dont la plus connue est IκBα (**Figure 16**). Ces inhibiteurs séquestrent les complexes NF-κB dans le cytoplasme des cellules au repos. Ils peuvent aussi entrer dans le noyau, détacher les complexes NF-κB de l'ADN et provoquer leur exportation dans le cytoplasme<sup>114</sup>.

La famille des protéines IκB inclue IκBα, IκBβ, IκBε, les précurseurs p100 (IκBδ) et p105 (IκBγ), ainsi que des inhibiteurs atypiques tels qu'IκBζ (codée par *NFKBIZ*), Bcl-3 (*B Cell Lymphoma 3*) et IκBNS (codée par *NFKBID*). Les molécules IκB atypiques (IκBζ, Bcl-3 et IκBNS) sont présentes à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Bcl-3 est impliqué à la fois dans la transactivation et la répression des gènes cibles de NF-κB et interagit avec les complexes contenant p50 et p52.

IκBζ agit à la fois comme un régulateur positif et négatif des gènes cibles de NF-κB et se lient préférentiellement à la sous-unité p50<sup>113</sup>. Enfin, IκBNS se fixe aussi à la sous-unité p50 et semble réguler positivement ou négativement les gènes cibles de NF-κB en fonction du type cellulaire.

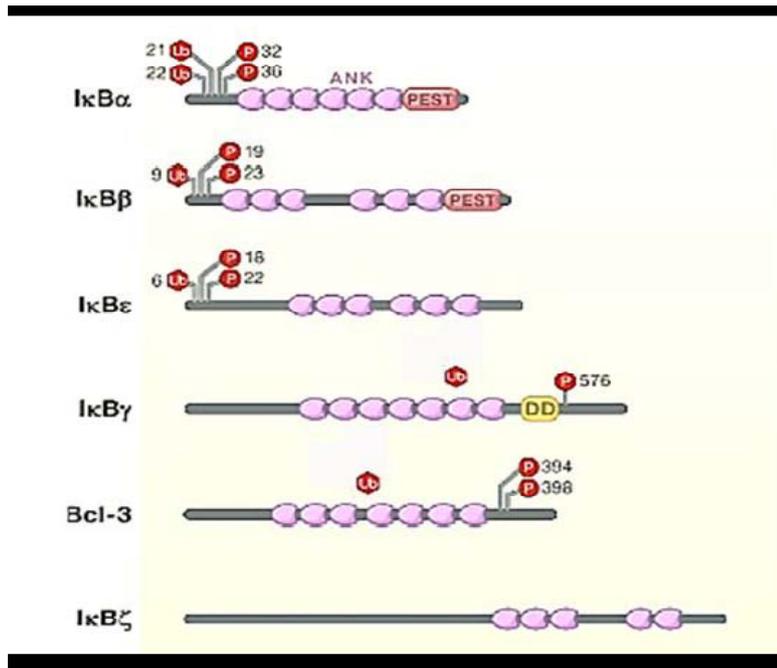


Figure 16 : Représentation schématique des inhibiteurs de la famille IκB (Inhibitor of NF-κB)

Les inhibiteurs de la famille IκB présentent des répétitions ankyrines (ANK) ainsi que des sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation. IκBα et IκBβ possèdent un domaine PEST (riche en Proline, Acide Glutamique, Serine et Thréonine) en carboxy-terminal.

*D'après Hayden and Ghosh<sup>13</sup>*

Les protéines IκB sont caractérisées par la présence de répétitions ankyrines permettant l'interaction avec les dimères NF-κB.

L'interaction des protéines IκB classiques (IκBα, IκBβ, IκBε) et des précurseurs p100 et p105 avec les dimères NF-κB masque leur séquence de localisation nucléaire, empêchant alors leur transport dans le noyau. L'activité des protéines IκB est régulée par phosphorylation en sérine, puis protéolyse. Elles possèdent des sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation permettant leur dégradation par le protéasome.

### II.3.2.1.3 Voies de signalisation NF-κB

L'activité des facteurs de transcription NF-κB est régulée selon deux voies principales induites par différents stimuli : la voie classique ou canonique et la voie alternative ou non canonique.

- **La voie d'activation classique (canonique)**

La voie canonique est induite par l'activation d'un certain nombre de récepteurs comme ceux des cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL-1 et par des produits bactériens ou viraux, comme les protéines LMP-1 de l'EBV et TAX du HTLV se caractérisant par l'activation du complexe IKK qui cible les complexes NF-κB séquestrés par IκBα<sup>32</sup> (Figure 17).

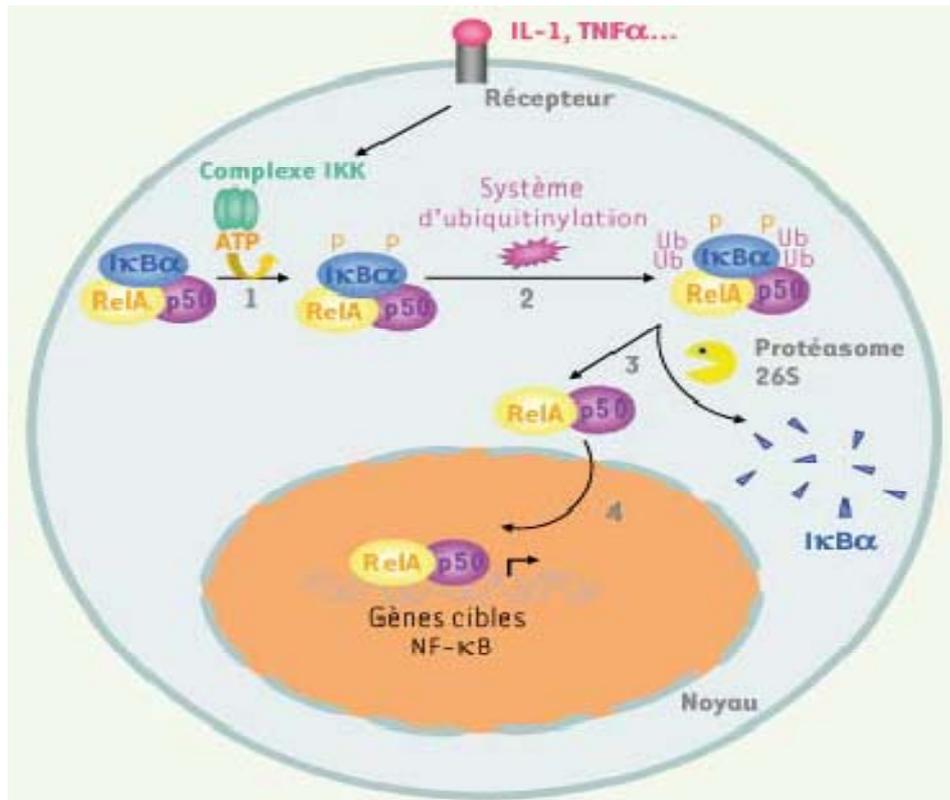


Figure 17 : Voie d'activation classique de NF-κB

*IKK phosphoryle les résidus sérines dans la partie amino-terminale d'IκBα (1) entraînant une poly-ubiquitinylation d'IκBα (2), aboutissant à sa dégradation par le protéasome (3) et donc à la libération du complexe p50/RelA.*

*D'après Shkoda et al<sup>32</sup>*

- **La voie d'activation alternative (non canonique)**

La voie d'activation alternative est induite par différents membres de la superfamille du TNF comme le CD40 ligand et le facteur BAFF (B cell Activating Factor).

L'activation du récepteur CD40 induit la voie alternative d'activation de NF-κB.

Après le recrutement des protéines TRAF2, TRAF3 et c-IAP1/2, TRAF2 induit sa propre ubiquitinylation et celle des protéines c-IAP1/2 (ubK63, ubiquitinylation activatrice non dégradante) ce qui a pour effet d'augmenter l'activité ubiquitine ligase des ces dernières sur TRAF3 (ubK48). TRAF3 est alors dégradé stabilisant la kinase NIK qui phosphoryle la kinase IKKα. IKKα activée phosphoryle p100 aboutissant à sa dégradation par le protéasome et la translocation du complexe p52/RelB dans le noyau<sup>3</sup>.

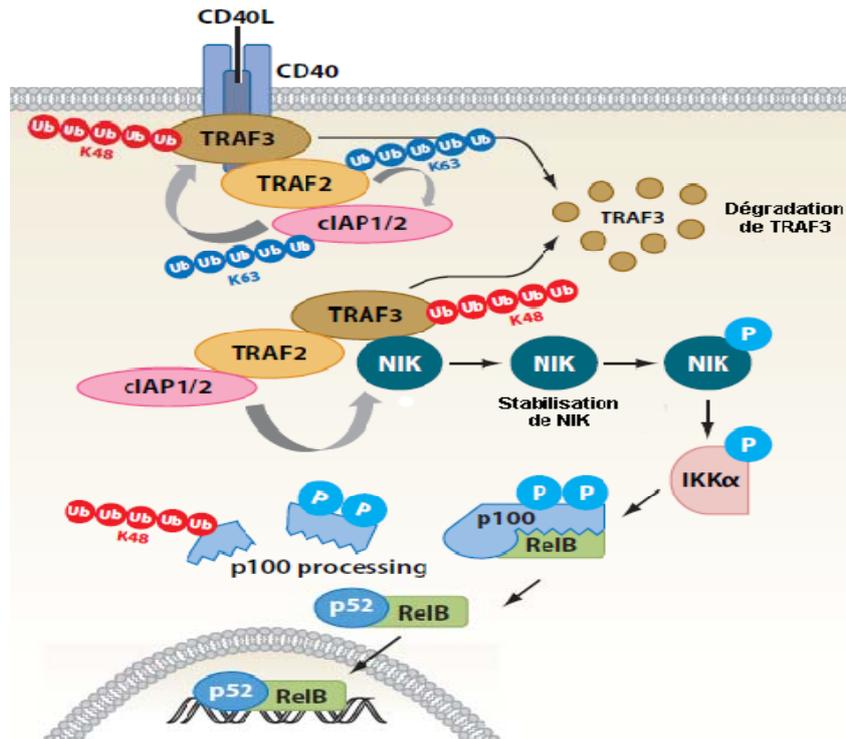


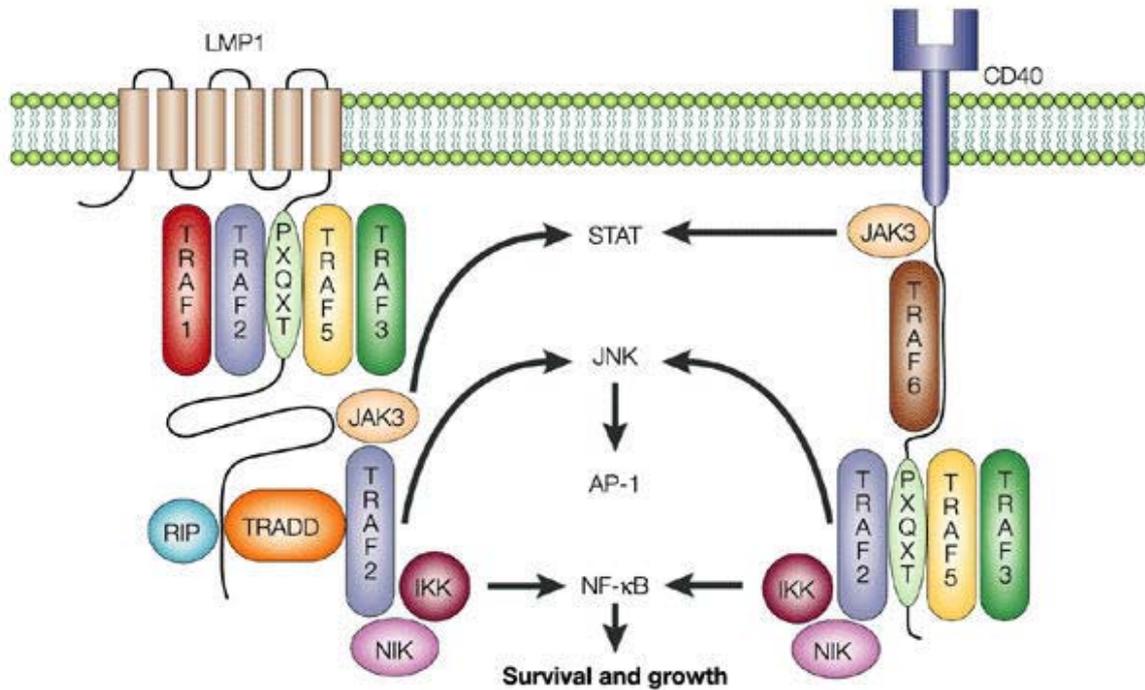
Figure 18 : Voie d'activation alternative de NF-κB

*D'après Compagno et al<sup>3</sup>*

- **NF-κB et transformation par LMP-1**

Parmi les protéines de latence de l'EBV, LMP1 joue un rôle majeur dans les processus d'immortalisation et de transformation. LMP-1 est capable d'induire les deux voies de signalisation aboutissant à l'activation des différents complexes NF-κB. Les protéines LMP1 et CD40 possèdent toutes les deux des domaines de liaison avec les facteurs TRAF et interagissent avec de multiples membres de cette famille. LMP1 et CD40 interagissent avec la kinase JAK3 et les protéines STAT. Elles activent le complexe de transcription de la protéine AP-1 par la voie de signalisation JNK. La libération de protéine kinase IKK, composée de plusieurs sous-unités et qui constitue une des protéines inhibitrice de NF-κB, déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau et conduit à la survie et à la croissance des lymphocytes B infectés par l'EBV<sup>95</sup> (Figure 19).

Les LBDGC EBV+ ont un profil d'activation de NF-κB plus prononcé par rapport à la majeure partie des LBDGC EBV-, avec une activation des voies classiques et alternes de NF-κB<sup>83,115</sup>. L'activation de NF-κB est le reflet de l'expression de LMP1, clairement exprimé dans ces lymphomes. L'étude du profil d'expression de gènes a permis d'identifier l'expression accrue des voies immunitaires et inflammatoires dans les tumeurs EBV+<sup>83</sup>. En plus des voies NF-κB, le récepteur JAK/STAT, le récepteur NOD et les voies de signalisation des récepteurs TLRs sont également activés. En outre, l'infection *in vitro* par l'EBV des lignées cellulaires de LBDGC-ABC dérivées de patients ont confirmé l'activation accrue de NF-κB et une phosphorylation accrue de STAT3<sup>83</sup>.



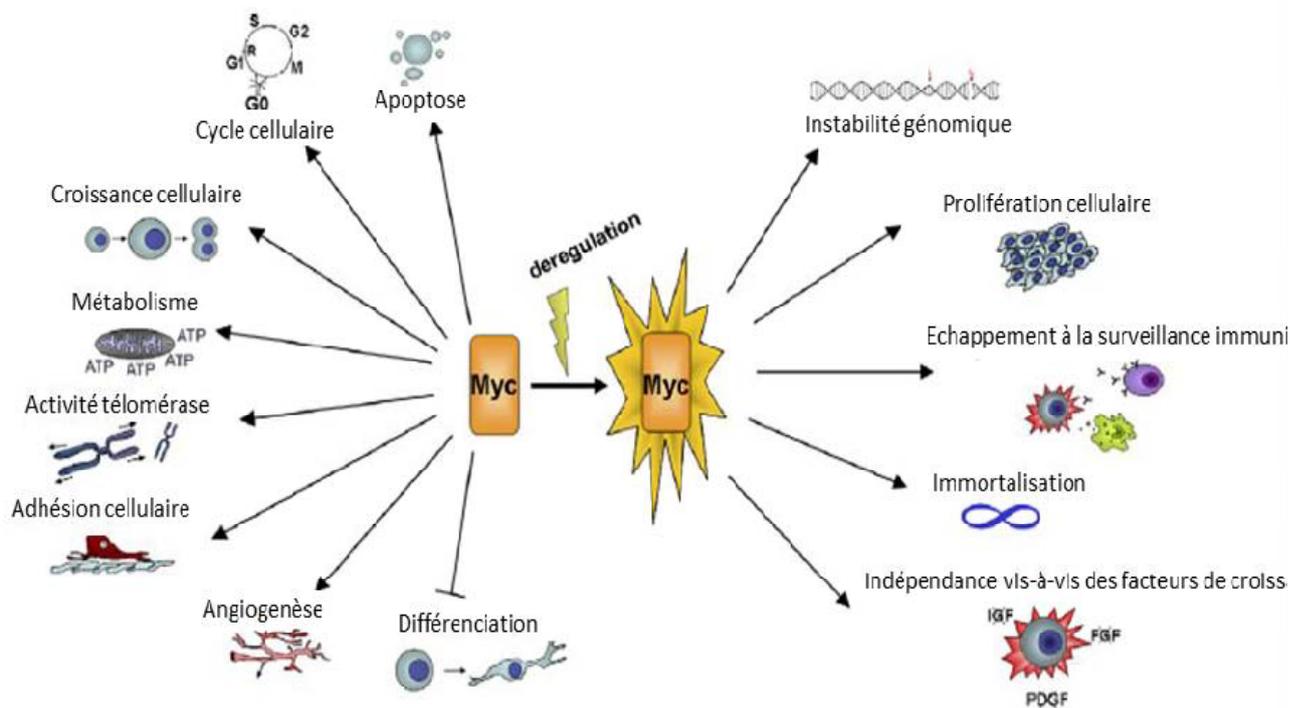
Nature Reviews | Immunology

Figure 19 : Mimétisme de CD40 par LMP1 et activation de la voie NF-κB

*D'après Thorley-Lawson<sup>110</sup>*

### II.3.2.2 c-MYC

Le facteur de transcription MYC est un régulateur clé de nombreuses activités biologiques telles que la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose<sup>116</sup> (**Figure 20**). De ce fait, un large spectre de cancers humains tels que les cancers hématopoïétiques, du sein, du colon, les cancers gastriques, les glioblastomes ou encore les mélanomes présente une expression élevée ou dérégulée de MYC<sup>117</sup>.



**Figure 20 : Mécanismes cellulaires contrôlés par MYC dans des conditions normales et lors de la tumorigenèse**

**MYC est un régulateur clé de nombreuses activités biologiques telles que la croissance cellulaire, la progression dans le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose, le métabolisme, l'adhésion cellulaire, l'instabilité génomique ou encore l'angiogenèse.**

**FGF: Fibroblast Growth Factor; IGF: Insuline-like Growth Factor; PDGF: Platelet Derived Growth Factor**

***D'après Vita and Henriksson<sup>116</sup>***

Les altérations de c-MYC dans les LBDGC peuvent être dues à des translocations (5 à 14%), un gain de copie (une à deux copies du gène) (19 à 38%), une amplification (nombre de copie du gène supérieur à trois) (2%) ou encore à des mutations (32%)<sup>62,118</sup>.

Les translocations peuvent être associées avec les loci de *IgH*, mais à la différence des lymphomes de Burkitt, elles sont plus fréquentes avec des loci de *IgL*<sup>119</sup>

Les mutations peuvent induire un changement de promoteur de P2 à P1 comme dans le lymphome de Burkitt, ou encore modifier le profil de phosphorylation de c-MYC permettant ainsi d'augmenter la stabilité de la protéine<sup>62</sup>.

Les altérations de c-MYC dans les LBDGC sont associées à une diminution du taux de survie des patients. On ne sait pas si le mauvais pronostic est attribuable aux altérations de *c-MYC* seules, ou au fait que 58 à 83% des translocations de c-MYC dans les LBDGC sont associées à une ou deux autres translocations touchant les gènes *BCL2* et/ou *BCL6*<sup>120</sup>.

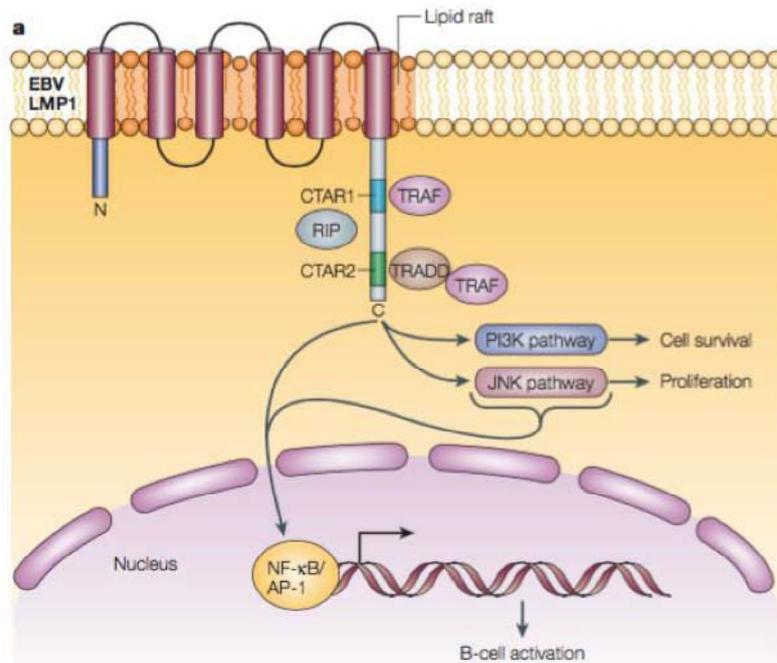
Parmi les sous-groupes de LBDGC, les LBDGC-ABC ont la plus forte expression de c-MYC. La stimulation des cellules B normales par une variété de récepteurs de surface cellulaires augmente l'expression de c-MYC et, en particulier, la voie de signalisation NF-κB

peut augmenter la transcription de c-MYC<sup>121</sup>. Par conséquent, l'activité constitutive de la voie NF- $\kappa$ B dans les LBDGC-ABC peut contribuer à l'expression élevée de c-MYC. Cependant, la régulation transcriptionnelle de c-MYC est complexe et il est peu probable que ce soit l'explication complète de l'expression élevée de c-MYC dans ce sous-type de LBDGC.

Kaiser et al ont identifié que c-MYC est une cible directe de EBNA2<sup>96</sup>. c-MYC est l'un des deux facteurs majeurs de transcription du programme de la latence III. Dans le transcriptome établi grâce à une puce « lymphome », il a été démontré que, la plupart des gènes induits sont régulés positivement par c-MYC, et impliqués dans la prolifération cellulaire. L'inactivation de c-MYC par le biais d'un inhibiteur chimique conduit à l'arrêt de prolifération des LCLs, ce qui confirme les données obtenues par transcriptomique. Plus récemment, David A et al ont montré que la surexpression de c-MYC conduit à la prolifération des cellules B immortalisées en programme de latence III, d'une manière dépendante de NF- $\kappa$ B<sup>122</sup>. c-MYC apparaît comme un acteur majeur de la prolifération des cellules B immortalisées par l'EBV.

### II.3.2.3 La voie de signalisation PI3K/AKT

LMP1 stimule l'activité de PI3K, en induisant la phosphorylation et l'activation d'Akt (cible située en aval de PI3K) et en favorisant la survie cellulaire<sup>123</sup>. En plus de bloquer la transduction du signal BCR, LMP2A active la voie PI3K/Akt, en induisant la phosphorylation d'Akt. L'activation de cette voie de signalisation agit comme un signal de survie des cellules B et des cellules épithéliales infectées. La protéine membranaire LMP1 peut interagir avec différentes protéines TRADD et TRAF, conduisant à l'activation des cellules B par l'induction des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B. Les voies PI3K et JNK sont consécutivement activées, ce qui permet la survie cellulaire et la prolifération des lymphocytes B infectés (**Figure 21**).



*Figure 21: Détournement de la voie PI3K/Akt par LMP1*

*D'après Young et al<sup>123</sup>*

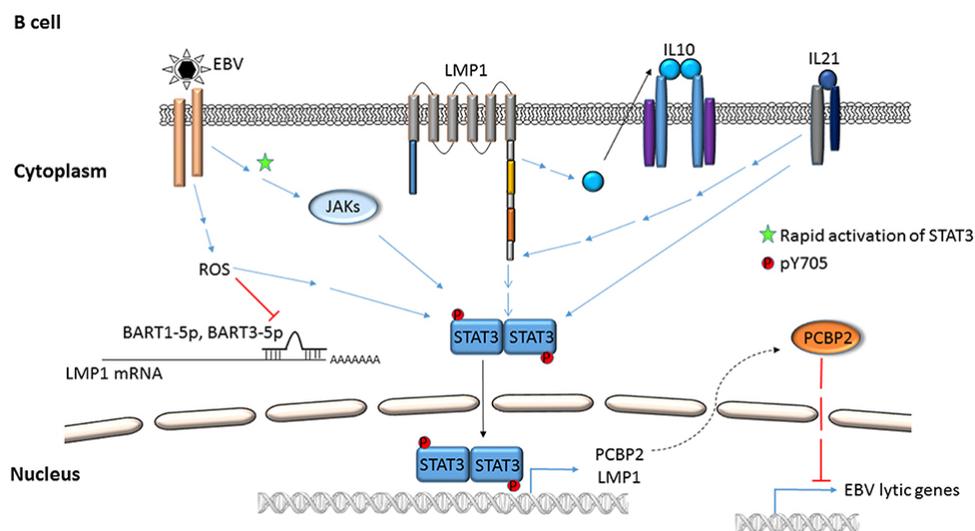
### II.3.2.4 La voie de signalisation JNK

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, la protéine membranaire LMP1 conduit à l'activation de la voie JNK, par l'activation en aval des protéines TRAF et TRADD<sup>124</sup>. TRAF1 est un régulateur essentiel de la signalisation JNK par le domaine de liaison TRAF de LMP1. LMP1 augmente l'activité des voies de signalisation JNK, p38, ERK et la voie canonique de NF- $\kappa$ B, via son domaine CTAR1/TES1<sup>124</sup>.

### II.3.2.5 La voie de signalisation JAK/STAT

Il existe quatre protéines JAK (Janus Activated Kinase) : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. La kinase JAK3 est exprimée seulement dans les lymphocytes B et T. La famille STAT (Signal Transducers Activators of Transcription) comporte sept membres : STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6. Les protéines STAT sont cytoplasmiques et leur translocation nucléaire est activée par phosphorylation par les kinases JAK. Ces dernières sont activées en réponse aux interférons par autophosphorylation après fixation sur des récepteurs cellulaires<sup>83</sup>. Les dimères STAT se fixent sur des éléments ISRE (Interferon-Stimulated Response Element) et GAS (interferon-Gamma Activation Site) présents au niveau des promoteurs de gènes impliqués dans des processus d'apoptose (Bcl-xl) et de prolifération cellulaire (Cycline D1). Zhang et al ont montré<sup>73</sup> que des niveaux élevés d'expression des protéines STAT-1, -2, -3 et 5A sont associés à la latence de type III de l'EBV. LMP1 est responsable de l'induction des STAT-1, -2, -3, et l'expression de STAT-1 peut être impliquée dans le processus de transformation des lymphocytes B. La signalisation de LMP1 induit la production de l'IFN- $\gamma$ , qui, par une voie autocrine, conduit à la phosphorylation des résidus Tyrosines de STAT1 et à l'expression des gènes cibles de cette dernière.

La liaison / entrée par l'EBV active rapidement STAT3 via les kinases Janus, c'est-à-dire la phosphorylation de STAT3 en Y705 via ROS, des cytokines cellulaires (IL10, IL21) (**Figure 22**).



*Figure 22: Mécanismes d'activation de STAT3 par LMP1*

*La liaison / entrée par EBV active rapidement STAT3 via les kinases Janus, phosphorylation de STAT3 en Y705 via ROS, des cytokines cellulaires (IL10, IL21).*

*D'après Xiaofan Li and Sumita Bhaduri-McIntosh<sup>125</sup>*

### II.3.2.6 La voie de signalisation P38/MAPK

LMP1 conduit à l'activation de la voie P38/MAPK, induisant l'expression des interleukines 6 et 8<sup>126</sup>. La voie de signalisation de P38 conduit également à la surexpression de LMP. LMP-1 induit l'activation des kinases JNK and p38 majoritairement grâce au domaine CTAR2 dans les cellules épithéliales mais peut aussi être médiée par le CTAR1 dans les lymphocytes<sup>126</sup> (Figure 23).

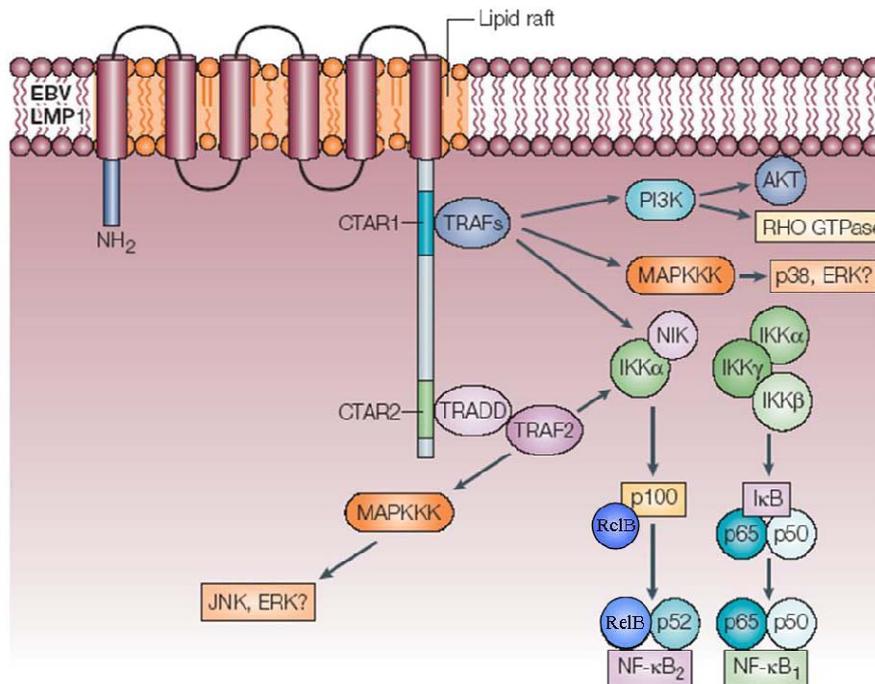


Figure 23 : Représentation schématique des différentes voies de signalisation pouvant être induite par LMP1

**Voie NF-κB (canonique et non canonique), voie des MAPK (p38, JNK et ERK) et voie des PI3K.**

*D'après Young and Rickinson<sup>92</sup>*

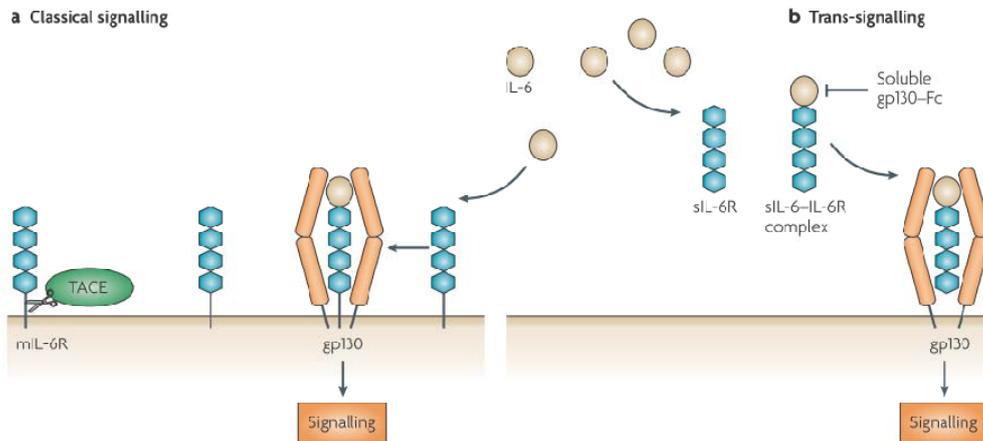
### II.3.2.7 La voie de signalisation IL-6

L'interleukine-6 est une cytokine pléiotropique caractérisée par sa capacité à promouvoir l'expansion et l'activation des cellules T, la différenciation des cellules B et la régulation de la réponse aigue.

L'IL-6 exerce ses effets biologiques via deux mécanismes (Figure 24) :

- La voie classique : elle consiste en l'induction du signal via un complexe tétramérique constitué de la sous unité IL-6R $\alpha$  membranaire, de l'IL-6 et de deux sous unités gp130 ; ou hexamérique constitué de deux sous unités alpha, deux cytokines IL-6 et de deux sous unités gp130. Cette voie est activée uniquement dans les cellules exprimant l'IL-6R $\alpha$ .
- La voie trans-signalétique : appelée aussi la voie alternative, elle consiste en l'obtention de la forme soluble du récepteur après le clivage de l'IL-6R $\alpha$  membranaire

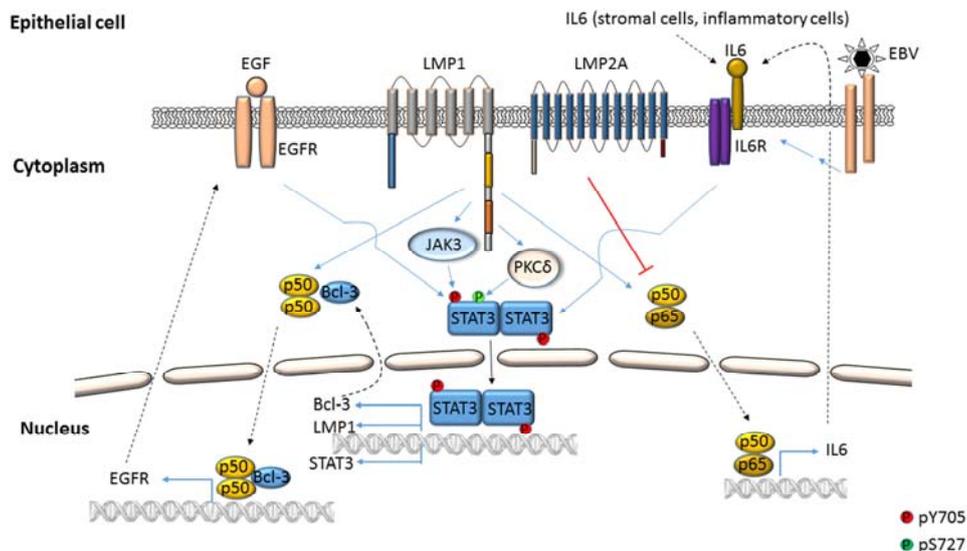
par l'enzyme TACE, qui forme alors un complexe actif avec la cytokine IL-6 pour se fixer à la gp130. Cette voie est activée dans les cellules qui n'expriment pas l'IL-6R $\alpha$ . En ce qui concerne l'activation de STAT3 par LMP1 via la voie IL-6, cela a été rapporté principalement dans les cellules épithéliales (**Figure 25**). Certaines de ces tumeurs principalement le carcinome indifférencié du nasopharynx ont également montré une augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-6, en augmentant l'activation de STAT3<sup>125</sup>.



**Figure 24:** La signalisation de l'IL-6 via la voie classique (a) et la voie trans-signaling (b)

*La signalisation via le récepteur conduit à l'activation des Janus kinas (JAK) induisant l'activation d'autres voies impliquant les STAT, les MAPK, et la PI3K. L'activation des STAT diffère selon la voie de signalisation engagée. En effet, la signalisation via la voie classique permet l'activation de l'homodimère ou l'hétérodimère STAT-1/STAT3 alors que la voie trans-signaling engage la STAT3<sup>127</sup>*

*D'après Kopf et al<sup>128</sup>*



**Figure 25:** Mécanisme d'action de STAT3 et IL-6

*STAT3 peut être phosphorylé en Y705 par LMP1 grâce à la coopération de cellules des protéines telles que NFκB, IL-6, EGFR et Janus kinas. LMP1 peut également provoquer la phosphorylation de STAT3 en S 727 via PKCδ.*

*D'après Xiaofan Li and Sumita Bhaduri-McIntosh<sup>125</sup>*

### II.3.3 Rôle du microenvironnement tumoral

#### II.3.3.1 Contrôle de l'infection par le système immunitaire

La forte prévalence de l'EBV chez les sujets immunocompétents suggère que le virus a développé des mécanismes d'échappement au système immunitaire. De fait, le réservoir des lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV est quasiment invisible au système immunitaire puisque l'EBV y est en latence 0 dans les cellules quiescentes, n'exprimant aucune protéine, et en latence I dans les cellules en cycle, n'exprimant qu'EBNA1, et cela de façon transitoire.

Dans le cas de pathologies associées à l'EBV, LMP1 est hautement dérégulée et devient abondante dans la cellule tumorale, promouvant alors la croissance cellulaire, la résistance à l'apoptose et la progression tumorale. Cette protéine module, par différents mécanismes, la réponse immunitaire de l'hôte, notamment par la sécrétion de cytokines, de chimiokines ou encore d'exosomes<sup>102</sup> (**Figure 26**). Dans le même temps, il a été montré qu'il existe une pression de sélection sur les protéines EBNA3 et LMP2A pour la conservation des épitopes les plus immunogènes pour la réponse T cytotoxique<sup>129</sup>. Ceci témoigne de l'importance de l'équilibre hôte-virus dans la biologie de l'EBV, en perpétuation au travers des âges.

*La résolution de la primo-infection, le plus souvent bénigne et asymptomatique, est due à une réponse immune T cytotoxique vigoureuse. Cependant, le virus persiste à l'état latent dans le réservoir B mémoire et peut-être associé à différents cancers tels que des lymphomes B.*

*Plusieurs études ont montré que le modèle de prolifération induit par l'EBV résulte d'un équilibre subtil entre l'activation simultanée de facteurs impliqués dans la prolifération et la survie et de facteurs impliqués dans la mort cellulaire. Dans les LBDGC EBV+, le virus infecte préférentiellement les cellules B par le récepteur CD21 et établit une latence à long terme caractérisée par une forte régulation négative de l'expression des gènes viraux afin de faciliter l'évasion de la réponse immunitaire et la persistance du virus chez l'hôte immunocompétent. Les cellules infectées resteront, dans des conditions normales, stables au cours des années dans les cellules B mémoires, à moins que la personne ne développe une immunosuppression. Bien que les anticorps anti-protéines membranaires virales puissent contrecarrer l'infectivité du virus, la réponse immunitaire cellulaire, composé de cellules T CD4 + et CD8 +, est nécessaire pour contrôler la primo-infection et pour reconnaître et éliminer les cellules B infectées de manière latente ciblant à la fois les antigènes lytiques et de latence<sup>130</sup>.*

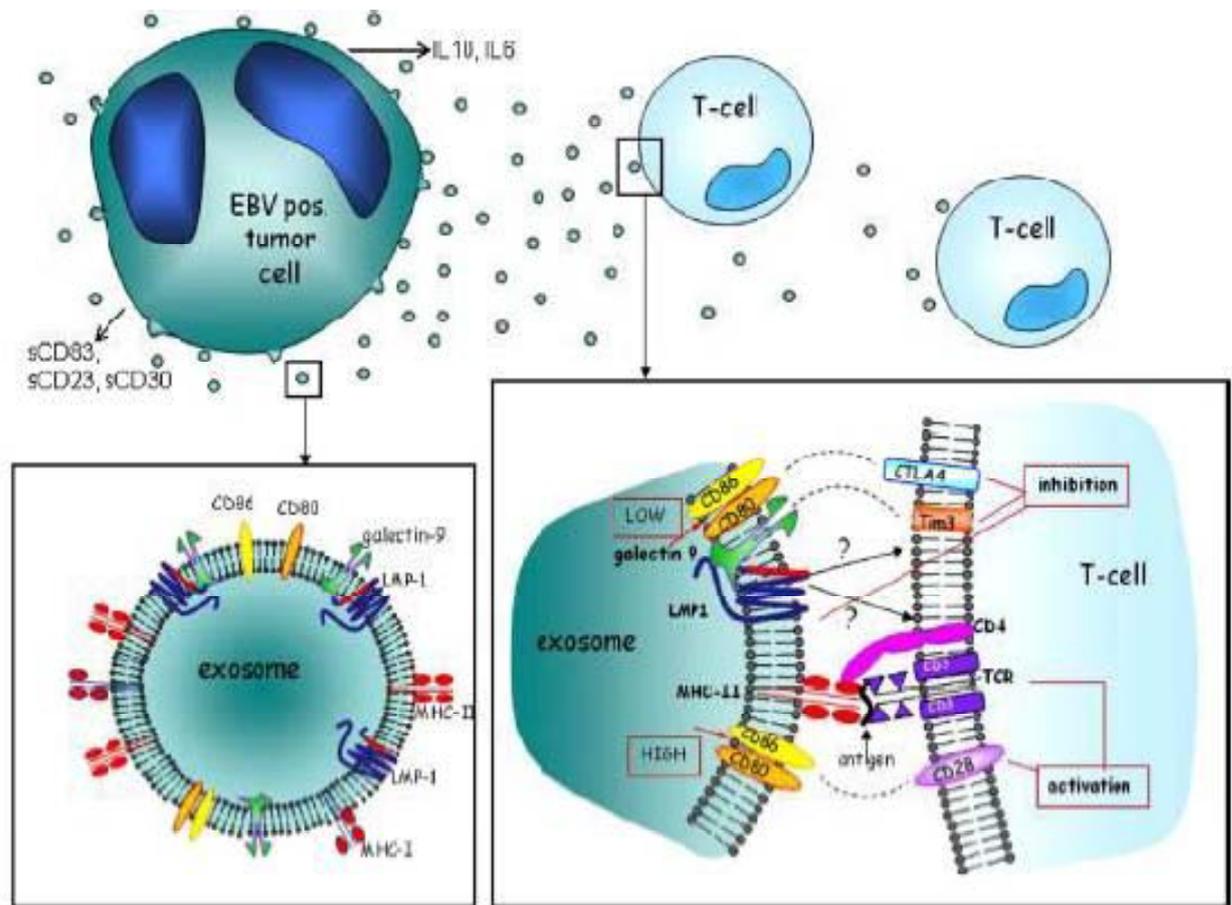


Figure 26: Les effets immunomodulateurs de LMP1

*LMP1 peut influencer la sécrétion de cytokines ou de chimiokines ou de récepteurs immunomodulateurs. Il peut affecter le taux de renouvellement de protéines et peut immunomoduler la sécrétion d'exosomes. Ces exosomes LMP1-positifs peuvent alors entrer en contact avec le TCR via le CMH et des récepteurs de co-interaction, permettant la fusion entre l'exosome et la cellule T. LMP1 peut ainsi perturber la signalisation de la cellule T, aboutissant par exemple à l'induction de l'anergie.*

*D'après Middeldorp and Pegtel<sup>131</sup>*

### II.3.3.2 Le concept de cancer immunoediting

Le concept de **cancer immunoediting** décrit par Schreiber et al<sup>126</sup> définit les différentes étapes de la progression tumorale : élimination, équilibre puis échappement de la cellule tumorale à son environnement immunitaire. La cellule tumorale peut échapper à la lyse par une cellule cytotoxique T CD8+ selon différents mécanismes, comme la non-reconnaissance (via la diminution ou l'absence d'expression de molécules du CMH de classe I) mais aussi par l'échappement via l'expression de certaines molécules — les immune-checkpoints —, dont l'attachement à leur récepteur sur les cellules immunitaires module et/ou inhibe la réponse immune.

Ainsi, l'interaction entre le récepteur PD-1, exprimé par les lymphocytes T et B, et son ligand PD-L1, exprimé par les cellules tumorales et par les cellules immunitaires et notamment par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) induit une inhibition des lymphocytes T effecteurs et joue ainsi un rôle clé dans l'échappement tumoral à la réponse immunitaire.

Les trois phases essentielles sont : phase d'élimination ; phase d'équilibre et phase d'échappement (**Figure 27**).

*1) Phase d'élimination*

Durant cette phase, le système immunitaire reconnaît et élimine les cellules tumorales transformées suite à des modifications intrinsèques (ex : mutation ou inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs) via les éléments de l'immunité innée et adaptative (les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules NK, les cellules TCD4+ et CD8+).

L'élimination complète des tumeurs n'est pas souvent le cas menant à la deuxième phase qui est la phase d'équilibre.

*2) Phase d'équilibre*

C'est une phase temporaire caractérisée par l'établissement d'un équilibre entre le système immunitaire et les cellules tumorales échappées de la première phase. Ces dernières, confèrent plus de modifications génomiques, accumulant des mutations au niveau de l'ADN et changeant le profil d'expression de gènes. En parallèle, le système immunitaire élimine les tumeurs et crée une sorte d'équilibre mais sans toutefois réussir à les éliminer. Les tumeurs restantes forment des clones résistants qui s'échappent à l'immunité anti-tumorale.

*3) Phase d'échappement*

Durant cette phase, le système immunitaire est incapable de bloquer la croissance tumorale. Les cellules tumorales se servent des cellules immunitaires pour leurs croissances et leurs invasions.

Plusieurs mécanismes d'échappements sont employés par la tumeur incluant l'échappement à la présentation d'antigènes tumoraux, l'expression et la sécrétion des molécules inhibitrices des cellules immunitaires telles que l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO), la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-6) et le recrutement des sous populations immunorégulatrices comme les T régulateurs (Treg) et les macrophages associés aux tumeurs (TAM) (**Figure 28**).

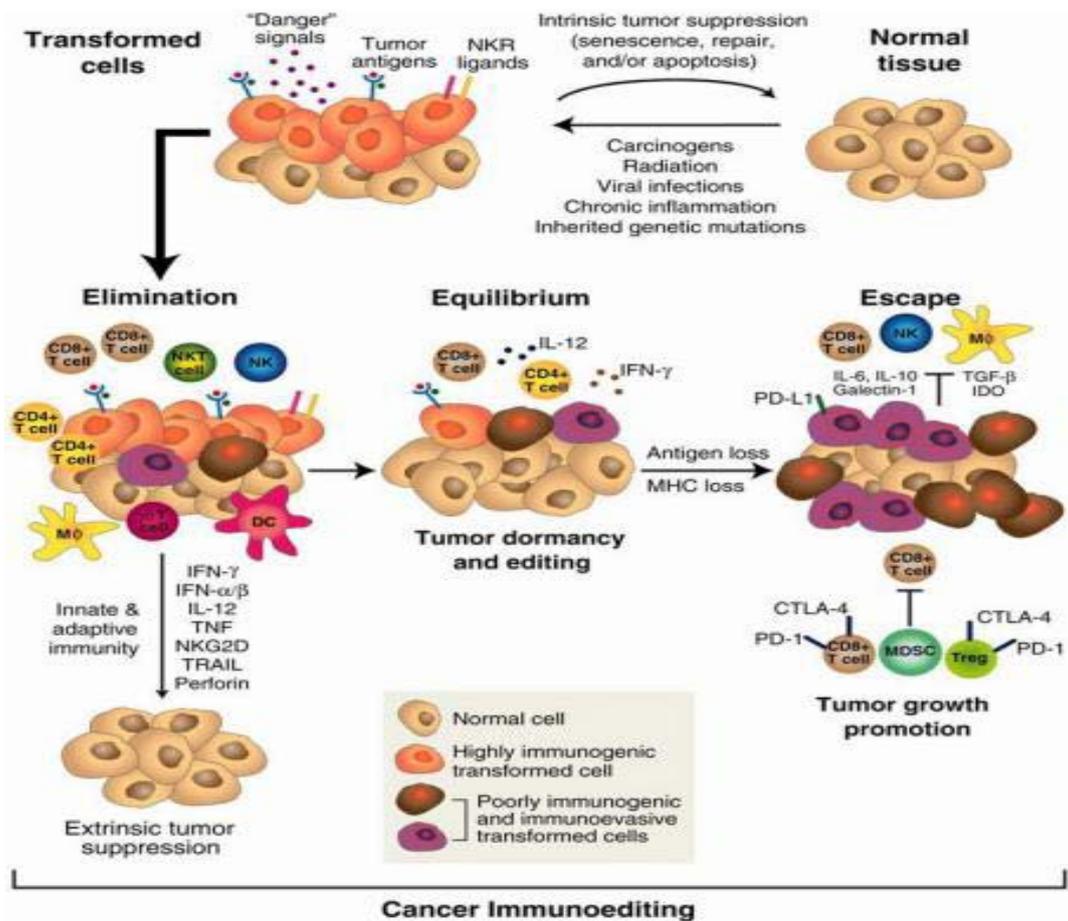


Figure 27: Le concept d'immunoediting

D'après Schreiber et al<sup>126</sup>

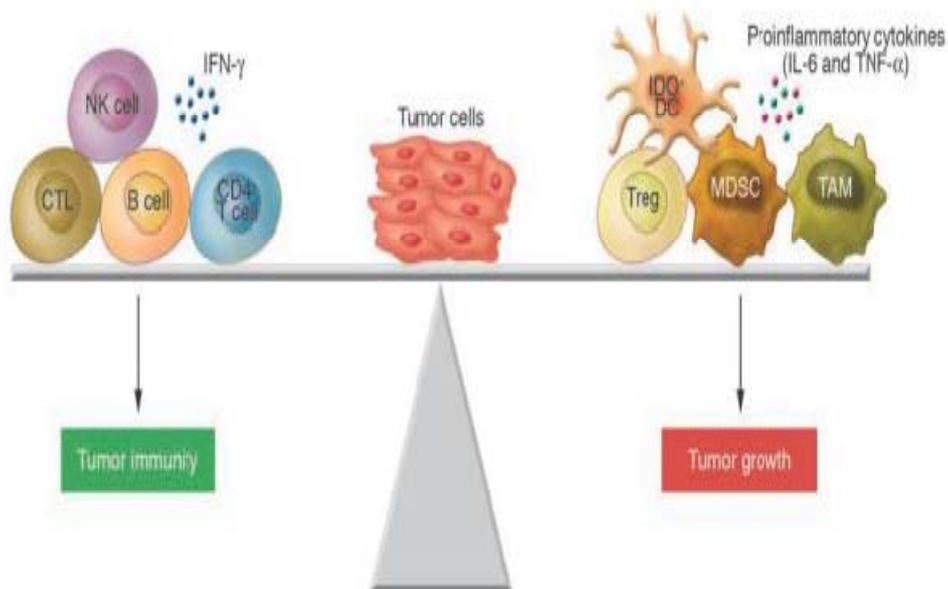


Figure 28: Rôle des cellules immunitaires et les cytokines produites dans l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil pro-ou anti-tumoral.

D'après Bhardwaj<sup>132</sup>

### II.3.3.3 Les cellules immunitaires infiltrant le microenvironnement tumoral

Dans les tumeurs solides, le ME est un environnement hétérogène constitué de cellules tumorales et du stroma contenant des fibroblastes, cellules endothéliales et des cellules leucocytaires : les TAM, les lymphocytes T (Th1/Th2/Th17 et les Treg), les lymphocytes B, les cellules Natural killer (NK), les Neutrophiles, les cellules dendritiques et les mastocytes<sup>133</sup>.

L'interaction entre les tumeurs et les cellules immunitaires via les cytokines vont influencer la réponse immunitaire vers un profil pro- ou anti-tumoral. Nombreuses sont les tumeurs solides caractérisées par une importante infiltration des lymphocytes. Ces derniers jouent un rôle dual dans la progression tumorale. Les données de littératures ont associé l'infiltration des LT au bon ou au mauvais pronostic chez les patients cancéreux<sup>134</sup>. En effet, les lymphocytes Th1 et LTc jouent un rôle important dans la réponse cellulaire anti-tumorale, mais elles demeurent inefficaces dans le contrôle de la croissance tumorale dans un contexte favorisant la présence de Treg et de cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) qui ont la capacité d'inhiber la prolifération des LT. Des données cumulatives sur plusieurs types de cancer ont démontré que l'infiltration des Treg dans le site tumoral est beaucoup plus fréquemment liée au mauvais pronostic qu'au bon pronostic chez les patients cancéreux<sup>134,135</sup>.

#### La balance Th1/Th2

Les caractéristiques des sous populations lymphocytaires (T helper) dans l'immunité anti tumorale sont déterminées selon le profil cytokinique<sup>136</sup>. Les Th1 sont caractérisées principalement par la production d'IFN- $\gamma$  et d'autres cytokines favorisant l'immunité à médiation cellulaire, alors que les Th2 produisent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et tendent à médier l'immunité humorale<sup>137</sup>. La voie Th1 est essentielle dans l'immunité anti-tumorale en favorisant la destruction des cellules tumorales via les LT cytotoxiques. La voie Th2 inhibe la voie Th1 et régule négativement la réponse anti-tumorale. La balance Th1/Th2 est cruciale dans la réponse anti-tumorale. En effet, une plasticité des cellules Th (de la voie Th1 vers la voie Th2) est observée au cours de la progression tumorale<sup>138</sup> et elle est liée à l'inefficacité de la réponse anti-tumorale à médiation cellulaire. Même si la voie Th2 est incriminée dans la progression tumorale, elle est aussi impliquée dans la réponse anti-tumorale. L'effet anti-tumoral des Th2 pourrait être médié par l'activation des macrophages produisant des ROS et le monoxyde d'azote<sup>139</sup>.

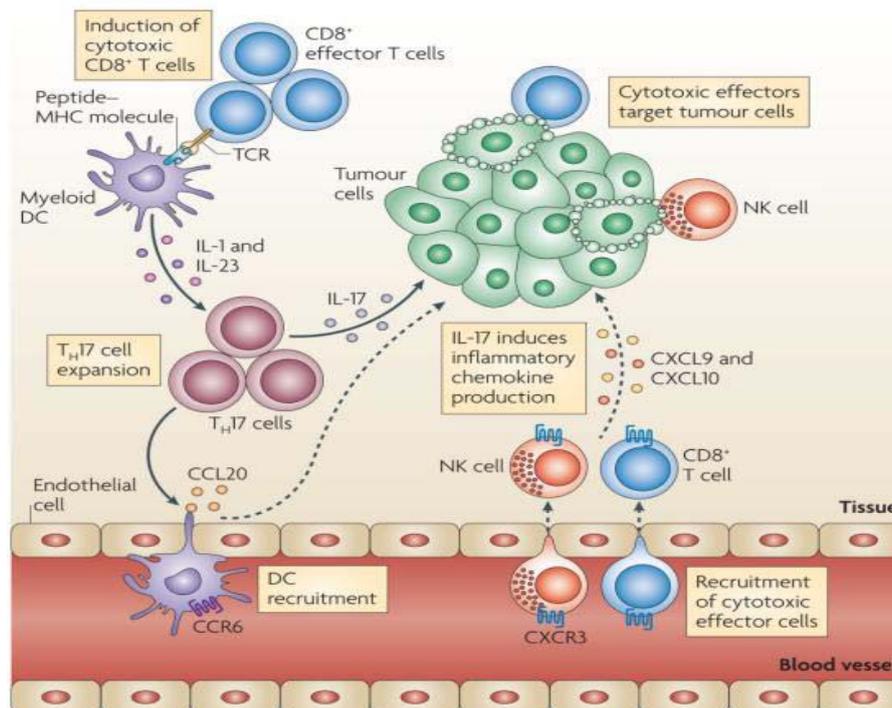
#### Les cellules Th17

Des études ont démontré que la proportion de cellules Th17 dans le ME des patients cancéreux et des sujets sains n'était pas différente. Cependant, un nombre élevé des cellules Th17 est trouvé dans le ME tumoral comparé aux tissus normaux suggérant que les Th17 ont été induites ou recrutées vers le site tumoral<sup>140</sup>. Les Th17 diffèrent des autres LT effecteurs et des Treg par l'absence ou la faible expression des marqueurs (HLA-DR, CD25, Granzyme B pour LT effecteurs) et FOXP3 pour les Treg.

En effet, les Th17 expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et produisent de l'IL-21, une cytokine clé permettant la prolifération des Th17 de manière autocrine<sup>139</sup>. Les Th17 infiltrant le ME tumoral expriment l'IL-17, IL-2, GM-CSF, IFN- $\gamma$  et le TNF- $\alpha$ <sup>140</sup>. L'induction des Th17 par l'IL-6 et le TGF- $\beta$  est controversée. Le TGF- $\beta$  est essentiel dans le développement des Th17 mais des forts taux du TGF- $\beta$  favoriseraient le développement des Treg et inhiberaient par conséquent la différenciation des Th17. Une forte expression d'IL-6 et de TGF- $\beta$  est observée dans le ME tumoral<sup>141</sup> ce qui pourrait expliquer la densité des cellules Th17

présentes dans le ME tumoral. Mais, la proportion des Th17 reste inférieure à celle des Treg<sup>140</sup> (**Figure 29**).

Tout étant la cytokine clé des cellules Th17, l'activité de l'IL-17 ne reflète pas l'activité des cellules Th17. En effet, l'effet pro-tumoral est attribué à la cytokine IL-17 plutôt qu'aux cellules Th17. Les cellules cibles de l'IL-17 dans le microenvironnement tumoral sont multiples comme les cellules endothéliales, les cellules stromales et les cellules tumorales. L'IL-17 induit l'expression de l'IL-6 par les cellules tumorales et dans le stroma qui à son tour active le facteur de transcription STAT3 régulant positivement les gènes de survie et de l'angiogénèse<sup>141</sup>.



*Figure 29 : Les cellules Th17 et l'immunité anti-tumorale.*

*D'après Zou et al<sup>141</sup>*

### ✚ Les cellules T régulatrices

Les Treg constituent une sous population des LT exprimant le facteur de transcription FOXP3, caractérisée par son rôle dans le maintien de la tolérance aux antigènes du soi mais aussi dans la répression de la réponse immunitaire<sup>142</sup>.

On distingue deux catégories de Treg :

- Les Treg naturelles (nTreg) : Ils se développent dans le thymus et maintiennent-la tolérance cellulaire d'une manière antigène indépendant.
- Les Treg induites (iTreg) : Ils se développent à la périphérie en réponse aux antigènes du soi ou tumoraux à partir des LT CD4+ naïfs<sup>143</sup>. Selon les cytokines produites, les iTreg sont subdivisées en Tr1 caractérisés par l'expression de l'IL-10 et Th3 produisant du TGF- $\beta$ <sup>144</sup>. Plusieurs études ont associé le nombre élevé de Treg dans les tumeurs des patients cancéreux avec la progression tumorale, la métastase et une diminution de la survie<sup>144</sup>.

Dans le ME, les Treg peuvent être recrutés ou induites par différents mécanismes<sup>141</sup>. En effet, les nTreg peuvent être recrutés vers le site tumoral via la CCL-22 produite dans le microenvironnement tumoral (**Figure 30**). Mais les Treg peuvent être également induites à partir des cellules T naïves par le TGF- $\beta$ . Les cellules dendritiques ont un rôle important dans l'induction et l'expansion des Treg via la production du TGF- $\beta$ <sup>145</sup>. Ce dernier joue un rôle crucial dans l'établissement de leurs effets immunosuppresseifs dans le microenvironnement tumoral (**Figure 31**) ainsi que son rôle dans la régulation de la survie, différenciation, prolifération et l'apoptose des cellules T.

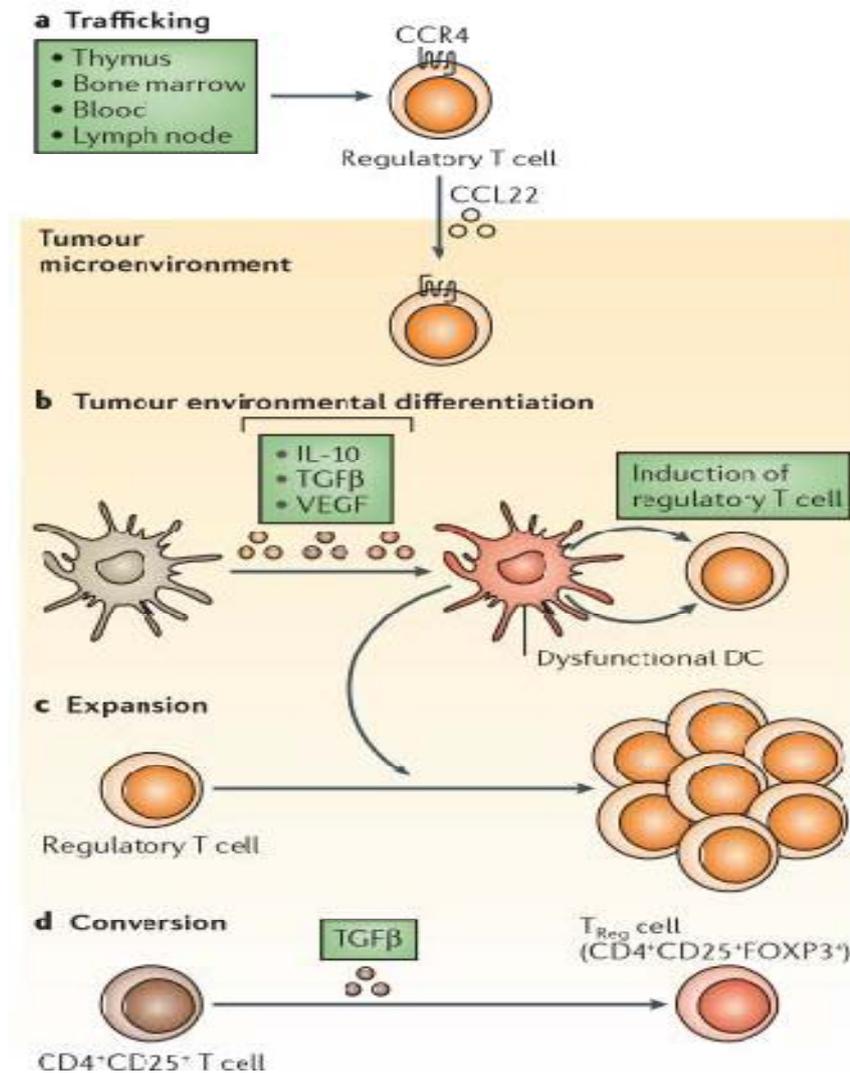
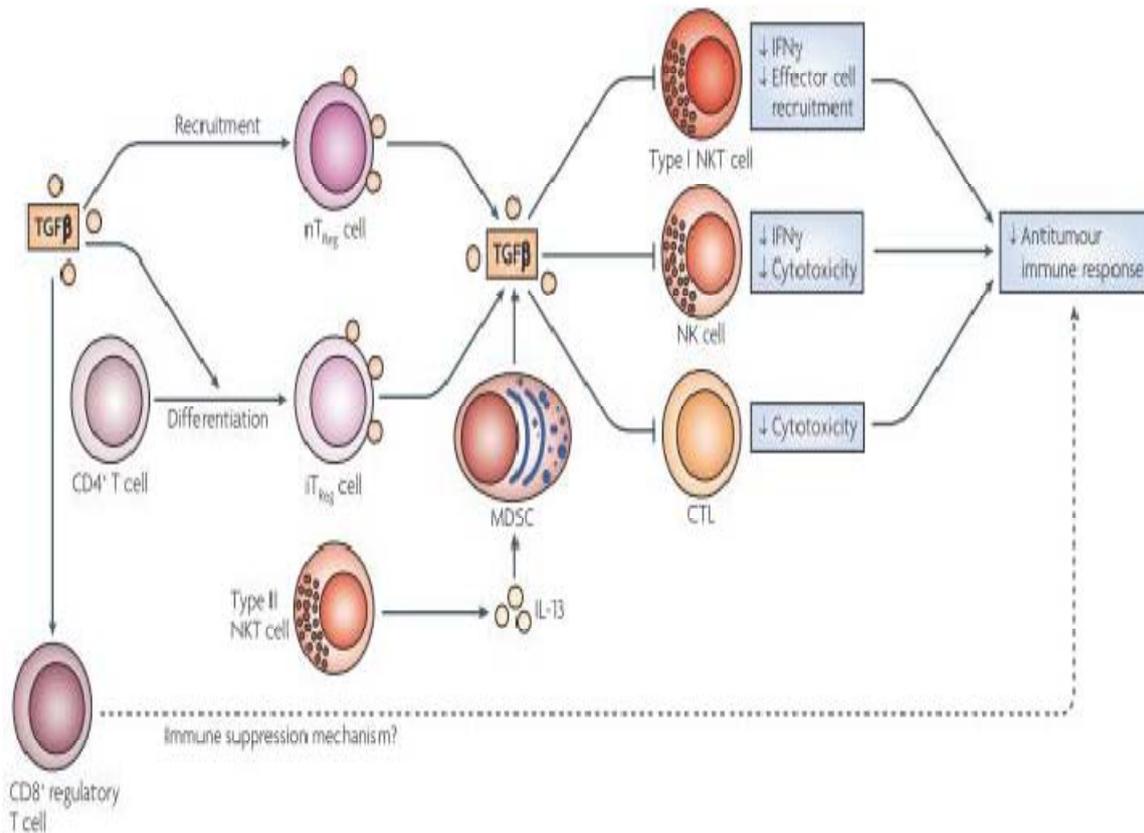


Figure 30 : Recrutement et induction des Treg dans le microenvironnement tumoral.

*D'après Zou et al<sup>141</sup>*



**Figure 31 : L'induction des Treg par le TGF- $\beta$  et son effet immunosuppresseur sur les cellules immunitaires.**

*D'après Flavell et al<sup>146</sup>*

Via STAT3, l'IL-23 favoriserait la prolifération des Treg qui expriment le récepteur IL-23R une fois recrutés au foyer tumoral et par conséquent augmenterait le nombre de Treg intra-tumoral<sup>147</sup>. Les Treg induisent leur effet immunosuppresseur par un contact cellule-cellule ou par l'intermédiaire des facteurs solubles comme les cytokines. L'IL-2 est essentielle pour la survie des cellules T effectrices qui expriment son récepteur. Les Treg entrent en compétition avec les LT en exprimant le récepteur de l'IL-2 empêchant ainsi la liaison de ce dernier à la surface des LT. Les Treg peuvent également induire l'apoptose des cellules T indépendamment de la voie Fas/FasL, et ceci via la voie perforine/granzyme<sup>148</sup>. Une fois activées par les Treg via le CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4), les CPA induisent l'expression de l'IDO impliquée dans le métabolisme du tryptophane. La réduction de cet acide aminé induit l'apoptose des cellules T ou leur anergie. Un autre mécanisme par lequel les Treg induisent leur effet suppressif est à travers l'induction de la molécule B7-H4 à la surface des CPA, celles-ci, à leur tour affectent l'activité des LT<sup>149</sup>. L'ensemble de ces mécanismes souligne l'importance des Treg dans l'échappement et la subversion immunitaire dans les tumeurs<sup>150</sup> (**Figure 32**).

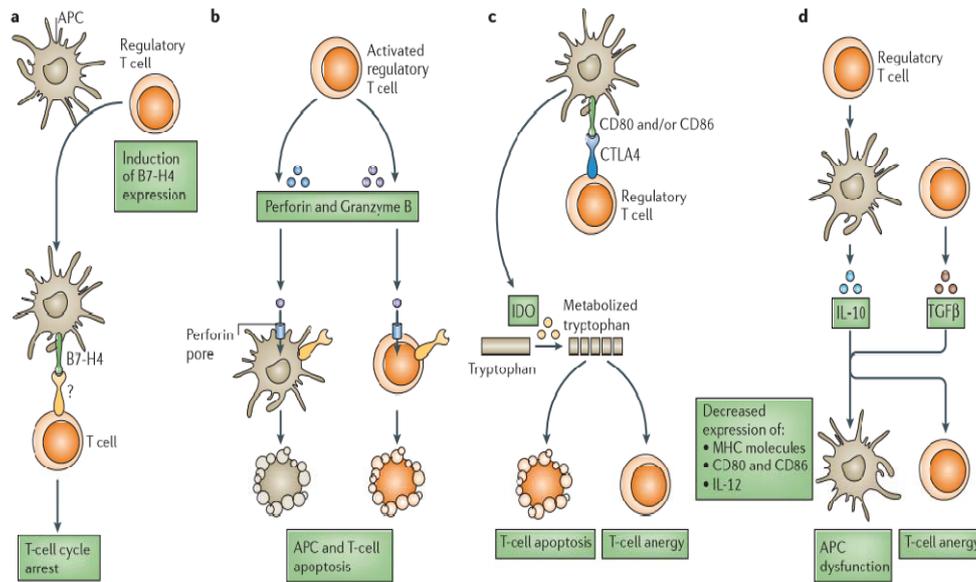


Figure 32 : Les différents mécanismes immunosuppresseurs des cellules T régulatrices dans le microenvironnement tumoral.

D'après Zou et al<sup>141</sup>

### II.3.3.4 Les Treg dans les LBDGC

Des études récentes ont révélé que certaines cellules T de lymphomes pourraient adopter un profil Treg<sup>151</sup>. Ils sont classés en quatre groupes: (a) Tregs suppresseurs; (b) Tregs malins; (c) Tregs tuant directement les tumeurs; et (d) Tregs incompetents (**Figure 33**). La classification en quatre groupes est significative dans la prédiction du pronostic et la conception d'immunothérapies à base de Tregs pour le traitement de ces lymphomes.

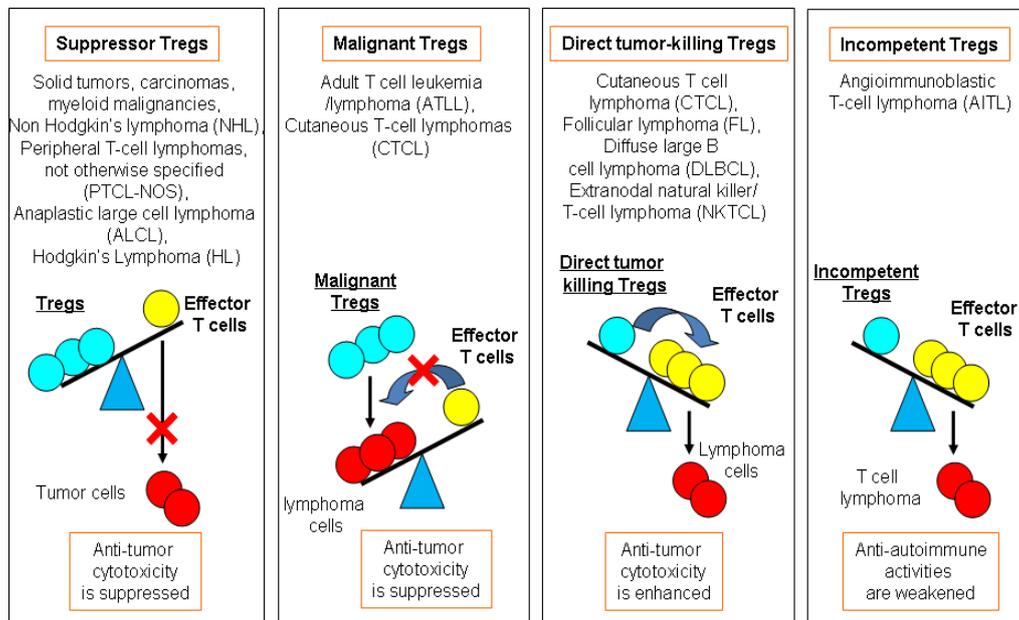


Figure 33: Les différentes fonctions des Treg dans les lymphomes.

D'après Wang et al<sup>151</sup>

Dans un modèle de régression de Cox, en tenant compte des résultats cliniques stades et l'âge, les nombres de FOXP3 + Treg sont de signification pronostique indépendante pour la maladie dans les LBGDC-GC. En revanche, les Tregs sont de mauvais pronostic dans les LBDGC-non GC, ABC. La raison de ces divergences reste obscure, bien que l'expression de FOXP3 + par les cellules Th1 activées peut fournir une explication<sup>152</sup>. Des recherches supplémentaires sont nécessaires sur l'utilité de Tregs comme facteurs pronostic et dans les stratégies thérapeutiques.

### II.3.3.5 Les immune-checkpoints

Les points de contrôle du système immunitaire sont des récepteurs qui interviennent dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires afin de limiter la durée et l'intensité de la réaction immune. Il existe à la surface d'une même cellule des récepteurs co-activateurs (qui renforcent l'activation) et des récepteurs co-inhibiteurs (qui diminuent l'activation) (**Figure 34**). C'est l'équilibre complexe entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs qui détermine si une cellule immunitaire peut s'activer. Ainsi, lorsqu'un lymphocyte T reconnaît son antigène spécifique grâce à son TCR, il ne pourra être activé que si les différents signaux envoyés par ses points de contrôles sont en faveur d'une activation (**Figure 35**). Ce phénomène est physiologiquement très important au quotidien. Il intervient pour prévenir le risque d'auto-immunité (récepteurs inhibiteurs) mais aussi renforcer l'activation du système immunitaire en cas d'infection par exemple (récepteurs activateurs). Il permet aussi de prévenir une réaction excessive du système immunitaire : lorsqu'une réponse immunitaire a lieu, les signaux inflammatoires libérés dans le microenvironnement vont favoriser l'expression de ligands des récepteurs inhibiteurs par les cellules à proximité afin d'éviter un emballement de la réaction immune.

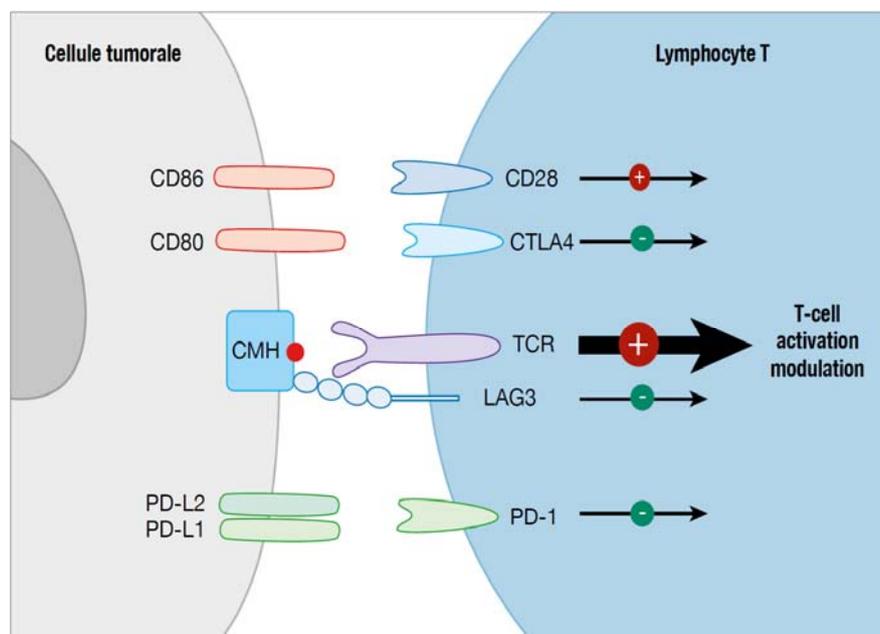


Figure 34 : Représentation schématique des principaux checkpoints immunitaires

**Reconnaissance antigénique du LT par son récepteur TCR. Les checkpoints tels que PD1 et ses ligands PD-L1 et PD-L2 ou CTLA4 modulent l'activation du LT**

*D'après Vagnat et Champiat<sup>153</sup>*

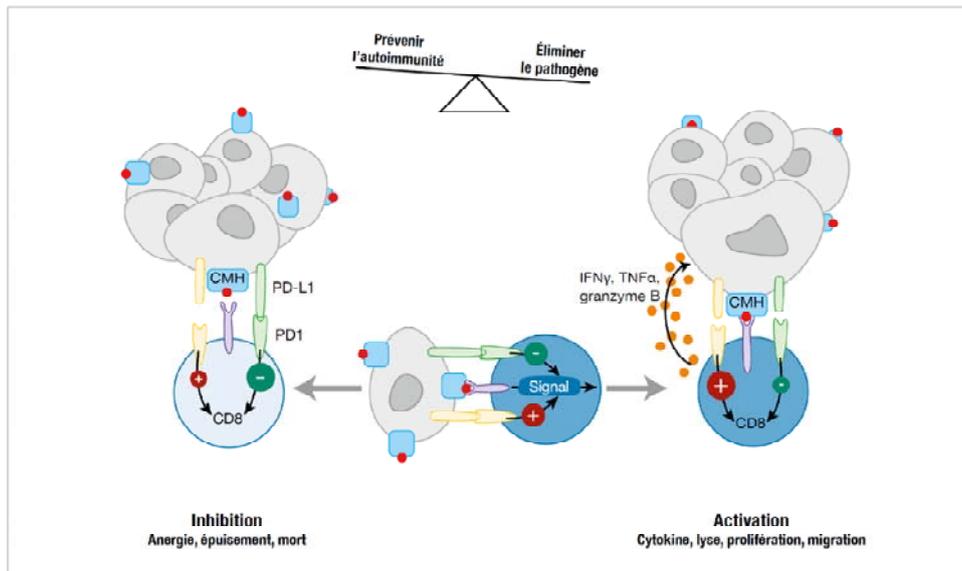


Figure 35 : Les points de contrôle de l'immunité, équilibre entre activation et inhibition

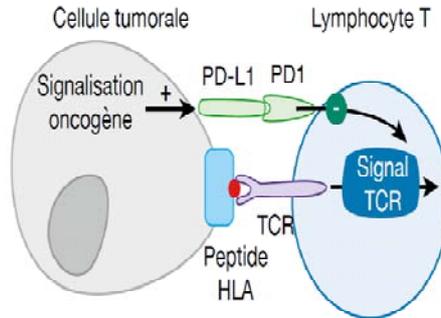
*D'après Vaugnat et Champiat<sup>153</sup>*

Les cellules tumorales sont capables de sur-exprimer à leur surface les ligands des récepteurs inhibiteurs pour échapper au système immunitaire grâce à 2 mécanismes de régulation (Figure 36) :

- **Résistance primaire** : du fait de ses mutations, la cellule tumorale se met à exprimer naturellement les ligands inhibiteurs,
- **Résistance secondaire** se produit en réaction à une attaque par le système immunitaire : lorsque la tumeur est attaquée, la libération de cytokines inflammatoires ( $\text{IFN}\gamma$ ) par les cellules immunes dans le ME favorise l'expression de ligands inhibiteurs à la surface des cellules tumorales.

### Résistance innée

La signalisation constitutive de la tumeur induit l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales



### Résistance adaptative

L'activation des cellules T induit une régulation à la hausse de PD-L1

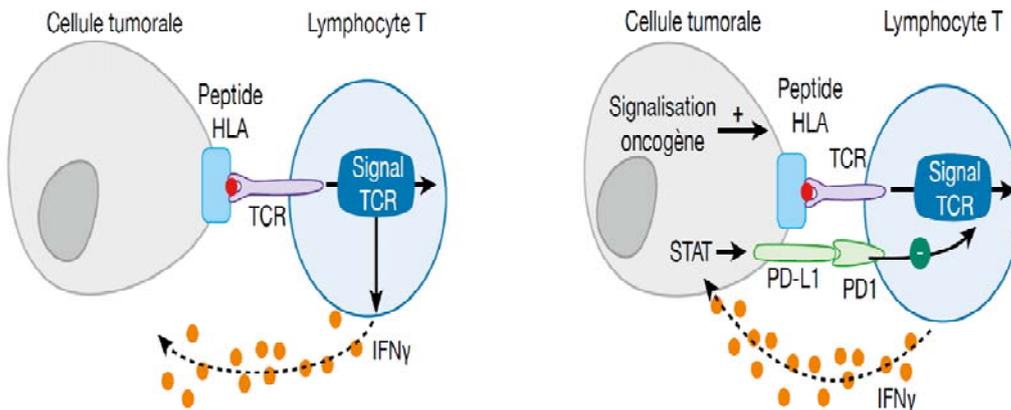


Figure 36: Schéma des mécanismes de résistance au système immunitaire des cellules tumorales

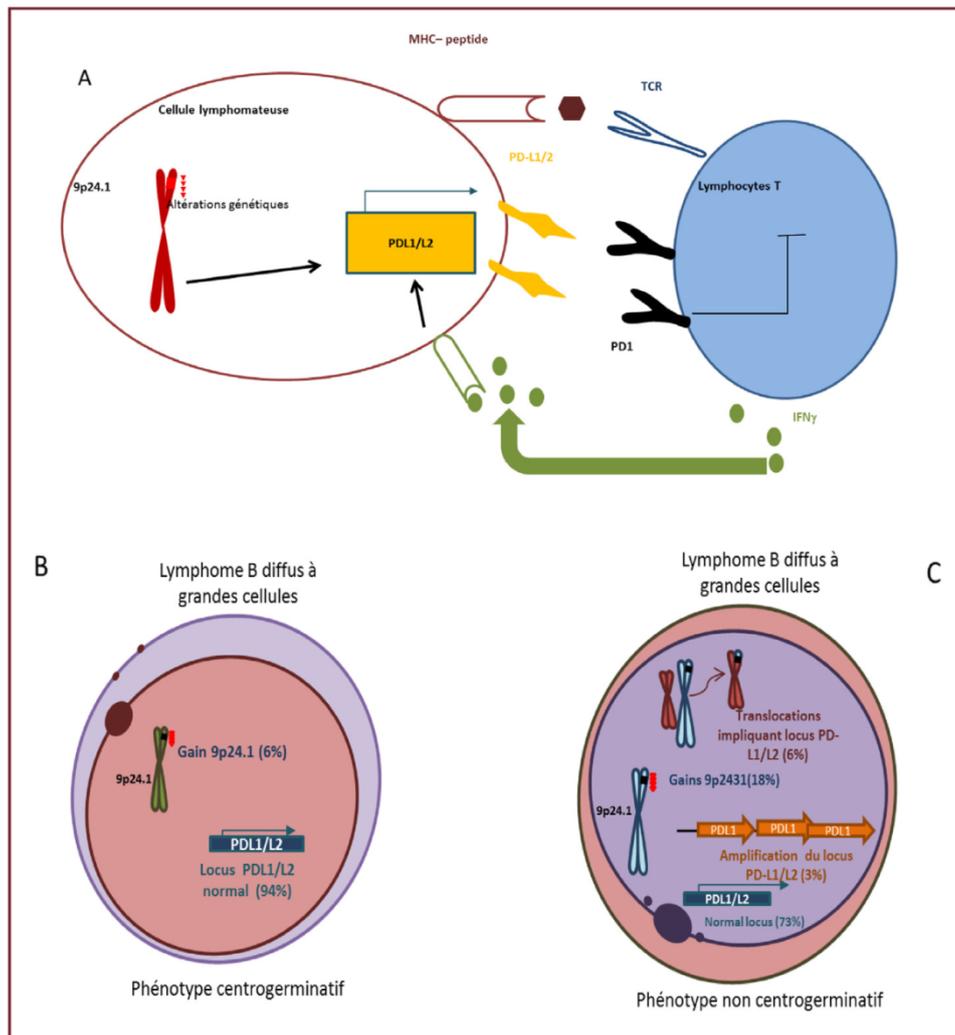
*D'après Vaugnat et Champiat<sup>153</sup>*

#### II.3.3.5.1 Mécanisme à l'origine de l'expression de PDL-1 dans les LBDGC EBV+ NOS

Les ligands de PD-1, que ce soit PD-L1 et/ou PD-L2, peuvent être exprimés à la fois par les cellules tumorales lymphoïdes mais aussi par les cellules immunitaires du ME. L'expression ou la surexpression de PD-L1/PD-L2 par des cellules tumorales lymphoïdes découle majoritairement d'altérations génétiques impliquant le locus PD-L1/L2 ou d'activations de voies de signalisation activant le promoteur de PD-L1 et plus rarement d'un environnement riche en cytokines Th1 particulièrement INF ou IL-10 induisant l'uprégulation de PD-L1<sup>50</sup> (Figure 37). Les altérations génétiques peuvent être des gains, des amplifications de gènes et

des fusions de gènes spécifiques du locus PD-L1/L2 situé sur le chromosome 9p24.1 induisant la surexpression de la protéine PD-L1/L2.

L'infection par EBV induit une activation constitutive de la voie AP1 et de ses composants cJUN et JUN-B activant directement le promoteur de PD-L1 ou via l'activation de JAK3-STAT5<sup>77,154</sup>. D'autres mécanismes ont été également identifiés comme les anomalies moléculaires de JAK2 ou agissant sur l'expression de JAK2 (inhibition du facteur SOCS1 ou micro RNA miR-135a) qui entraîne l'uprégulation de l'expression de PD-L1<sup>155</sup>. Enfin l'activation de la voie JAK/STAT induite par la mutation MYD88 L265P dans les LBDGC peut également induire une uprégulation de PD-L1<sup>60</sup>.



**Figure 37: Différents mécanismes d'expression de PD-L1/PD-L2 par la cellule lymphomateuse.**

**A : Uprégulation de PD-L1 à la surface des cellules tumorales secondaires à des mécanismes intrinsèques (altérations génétiques situées au niveau du chromosome 9p24.1) ou extrinsèques (sécrétion de cytokines inflammatoires comme IFN).** **B et C : Schématisation des différentes anomalies moléculaires du chromosome 9p24.1 impliquant le locus PD-L1/L2 et conduisant à l'uprégulation de la protéine PD-L1 dans les lymphomes B diffus à grandes cellules de phénotype GC (B) et de phénotype non GC (C).**

*D'après Burroni et al<sup>77</sup>*

### II.3.3.5.2 *Expression du PDL-1 dans les LBDGC EBV+ NOS*

Le PD-L1 peut être exprimé par les cellules tumorales et par les cellules du ME comme les macrophages, tandis que PD-1 est habituellement restreint aux lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL)<sup>156</sup>. L'expression de PD-1 est décrite presque exclusivement dans les TIL du ME des LBDGC NOS<sup>157</sup>. Le choix de seuils de positivité différents entre le compartiment tumoral et non tumoral est retrouvé dans les études concernant les tumeurs solides et apporte un élément de confusion. Néanmoins, l'étude de Kiyasu et al a confirmé la corrélation positive entre l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et le sous-type non GC de LBDGC ainsi que l'association forte entre l'expression de PD-L1 et la présence d'EBV<sup>156</sup>. Ce dernier résultat est en accord avec d'autres études visant à analyser le lien entre lymphoprolifération et EBV comme dans les LBDGC EBV+ (100 % de cellules tumorales PD-L1+). la positivité de PD-L1 a été également rapportée dans des tumeurs EBV<sup>84</sup>.

### II.3.3.5.3 *Impact pronostic de l'expression de PD-1 et PDL-1*

La surexpression de PD-L1/L2 est plus fréquemment observée dans les LBDGC de sous-type non GC que dans les sous-types GC<sup>18,158</sup> et serait de ce fait associée à un pronostic plus péjoratif mais les deux paramètres ne sont peut-être pas indépendants<sup>17</sup>. La présence d'un taux élevé de la protéine PD-L1 dans le sang de patients atteints de lymphomes malins non hodgkiniens a de plus été rapportée comme un marqueur de mauvais pronostic

## II.4 **Facteurs pronostiques**

L'âge inférieur à 45 ans est un facteur pronostic significatif dans les LBDGC EBV+ par rapport aux sujets âgés<sup>78</sup>, avec une rémission de plus de 80%<sup>15</sup>. La variante polymorphe LBDGC like semble de meilleure pronostic que la variante monomorphe<sup>15,79</sup>. L'expression de CD30 et de EBNA2 semble être corrélée à un mauvais pronostic<sup>17,159</sup>. Les récentes études ont montré qu'il existe une différence de pronostic chez les différentes populations ethniques. Les patients de L'Asie, d'Amérique latine et d'Europe de l'Est semblent avoir une survie relativement courte, alors qu'il n'existe aucune différence de survie entre patients EBV+ et EBV- chez les Nord Américains<sup>17</sup>.

## II.5 **Facteurs histo-pronostiques**

Parmi les facteurs histo-pronostiques, les LBDGC EBV+ ont un index de prolifération Ki67 élevé, une forte expression de P53, c-MYC et BCL2<sup>23,24</sup>. Cette expression a été essentiellement notée dans les stades avancés<sup>23,24</sup>.

## II.6 **Traitement**

Il n'existe pas d'approche standard pour le LBDGC EBV+ et les options de traitement concordent généralement avec les stratégies actuelles pour le LBDGC NOS.

Les taux de réponse globale (RG) au CHOP varient de 30 à 80 %, et les taux de réponse complète (RC), de 30 %. 50%<sup>20</sup>. Des données plus récentes suggèrent des taux de réponse plus élevés à la chimio-immunothérapie, en particulier le rituximab et le CHOP (R-CHOP) avec les taux de RG de 50 à 90 % et des taux de RC de 30 à 70 %<sup>20</sup>.

# **III MATERIEL ET METHODES**

### III.1 Matériel

#### Schéma de l'étude :

Il s'agit d'une étude transversale de 162 LBDGC NOS, diagnostiqués selon les critères histopathologiques et phénotypiques de la classification révisée de l'OMS 2016 et colligés au service d'Anatomie Pathologique du CHU de Blida sur une période de 44 mois.

#### – Critères d'inclusion

Tout patient quelque soit l'âge présentant un LBDGC NOS, de novo de siège ganglionnaire et ou extra-ganglionnaire chez des sujets immunocompétents.

#### – Critères d'exclusion

- LBDGC secondaires
- LBDGC riche en T/et ou histiocytes
- LBDGC EBV+ avec ulcère cutanéomuqueux
- LBDGC primitif cutané de type jambe
- LBDGC associé à une inflammation chronique
- LBDGC primitif du médiastin
- LBDGC primitif du SNC

### III.2 Méthodes :

#### III.2.1 Source et recueil des données

##### III.2.1.1 Données cliniques

Le recueil des données a été réalisé à partir des fiches cliniques pré-établies (**Annexe 1**), complétées des dossiers cliniques des patients. La majorité des prélèvements ont été adressés par les services d'hématologie du Centre de lutte contre le cancer (CLCC) de Blida et du CHU de Blida, de l'oncologie du CLCC Blida et du CHU de Blida, de l'ORL, de la chirurgie générale de l'EPH Boufarik, de Médéa, d'Aïn Defla, de Laghouat, Chlef, Afflou, et du secteur privé.

Les paramètres cliniques reportés sur la fiche de renseignements pour les LBDGC EBV+ incluent :

- Les données démographiques (Nom, prénom, âge, sexe)
- Antécédent du patient : notion de déficit immunitaire (VIH, traitement immunosupresseur, tuberculose, transplantation.....)
- Syndrome tumoral périphérique et profond
- Le stade clinique d'Ann Arbor (**Annexe 3**)
- La stratification des patients selon l'index Pronostique International (IPI) standard (**Annexe 4**)

- Réponse thérapeutique : survie globale et survie sans progression

### III.2.1.2 Données anatomopathologiques

Le recueil des données anatomopathologiques, a été établi à partir d'une fiche technique (**Annexe 2**), réalisée pour les LBDGC EBV + incluant les paramètres suivants et détaillés plus loin (voire paramètres d'évaluation anatomopathologiques):

- Sous type histologique
- Phénotype des cellules tumorales
- Sous type moléculaire GCB ou ABC
- % d'EBER
- Type de latence II ou III
- Type de voie NF-κB classique ou alternative
- Positivité de STAT3
- Phénotype du microenvironnement tumoral
- % d'expression de PDL1 des cellules tumorales et du microenvironnement tumoral
- Expression de CD30 et CD15
- Facteurs histo-pronostiques

### III.2.2 Paramètres d'évaluation

#### III.2.2.1 Démographiques

L'âge, sexe, la localisation ou le siège, notion de déficit immunitaire. L'âge de répartition chez les patients EBV + (âge <à 50 ans) et (âge >50ans).

#### III.2.2.2 Cliniques

- La présence de symptômes B (fièvre de plus de huit jours sans foyer infectieux, amaigrissement de plus de 10% du poids du corps dans les six derniers mois, sueurs nocturnes mouillant le linge)
- La sérologie EBV si elle a été réalisée
- Le taux de LDH ( Lactate Désydrégénase)
- La présence d'un syndrome tumoral périphérique ou profond, sites ganglionnaires ou extra-ganglionnaires atteints.
- Les données de la Cytométrie en Flux (CMF) si elle a été réalisée pour le patient
- Le stade clinique
- Les patients sont classés selon la classification d'Ann Arbor modifiée
- La stratification en groupe pronostiques est effectuée selon l'IPI standard :
  - ✓ Les groupes IPI de risque faible (Score 0-1) et de risque intermédiaire faible (Score2) sont groupés ensemble en IPI bas risque.
  - ✓ Les groupes IPI de risque intermédiaire, élevé (Score 3) et de risque élevé (Score 4-5) sont groupés en IPI risque élevé.
- Le traitement à base de R-CHOP associé ou pas à une radiothérapie
- Evaluation de la réponse au traitement après 03 cycles de chimiothérapie pour tous les patients sur les résultats de l'examen physique, la radiologie, la tomographie, et la biopsie ostéo-médullaire sur les critères de réponse des

lymphomes selon « The International Working Group » (IWG), ainsi que le PETScan. Les réponses sont classées en réponse complète (RC), réponse partielle (RP) ou échec.

La RC est définie par la disparition des lésions et des anomalies radiologiques ou biologiques notés lors de l'examen clinique et l'absence de nouvelles lésions après huit (06-08) cures de R-CHOP.

La RP est définie par la régression d'au moins 50% de toutes les lésions mesurables et l'absence de nouvelles lésions après huit (06-08) cures de R-CHOP.

L'échec est défini par l'apparition de nouvelles lésions ou la diminution des lésions initiales de moins de 25% ou augmentation des lésions mesurables qui ont régressé durant le traitement de plus de 50%.

### III.2.2.3 Anatomopathologiques

#### III.2.2.3.1 Phase pré-analytique

- **Etude macroscopique :**

Les prélèvements parvenus au service sont représentés par des prélèvements biopsiques quelque soit le siège ou bien par une exérèse totale du ganglion s'il s'agit d'une localisation ganglionnaire. Ces derniers sont de taille variable allant de 2 à 5 cm de grand diamètre avec aspect en chair de poisson à la tranche de section. Dans tous les cas les prélèvements ont fait l'objet d'une inclusion en totalité.

- **Préparation des prélèvements tissulaires**

Après l'étape de fixation au formol, d'une durée de 24 heures pour les prélèvements biopsiques et de 48 heures pour les pièces opératoires ; les prélèvements tissulaires ont été déshydratés et inclus dans des blocs de paraffine suivant les étapes en **Annexe 5 (Tableau 59)**. Des coupes histologiques de 3 $\mu$  ont été réalisées pour chaque bloc en utilisant un microtome (Leica). Les coupes ont été étalées sur des lames porte-objet et séchées dans une étuve à 100 C° pendant 30 minutes. Une coloration à l'Hématoxyline-éosine (HE) a été réalisée dans l'automate de coloration Leica (ST4040) suivant les étapes en **Annexe 5 (Tableau 60)**.

30 cas ont été adressés au service en blocs de paraffine, en deuxième intention pour avis.

#### III.2.2.3.2 Phase analytique

- **Etude de la prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS**

→ **Etude histopathologique**

Le diagnostic de LBDGC NOS a été retenu selon les critères morphologiques et phénotypiques de la 4<sup>ème</sup> édition de la classification révisée de l'OMS 2016<sup>2</sup>. Les cas ont été revus par deux pathologistes, un sénior et un junior.

→ *Etude immunohistochimique*

Une étude IHC a été réalisée soit en technique manuelle ou automatique (automate Ventana Benchmarck ULTRA ou automate Leica BOND III) avec un contrôle externe (positif et négatif) sur chaque lame (**Annexe 6, Tableau 61**) selon le principe de polymère (micropolymère : Cell marque, Leica, macropolymère : Dako ou multimère : Ventana) lié à la peroxydase (HRP) en deux ou trois étapes (**Annexe 6, Tableau 61**).

En premier, le phénotype B a été confirmé par des anticorps de base (CD20, CD79a) et des anticorps de deuxième intention (PAX5, BOB-1 et OCT-2) (**Annexe 6, Tableau 61**). Pour le sous groupe moléculaire selon la COO, GCB et ABC selon l'algorithme de Hans<sup>4</sup>. Nous avons utilisé les trois anticorps CD10, BCL6 et MUM1/IRF4 avec un cut off de 30% pour chaque marqueur (**Annexe 6, Tableau 61**). Les marqueurs T : CD3 et CD5 ont également été réalisés systématiquement (**Annexe 6, Tableau 65**).

→ *Hybridation in situ chromogénique (CISH)*

La recherche de transcrits EBERs positifs a été réalisée par technique d'hybridation in situ chromogénique (CISH), sur automate Ventana Benchmarck Ultra, utilisant la sonde ARN Inform EBER de Ventana (**Annexe 6, Tableau 62**).

Cette technique a été réalisée avec un contrôle externe positif sur chaque lame carcinome indifférencié du nasopharynx (UCNT). Un cut off minimal de 20% a été retenu pour notre étude.

- ***Rôle de l'EBV dans la lymphomagenèse et le microenvironnement tumoral des LBDGC EBV+, NOS et comparaison des deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-***

→ *Etude histopathologique*

Nous avons classé les LBDGC EBV+ selon les critères histopathologiques de Montes-Moreno et al<sup>29</sup> rapportés dans la classification révisée de l'OMS 2016<sup>2</sup> en deux sous types histologiques : monomorphe et polymorphe (LBDGC like, Hodgkin like et lymphoprolifératif like). Nous avons également apprécié la présence d'un aspect en ciel étoilé, l'architecture nodulaire, la présence de cellules de Reed Sternberg et Hodgkin like ainsi que la nécrose.

→ *Phénotype B des cellules lymphoïdes tumorales*

Nous avons apprécié le % des marqueurs de l'origine B en utilisant les mêmes anticorps sus cités à savoir CD20, CD79a, PAX5, OCT2 et BOB1.

→ *Sous type moléculaire GCB ou ABC*

Nous avons apprécié le sous type moléculaire prédominant GCB ou ABC

→ *% d'EBERs*

Nous avons estimé le % de transcrits EBERs positifs dans chaque cas.

→ *Profil de latence II ou III*

Le profil de latence II ou III a été évaluée par les anticorps LMP1 et EBNA2 (**Annexe 6, Tableau 63**).

→ *Les voies de la lymphomagenèse*

Nous avons recherché l'expression du facteur de transcription NF-κB par son expression au niveau des cellules lymphoïdes tumorales essentiellement par deux marqueurs de la voie canonique : NF-κB P50 et NF-κB P65 (**Annexe 6, Tableau 64**). Lorsque cette voie est induite, on a observé une expression nucléaire par les cellules lymphoïdes tumorales et cytoplasmique lorsqu'elle n'a pas été induite. La voie non canonique n'a pas pu être étudiée par non disponibilité de l'AC chez les différents fournisseurs accrédités en Algérie. La voie de signalisation JAK-STAT3 par l'AC STAT3 thyr 705 dans sa forme phosphorylée avec un cut off de 40% pour ce dernier selon les données de la littérature<sup>154</sup> (**Annexe 6, Tableau 64**).

Nous avons également estimé l'expression de CD40 et l'IL-6 (**Annexe 6, Tableau 64**).

Cette dernière a été estimée au niveau des cellules lymphomateuses et au niveau du ME, selon un H-Score, en se basant sur des données de la littérature<sup>160-162</sup>.

Ce marquage prend en compte le nombre de cellules positives et l'intensité de marquage selon l'équation suivante : H-score= (% cellules positives et intensité faible X 1) + (% cellules positives et intensité modérée X 2) + (% cellules positives et intensité forte X 3)= 300. Dix champs aléatoires à forte positivité par patient ont été analysés pour la quantification. L'évaluation et la quantification du H-score a été revue par un deuxième investigateur (biologiste et collaboratrice dans notre service) ignorant le statut EBV des patients. Pour les deux facteurs de transcription NF-κB P65 et NF-κB P50 : étant donné que la localisation nucléaire représente une transition de la forme inactive (cytoplasmique) à la forme active (nucléaire), l'expression nucléaire a été évaluée et classée en : **0** négative ou **1** positive<sup>17,160,163</sup>.

→ **Phénotype du microenvironnement tumoral**

Le phénotype des TIL du ME a été étudié par l'expression de CD3, CD5. L'expression de CD5 a été également estimée par les cellules lymphomateuses selon les recommandations de l'OMS<sup>2</sup>.

Chaque marqueur a été estimé par son absence d'expression (0%), expression faible (10-30%), expression modérée (40-50%) et une forte expression (> 60%)<sup>164,165</sup>. Nous avons évalué le profil cytotoxique des TIL du ME par les marqueurs : CD8, Granzyme B, TiA1, et Perforine (**Annexe 6, Tableau 65**). Leur expression a été estimée, selon les données de la littérature sur une échelle de 4 niveaux : 0 (négatif), 1+ (faible), 2+ (modéré) et 3+ (fort)<sup>164,166</sup> sauf pour le CD8 qui a été évalué comme pour l'expression de CD3 et CD5.

Nous avons évalué le profil Treg des TIL, avec les marqueurs CD4 (Lymphocytes T Helper), CD25 et leur facteur de transcription FOXP3 ainsi que l'expression de la cytokine TGF-β pour les Treg Th3 (**Annexe 6, Tableau 65**). L'expression de CD4 a été estimée, selon les données de la littérature sur une échelle à 3 niveaux<sup>164</sup> :

- ✓ Expression faible 1+ (<10%)
- ✓ Modérée 2+ (20-40%)
- ✓ Forte 3+ (>50%)

Le CD25 a été estimé en % d'expression, et le FOXP3 par la somme du % de 10 champs X100 au GX40<sup>167</sup>.

Nous avons réalisé un H-score pour le TGF- $\beta$  = (% cellules positives et intensité faible X 1) + (% cellules positives et intensité modérée X 2) + (% cellules positives et intensité forte X 3) = 300. Dix champs aléatoires à forte positivité par patient ont été analysés pour la quantification.

L'évaluation et la quantification de l'H-score ainsi que le FOXP3 ont été revus par un deuxième investigateur (biologiste et collaboratrice dans notre service) ignorant le statut EBV des patients.

Nous avons également estimé le % d'expression par les cellules lymphoïdes tumorales de PD-L1 (PD-L1t) avec un cut off de 30%, et PD-1 avec un cut off de 5% selon les récentes études publiées<sup>39</sup>(PD-1t). Le PD-1 a été également estimé au niveau du ME (PD-1me).

#### → **Facteurs histo-pronostiques**

Les facteurs histopronostiques que nous avons étudié sont : BCL2, c-MYC, P53 et Ki-67 avec un cut off de 50% pour BCL2, 40% pour c-MYC, 30% pour P53 et 40% pour Ki-67<sup>2,51,59</sup> (**Annexe 6, Tableau 66**). Nous avons également recherché le phénotype double expresseur BCL2 et c-MYC

#### → **Expression du CD30 et CD15**

Nous avons recherché la positivité de CD15 et CD30 dans chaque cas, avec un seuil de positivité de 20% pour le CD30 selon les données de la littérature<sup>20,47,49,168-170</sup>. Le CD15 a été réalisé seulement dans les LBDGC EBV+ (**Annexe 6, Tableau 67**).

#### → *Hybridation in situ en fluorescence (FISH)*

Nous avons utilisé 4 sondes pour l'hybridation in situ en fluorescence : (BCL2, BCL6, MYC et IgH).

- ❖ **BCL2** : La sonde détachable BCL2 (18q21) est optimisée pour détecter les réarrangements impliquant le locus 18q21 sur des tissus inclus en paraffine fixés au formol.
- ❖ **BCL6**: La sonde détachable BCL6 (3q27) est optimisée pour détecter les réarrangements impliquant le locus 3q27 sur des tissus inclus en paraffine fixés au formol.
- ❖ **MYC**: La sonde détachable MYC (8q24) est optimisée pour détecter les réarrangements impliquant le locus 8q24 sur des tissus inclus en paraffine fixés au formol.
- ❖ **IgH**: La sonde détachable IGH (14q32) est optimisée pour détecter les réarrangements impliquant le locus (14q32) sur des tissus inclus en paraffine fixés au formol.

La technique FISH a été réalisée sur automate d'hybridation Thermobrite Elite de Leica (**Annexe 6, Tableau 68**). Une coupe de 5 $\mu$  a été réalisée sur chaque bloc technique.

La lecture des lames a été réalisée sur microscope FISH Zeiss, au service d'Hématologie du CLCC de Blida.

### III.2.3 Analyse statistique :

Les effectifs ont été exprimés en proportions pour les variables qualitatives (sexe, localisation, sous-type moléculaire, sous-type histologique, phénotype B, marqueurs du sous type moléculaire, profil de latence, CD15, CD30, symptômes B, réponse au traitement, EBER, CD40, NF- $\kappa$ B P50 et NF- $\kappa$ B P65, CD3, CD5, CD8, CD4, Granzyme B, Tia1, Perforine, PD-1, PD-L1, STAT3) et en moyennes ou médianes pour les variables quantitatives (âge, taux de survie, IPI).

L'analyse descriptive a été effectuée par l'estimation de la moyenne  $\pm$  écart-types et/ou médianes, pour les variables quantitatives et par l'estimation des pourcentages pour les variables qualitatives.

Les tests statistiques du khi2 Fisher, Student, Wilcoxon-Mann-Whitney, ont été utilisés pour les comparaisons de 2 ou plusieurs variables.

Le test de khi2 de Mantel- Haenszel a été utilisé comme test d'ajustement pour choisir entre 02 variables redondantes liées à la variable dépendante dans l'analyse multivariée par régression. Les variables associées à la variable dépendante ayant un seuil  $<$  à 20% ont fait l'objet d'une analyse multivariée par régression logistique dichotomique qui a utilisé la procédure de pas à pas descendant.

Le Khi2 de Mantel Haenszel a été utilisé pour ajuster les variables redondantes liées à la variable dépendante.

Le test de l'indice de Breslow a été utilisé pour mettre une interaction entre les différentes variables

L'estimation du taux de survie (SSR) a été faite par la méthode indirecte de Kaplan Meir. L'intervalle de confiance a été calculé selon la méthode de Greenwood. La comparaison des taux de survie a été réalisée par le test de Log rank.

Le seuil de signification statistique a été fixé à 0.05.

Le recueil et le traitement des paramètres de l'étude ont été réalisés par outil informatique (SPSS dans sa 23<sup>ème</sup> version).

# **IV RESULTATS**

De janvier 2015 à Aout 2018, 379 patients atteints de lymphomes non hodgkiniens ont été diagnostiqués au service d'Anatomie pathologique du CHU de Blida dont 182 LBDGC NOS, représentant 50,69% des cas. Sur les 182, 20 ont été exclus de notre série : 16 lors de la phase pré-analytique pour matériel insuffisant (afin de réaliser une étude IHC et une HIS) et 04 patients étaient VIH+.

Afin de répondre aux objectifs de notre travail, nous avons organisé notre étude autour de deux volets :

- D'une part, l'estimation de la prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS, sur la cohorte initiale de 162 patients, ainsi que l'étude descriptive des LBDGC EBV+.
- D'autre part, et ce afin de mieux individualiser le groupe LBDGC EBV+, nous avons comparé le profil clinique, l'expression du CD30, les voies de lymphomagenèse et les TIL du ME ainsi que les facteurs histopronostiques des deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- . Pour ce volet, seulement 78 patients LBDGC EBV- suivis et traités au CLCC et au CHU de Blida ont été retenus.

#### IV.1 Volet 1 : Profil épidémiologique des LBDGC NOS / Etude descriptive des LBDGC EBV+

##### IV.1.1 Profil épidémiologique des LBDGC NOS

###### IV.1.1.1 Démographiques

###### IV.1.1.1.1 Répartition selon l'âge

La moyenne d'âge au moment du diagnostic tout sexe confondu était de **58,96 avec une déviation standard de 17,16 (écart type)**. Les extrêmes d'âge étaient de 15 ans et 96 ans (**Tableau 5, Figure 38**).

*Tableau 5 : Répartition des LBDGC NOS selon l'âge*

Moyenne		58,96
Médiane		<b>60,00</b>
Mode		<b>66</b>
Ecart type		<b>17,163</b>
Minimum		<b>15</b>
Maximum		<b>96</b>
Percentile	<b>25</b>	<b>47,00</b>
	<b>50</b>	<b>60,00</b>
	<b>75</b>	<b>71,00</b>

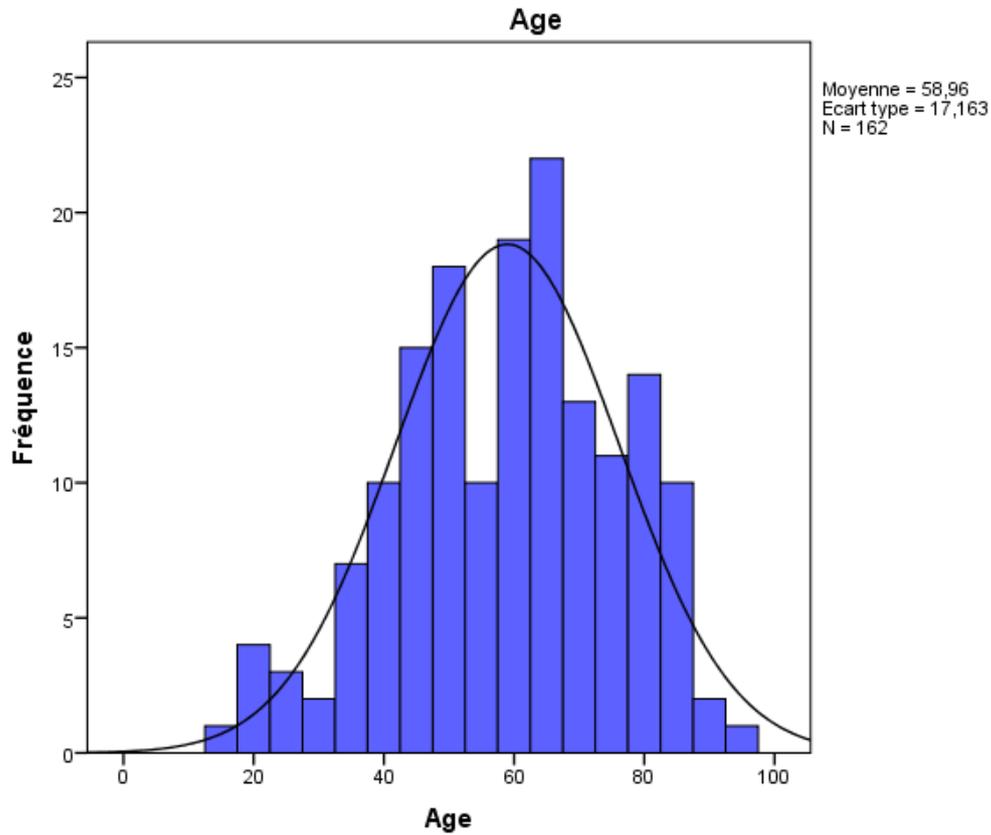


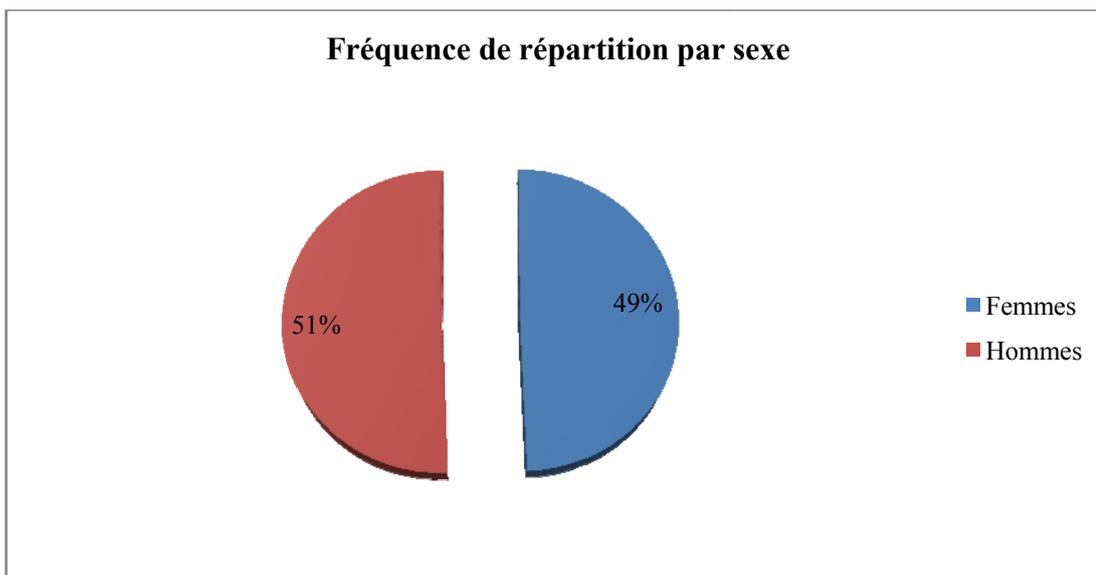
Figure 38 : Répartition des patients en fonction de l'âge

#### IV.1.1.1.2 Répartition selon le sexe

Nos patients étaient répartis en 80 femmes (49%) et 82 hommes (51%), **Sex-ratio = 82/80 = 1.02** (Tableau 6, Figure 39).

Tableau 6 : Fréquence des patients présentant un LBDGC NOS selon le sexe

	Effectif	Pourcentage
<b>Femmes</b>	80	49,4
<b>Hommes</b>	82	50,6
<b>Total</b>	<b>162</b>	<b>100,0</b>



*Figure 39 : Fréquence de répartition des patients présentant un LBDGC NOS selon le sexe*

La moyenne d'âge chez les hommes au moment du diagnostic était de  $58,80 \pm 16.9$  ans, et celle des femmes de  $59,11 \pm 17.4$  ans (**Tableau 7**).

*Tableau 7 : Moyenne d'âge selon le sexe des LBDGC NOS*

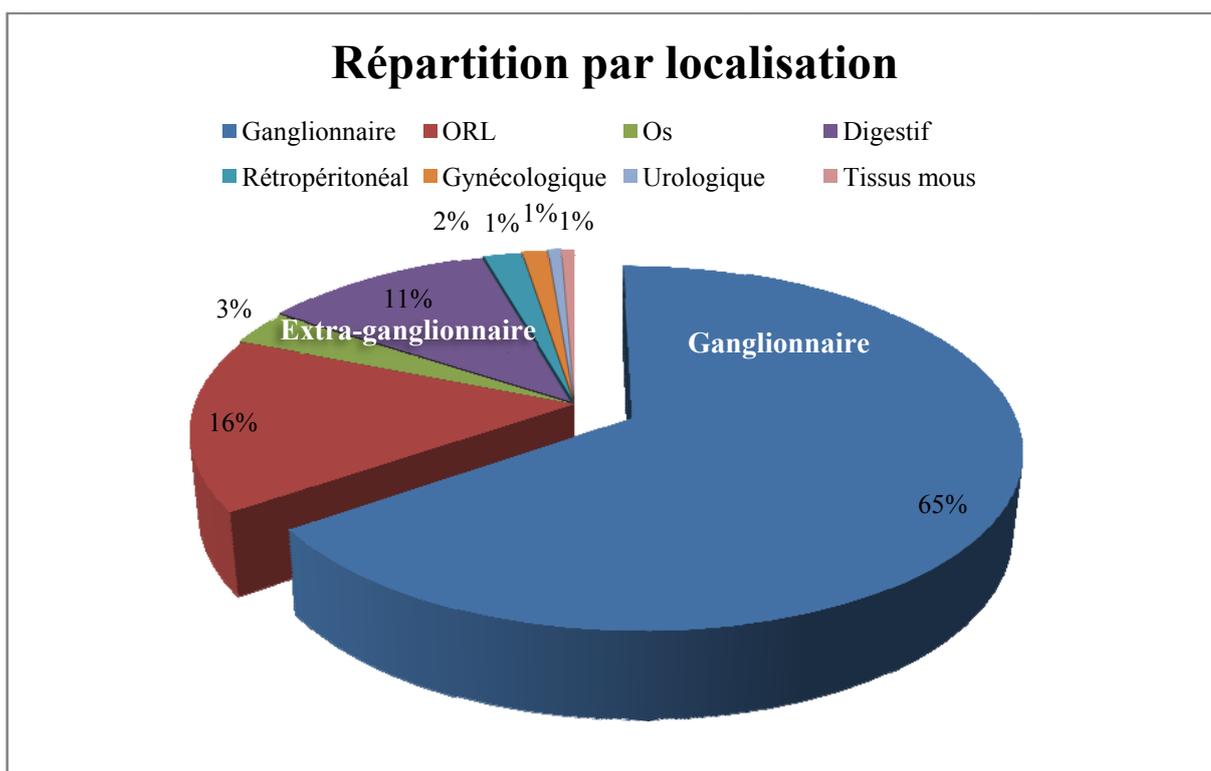
Sexe	Moyenne	Effectif	Ecart-type
Femmes	59,11	80	17,452
Hommes	58,80	82	16,982
<b>Total</b>	<b>58,96</b>	<b>162</b>	<b>17,163</b>

#### IV.1.1.1.3 Répartition selon la localisation

104 LBDGC NOS étaient de siège ganglionnaire soit 65%, et 58 de siège extra-ganglionnaire soit 35% (**Tableau 8, Figure 40**).

*Tableau 8 : Fréquence des LBDGC NOS selon la localisation*

	Effectif	Pourcentage
<b>Ganglionnaire</b>	<b>104</b>	<b>65</b>
<b>Extra-ganglionnaire</b>	<b>58</b>	<b>35</b>
ORL	25	16
Os	5	3
Digestif	18	11
Rétropéritonéal	3	2
Gynécologique	2	1
Urologique	1	1
Tissus mous	1	1



*Figure 40: Répartition des LBDGC NOS selon la localisation*

#### IV.1.1.2 Anatomopathologiques

#### IV.1.2 Répartition selon le sous type moléculaire

Le sous type moléculaire prédominant était le sous type ABC non GC avec une fréquence de 85% n=137. Le sous type GC représentait 15% n=25 (**Tableau 9, Figure 41**).

*Tableau 9 : Fréquence des LBDGC NOS selon le sous type moléculaire*

	Effectif	Pourcentage
<b>GCB</b>	25	15,4
<b>ABC</b>	137	84,6
<b>Total</b>	<b>162</b>	<b>100,0</b>

## Répartition selon le sous type moléculaire

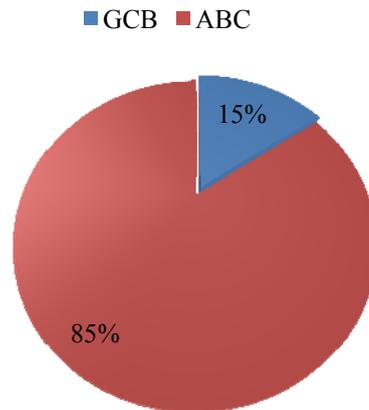


Figure 41: Répartition des LBDGC NOS selon le sous type moléculaire

### IV.1.3 Prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS

Avec un cut off de 20% pour l'expression de transcrits EBERs au niveau des cellules lymphoïdes tumorales, l'EBER était positif chez 13 patients (8%). La prévalence de l'EBV dans notre série a été de 8% (Tableau 10, Figure 42).

Tableau 10: Prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS

	Effectif	Pourcentage
Négatif	149	92,0
Positif	13	8,0
<b>Total</b>	<b>162</b>	<b>100,0</b>

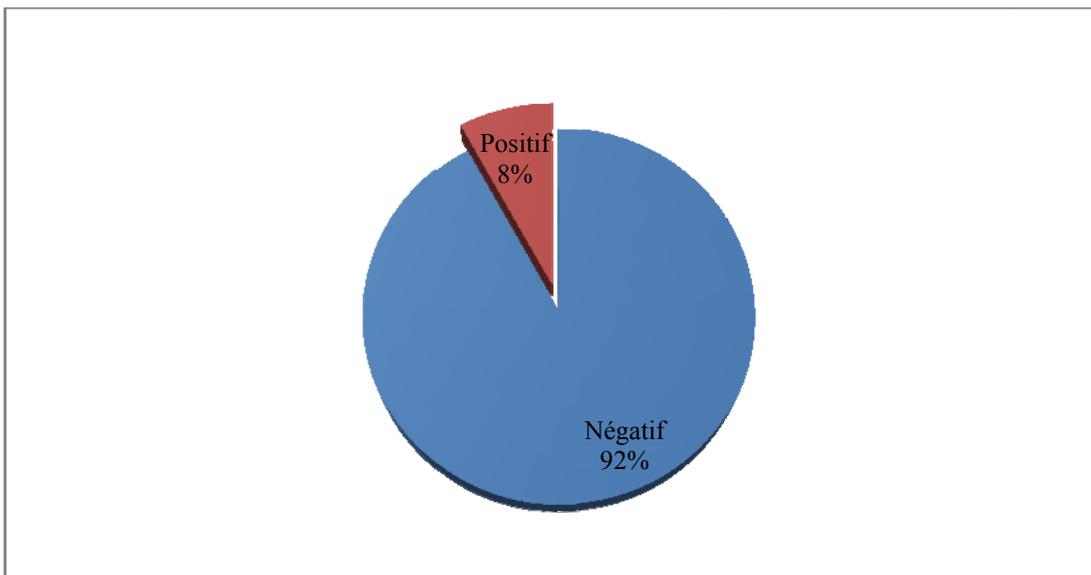


Figure 42 : Prévalence de l'EBV dans les LBDGC NOS

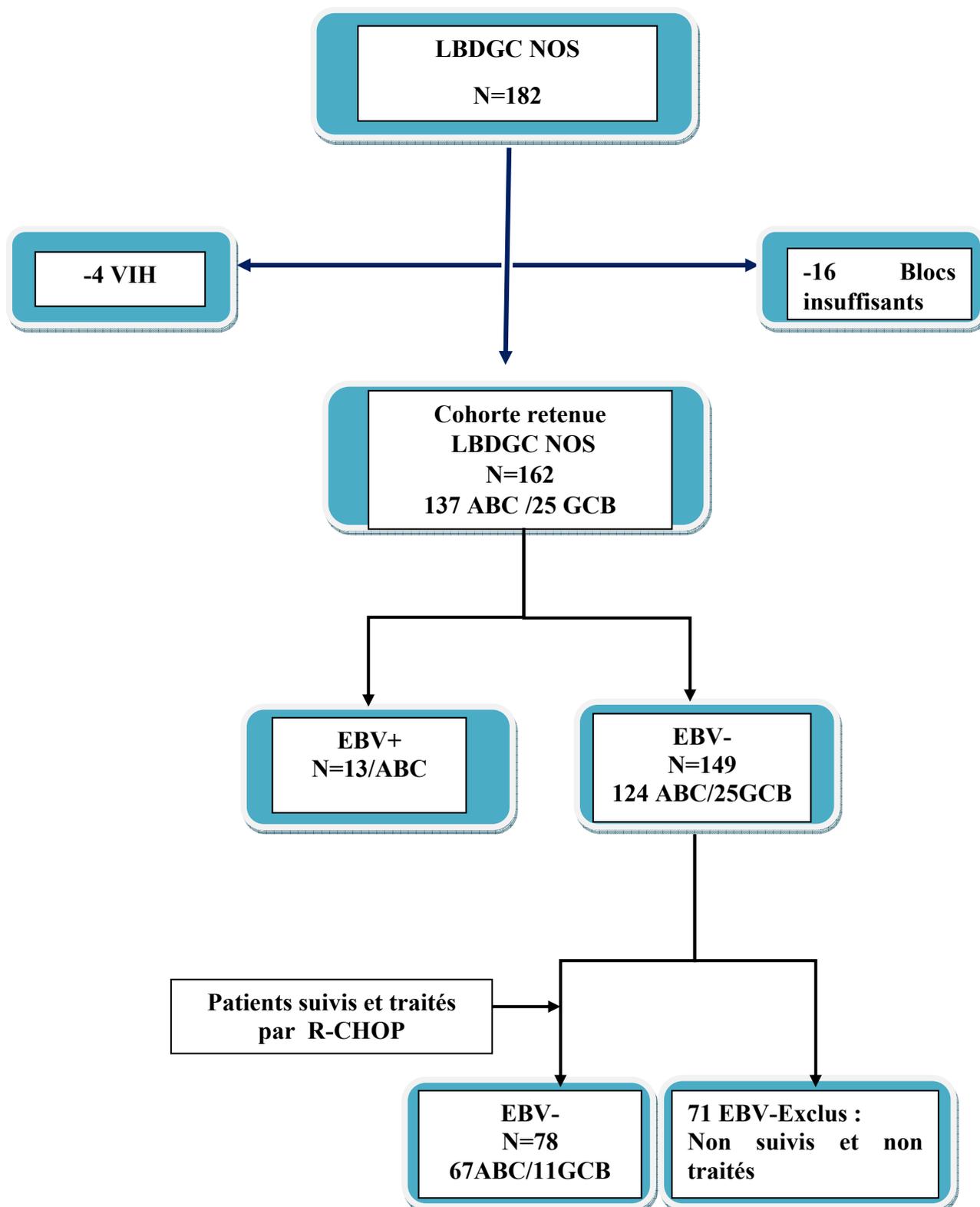


Figure 43: Schéma récapitulatif de l'étude

#### IV.1.4 Etude descriptive des LBDGC EBV+

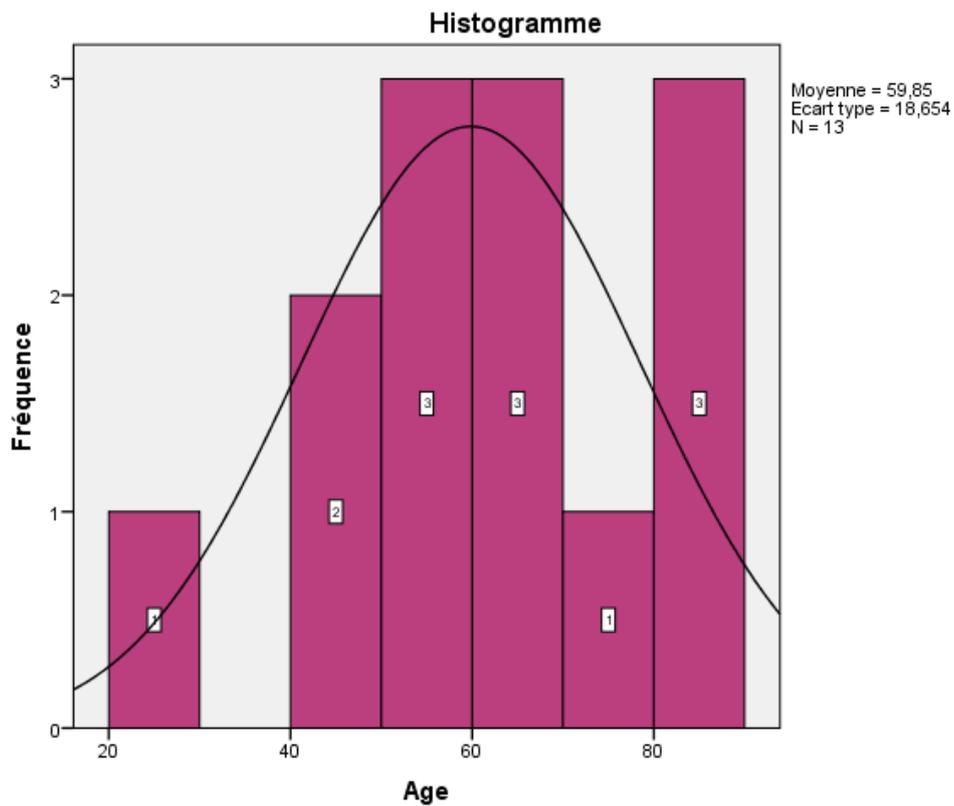
##### IV.1.4.1 Démographiques

###### IV.1.4.1.1 Répartition selon l'âge

La moyenne d'âge au moment du diagnostic tout sexe confondu était de **59,85±18,65**, avec des extrêmes de **22 ans** et de **87 ans** (Tableau 11, Figure 44).

*Tableau 11 : Moyenne d'âge des LBDGC EBV+ NOS*

Moyenne	<b>59,85</b>
Médiane	<b>60,00</b>
Mode	<b>44</b>
Ecart type	<b>18,654</b>
Minimum	<b>22</b>
Maximum	<b>87</b>



*Figure 44 : Répartition selon l'âge des LBDGC EBV+ NOS*

#### IV.1.4.1.2 Répartition selon le sexe

Parmi nos 13 patients, 6 (46.15%) étaient des hommes et 7(53.85%) étaient des femmes. Il existe une légère prédominance féminine avec un **Sex ratio de 0,86** (Tableau 12, Figure 45).

Tableau 12 : Répartition des LBDGC EBV+ selon le sexe

Sexe	Effectif	Pourcentage
Femme	7	53,8
Homme	6	46,2
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>

Sex ratio = 0,86

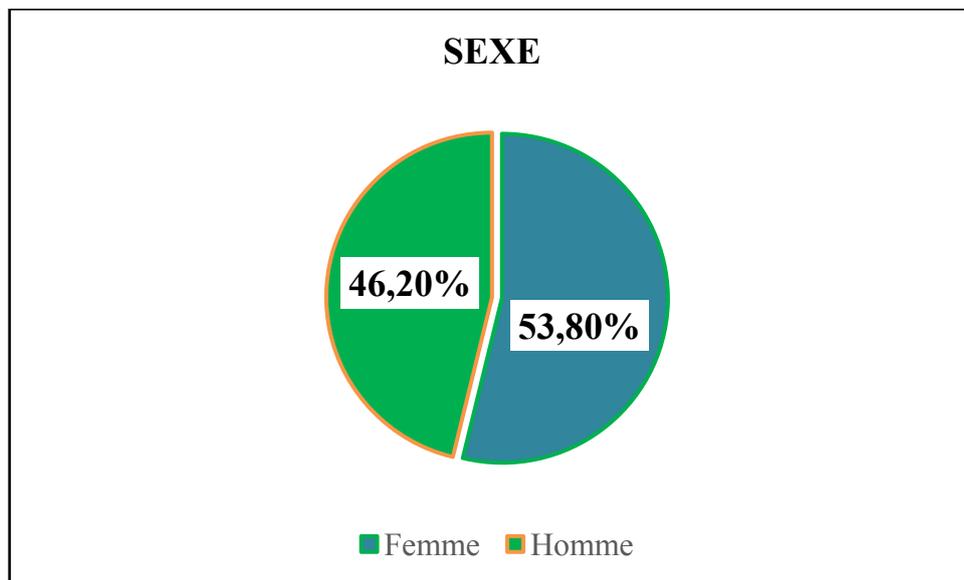


Figure 45 : Fréquence de répartition des LBDGC EBV+ selon le sexe

La moyenne d'âge chez les hommes au moment du diagnostic a été de **52,83 ± 21.2 ans**, et celle des femmes de **65,86 ± 15.1 ans** (Tableau 13).

Tableau 13 : Moyenne d'âge selon le sexe

Sexe	Moyenne	Effectif	Ecart-type
Femme	65,86	7	15,115
Homme	52,83	6	21,245
<b>Total</b>	<b>59,85</b>	<b>13</b>	<b>18,654</b>

#### IV.1.4.1.3 Répartition selon la catégorie d'âge

Afin de mieux individualiser la classe d'âge de nos 13 patients EBV+. Nous les avons classé en deux catégories : sujets de moins de 50 ans (< 50 ans) et sujets âgés de 50 ans et plus ( $\geq 50$  ans), 3 (23.1%) avaient un âge < 50 ans et 10 (76.9%) avaient un âge  $\geq 50$  ans (Tableau 14).

Tableau 14 : Répartition des LBDGC EBV+ NOS selon la catégorie d'âge

Catégorie d'âge	Effectif	Pourcentage
SUJETS (< 50 ANS)	3	23,1
SUJETS ( $\geq 50$ ANS)	10	76,9
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>

Parmi les sujets < 50 ans, 2 (15.38%) étaient des hommes et 1 femme (7.69%). Parmi les sujets  $\geq 50$  ans, 4 (30.77%) étaient des hommes et 6 (46.15%) étaient des femmes (Tableau 15, Figure 46).

Tableau 15 : Répartition par catégorie d'âge selon le sexe

Catégorie d'âge	Sexe		Total
	Femme	Homme	
SUJETS (< 50 ans)	1	2	3
SUJETS ( $\geq 50$ ans)	6	4	10
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>13</b>

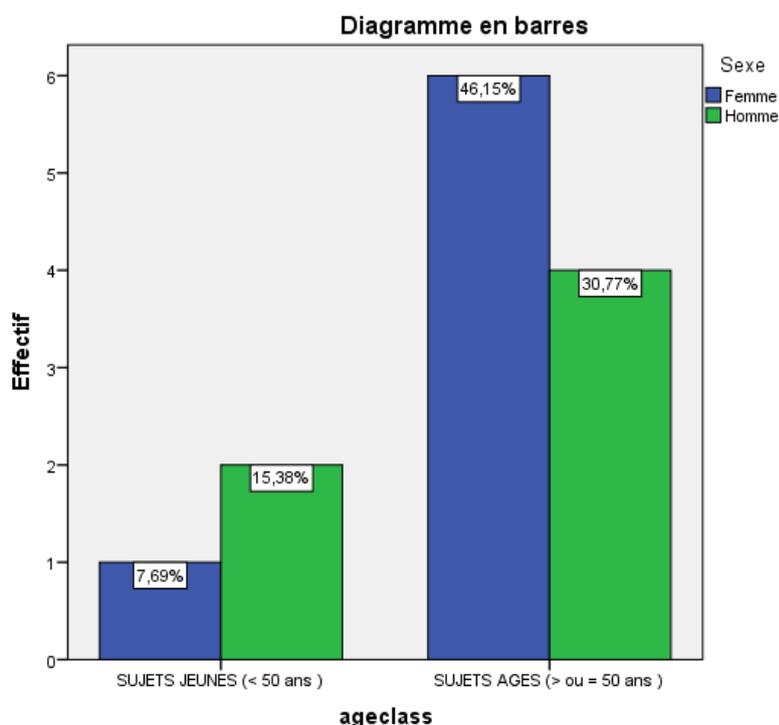


Figure 46 : Répartition par catégorie d'âge selon le sexe

#### IV.1.4.1.4 Répartition selon la localisation

La localisation ganglionnaire était de (77%) n=10, suivie à égale fréquence de la localisation gastrique (7.7%) n=1, cavaire (7.7%) n=1 et rétropéritonéale (7.7%) n=1 (Tableau 16, Figure 47).

Tableau 16 : Répartition des LBDGC EBV+NOS selon la localisation

Localisation	Effectif	Pourcentage
Ganglion	10	76,9
Cavum	1	7,7
Estomac	1	7,7
Rétropéritoine	1	7,7
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>

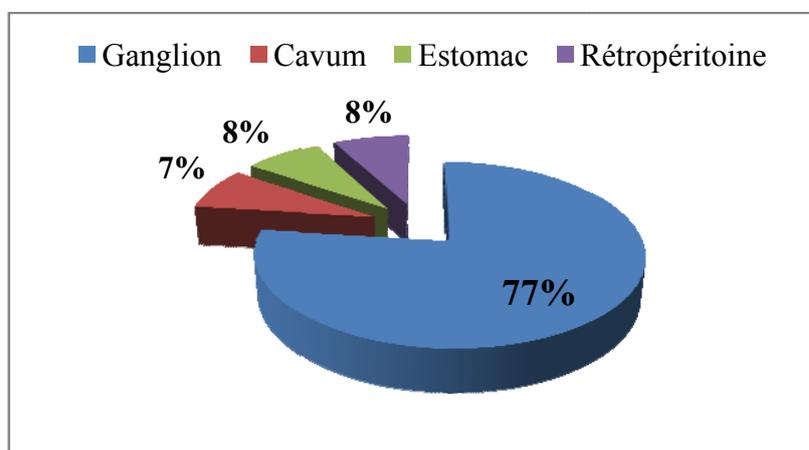
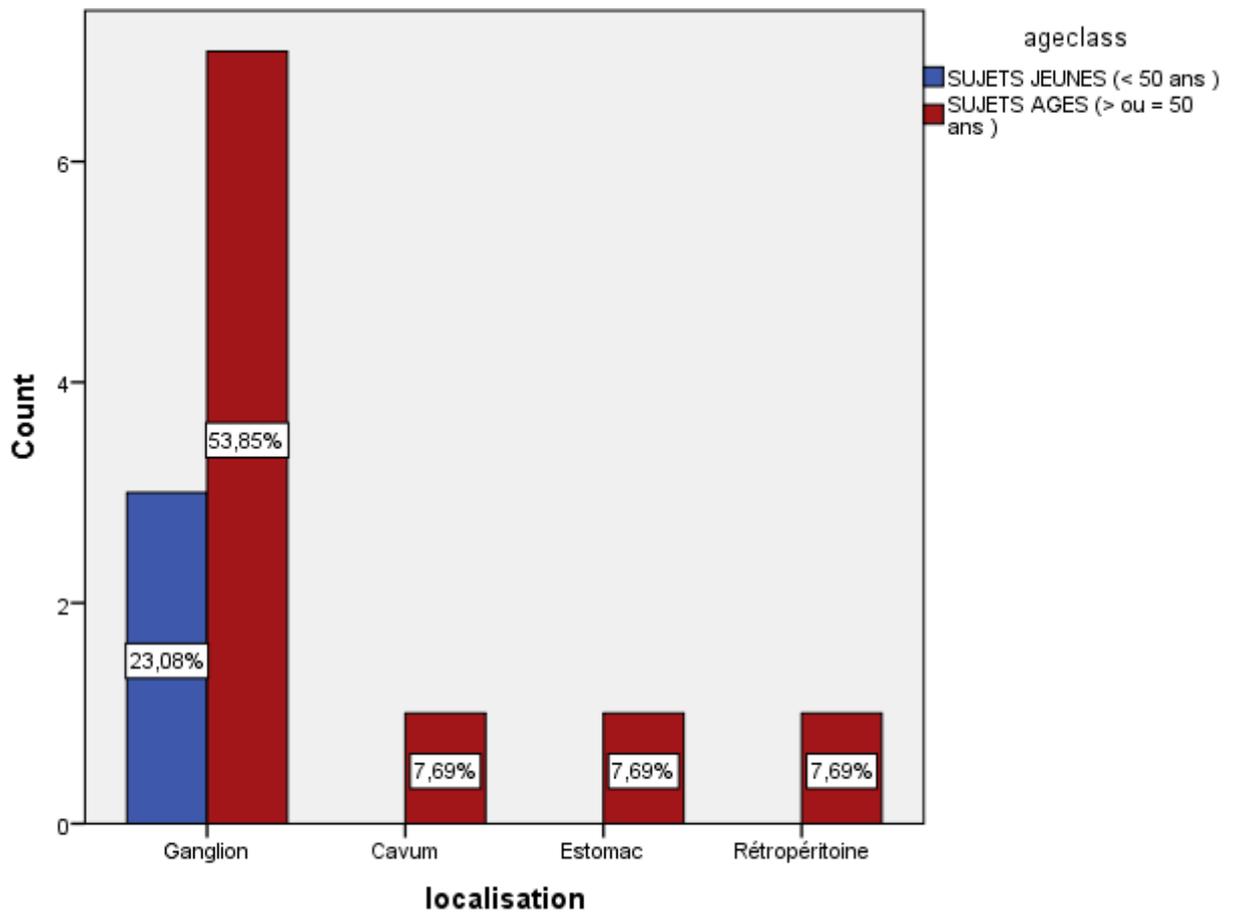


Figure 47 : Fréquence de répartition des LBDGC EBV+ NOS selon la localisation

Quelque soit la catégorie d'âge, la localisation ganglionnaire était la plus fréquente de 23.08% chez les sujets < 50 ans n=3 et de 53.85% chez les ≥ 50 ans n=10 (Tableau 17, Figure 48).

Tableau 17 : Répartition de la localisation des LBDGC EBV+ selon la catégorie d'âge

		Catégorie d'âge		Total
		SUJETS JEUNES	SUJETS AGES	
		< 50 ans	≥ 50 ans	
localisation	Ganglion	3	7	10
	Cavum	0	1	1
	Estomac	0	1	1
	Rétropéritoine	0	1	1
<b>Total</b>		<b>3</b>	<b>10</b>	<b>13</b>



*Figure 48 : Fréquence de répartition de la localisation des LBDGC EBV+ selon la catégorie d'âge*

#### IV.1.4.2 Anatomopathologiques

##### IV.1.4.2.1 Répartition selon le sous type histologique

Nous avons classé les LBDGC EBV+ selon les critères histologiques de Montes-Moreno et al, reconnus dans la classification OMS 2016<sup>2,29</sup>.

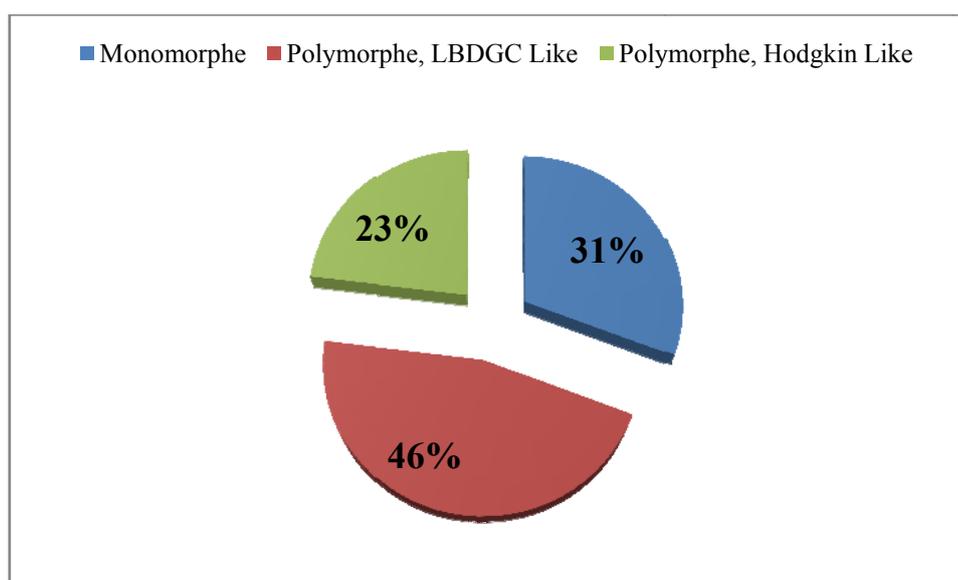
Dans 100% des cas nous avons observé un aspect en ciel étoilé, ainsi que des cellules de Reed Sternberg et Hodgkin like, dans 50% une architecture nodulaire et dans 30% une nécrose géographique.

Le sous type histologique le plus fréquent a été le sous type polymorphe LBDGC like (46%) n=6, suivi du sous type monomorphe (31%) n=1 et du sous type polymorphe Hodgkin-like (23%) n=3 (**Tableau 18, Figure 49**).

Le sous type polymorphe LBDGC like était prédominant chez les sujets < 50 ans (15.38%) n= et les deux sous types monomorphe et polymorphe Hodgkin-like étaient à égale fréquence chez les sujets ≥50 ans (30.77%) (**Tableau 19, Figure 50**).

*Tableau 18: Répartition des LBDGC EBV+ selon le sous type histologique*

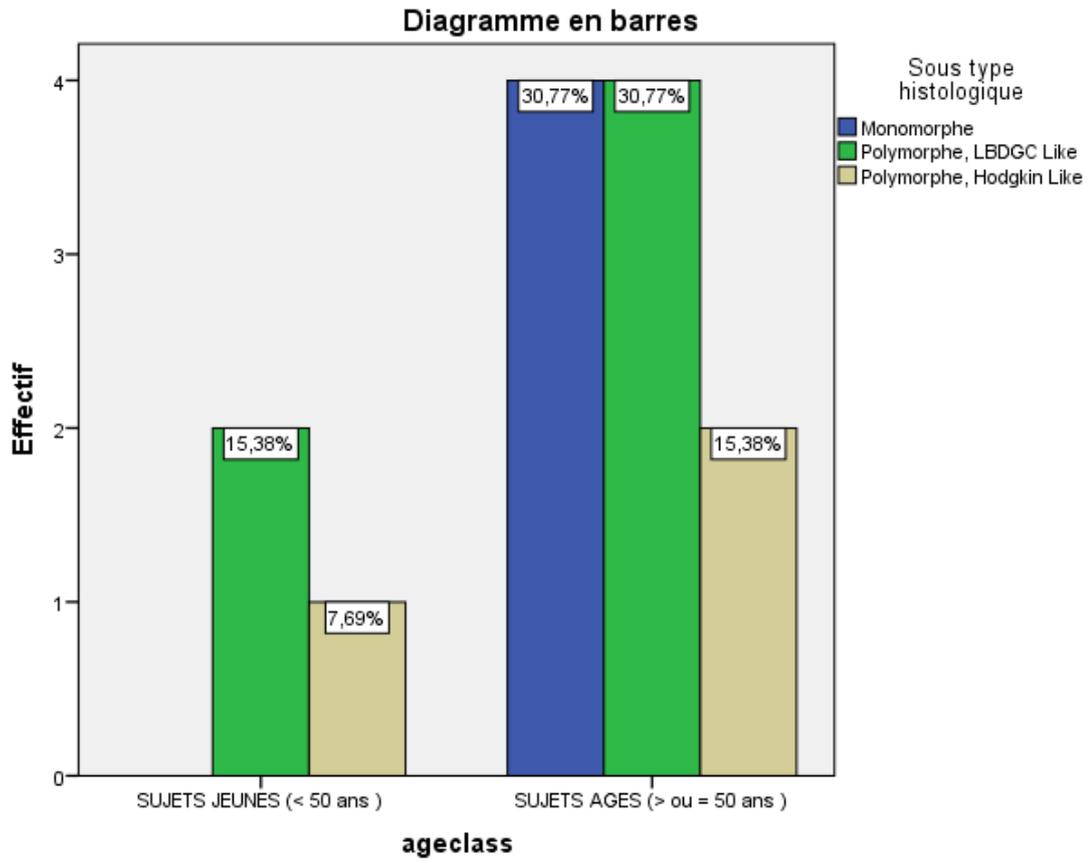
Sous type histologique	Effectif	Pourcentage
Monomorphe	4	30,8
Polymorphe, LBDGC Like	6	46,2
Polymorphe, Hodgkin Like	3	23,1
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>



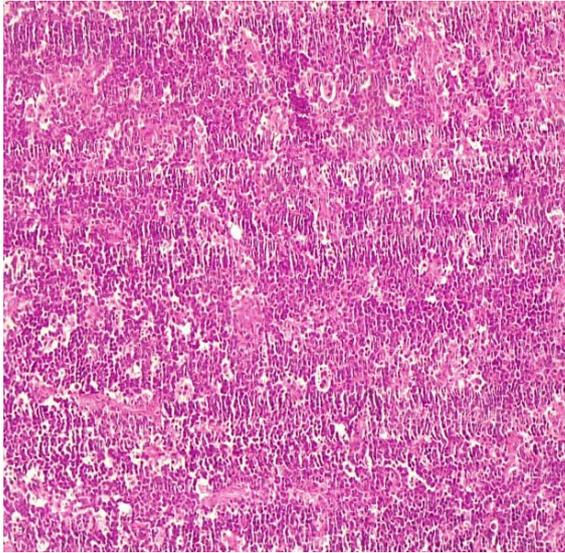
*Figure 49 : Répartition des LBDGC EBV+ selon le sous type histologique*

*Tableau 19 : Répartition du sous type histologique, selon la catégorie d'âge*

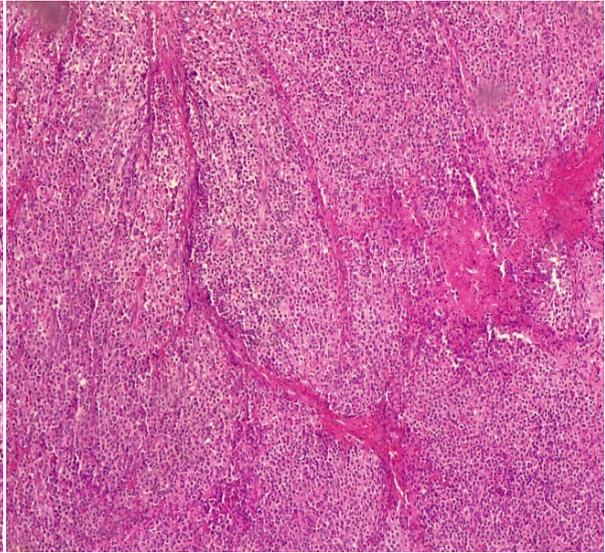
Catégorie d'âge	Sous type histologique			Total
	Monomorphe	Polymorphe LBDGC Like	Polymorph e Hodgkin Like	
SUJETS < 50 ans	0	2	1	3
SUJETS ≥ 50 ans	4	4	2	10
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>13</b>



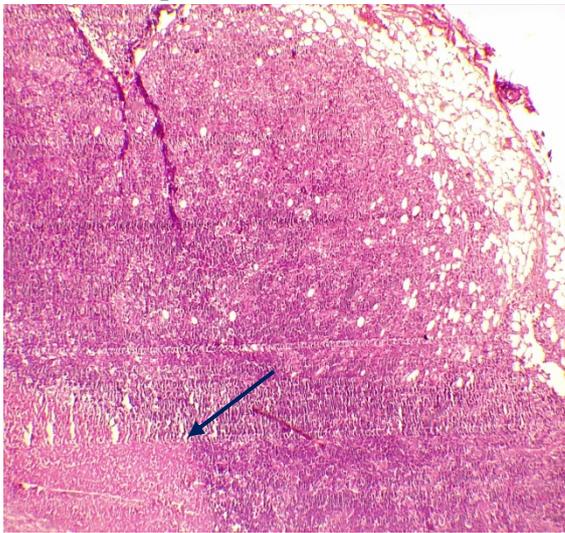
*Figure 50: Fréquence de répartition du sous type histologique selon la catégorie d'âge*



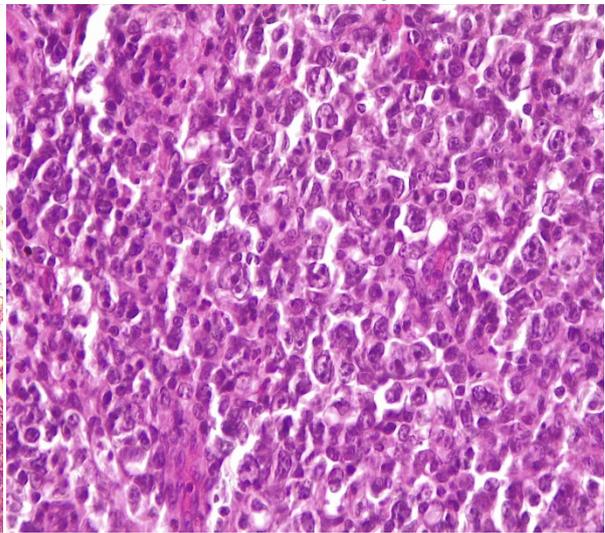
**A : Aspect en ciel étoilé GX10**



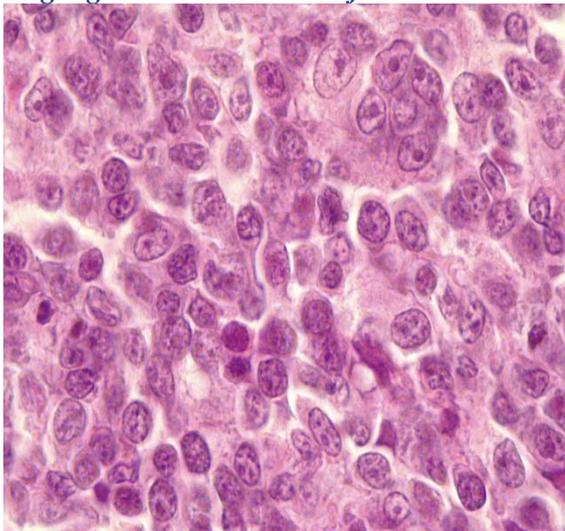
**B : Architecture nodulaire et fibreuse GX10**



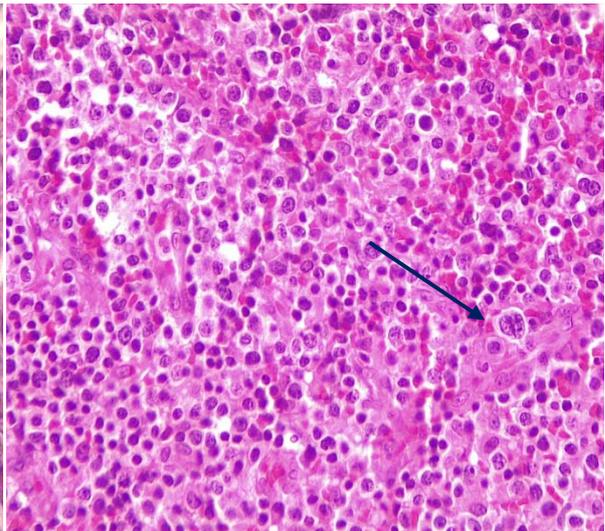
**C : Extension au delà du tissu adipeux péri-ganglionnaire et nécrose flèche noire**



**D : Cytologie polymorphe GX10**



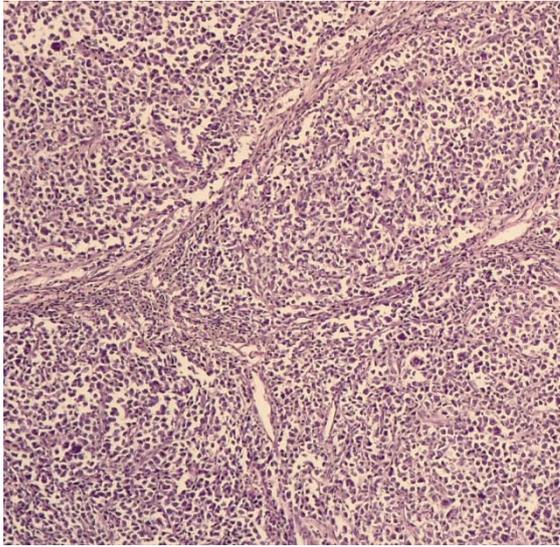
**E : Cytologie polymorphe GX40**



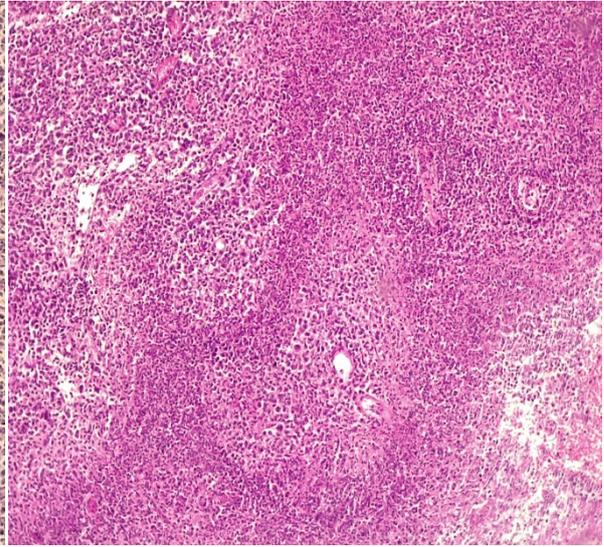
**F : Présence de cellules de cellules de Reed Sternberg like GX40 flèche noire**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

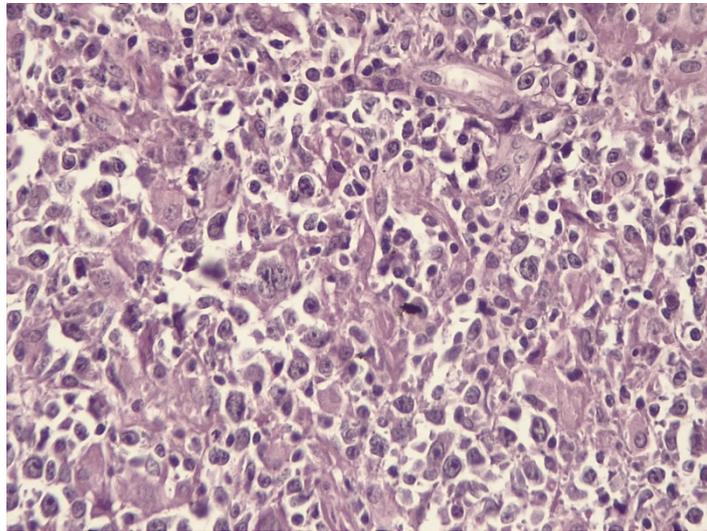
**Figure 51 : Sous type histologique polymorphe LBDGC like**



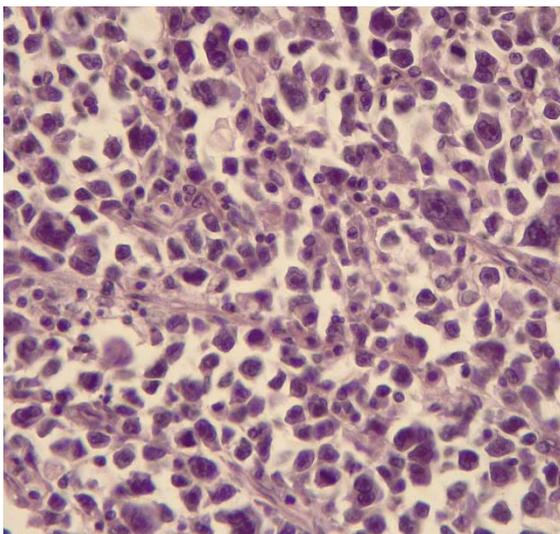
**A :** *Architecture nodulaire et fond riche en lymphocytes, plasmocytes et histiocytes GX10*



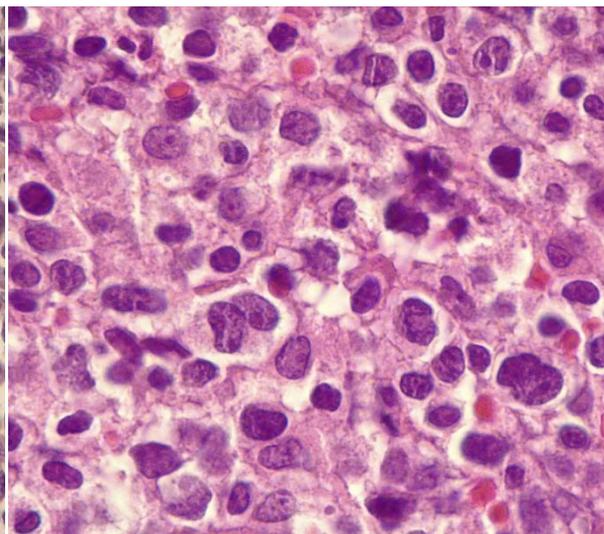
**B :** *Nécrose géographique GX10*



**C :** *Cellules Reed Sternberg-like et Hodgkin-like GX40*



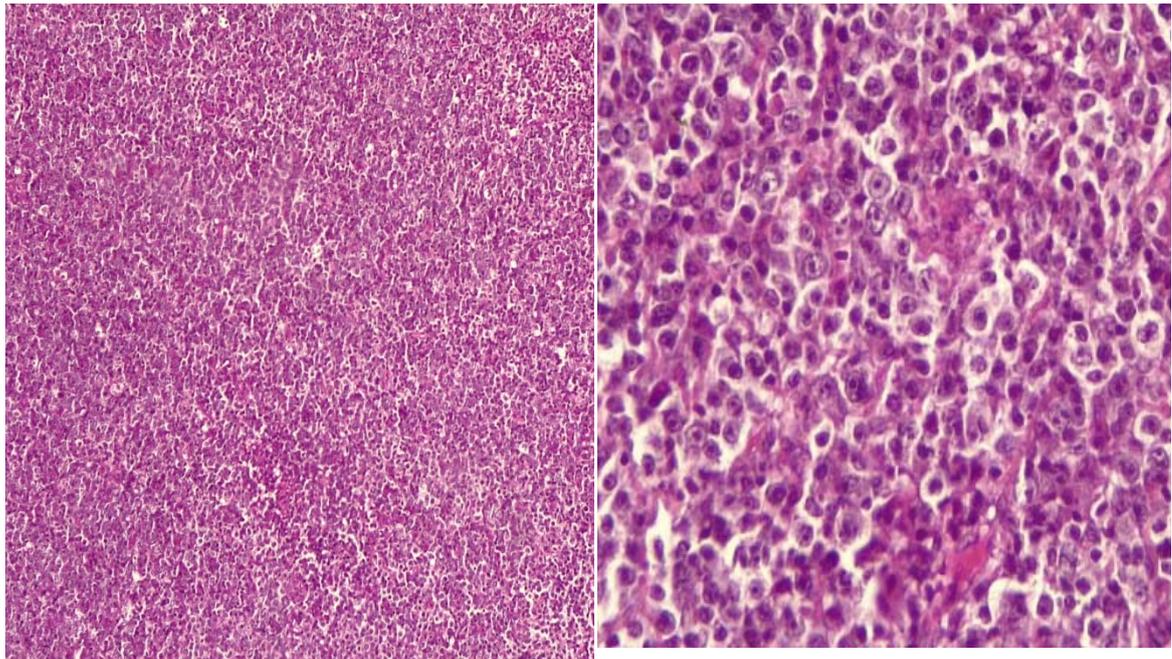
**D :** *Cellules Reed Sternberg-like et Hodgkin-like GX40*



**E :** *Cellules Reed-Sternberg-like GX100*

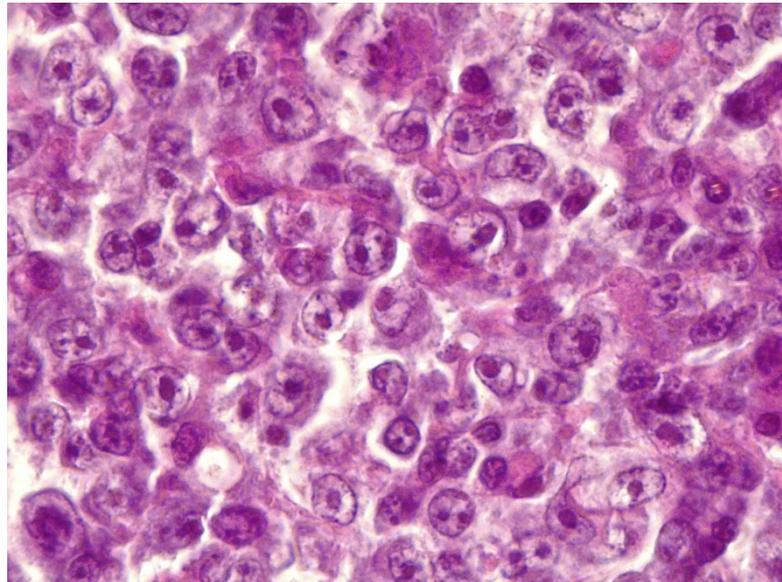
*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 52 :** *Sous type histologique polymorphe Hodgkin-like*



A : Aspect en ciel étoilé GX10

B : Aspect monomorphe GX40



C : Immunoblastes GX100

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

*Figure 53 : Sous type histologique monomorphe.*

#### **IV.1.4.2.2 Phénotype des cellules lymphoïdes tumorales**

100% des cellules lymphoïdes tumorales exprimaient le CD20, BOB-1 et OCT-2.

Le PAX5 était positif dans 84.6% des cas n=11 et négatif dans 15.4% des cas n=2 (Tableau 20).

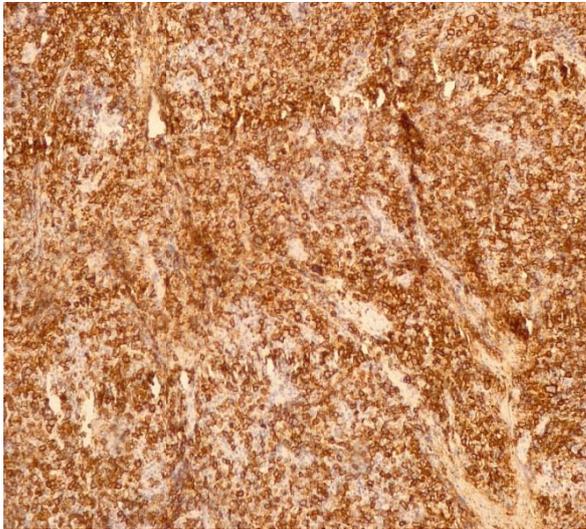
Le CD79 était positif dans 30.8 % des cas n=4 et négatif dans 69.2% des cas n=9 (Tableau 21).

*Tableau 20 : Fréquence de la positivité de PAX5*

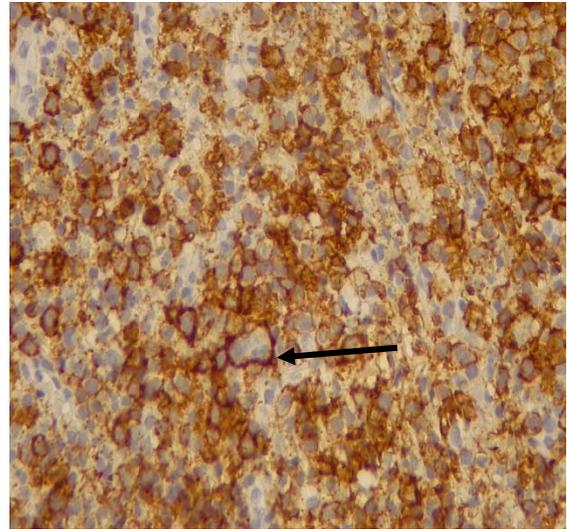
	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
Négatif	2	15,4
Positif	11	84,6
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>

*Tableau 21 : Fréquence de la positivité de CD79*

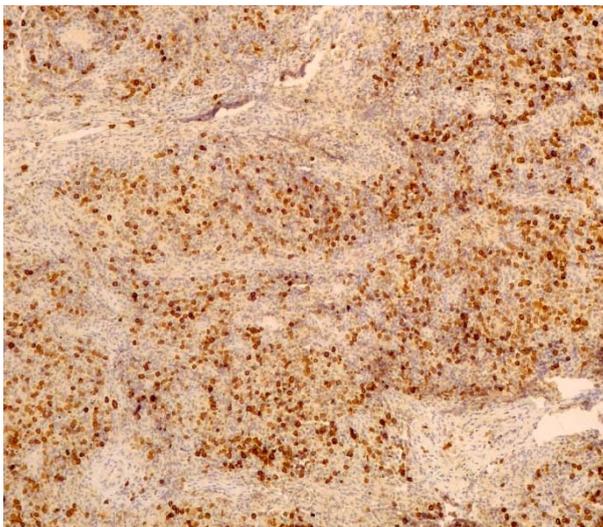
	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
Négatif	9	69,2
Positif	4	30,8
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>



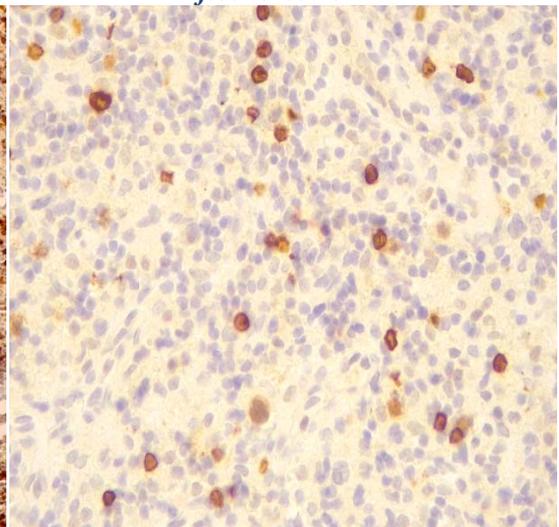
**A : Expression membranaire intense de CD20 GX10**



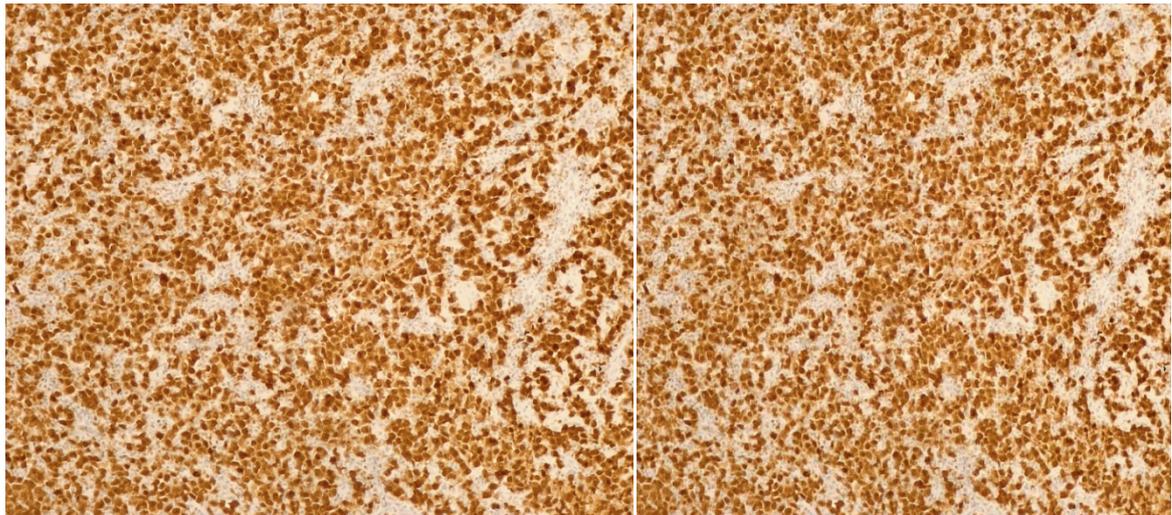
**B : Expression membranaire de CD20 GX40, cellule Reed-Sternberg-like positive flèche noire**



**C : Absence d'expression de CD79a GX10**

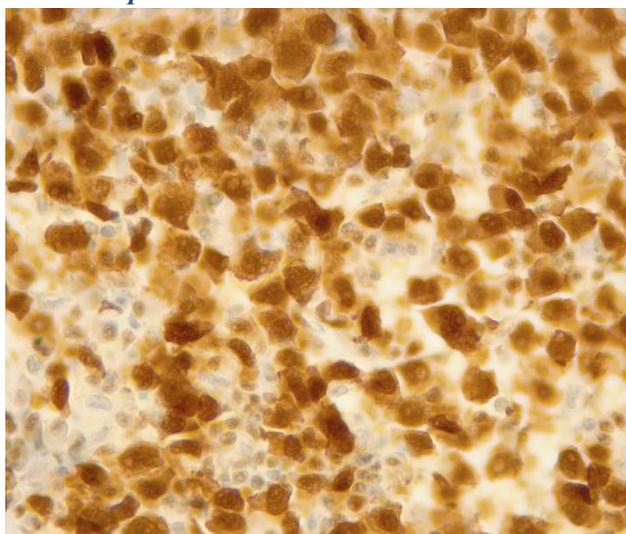


**D : CD79a : positivité des plasmocytes GX40**

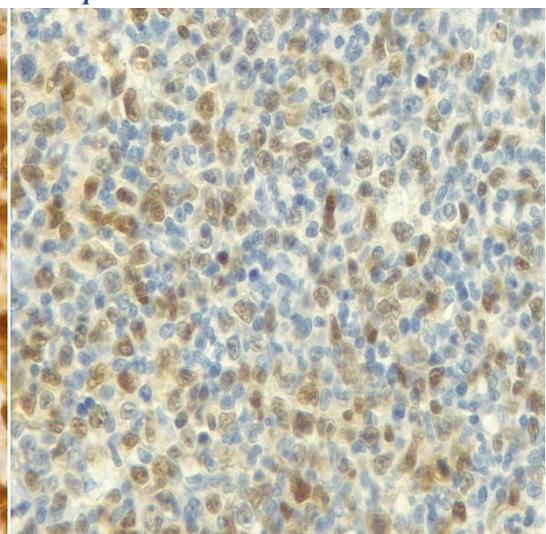


**E** : *Expression nucléaire D'OCT-2 GX10*

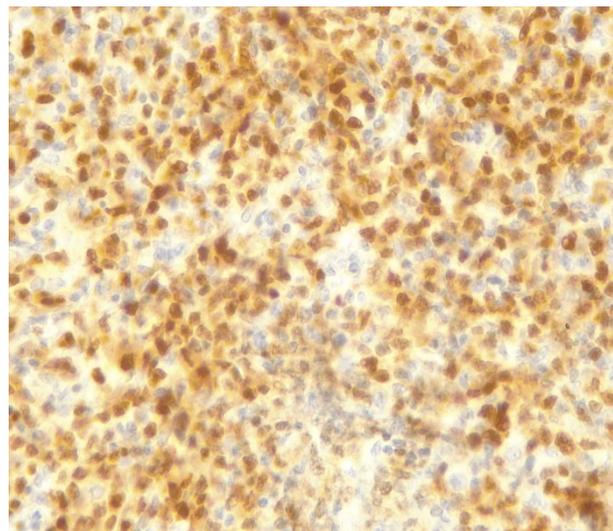
**F** : *Expression nucléaire de BOB-1 GX10*



**G** : *Expression nucléaire D'OCT-2 GX40*



**H** : *Expression nucléaire hétérogène du PAX5 GX10*



**I** : *Expression nucléaire hétérogène du PAX5 GX40*

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 54** : *Phénotype B des cellules lymphoïdes tumorales*

#### IV.1.4.2.3 Répartition selon le sous type moléculaire

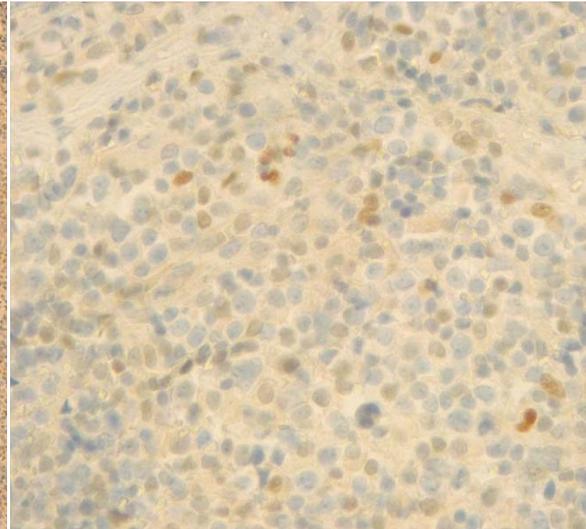
Le phénotype ABC, non GC a été retrouvé dans 100% des LBDGC EBV+ (**Tableau 22**). Le CD10 et le BCL6 étaient négatifs dans 100% des cas. Le MUM1 était positif dans 100% des cas (**Figure 55**).

*Tableau 22 : Répartition des LBDGC EBV+ NOS selon le sous type moléculaire*

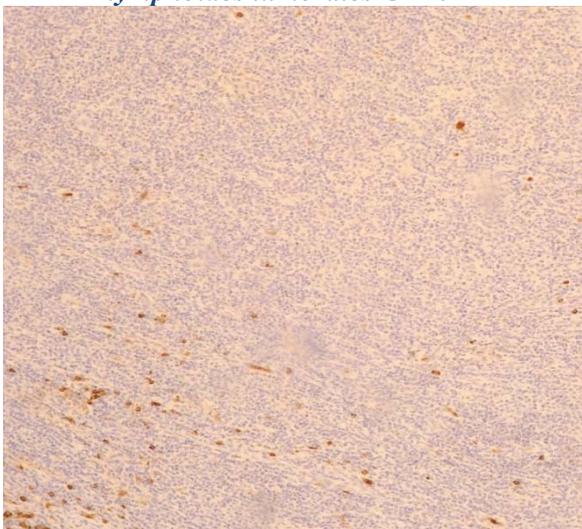
	Effectif	Pourcentage
ABC	13	100,0



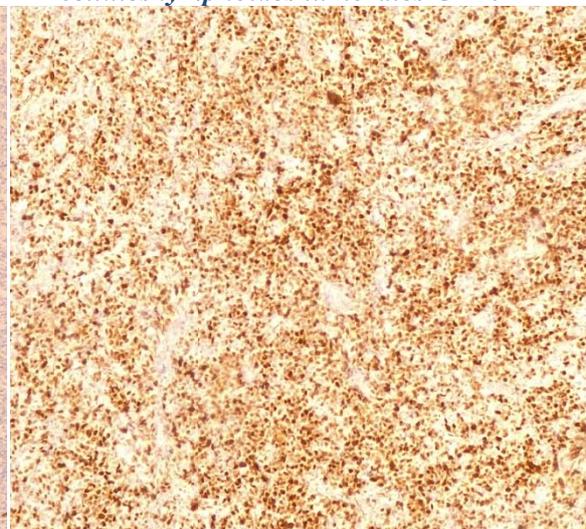
**A : BCL6, absence d'expression des cellules lymphoïdes tumorales GX10**



**B : BCL6 expression nucléaire < 30% des cellules lymphoïdes tumorales GX40**



**C : CD10 absence d'expression des cellules lymphoïdes tumorales GX10**



**D : MUM1 expression nucléaire intense des cellules lymphoïdes tumorales GX10**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

*Figure 55 : Expression des marqueurs du sous type moléculaire*

#### IV.1.4.2.4 Pourcentage D'EBERs

Le % d'expression de transcrits EBERs au niveau des cellules lymphoïdes tumorales variait, de 20% (7.7%) n=1, 30% (15.4%) n=2, 50% (7.7%) n=1, 80% (15.4%) n=2 et 90% (7.7%) n=1, 100% (46.2%) n=6 (Tableau 23, Figure 56).

Tableau 23 : % de transcrits EBERs Dans les LBDGC EBV+

%	Effectifs	Pourcentage
20	1	7,7
100	6	46,2
30	2	15,4
50	1	7,7
80	2	15,4
90	1	7,7
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>

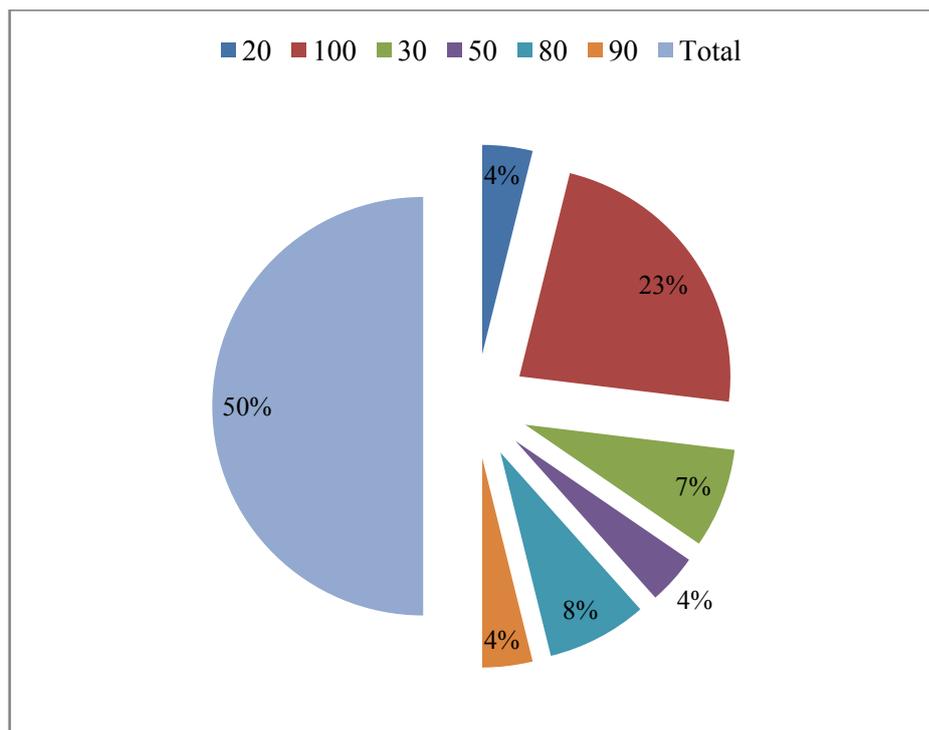
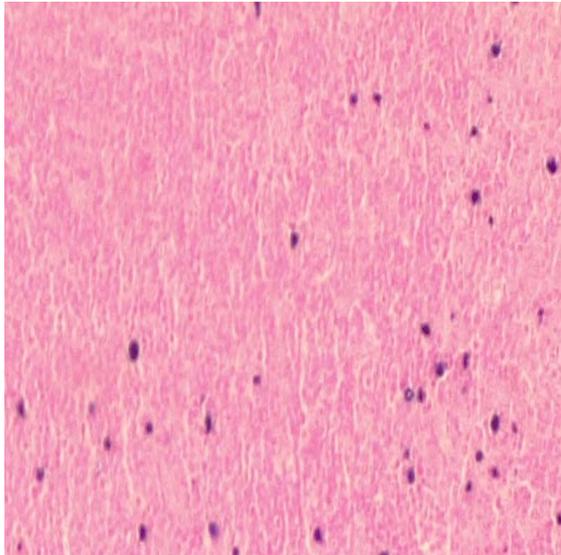
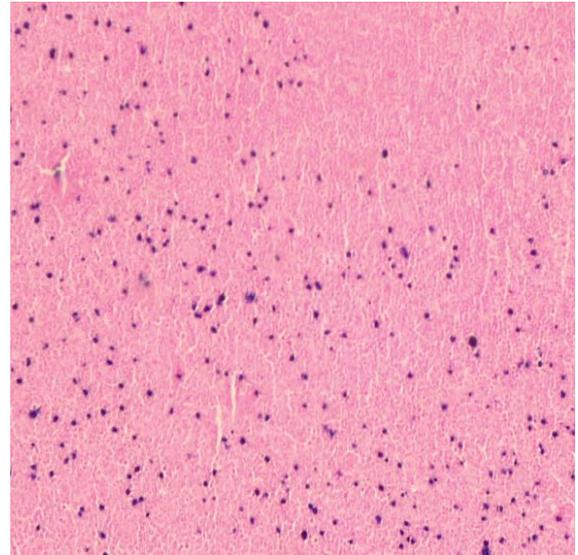


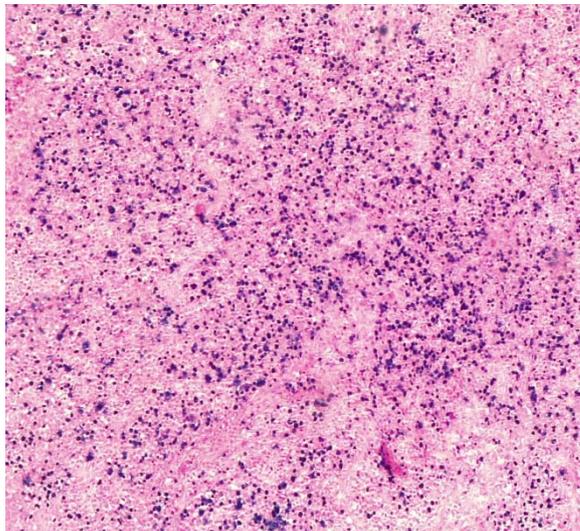
Figure 56: Répartition du % de transcrits EBERs dans les LBDGC EBV+



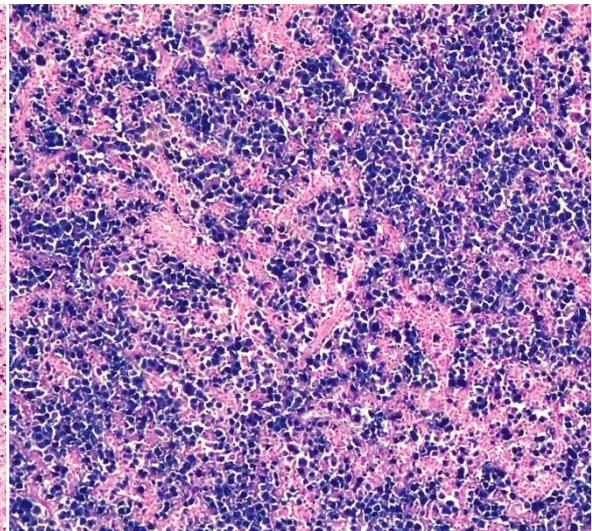
**A : 20% de transcrits EBERs**



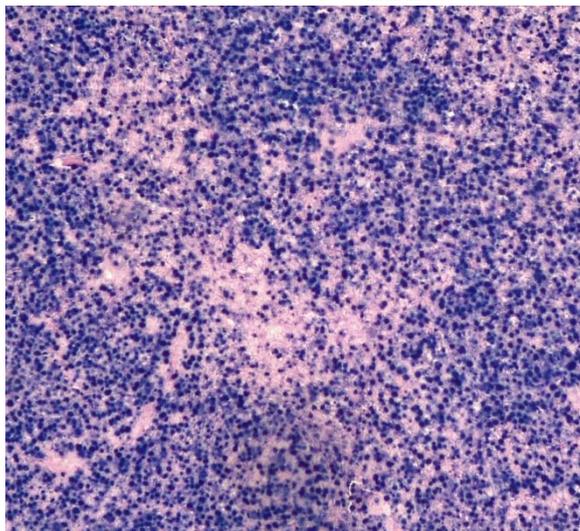
**30% de transcrits EBERs**



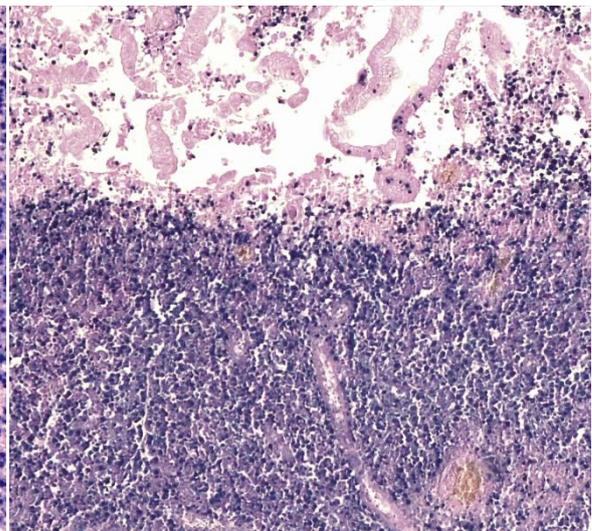
**C : 50% de transcrits EBERs**



**D : 90% de transcrits EBERs**



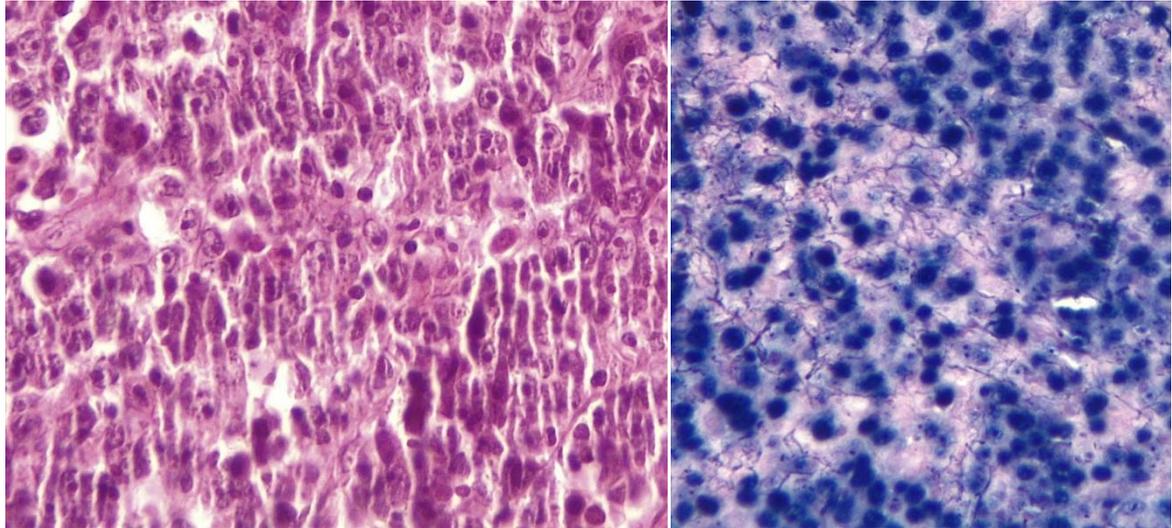
**E : 100% de transcrits EBERs**



**F : Paroi gastrique : présence de 100% de transcrits EBERs**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 57: % de transcrits EBER**



**A : Variante LBDGC-like GX40**

**B : Présence de 100% de transcrits  
EBERs GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 58 : Positivité de l'EBER dans la variante LBDGC-like**

#### **IV.1.4.2.5 Répartition selon le profil de latence II et III**

Le profil latence a été déterminée par la positivité ou la négativité des antigènes de latence LMP1 et EBNA2, par technique d'IHC ainsi que la positivité des transcrits EBERs par technique d'HIS. Il existe 3 types de latence :

- Latence de type I : EBERs+, LMP1-, EBNA2-
- Latence de type II : EBERs+, LMP1+, EBNA2-
- Latence de type III : EBERs+, LMP1+, EBNA2+

La latence de type III a été retrouvée dans 53.8% n= 6 (**Tableau 24, Figure 59**) et la latence de type II représentait 46.2% n=7 (**Tableau 23, Figure 60**).

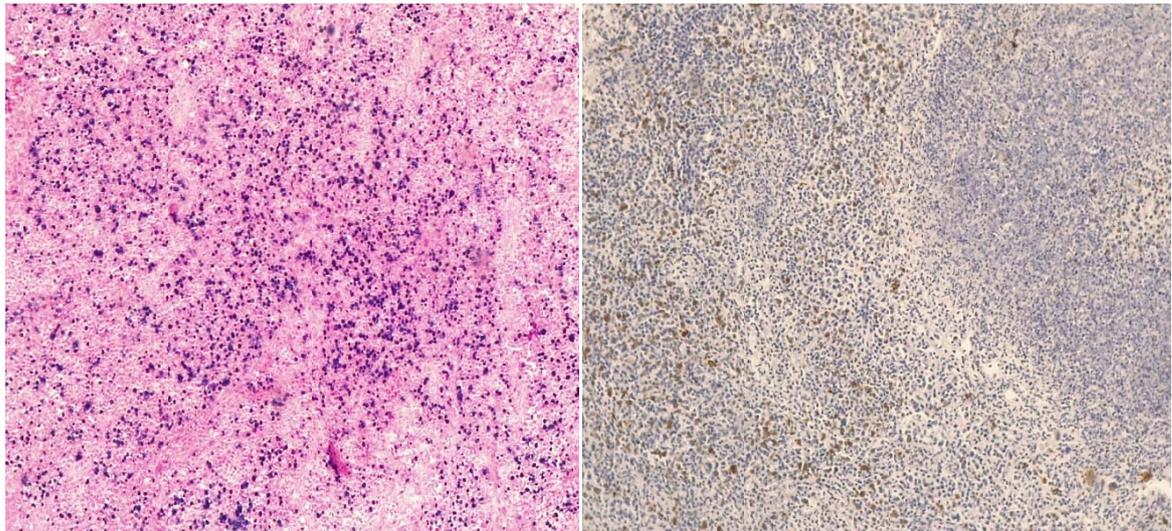
La latence de type II a été notée chez 100% des sujets < 50 ans n =6 et la latence de type III a été retrouvée chez 53.85% des sujets ≥ 50 ans n = 7 (**Tableau 25, Figure 61**).

*Tableau 24 : Répartition des LBDGC EBV+ NOS selon le profil de latence II et III*

<b>Profil de latence</b>	<b>Effectif</b>	<b>Pourcentage</b>
Type II	6	46,2
Type III	7	53,8
<b>Total</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>

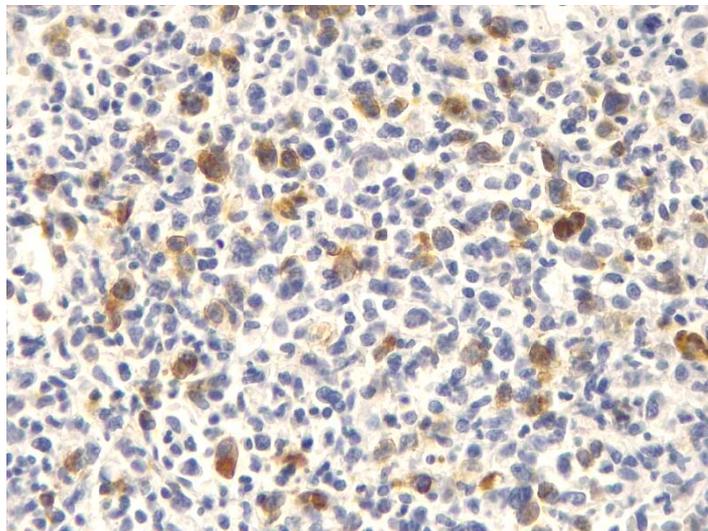
*Tableau 25 : Répartition des latences II et III selon la catégorie d'âge*

<b>Catégorie d'âge</b>	<b>Profil de latence</b>		<b>Total</b>
	Type II	Type III	
SUJETS < 50 ans	3	0	3
SUJETS ≥ 50 ans	3	7	10
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>13</b>

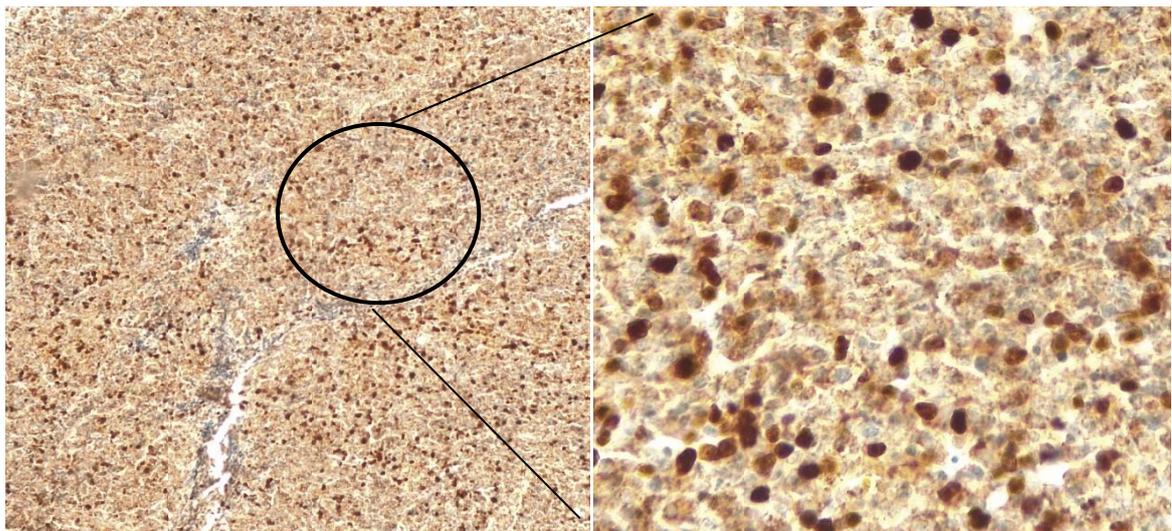


**A : EBERs+**

**B : LMP1+ GX10**



**C : LMP1+, expression cytoplasmique des cellules lymphoïdes tumorales GX40**

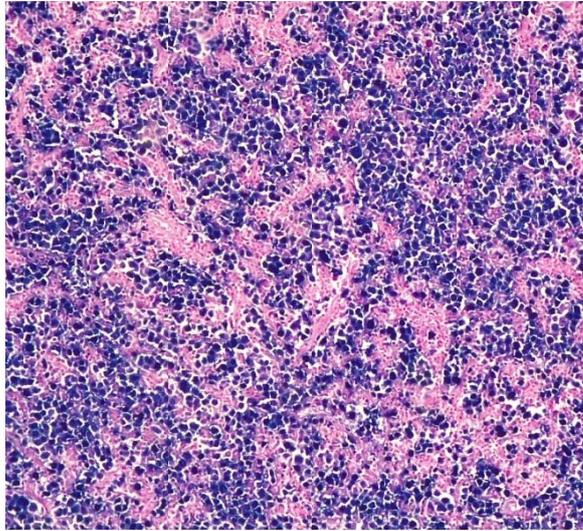


**D : EBNA2 + GX10**

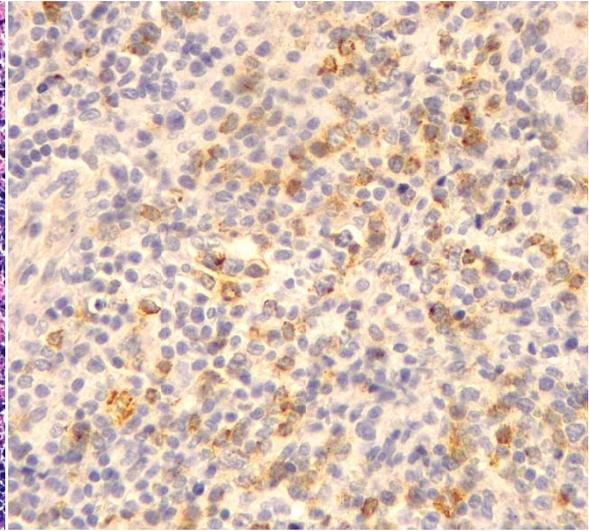
**E : EBNA2+, expression nucléaire intense GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

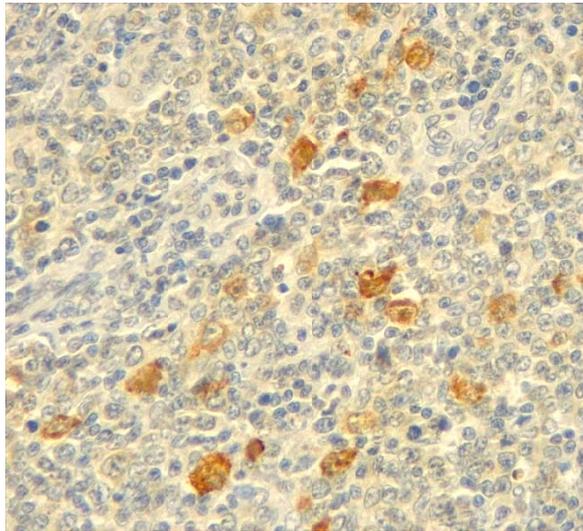
*Figure 59 : Latence de type III*



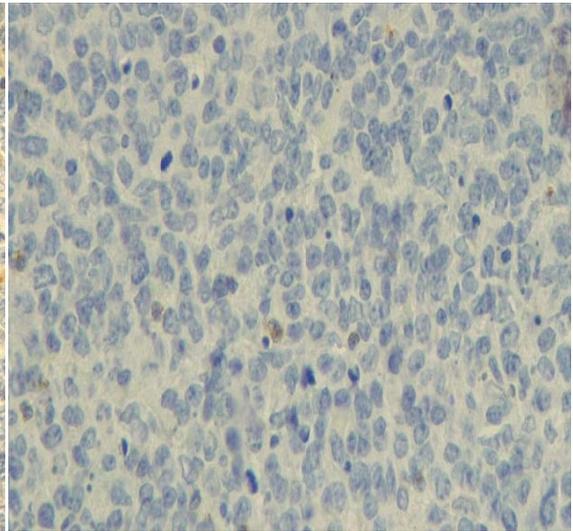
**A : EBERs+**



**B : LMP1+ GX10**



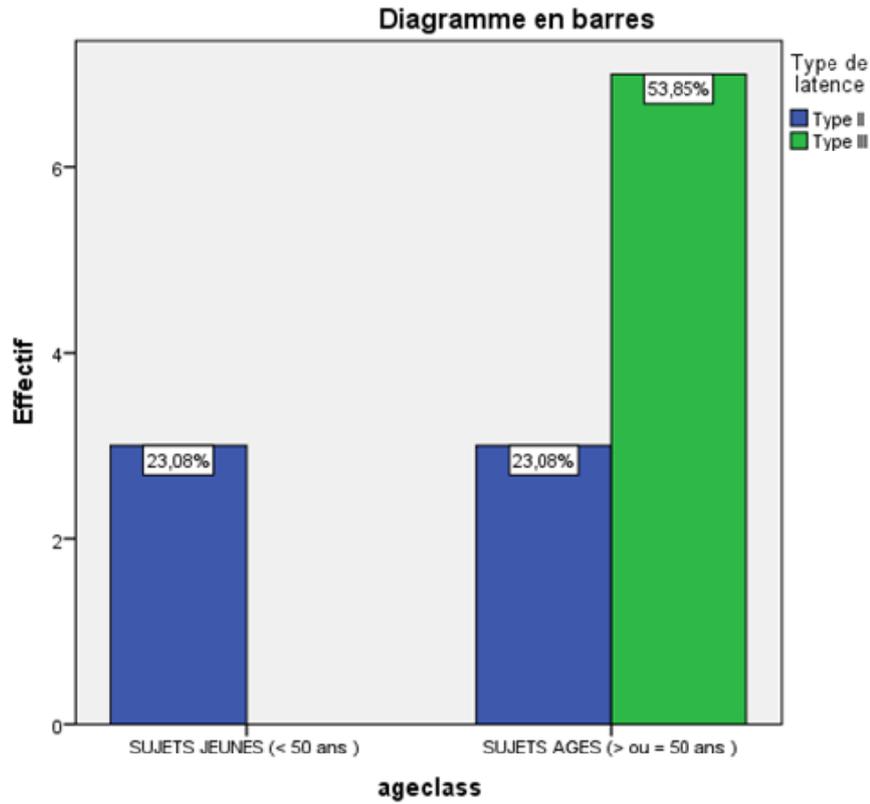
**C : LMP1+ GX40**



**D : EBNA2 - GX10**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

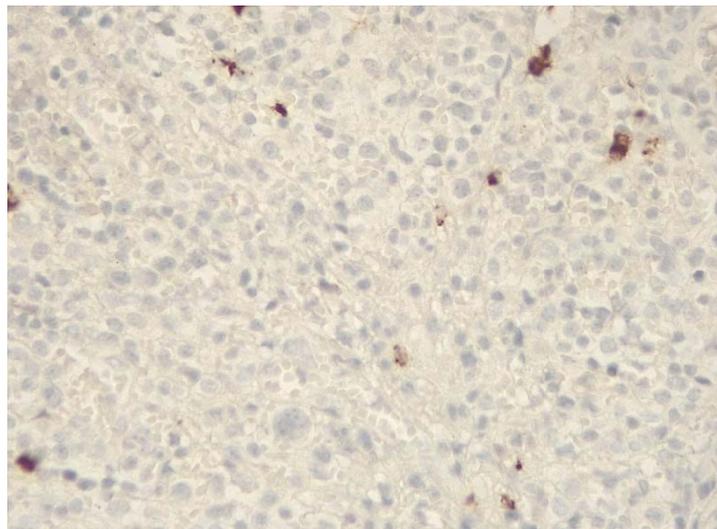
*Figure 60 : Latence de type II*



*Figure 61 : Fréquence de répartition des latences II et III selon la catégorie d'âge*

#### *IV.1.4.2.6 Expression du CD15*

L'expression du CD15 était négative dans 100% des cas (**Figure 62**).



*Microphotographie Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

*Figure 62: Négativité de l'expression du CD15 GX40*

**Tableau 26 : Caractéristiques démographiques et anatomopathologiques des LBDGC EBV+**

Patient	Sexe	Age	Localisation	Sous type histologique	Sous type moléculaire	% EBERS	Profil de latence	Expression du CD15
1	H	50	Rétropéritoine	Polymorphe LBDG -like	ABC	100	III	-
2	F	62	Cavum	Monomorphe	ABC	30	II	-
3	F	79	Ganglion	Monomorphe	ABC	30	II	-
4	H	44	Ganglion	Polymorphe LBDG -like	ABC	80	II	-
5	F	82	Ganglion	Monomorphe	ABC	100	III	-
6	H	22	Ganglion	Polymorphe LBDG -like	ABC	90	II	-
7	F	44	Ganglion	Polymorphe HDG-like	ABC	30	II	-
8	F	52	Ganglion	Polymorphe LBDG -like	ABC	10	II	-
9	F	81	Ganglion	Polymorphe LBDG -like	ABC	100	III	-
10	H	80	Ganglion	Polymorphe HDG-like	ABC	50	III	-
11	F	61	Estomac	Polymorphe HDG-like	ABC	100	III	-
12	H	87	Ganglion	Polymorphe LBDG -like	ABC	80	III	-
13	H	60	Ganglion	Monomorphe	ABC	100	III	-

#### **IV.2 Volet 2 : Comparaison du profil clinique, l'expression de CD30, les voies de lymphomagenèse et les TIL du ME ainsi que les facteurs histopronostiques des deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-**

Pour ce volet, nous avons étudié les caractéristiques cliniques des LBDGC EBV+ au préalable (symptômes B, stade clinique, IPI, réponse au traitement et survie) ainsi que l'expression du CD30, les voies de lymphomagenèse, les TIL du ME ainsi que les facteurs histopronostiques par une étude descriptive.

Pour l'analyse bi-variée, **78** patients LBDGC EBV- ayant reçu 6 à 8 cures de R-CHOP et suivis en hématologie et en oncologie à Blida ont été retenus et comparés aux **13** patients LBDGC EBV+.

**71** patients EBV- ont été exclus, ces patients n'étaient pas suivis et traités à Blida.

#### IV.2.1 Profil Clinique

Les paramètres cliniques étudiés étaient (**Tableau 27**) :

- sexe,
- âge (<50 ans et âge ≥ à 50 ans),
- présence de symptômes B,
- stade clinique,
- score IPI,
- réponse au traitement
- et survie.

L'analyse bivariée a été réalisée par le test Khi-Deux  $X^2$  afin d'analyser les différences de proportion entre les deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-.

La variable cible était l'EBV avec deux modalités « présent– absent » (**Tableau 33**).

Nous avons également comparé entre le statut EBV et la sérologie EBV quand elle a été réalisée.

##### IV.2.1.1 Caractéristiques cliniques des LBDGC EBV+

*Tableau 27: Caractéristiques cliniques des LBDGC EBV+*

Patient	Sexe	Age	Symptômes B	Stade clinique	IPI	Réponse au traitement	Survie	Sérologie EBV
1	H	50	Présents	IIIB	Haut	Echec	DCD	NF
2	F	62	Absents	IIA	faible	RP	Vivant	NF
3	F	79	Présents	IVB	Haut	Echec	DCD	NF
4	H	44	Présents	IVB	Intermédiaire faible	RC	Vivant	+
5	F	82	Présents	IIIB	Haut	Echec	DCD	NF
6	H	22	Présents	IIIB	Haut	Echec	DCD	NF
7	F	44	Présents	IIIB	Faible	RC	Vivant	+
8	F	52	Absents	IIA	Faible	RC	Vivant	+
9	F	81	Présents	IVB	Haut	Echec	DCD	NF
10	H	80	Présents	IVB	Intermédiaire haut	Echec	DCD	+
11	F	61	Présents	IVB	Haut	Echec	DCD	NF
12	H	87	Présents	IVB	Intermédiaire faible	Echec	DCD	NF
13	H	60	Présents	IVB	Intermédiaire faible	Echec	DCD	NF

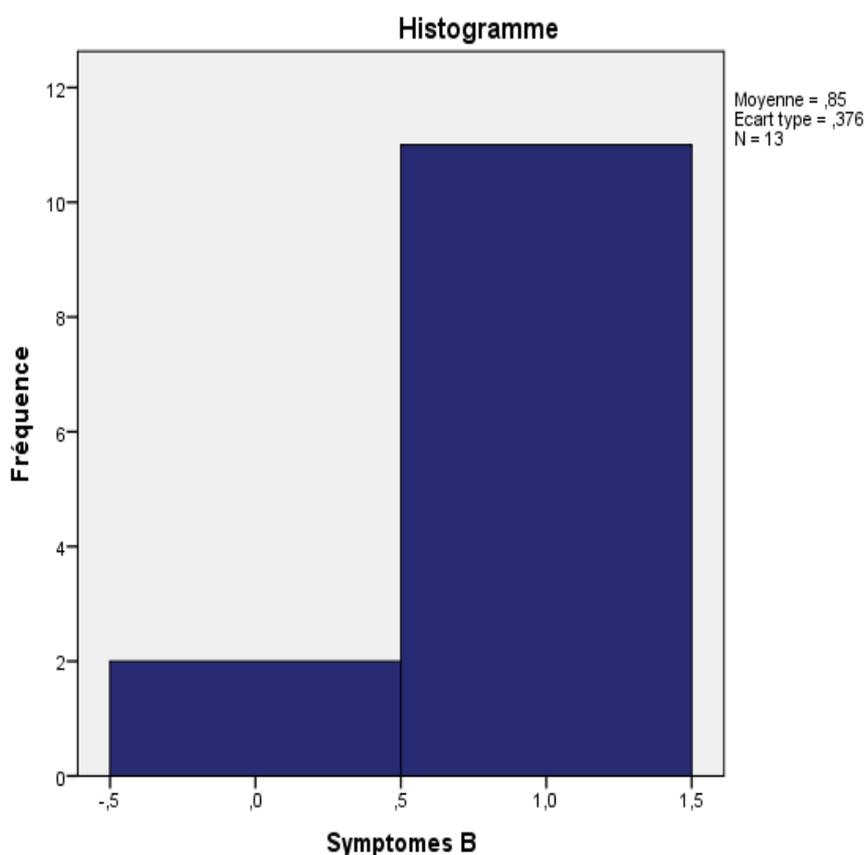
RP : réponse partielle, RC : réponse complète, DCD : décédé, NF : non faite

#### Symptômes B

84.6% n=11 des patients ont présenté une symptomatologie de type B et 15,4% n= 3 une symptomatologie de type A (**Tableau 28, Figure 63**).

*Tableau 28 : Fréquence des symptômes B LBDGC EBV+*

Effectif	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
2	15,4	15,4	15,4
11	84,6	84,6	100,0
13	100,0	100,0	



*Figure 63 : Répartition des symptômes B dans les LBDGC EBV+*

### 🚦 Stade clinique

84.6% n=11 des patients ont présenté un stade clinique avancé (III et IV) et 15,4% n= 3 un stade clinique précoce (I et II) (**Tableau 29, Figure 64**).

*Tableau 29 : Fréquence du stade clinique LBDGC EBV+*

Effectif	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
2	15,4	15,4	15,4
11	84,6	84,6	100,0
13	100,0	100,0	

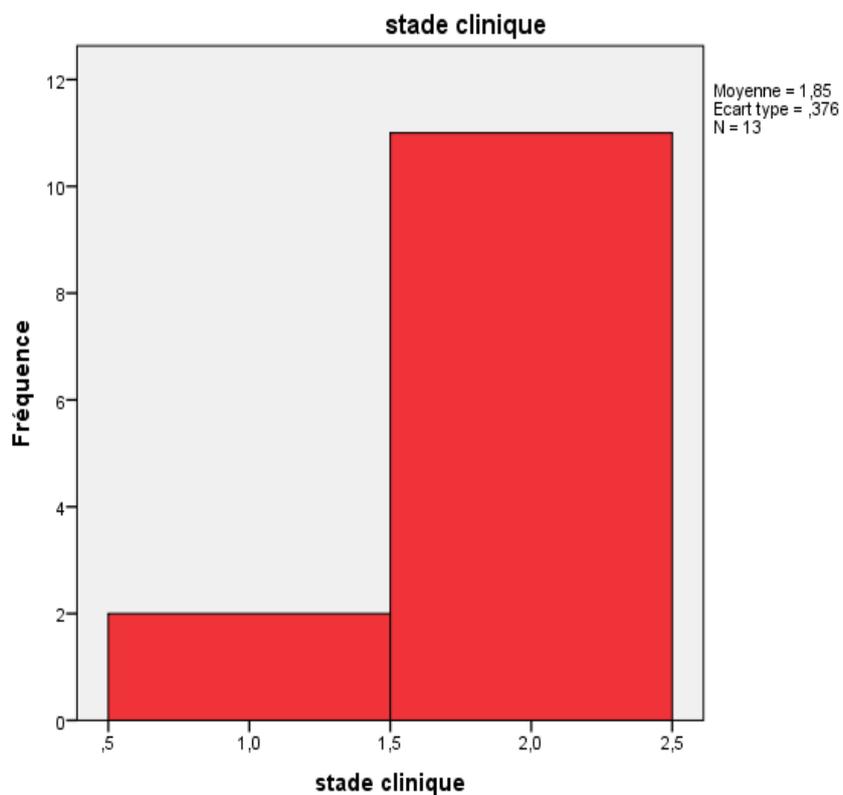


Figure 64 : Répartition de la fréquence du stade clinique LBDGC EBV+

#### IPI

46.2% n=6 des patients ont présenté un IPI haut (4 et 5) (Tableau 30, Figure 64).

Tableau 30 : Fréquence de l'IPI LBDGC EBV+

Effectif	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
3	23,1	23,1	23,1
3	23,1	23,1	46,2
1	7,7	7,7	53,8
6	46,2	46,2	100,0
<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	

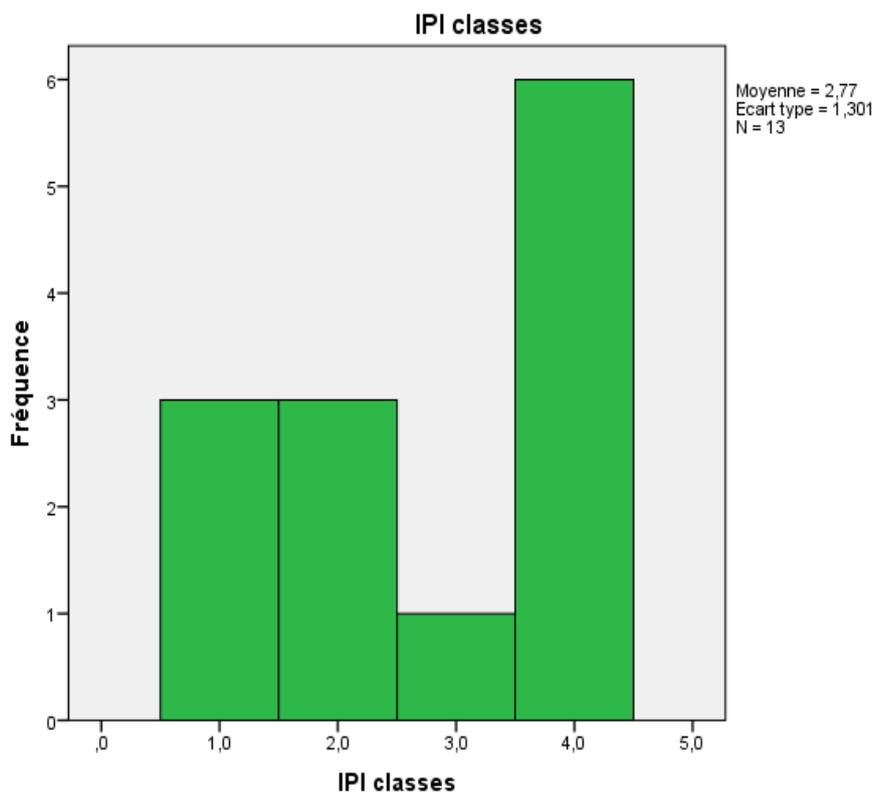


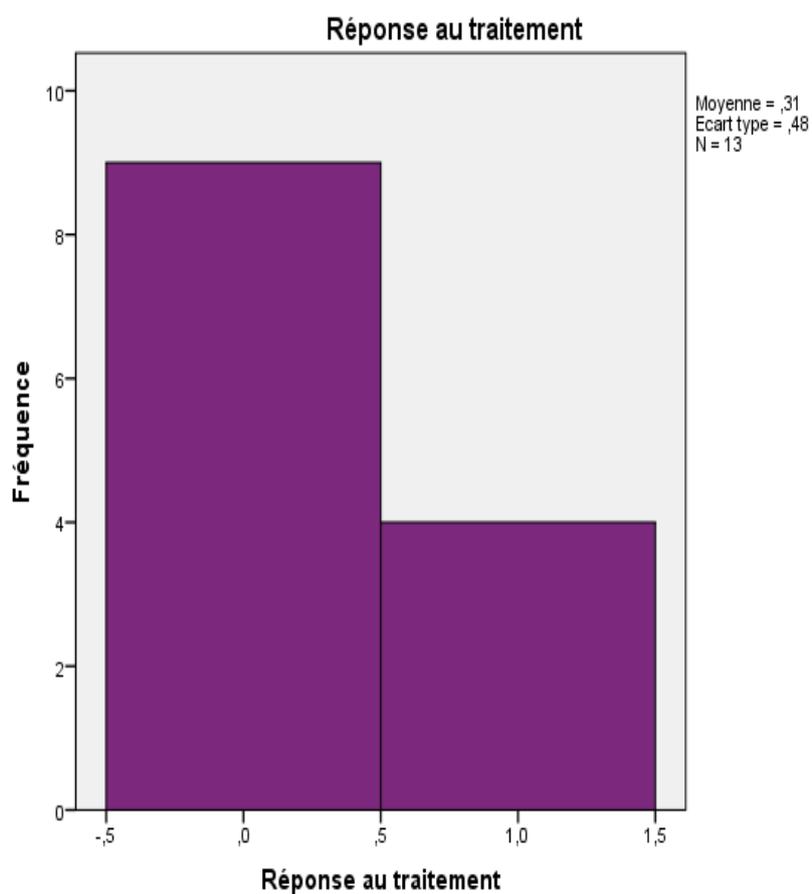
Figure 65: Répartition de la fréquence de l'IPI

### 🚦 Réponse au traitement

69.2 % n=9 des patients ont présenté un échec au traitement et 30.8% n= 4 ont répondu au traitement (Tableau 31, Figure 66).

Tableau 31 : Taux de réponse au traitement

Fréquence	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
9	69,2	69,2	69,2
4	30,8	30,8	100,0
<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	



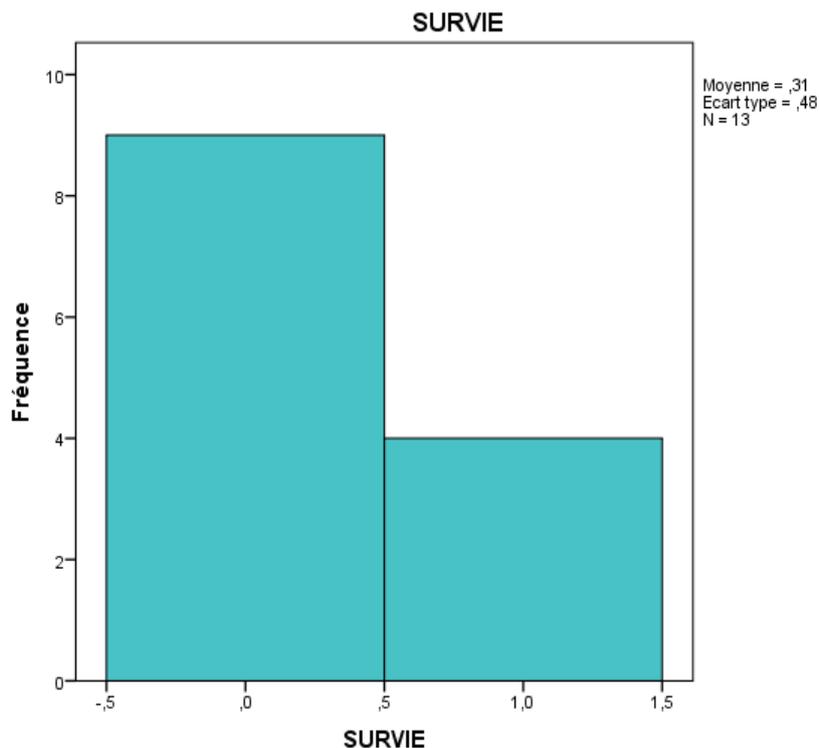
*Figure 66 : Fréquence du taux de réponse au traitement*

### **Survie**

69.2 % n=9 des patients sont décédés et 30.8% n= 4 sont vivants (**Tableau 32, Figure 67**).

*Tableau 32: Taux de survie*

<b>Fréquence</b>	<b>Pourcentage</b>	<b>Pourcentage valide</b>	<b>Pourcentage cumulé</b>
<b>9</b>	69,2	69,2	69,2
<b>4</b>	30,8	30,8	100,0
<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	



*Figure 67 : Répartition du taux de survie*

→ **Analyse bivariée**

Au terme de l'analyse bivariée, nos résultats ont montré une différence significative entre les deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- :

Sur le score IPI (**p=0.07**), celui-ci était haut chez les patients présentant un LBDGC EBV+ (46.2%) (**Figure 68**), et la réponse au traitement R-CHOP (**p=0.01**) a été faible (**Figure 69**). L'échec au traitement a été noté dans 69.2% des LBDGC EBV+.

Nous n'avons pas constaté de différence significative pour les paramètres : âge (**p=0.86**), sexe (**p=0.29**), symptômes B (**p=0.145**) et le stade clinique (**p=0.34**) entre les deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-.

Tableau 33 : Analyse bivariée du profil clinique des LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-

Caractéristiques	Catégories	Total	EBV+		EBV-		p
			n	%	n	%	
Sexe	Homme	44	6	46.2	38	48.7	0.864
	Femme	47	7	53.8	40	51.3	
Age	<50 ans	33	3	9.1	30	90.9	0.362
	≥50 ans	58	10	17.2	48	82.8	
Symptômes B Stade Clinique	Absents	30	2	15.4	28	35.9	0.14
	Présents	61	11	84.6	50	64.1	
	I-II	26	2	15.4	24	30.8	
Score IPI	III-IV	65	11	84.6	54	69.2	0.07
	Faible	91	3	23.1	31	39.7	
	Intermédiaire	23	3	23.1	20	20	
Réponse au traitement	Faible	16	1	7.7	15	19.2	0.014
	Intermédiaire	16	1	7.7	15	19.2	
	Haut	18	6	46.2	12	15.4	
	Echec	34	9	69.2	25	32.1	
	RC/RP	57	4	30.8	53	67.9	

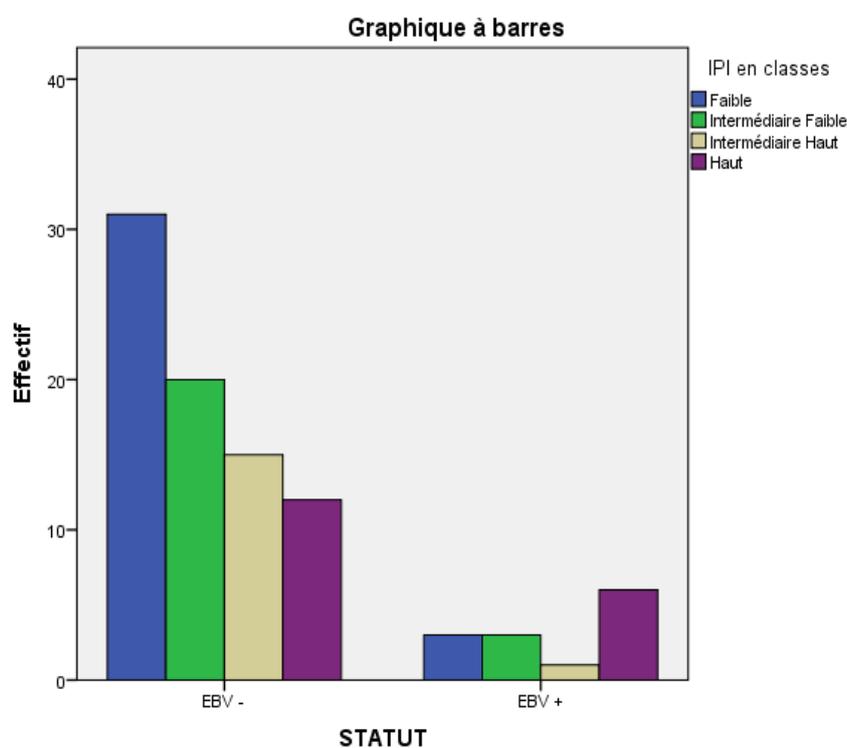
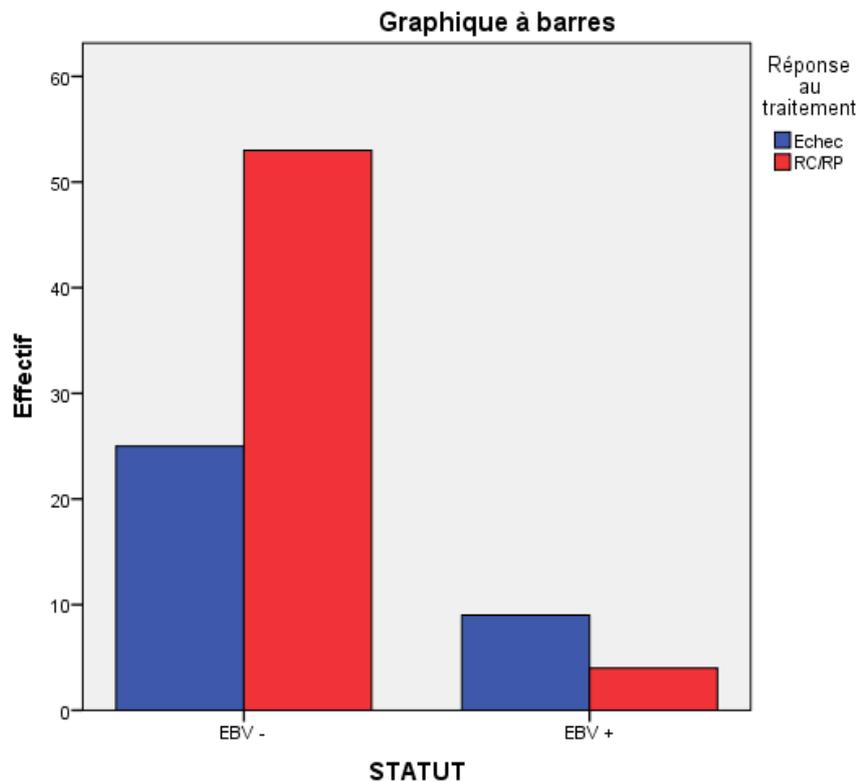


Figure 68: Fréquence du score de l'Index Pronostic International



*Figure 69 : Fréquence de la réponse au traitement R-CHOP*

→ **Analyse du taux de survie**

L'analyse du taux de survie selon la méthode Kaplan Meier a montré une différence significative du taux de survie entre les LBDGC EBV+ et EBV-. Log Rank (Mantel-Cox) **p=0.0001 (Figure 70)**.

Cependant, il n'existait pas de différence significative entre le sous type moléculaire ABC non GC et GC. Log Rank (Mantel-Cox) **p=0.5 (Figure 70)**.

La survie a été significativement associée à l'EBV (**p=0.0001**). La moyenne de survie a été de 50,14 IC [41.6-58.6] pour les EBV – versus 8,9 [3,6-14,1]. Elle a « été faible pour les lymphomes associés à l'EBV (**la survie à 10 mois à 29% EBV+ versus 87% EBV -**)

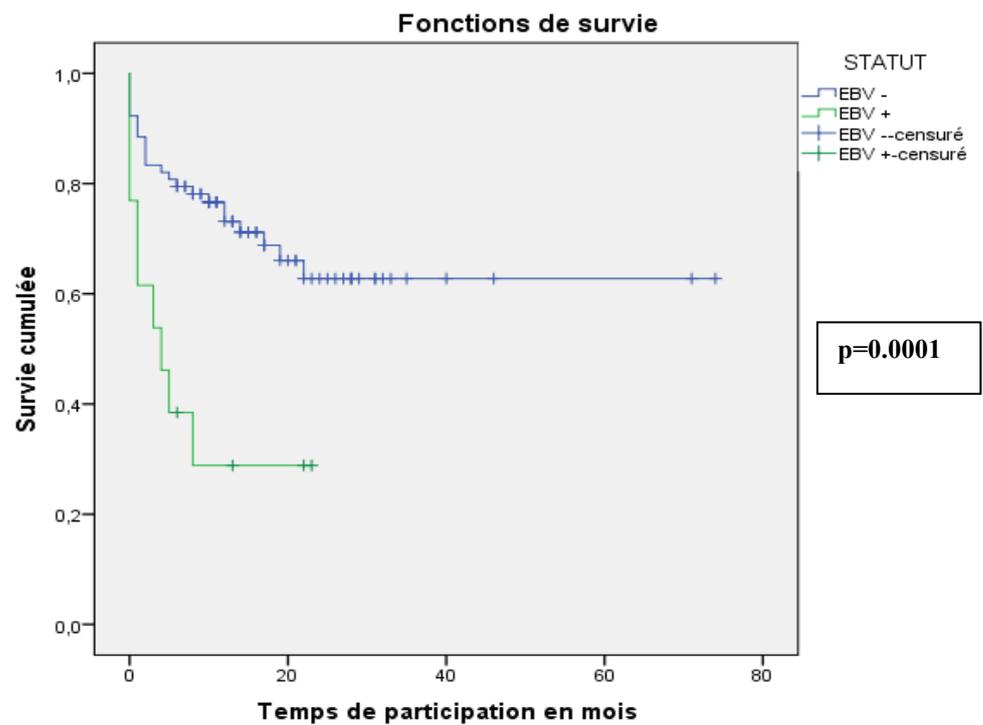
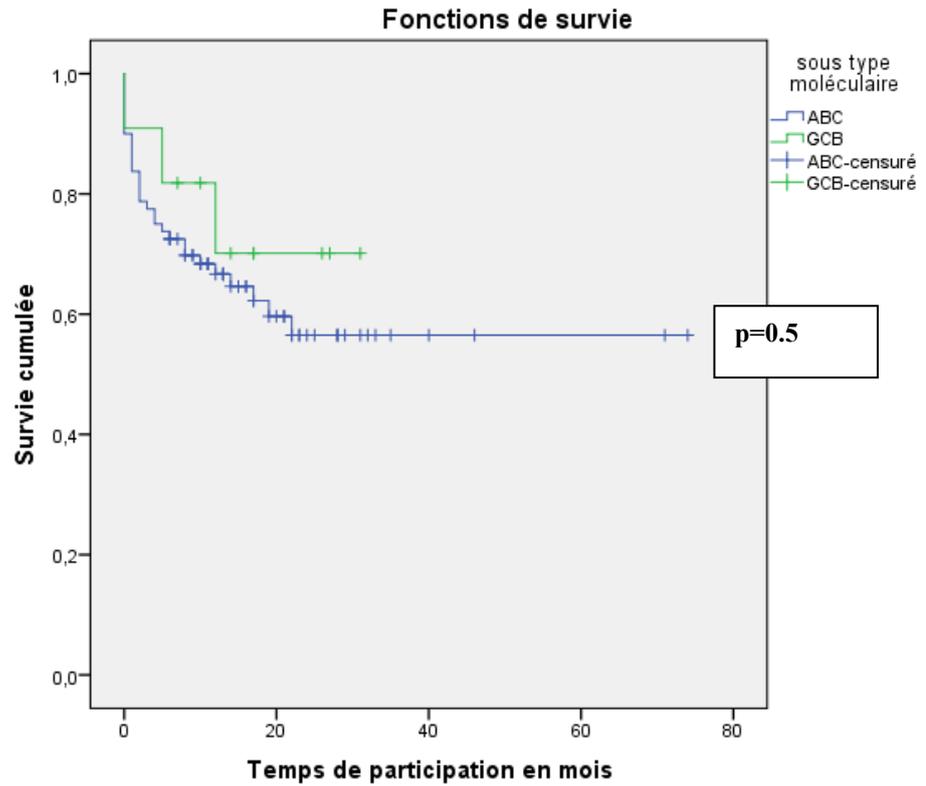


Figure 70 : Analyse du taux de survie

→ *Analyse univariée du profil de latence par rapport à la réponse au traitement et la survie*

Dans le groupe LBDGC EBV+, nous avons également apprécié la réponse thérapeut au traitement et la survie par rapport au profil de latence.

L'analyse du profil de latence par rapport à la réponse thérapeutique a montré une différence significative entre les deux profils de latence II et III **p=0.009**.

77,8% n=7 des patients avec un profil de latence de type III et 22.2% n=2 avec un profil de latence de type II n'ont pas répondu au traitement (**Tableau 34**).

66.7% n=4 des patients avec un profil de latence de type II ont répondu au traitement (**Tableau 34**).

L'analyse univariée du profil de latence par rapport à la survie a montré une différence significative entre les deux profils de latence II et III **p=0.009**.

77.8% n=7 des patients avec un profil de latence de type III et 22.2% n=2 avec un profil de latence de type II sont décédés (**Tableau 35**).

66.7% n=4 des patients avec un profil de latence de type II sont vivants (**Tableau 35**).

*Tableau 34: Fréquence du profil de latence par rapport à la réponse au traitement*

Réponse au traitement		Profil de latence		Total	
		Latence II	Latence III		
0	Effectif	2	7	9	
	% dans Réponse au traitement	22,2%	77,8%	100,0%	
	% dans Type de latence	33,3%	100,0%	69,2%	
1	Effectif	4	0	4	
	% dans Réponse au traitement	100,0%	0,0%	100,0%	
	% dans Type de latence	66,7%	0,0%	30,8%	
		Effectif	6	7	13
		% dans Réponse au traitement	46,2%	53,8%	100,0%
		<b>% dans Type de latence</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>

*Tableau 35: Analyse de la survie par rapport au profil de latence*

SURVIE		Profil de latence		Total
		Latence II	Latence III	
0	Effectif	2	7	9
	% dans SURVIE	22,2%	77,8%	100,0%
	% dans Type de latence	33,3%	100,0%	69,2%
1	Effectif	4	0	4
	% dans SURVIE	100,0%	0,0%	100,0%
	% dans Type de latence	66,7%	0,0%	30,8%
<b>Total</b>	Effectif	6	7	13
	% dans SURVIE	46,2%	53,8%	100,0%
	<b>% dans Type de latence</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>	<b>100,0%</b>

#### IV.2.1.2 Sérologie EBV

La sérologie EBV a été réalisée chez seulement 27 patients, 4 EBV+ et 22 EBV-. La sérologie EBV a été positive chez 84% patients EBV – et 100% des patients EBV+ (**Tableau 36**). Il n’existait pas de différence significative entre les deux groupes. **p=0.82**.

*Tableau 36 : Sérologie EBV*

Sérologie EBV		STATUT		Total
		EBV -	EBV +	
<b>NON FAITE</b>	Effectif	55	9	64
	% dans Sérologie EBV	85,9%	14,1%	100,0%
<b>POSITIVE</b>	Effectif	21	4	25
	% dans Sérologie EBV	84,0%	16,0%	100,0%
<b>NEGATIVE</b>	Effectif	2	0	2
	% dans Sérologie EBV	100,0%	0,0%	100,0%
<b>Total</b>	Effectif	78	13	91
	<b>% dans Sérologie EBV</b>	<b>85,7%</b>	<b>14,3%</b>	<b>100,0%</b>

#### IV.2.2 Expression du CD30

Le CD30 était positif chez 76.9% n=10 des patients et négatif chez 23.1% n=3 des patients (**Tableau 38, Figure 71**).

*Tableau 37 : % d'expression du CD30 dans les LBDGC EBV+*

Patient	Sexe	Age	%Expression de CD30
<b>1</b>	H	50	30
<b>2</b>	F	62	0
<b>3</b>	F	79	0
<b>4</b>	H	44	40
<b>5</b>	F	82	20
<b>6</b>	H	22	20
<b>7</b>	F	44	30
<b>8</b>	F	52	0
<b>9</b>	F	81	80
<b>10</b>	H	80	30
<b>11</b>	F	61	40
<b>12</b>	H	87	30
13	H	60	40

*Tableau 38: Fréquence d'expression du CD30 par les LBDGC EBV+*

Effectif	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
3	23,1	23,1	23,1
10	76,9	76,9	100,0
<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	

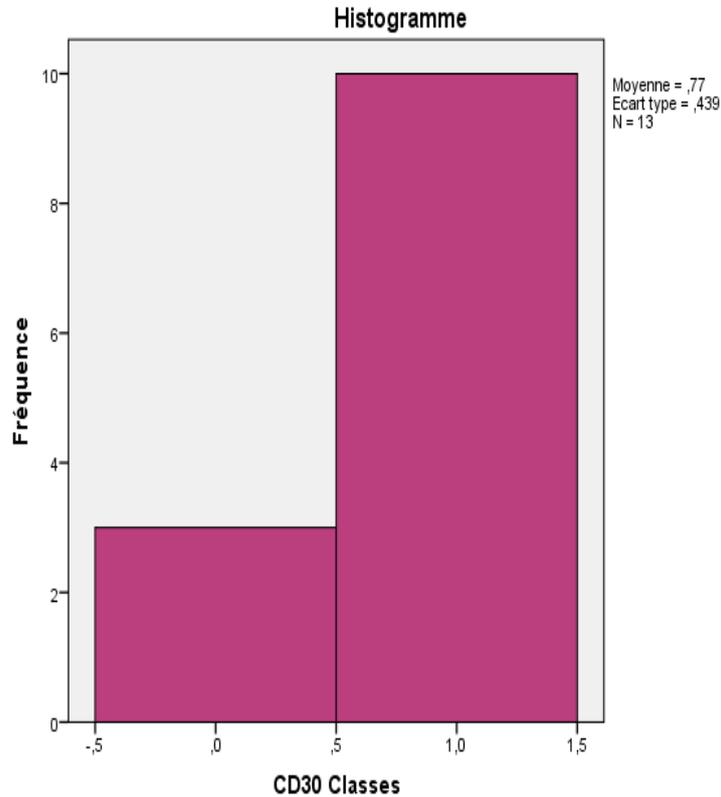


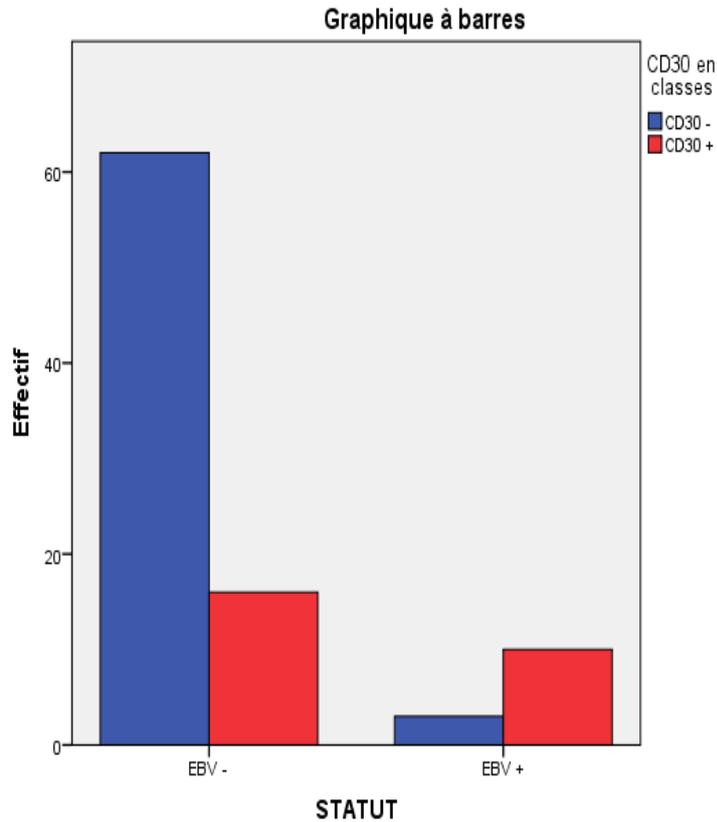
Figure 71 : Répartition de la fréquence d'expression du CD30 dans les LBDGC EBV+

→ Analyse bivariée de l'expression du CD30

L'analyse bivariée a montré une différence significative entre les LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-. ( $p < 0.001$ ). Le CD30 a été positif dans 76.9% des LBDGC EBV+ et 20.5% des LBDGC EBV- (Tableau 39, Figure 72).

Tableau 39 : Analyse bivariée de l'expression du CD30

Caractéristiques	Catégories	Total	EBV+	EBV-	p
CD30	CD30-	65	3	23.1 62 79.5	0.000
	CD30+	26	10	76.9 16 20.5	



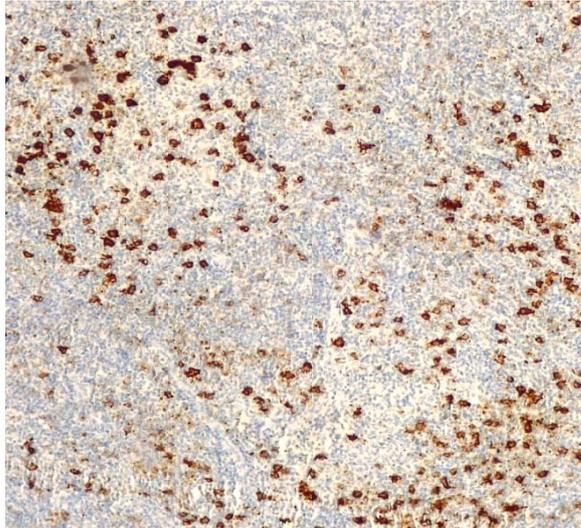
*Figure 72 : Fréquence d'expression de CD30*

L'analyse de corrélation bivariée par le test de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression d'EBER et l'expression du CD30 ( $r=0,367$ ,  $p<0.000$ ) (Tableau 40).

*Tableau 40 : Corrélation bivariée entre l'expression du CD30 et le statut EBV, test de Pearson*

Corrélations		CD30	EBER (%)
<b>CD30</b>	Corrélation de Pearson	1	,367**
	Sig. (bilatérale)		,000
	N	91	90
<b>EBER (%)</b>	Corrélation de Pearson	,367**	1
	Sig. (bilatérale)	,000	
	N	90	90

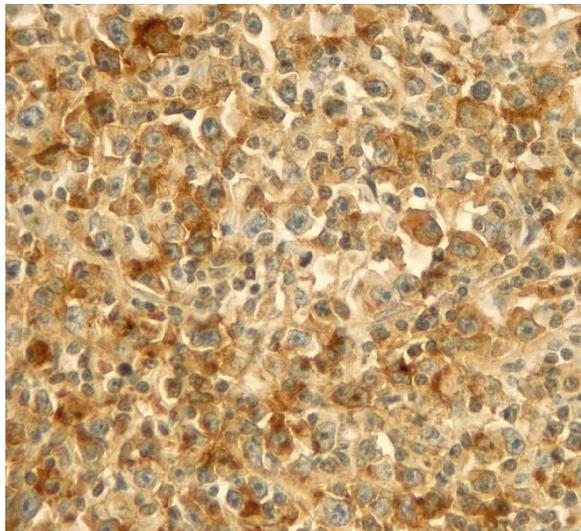
**\*\* . La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).**



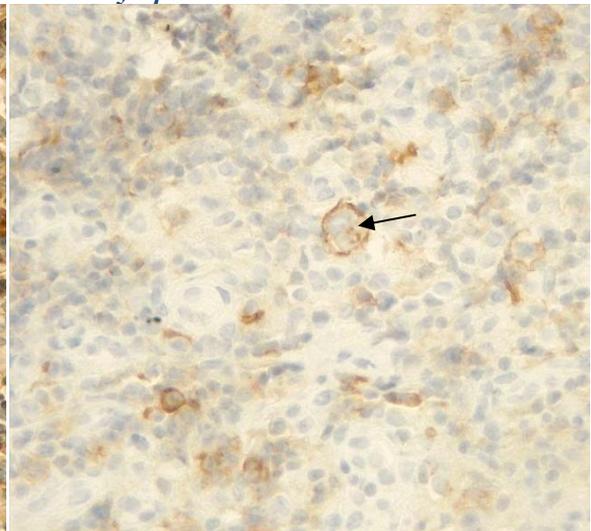
**A : Positivité de 40% des cellules lymphoïdes tumorales GX10**



**B : Positivité de 100% des cellules lymphoïdes tumorales GX10**



**C : Expression cytoplasmique avec renforcement membranaire des cellules lymphoïdes tumorales GX40,**



**D : Cellule Reed-Sternberg like positive au CD30 GX40, flèche noire**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 73: Expression du CD30 dans les LBDGC EBV+**

#### IV.2.3 Voies de lymphomagenèse

##### → Profil de lymphomagenèse des LBDGC EBV+

La voie de signalisation NF- $\kappa$ B par le dimère P50 a été induite dans 92.3% n=12 des cas (**Tableau 42**) et par le dimère P65 dans 7.7% n=2 (**Tableau 43**). La voie JAK –STAT3 a été notée dans 100% des cas.

*Tableau 41 : Tableau récapitulatif des marqueurs des voies de lymphomagenèse des LBDGC EBV+*

Patient	Sexe	Age	CD40	Voie de signalisation NF- $\kappa$ B P50	Voie de signalisation NF- $\kappa$ B P65	Voie de signalisation JAK-STAT3	IL-6 H-score
1	H	50	+	Induite	Non induite	50	30
2	F	62	+	Induite	Non induite	50	20
3	F	79	+	Induite	Non induite	70	240
4	H	44	+	Induite	Non induite	50	40
5	F	82	+	Induite	Non induite	70	240
6	H	22	+	Induite	Non induite	70	60
7	F	44	+	Induite	Non induite	50	140
8	F	52	+	Non induite	Induite	50	270
9	F	81	+	Induite	Non induite	50	240
10	H	80	+	Induite	Non induite	50	200
11	F	61	+	Induite	Non induite	70	75
12	H	87	+	Induite	Non induite	50	30
13	H	60	+	Induite	Non induite	40	240

*Tableau 42: Fréquence d'induction de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B P50*

Effectif	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
1	7,7	7,7	7,7
12	92,3	92,3	100,0
13	100,0	100,0	

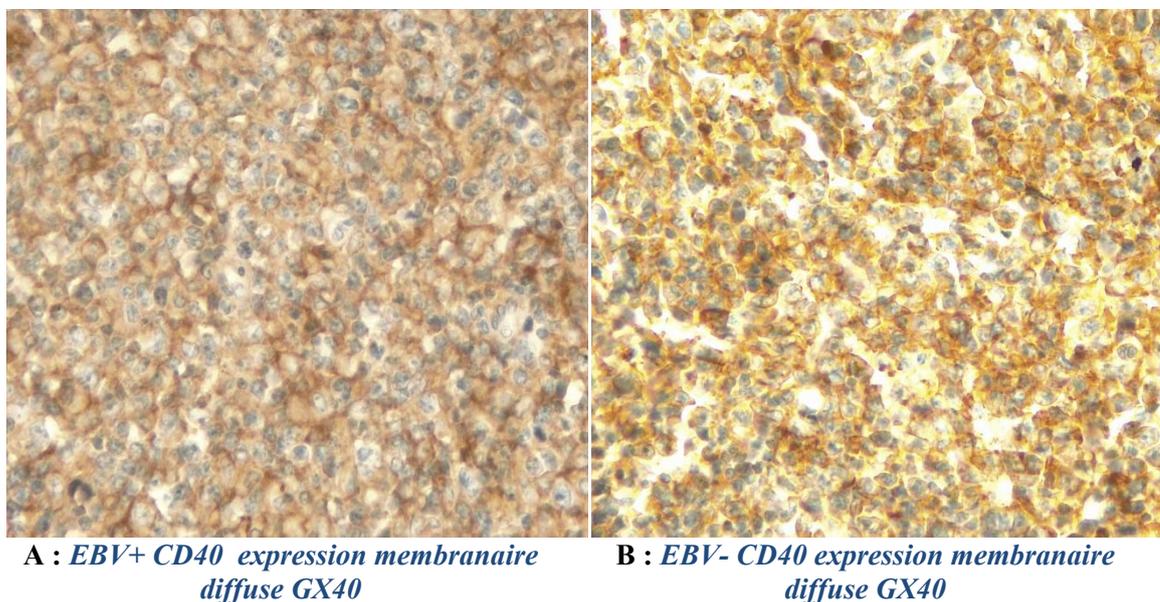
*Tableau 43 : Fréquence d'induction de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B P65*

Effectif	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
12	92,3	92,3	92,3
1	7,7	7,7	100,0
13	100,0	100,0	

→ Analyse bivariée

#### IV.2.3.1 Expression du CD40

L'expression du CD40 a été notée dans 100% des LBDGC EBV+ et EBV- (**Figure 74**).



*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

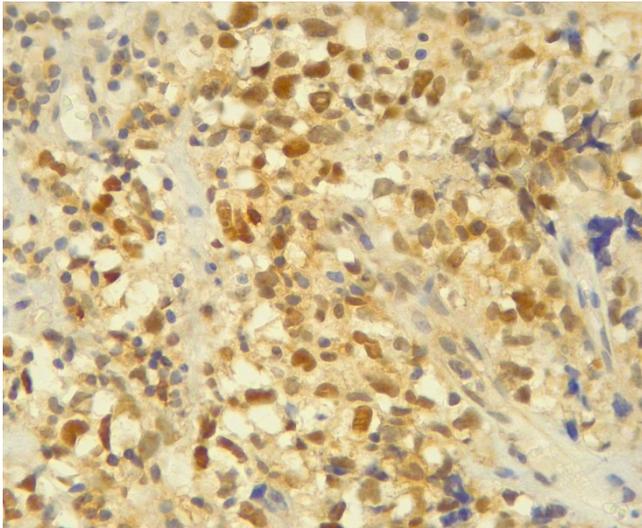
*Figure 74: Expression du CD40*

#### IV.2.3.2 Voie de signalisation NF-κB

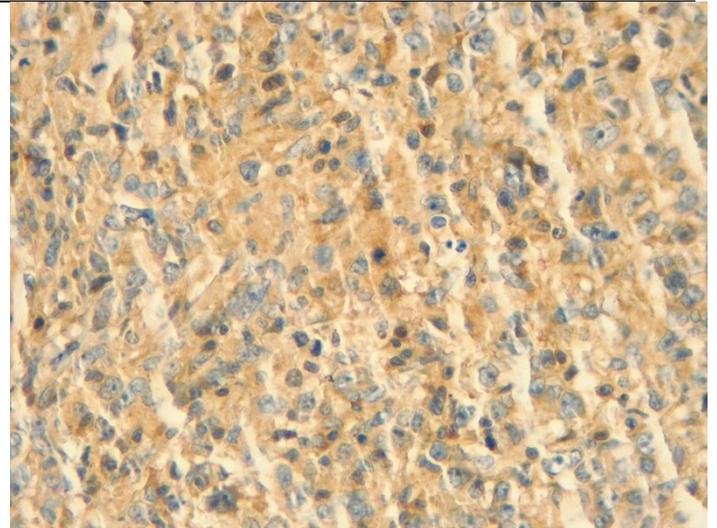
Au terme de l'analyse bivariée, il a été noté une différence significative entre les LBDGC EBV+ et EBV- **p<0.001 (Tableau 44)**. Le dimère **P50** a été induit dans 91% des LBDGC EBV+ et **P65** dans 96.2% des LBDGC EBV-. Lorsqu'une des deux voies a été induite, l'expression nucléaire représente une transition de la forme inactive (cytoplasmique) à la forme active (nucléaire) (**Figure 75**).

*Tableau 44 : Analyse bivariée de la voie de signalisation NF-κB*

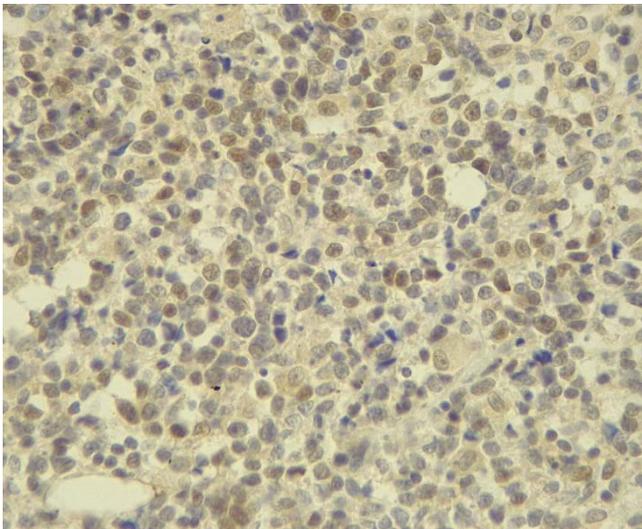
Caractéristiques	Catégories	Total	EBV				p
			EBV+		EBV-		
			n	%	n	%	
NF-κB P50	Non induite	72	1	7.7	12	92.3	0.000
	Induite	19	71	91	7	9	
		91	72	100	19	100	
NF-κB P65	Non induite	15	12	92.3	3	3.8	0.000
	Induite	76	1	7.7	75	96.2	
		91	13	100	78	100	



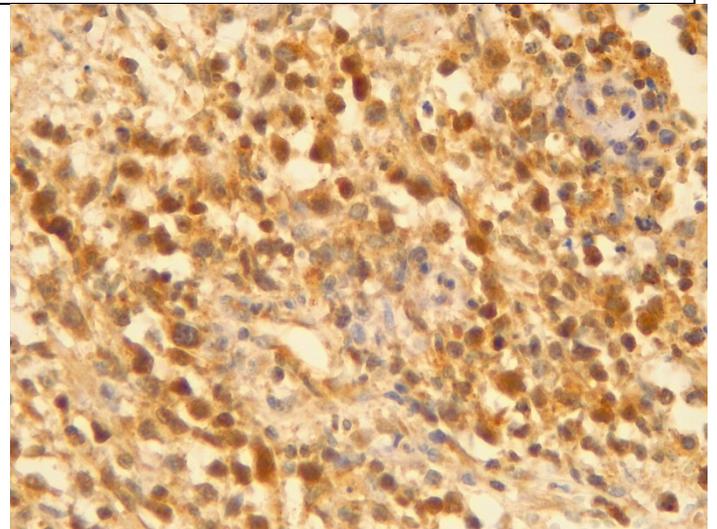
**A : EBV+ NF-κB P50 +, expression nucléaire des cellules lymphoïdes tumorales GX40**



**B : EBV+ NF-κB P65-, expression cytoplasmique des cellules lymphoïdes tumorales GX40**



**C : EBV- NF-κB P50, expression cytoplasmique des cellules lymphoïdes tumorales -GX40**



**D : EBV- NF-κB P65 +, expression nucléaire des cellules lymphoïdes tumorales GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 75: Voie de signalisation NF-κB**

L'analyse de corrélation bivariée par le test de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression de NF-κB P50 et l'expression de c-MYC (**r=0,272 P=0.009**) (Tableau 45).

Tableau 45 : Corrélation bivariée de l'expression du NF-κB et c-MYC

		Corrélations	
		NF-κB P50	c-MYC
NF-κB P50	Corrélation de Pearson	1	,272**
	Sig. (bilatérale)		,009
	N	91	91
c-MYC	Corrélation de Pearson	,272**	1
	Sig. (bilatérale)	,009	
	N	91	91

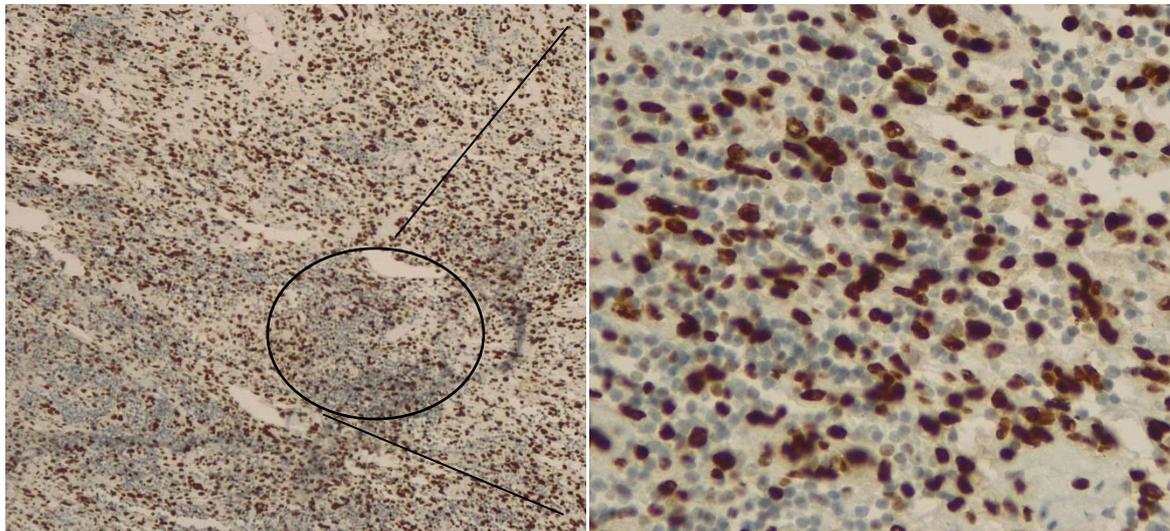
**\*\*.** La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).

#### IV.2.3.3 STAT3

L'analyse bivariée a montré une différence significative  $p < 0,001$  entre les LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-. La voie de signalisation JAK-STAT3 a été exprimée dans 100% des cas par les LBDGC EBV+ et dans 20.5% des LBDGC EBV- (Tableau 46) par le facteur de transcription phosphorylé STAT3 (Figure 75).

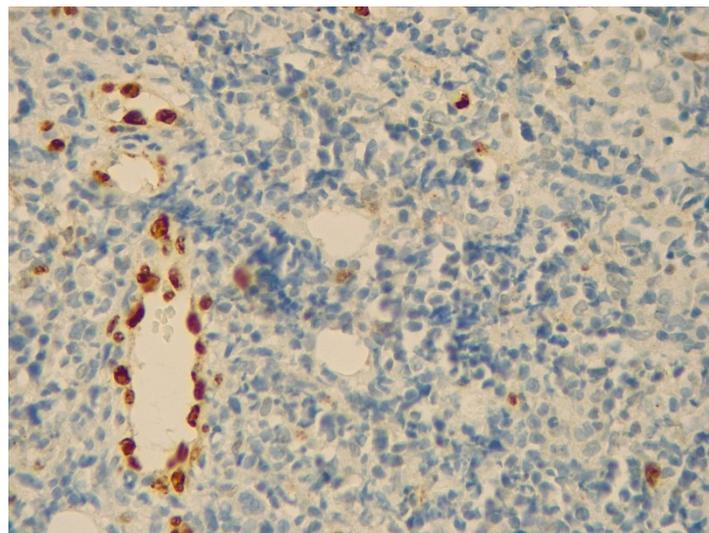
Tableau 46: Analyse bivariée de la voie de signalisation JAK-STAT3

Caractéristiques	Catégories	Total	EBV				p
			EBV+		EBV -		
			n	%	n	%	
STAT3	STAT3-	62	0	0	62	79.5	<0,001
	STAT3+	29	13	100	16	20.5	
		91	13	100	78	100	



**A : EBV+ STAT3, expression nucléaire GX10**

**B : EBV+ STAT3, expression nucléaire intense GX40**

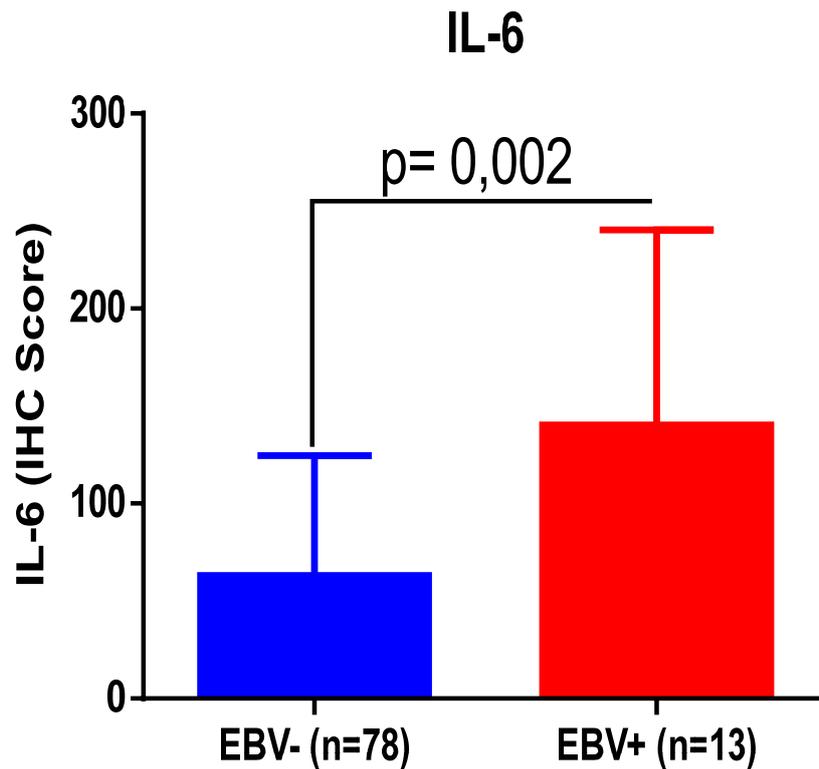


**C : EBV- STAT3 Absence d'expression, vaisseaux témoin interne**  
*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

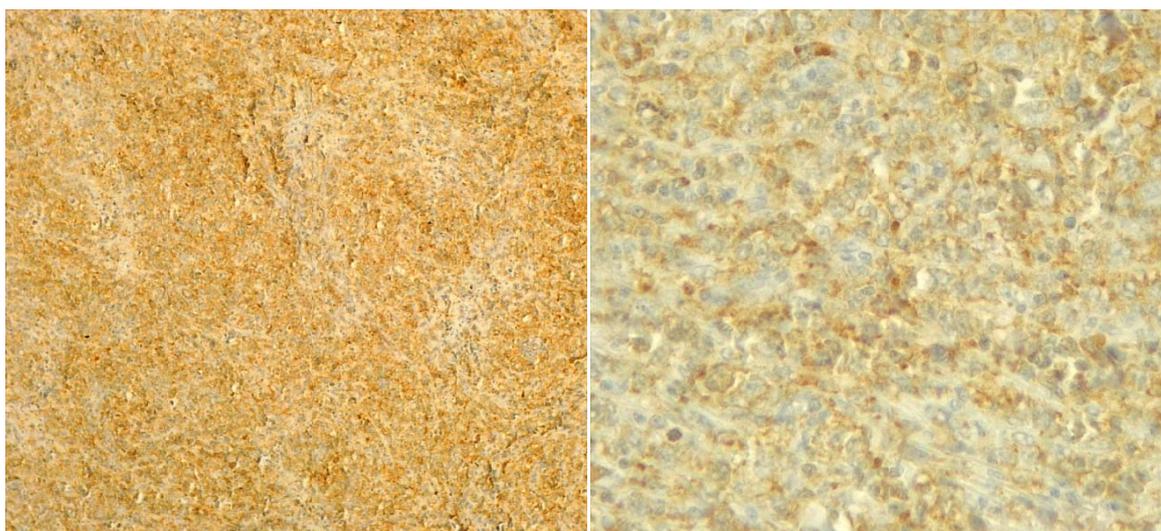
*Figure 76: Expression du STAT3*

#### IV.2.3.4 Voie de signalisation IL-6

Le test de Mann-Whitney de l'H –Score de l'IL-6 (**Figure 77**) a montré une différence significative entre les LBDGC EBV+ et EBV-  $p=0,002$ . Cependant, son expression différait. Elle a été notée essentiellement par les cellules lymphoïdes tumorales et le ME dans les LBDGC EBV+ et par seulement le ME des LBDGC EBV- (**Figure 78**).

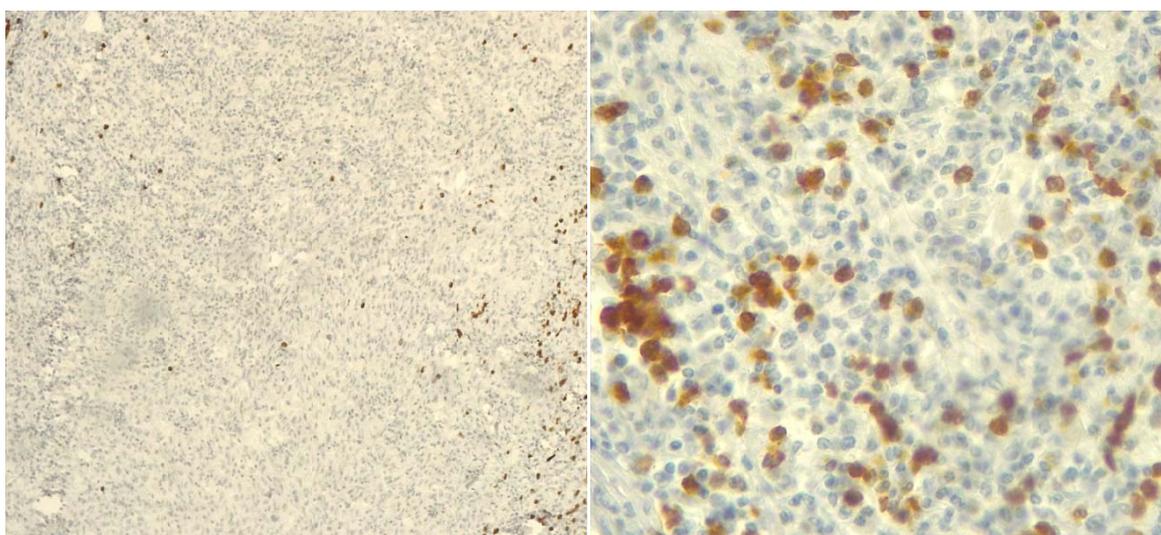


*Figure 77: Test de Mann-Whitney IL-6*



**A : EBV+ IL-6, expression membranaire diffuse des cellules lymphoïdes tumorales GX10**

**B : EBV+ IL-6, expression membranaire diffuse des cellules lymphoïdes tumorales GX40**



**C : EBV- IL-6, positivité des cellules du ME GX10**

**D : EBV- IL-6, positivité des cellules du ME GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 78: Expression d'IL-6**

L'analyse de corrélation bivariée par le test de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression d'IL-6 et STAT3 ( $r=0,368$ ,  $p<0.000$ ) (Tableau 47).

*Tableau 47 : Corrélation bivariée de l'expression du STAT3 et IL-6*

Corrélations			
		<b>STAT3</b>	<b>IL-6</b>
<b>STAT3</b>	Corrélation de Pearson	1	,368**
	Sig. (bilatérale)		,000
	N	91	91
<b>IL-6</b>	Corrélation de Pearson	,368**	1
	Sig. (bilatérale)	,000	
	N	<b>91</b>	<b>91</b>

**\*\* . La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).**

#### IV.2.4 Profil du microenvironnement tumoral

##### → Profil du microenvironnement des LBDGC EBV+

Le PD-L1 a été exprimée par 100% des cellules lymphomateuses (**Tableau 48**) et PD-1 par 15.4% des cellules lymphomateuses (**Tableau 49**). On a également noté cette expression par le ME. Cette expression a été observée essentiellement par les macrophages, histiocytes pour le PD-L1 et par les TIL pour le PD-1. Ce dernier a été estimé pour le profil immunomodulateur.

*Tableau 48 : Profil d'expression des différents marqueurs du microenvironnement*

Patient	CD3	CD5	CD4	CD8	Granzyme B	TiA1	Perforine	FOXP 3	TGFB	CD25	PD-1t	PD-L1t
1	Forte	Forte	Non induite	50	30	Forte	Forte	10	30,0	58,33	0	100
2	Forte	Forte	Non induite	50	20	Forte	Forte	26	60,0	25,00	80	100
3	Modérée	Modérée	Non induite	70	240	Modérée	Modérée	32	10,0	58,33	0	100
4	Forte	Forte	Non induite	50	40	Modérée	Modérée	30	60,0	66,67	0	100
5	Forte	Forte	Non induite	70	240	Forte	Forte	32	90,0	58,33	0	100
6	Forte	Forte	Non induite	70	60	Modérée	Modérée	25	240,0	66,67	0	100
7	Modérée	Modérée	Non induite	50	140	Forte	Forte	25	270,0	25,00	0	100
8	Modérée	Modérée	Induite	50	270	Forte	Forte	23	3,0	58,33	80	100
9	Forte	Forte	Non induite	50	240	Modérée	Modérée	24	30,0	58,33	0	100
10	Modérée	Modérée	Non induite	50	200	Forte	Forte	25	15,0	58,33	0	100
11	Modérée	Modérée	Non induite	70	75	Forte	Forte	30	240,0	41,67	0	100
12	Forte	Forte	Non induite	50	30	Forte	Forte	25	150,0	58,33	0	100
<b>13</b>	<b>Forte</b>	<b>Forte</b>	<b>Non induite</b>	<b>40</b>	<b>240</b>	<b>Modérée</b>	<b>Modérée</b>	<b>24</b>	<b>60,0</b>	<b>58,33</b>	<b>0</b>	<b>80</b>

*Tableau 49: Fréquence d'expression du PDL-1 dans les LBDGC EBV+*

Effectif	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>

*Tableau 50: Fréquence d'expression du PD1 dans les LBDGC EBV+*

Effectif	Pourcentage	Pourcentage valide	Pourcentage cumulé
<b>11</b>	84,6	84,6	84,6
<b>2</b>	15,4	15,4	100,0
<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	

→ Analyse bivariée

#### IV.2.4.1 Expression du CD3 et CD5

Le test de Mann-Whitney n'a pas montré de différence significative entre l'expression du CD3 et CD5 entre les LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-  $p=0,76$  (Figure 79).

Cette expression était comparable entre les deux groupes. Il n'a pas été noté d'expression du CD5 par les cellules lymphomateuses. Leur expression a été le plus souvent modérée à forte (Figure 81).

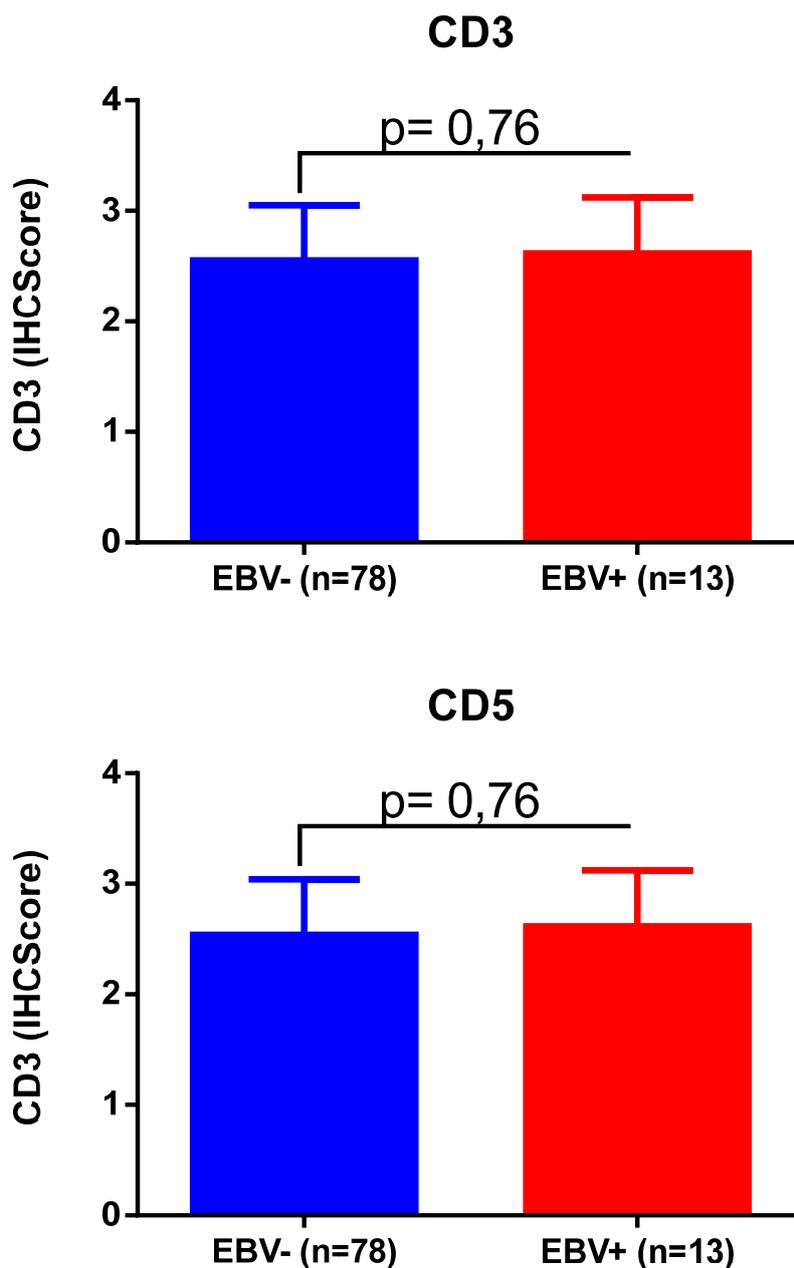
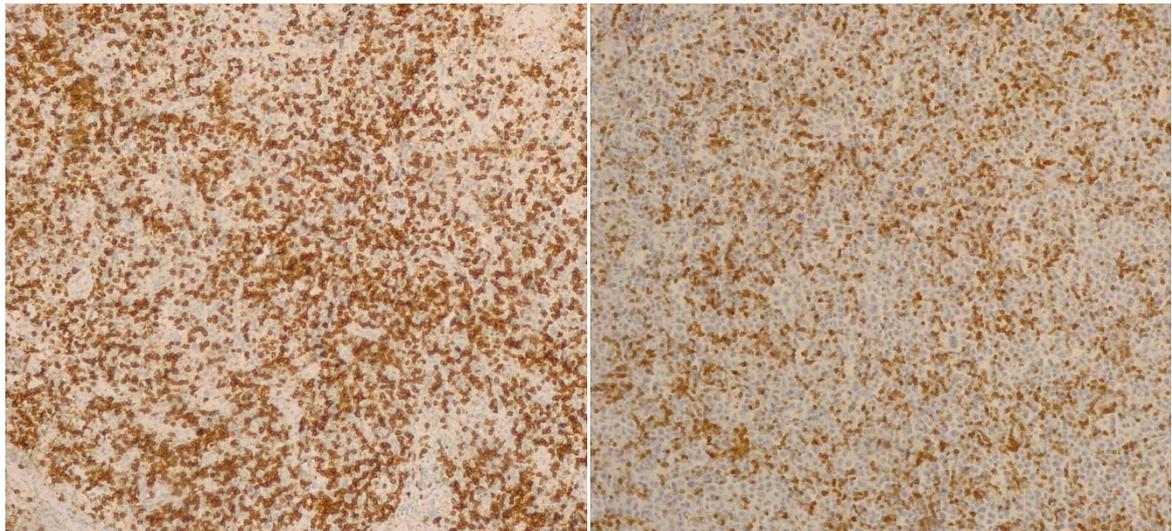
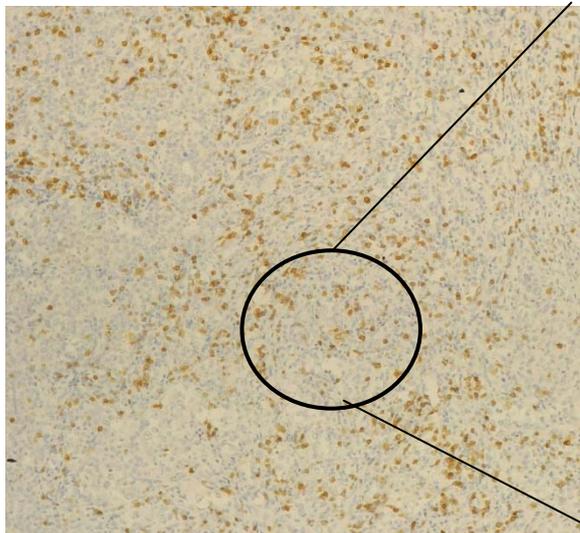


Figure 79: Test de Mann-Whitney CD3 et

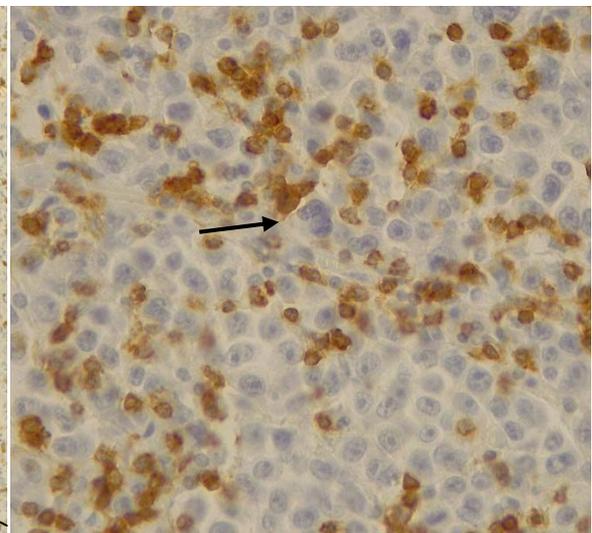


**A : EBV+ CD3, expression forte GX10**

**B : EBV+ CD3, expression modérée GX10**



**C : EBV – CD3, expression faible GX10**



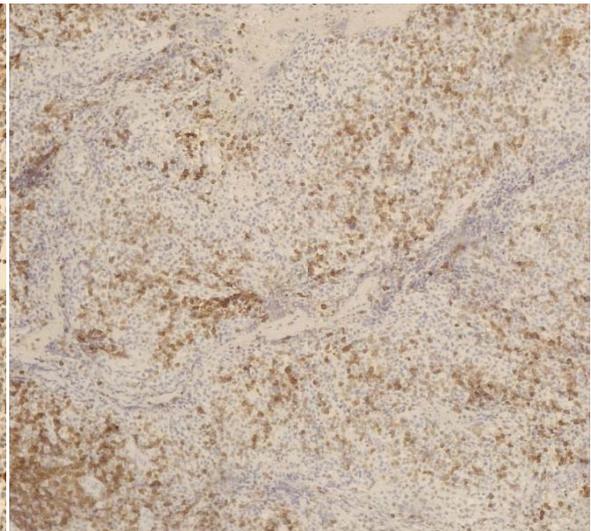
**D : EBV+ CD3, absence de couronne  
autours d'une cellule de Reed-Sternberg like  
flèche noire GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

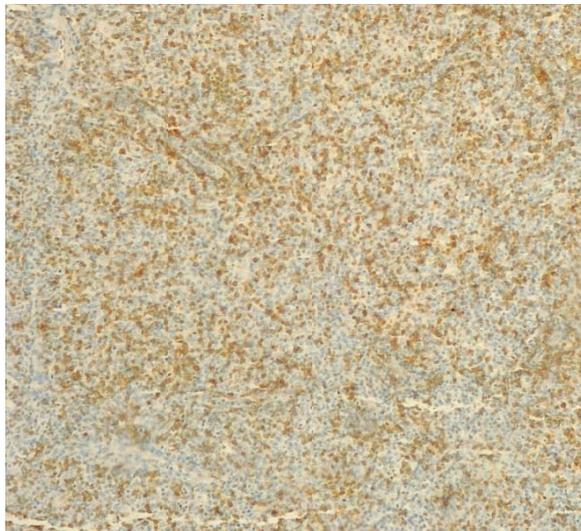
*Figure 80: Expression du CD3*



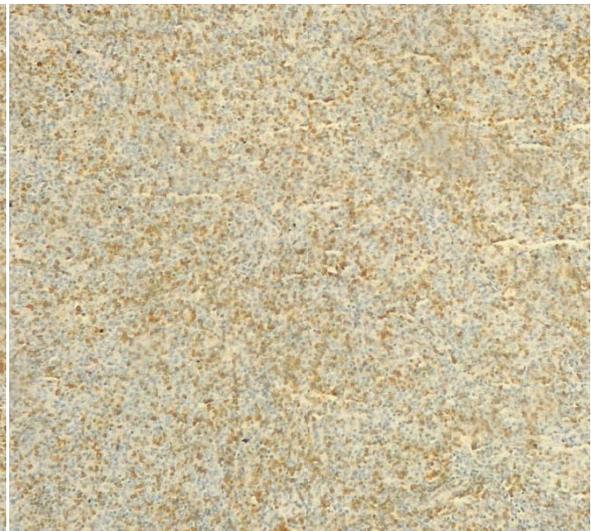
**A : EBV+ CD5, expression forte GX10**



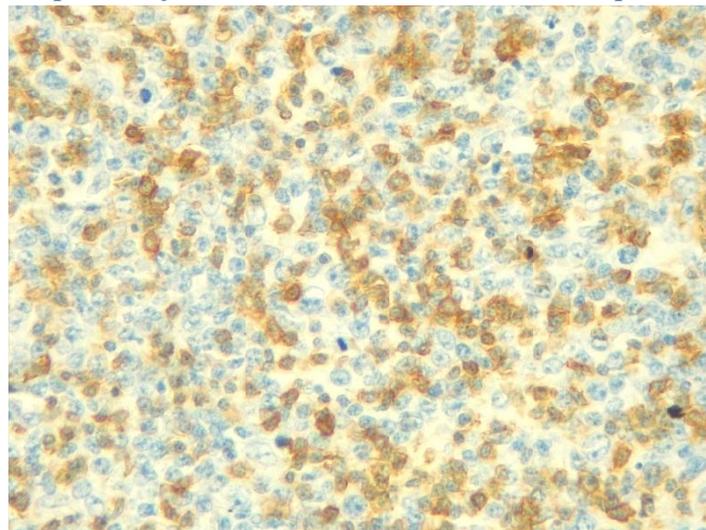
**B : EBV+, CD5 expression modérée GX10**



**C : EBV- CD5, expression forte GX10**



**D : EBV- CD5, expression modérée GX10**



**E : EBV- CD5, absence d'expression par les cellules lymphomateuses GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 81: Expression du CD5**

#### IV.2.4.2 Profil cytotoxique

Le test de Mann-Whitney du profil cytotoxique a montré une différence significative entre les LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-. La comparaison des 2 groupes a révélé une différence dans la composition des cellules cytotoxiques mis en évidence par les cellules CD8  $p=0,0077$ , Granzyme B  $p<0,0001$ , Tia1  $p<0,0001$ , Perforine  $p<0,0005$  (Figure 82).

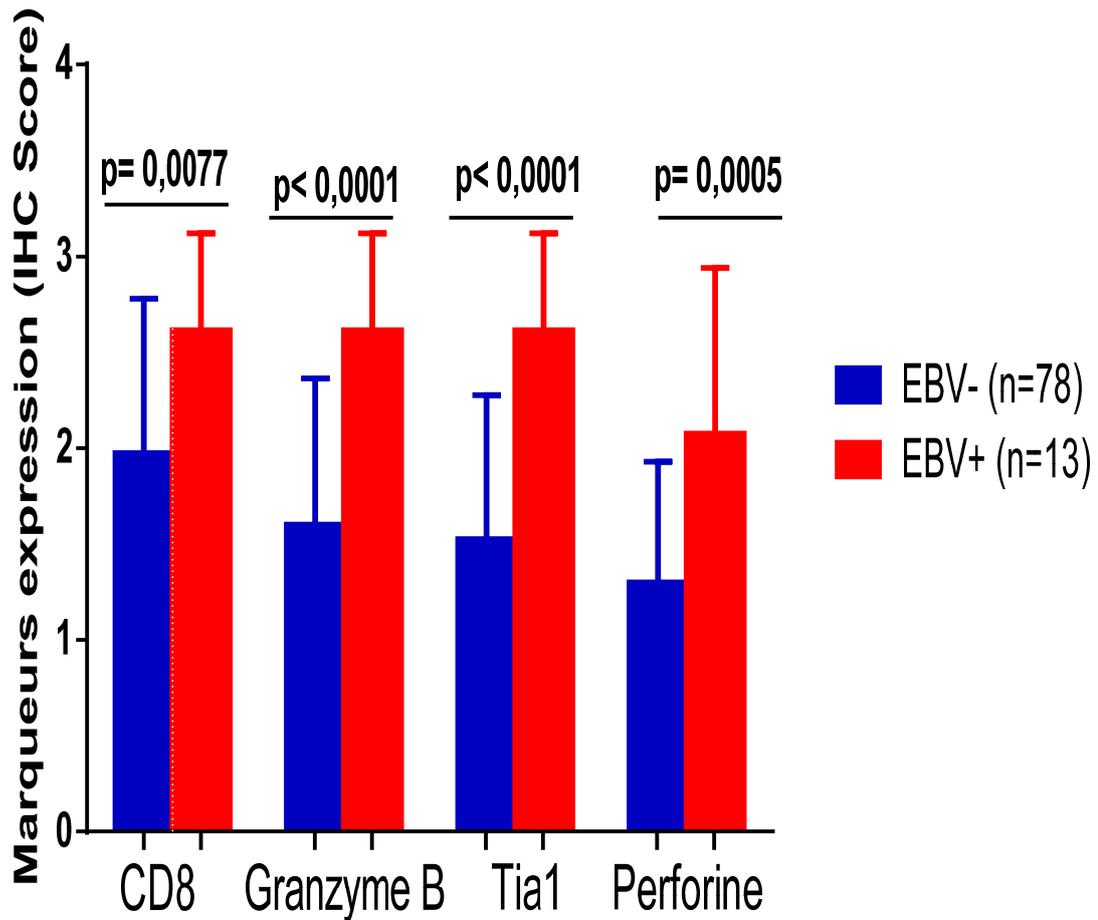
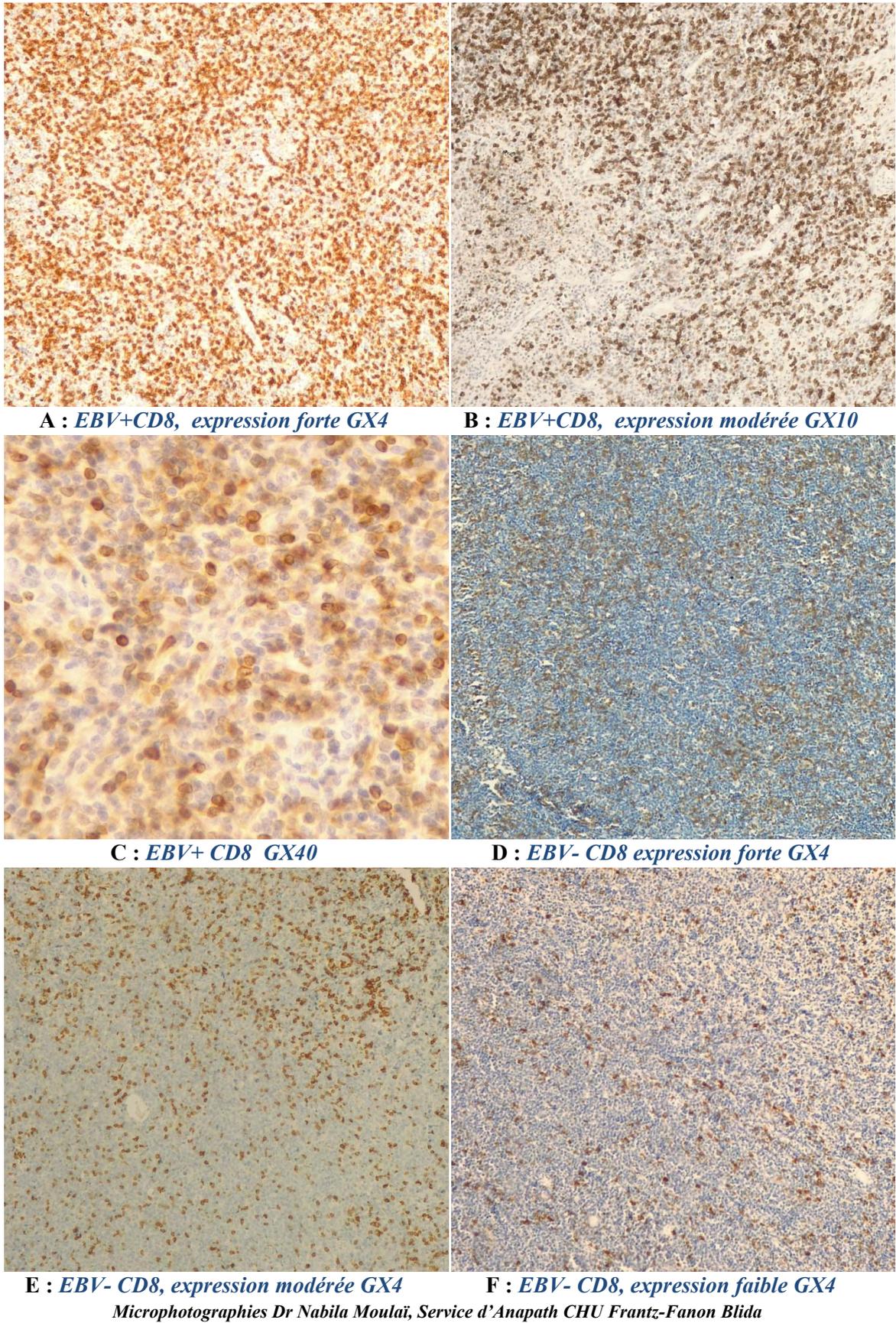
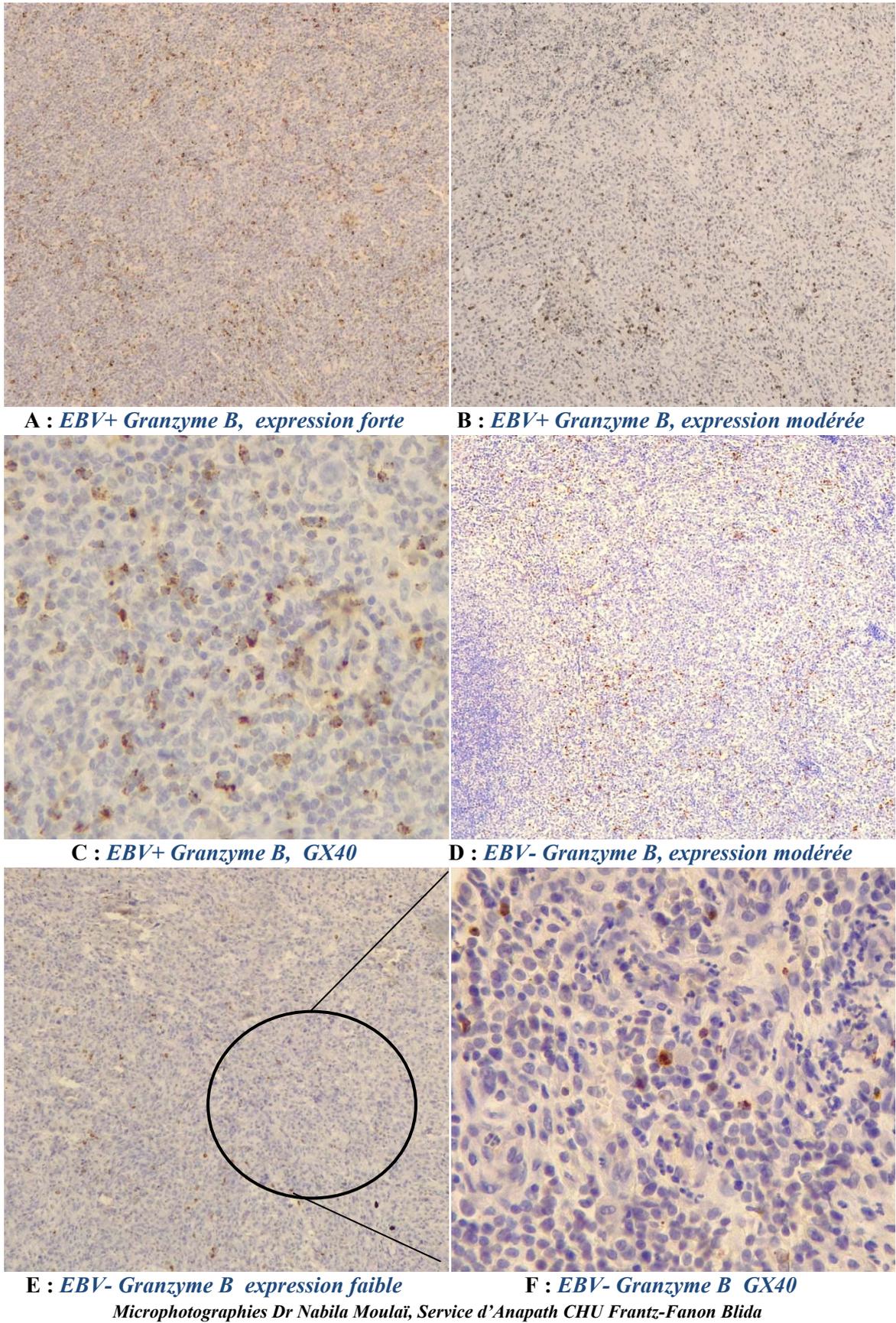


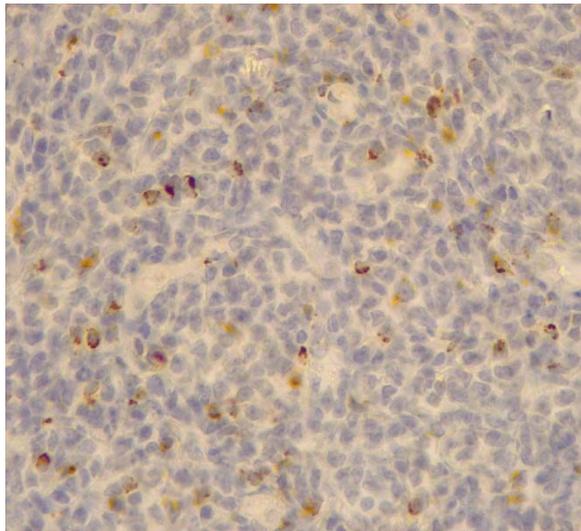
Figure 82: Test de Mann-Whitney profil cytotoxique



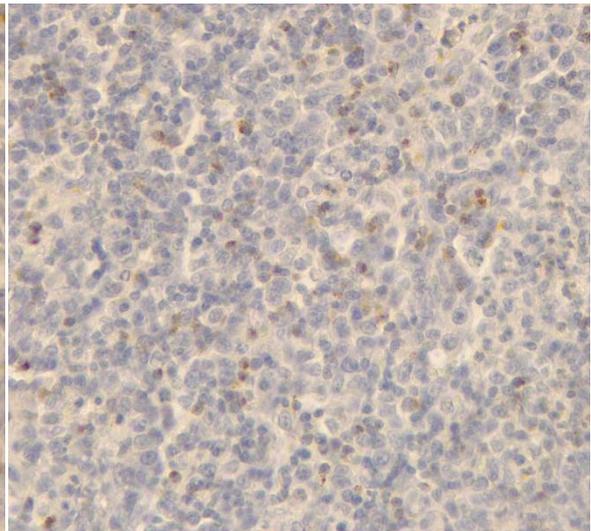
**Figure 83: Expression du CD8**



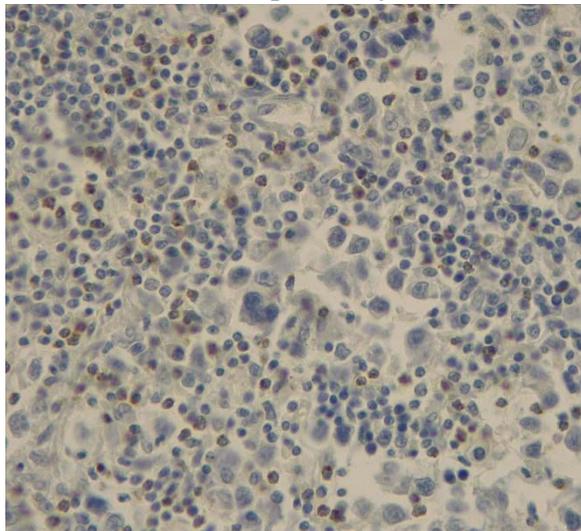
**Figure 84: Expression de la Granzyme B**



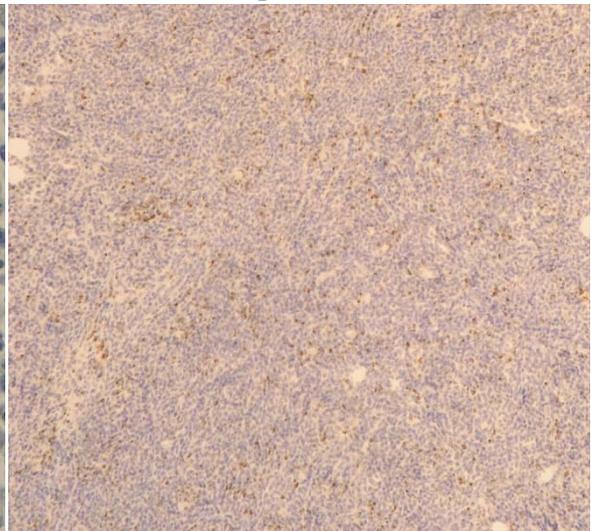
**A : EBV+ Tia1, expression forte GX4**



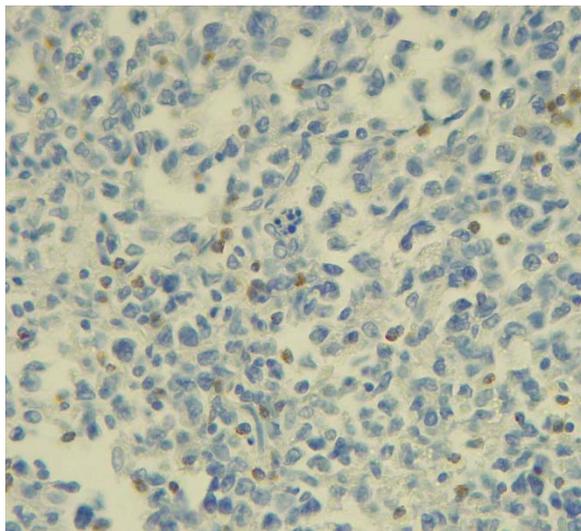
**B : EBV+ Tia1, expression modérée GX4**



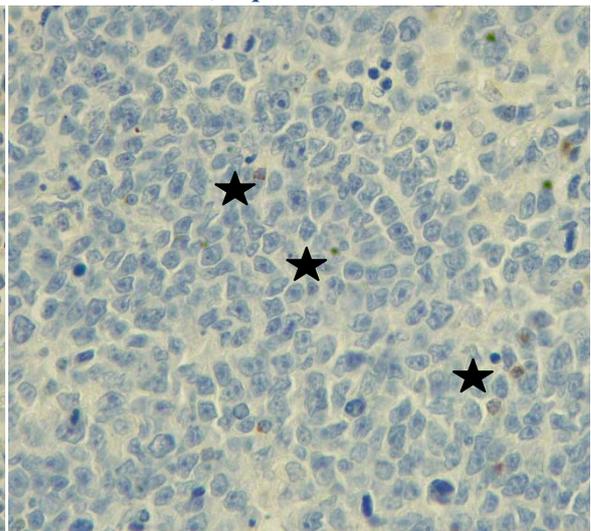
**C : EBV+ Tia1 GX40**



**D : EBV- Tia1, expression modérée GX4**



**E : EBV- Tia1, expression faible GX10**



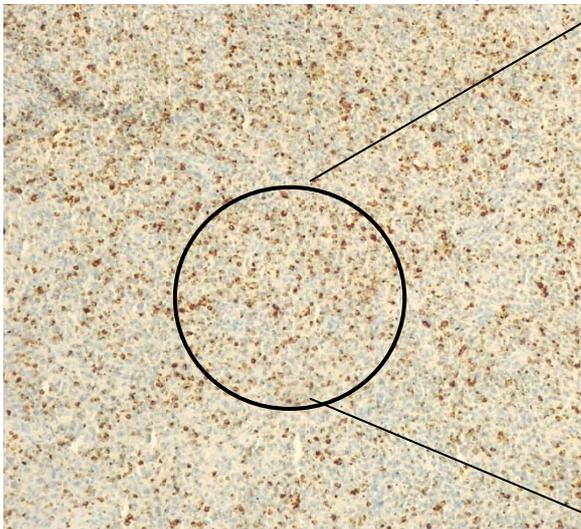
**F : EBV- Tia1 GX40 ★**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

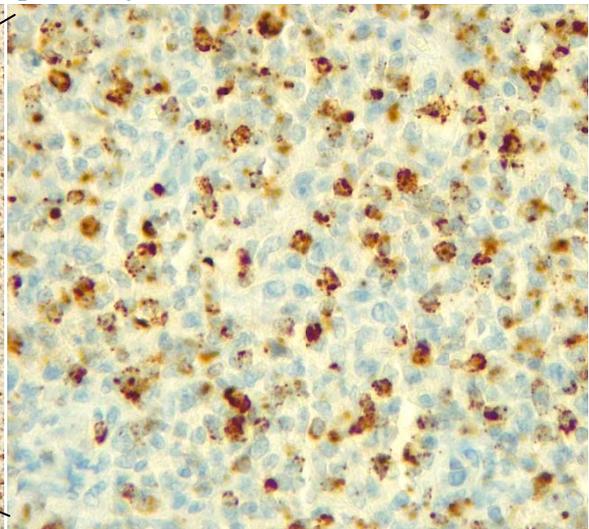
**Figure 85: Expression de la Tia1**



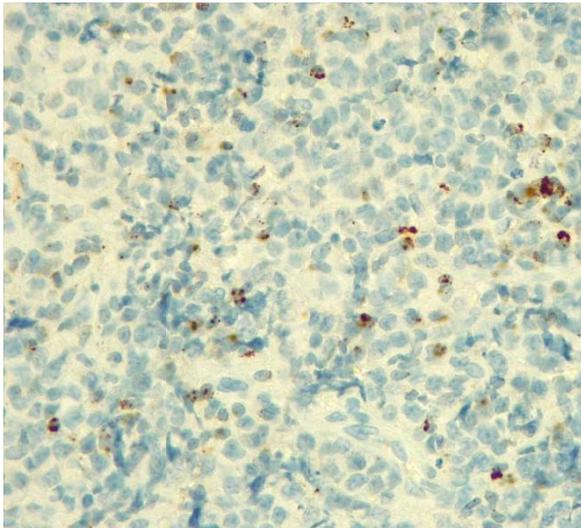
**A : EBV+ Perforine, expression forte GX4**



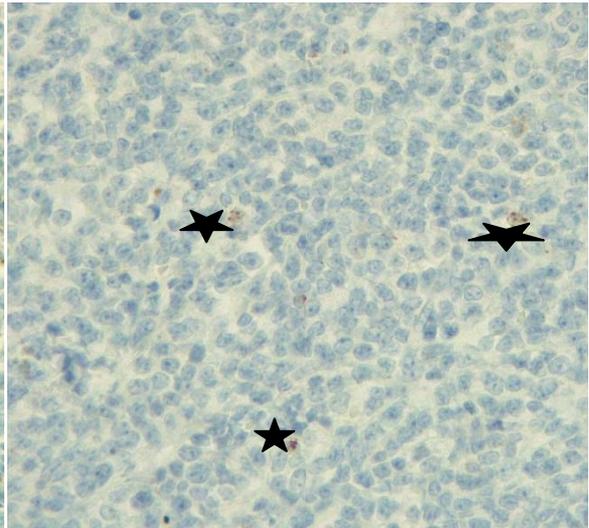
**B : EBV+ Perforine, expression forte GX10**



**C : EBV+ Perforine, expression forte GX40**



**D : EBV- Perforine, expression modérée**



**E : EBV- Perforine, expression faible GX10★**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 86: Expression de la perforine**

#### IV.2.4.3 Profil immunomodulateur

Le test de Mann-Whitney n'a pas montré de différence significative par les marqueurs des TIL reg CD4 ( $p=0.49$ ), CD25 ( $p=0.26$ ), FOXP3 ( $p=0.06$ ), ainsi que la cytokine TGF- $\beta$  ( $p=0.29$ ) entre les deux groupes (**Figure 87**).

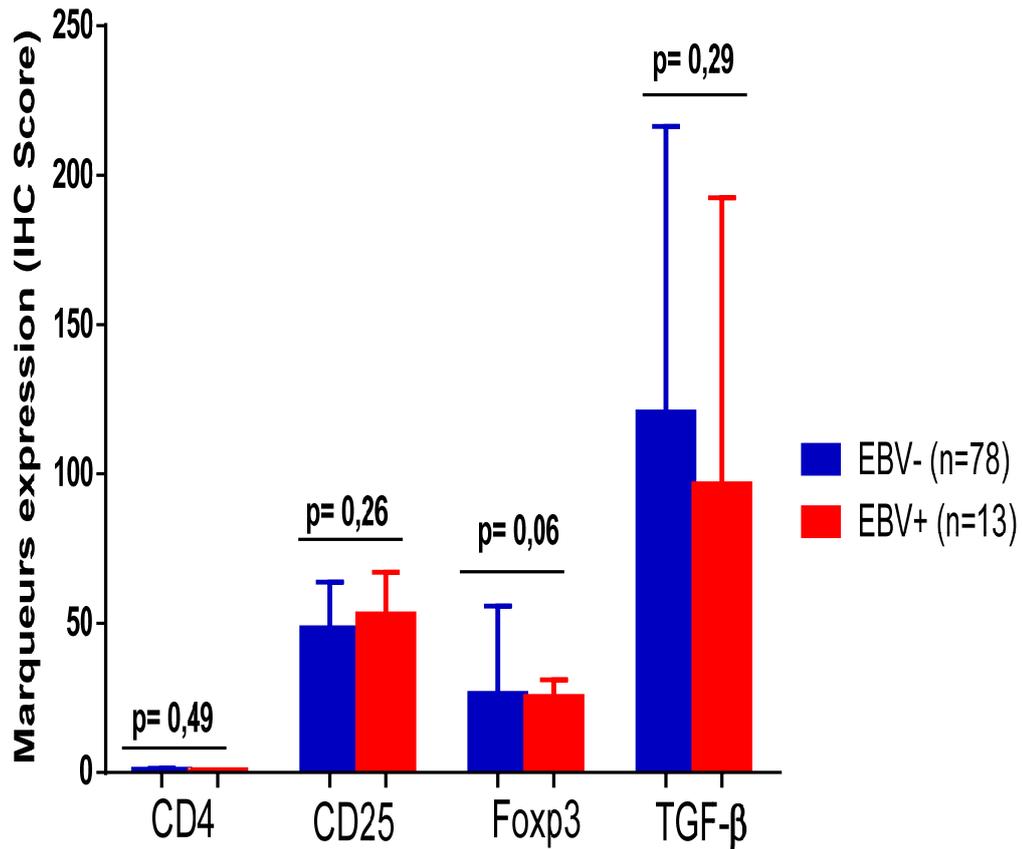
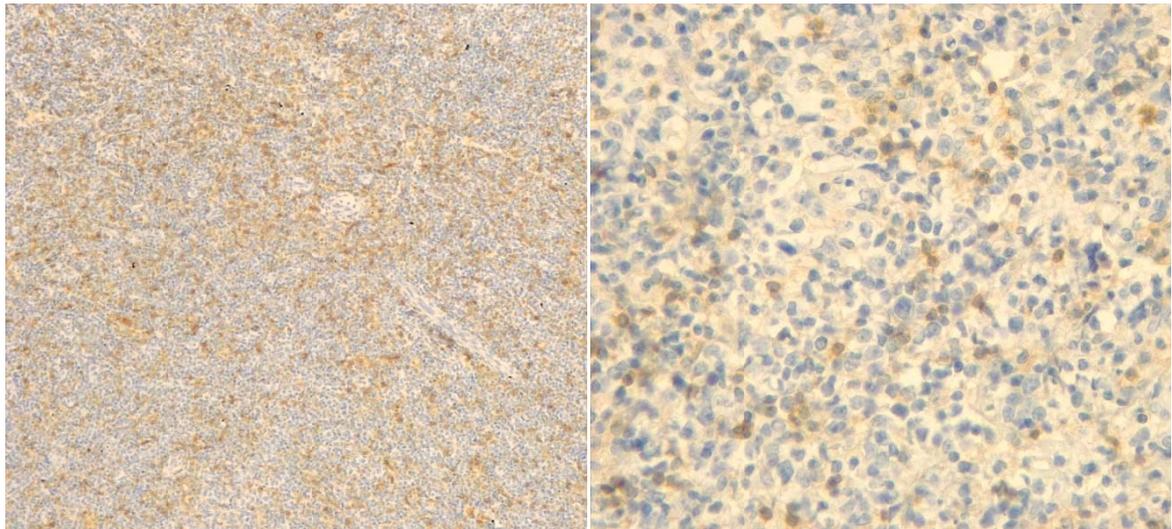
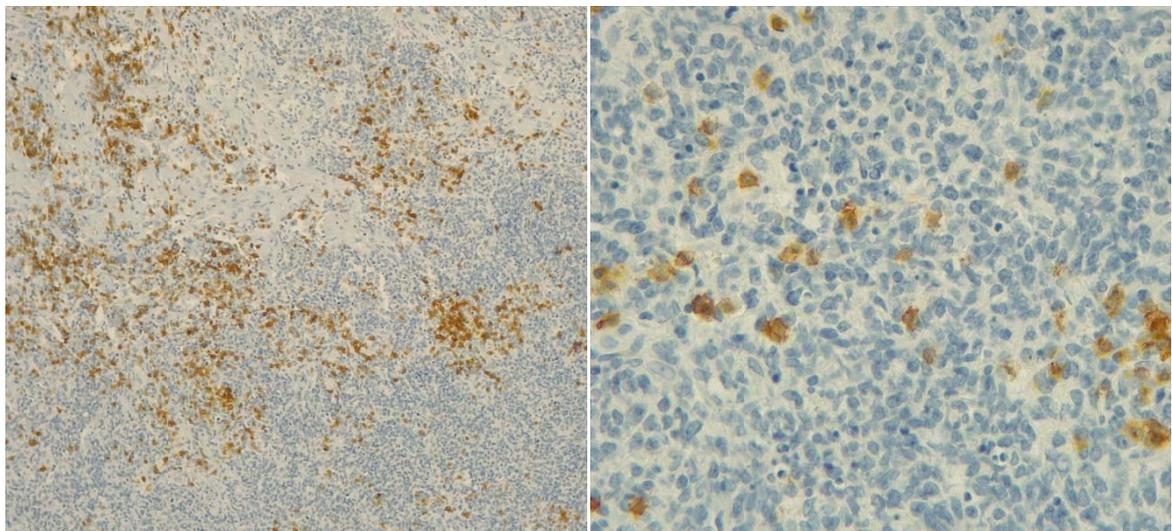


Figure 87: Test de Mann-Whitney profil immunomodulateur



**A : EBV+ CD4 GX10**

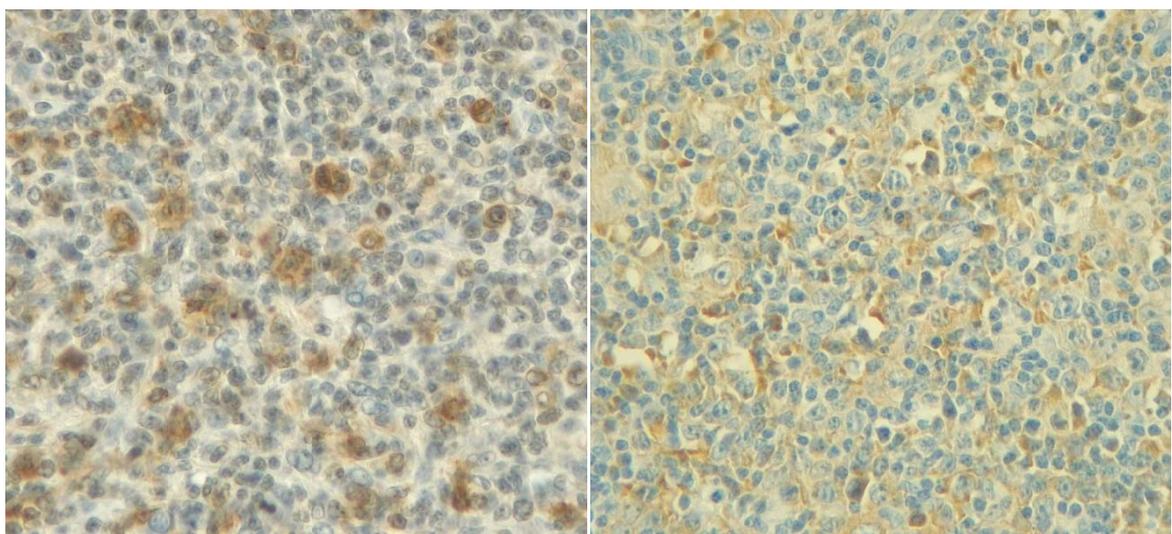
**B : EBV+ CD4 GX40**



**C : EBV- CD4 GX10**

**D : EBV- CD4 GX40**

*Figure 88 : Expression du CD4*

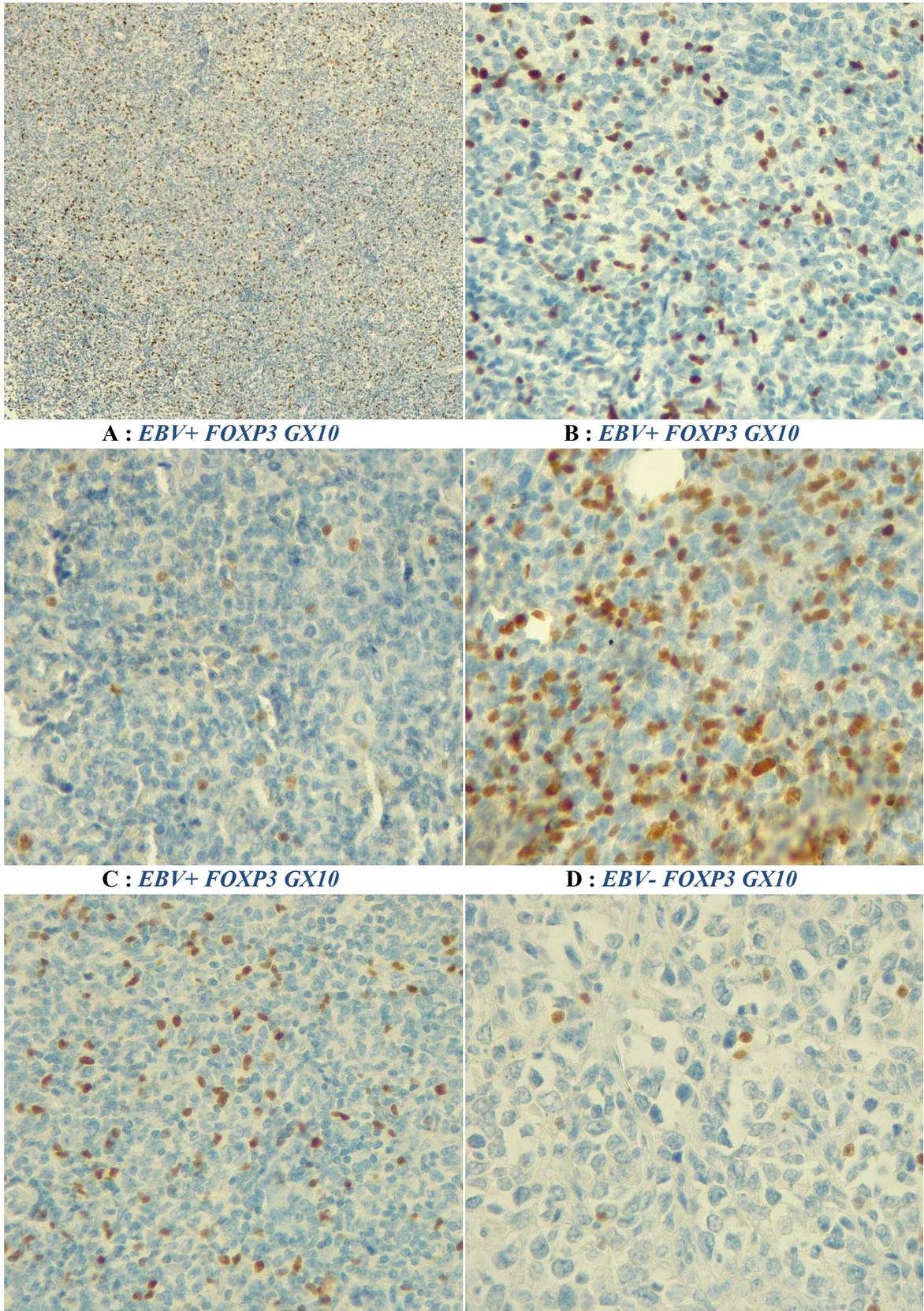


**A : EBV+ CD25 GX40**

**B : EBV- CD25 GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon*

*Figure 89 : Expression du CD25*



**A : EBV+ FOXP3 GX10**

**B : EBV+ FOXP3 GX10**

**C : EBV+ FOXP3 GX10**

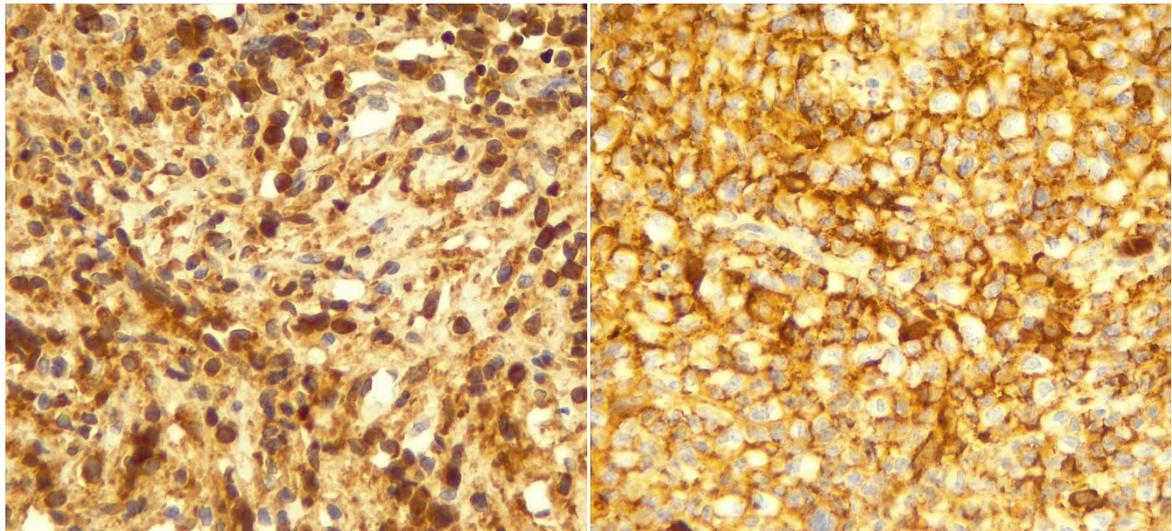
**D : EBV- FOXP3 GX10**

**E : EBV- FOXP3 GX10**

**F : EBV- FOXP3 GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 90: Expression du FOXP3**



**A : EBV+ TGFβ GX40**

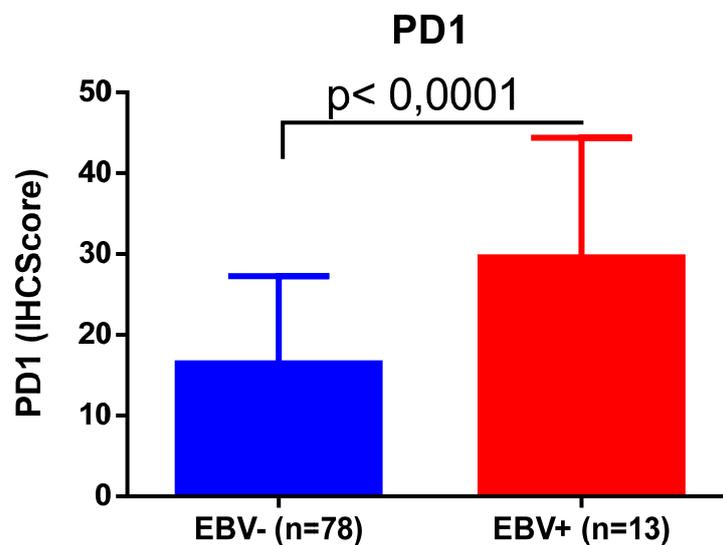
**B : EBV- TGFβ GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

*Figure 91: Expression de la TGFβ*

Nous avons ensuite cherché à déterminer la contribution du microenvironnement immunomodulateur et sa relation avec l'axe PD-1 et PD-L1, par l'expression de PD-1 au niveau du ME. Le test de Mann-Whitney a montré une différence significative entre les LBDGC EBV+ et EBV-  $p < 0.0001$  (Figure 92).

L'analyse de corrélation bivariée par le test de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression du PD-1 et FOXP3 ( $r=0,56$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 93).



*Figure 92 : Test de Mann-Whitney PD-1 microenvironnement*

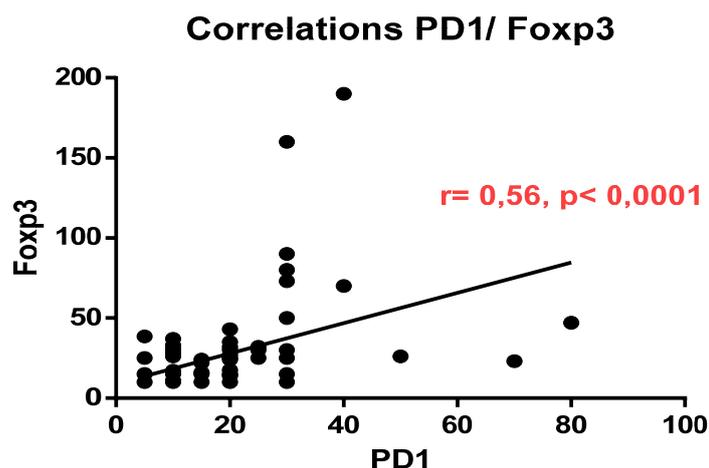


Figure 93 : Corrélation linéaire PD-1me et FOXP3

#### IV.2.4.4 Immune-checkpoints

L'analyse bivariée a montré une différence significative de l'expression de PD-L1 par les cellules lymphomateuses  $p < 0,0001$ . Cette expression a été retrouvée dans 100% des LBDGC EBV+ et dans 24.4% des LBDGC EBV-. Le PD-1 exprimé par les cellules lymphoïdes tumorales n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes  $p = 0.261$  (Tableau 51).

Tableau 51: Analyse bivariée des immune-checkpoints

Caractéristiques	Catégories	Total	EBV				p
			EBV+		EBV-		
			n	%	n	%	
PD-1t	PD-1t-	84	11	84.6	73	93.6	0.261
	PD-1t +	7	2	15.4	5	6.4	
		91	13	100	78	100	
PD-L1t	PD-L1t-	59	0	0	59	75.6	0.000
	PD-L1t+	32	13	100	19	24.4	
		91	13				

L'analyse de corrélation bivariée par le test de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression du PD-L1 et du STAT3 ( $r = 0,287$ ,  $p = 0.006$ ) (Tableau 52).

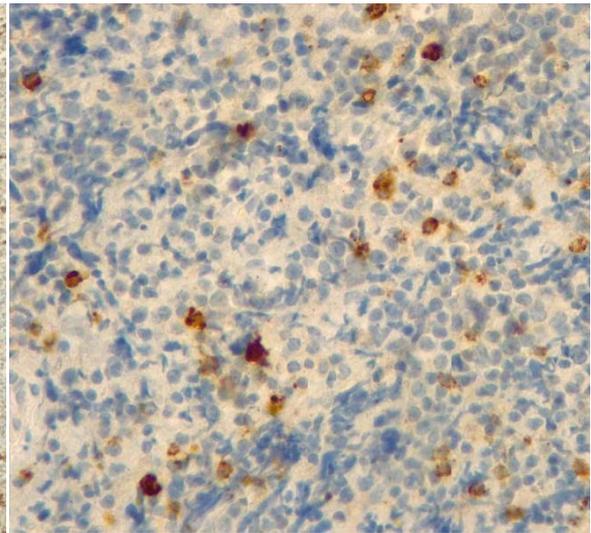
*Tableau 52: Corrélation bivariée de l'expression du STAT3 et du PD-L1*

Corrélations			
		<b>STAT3</b>	<b>PD-L1</b>
<b>STAT3</b>	Corrélation de Pearson	1	,287**
	Sig. (bilatérale)		,006
	N	91	91
<b>PD-L1</b>	Corrélation de Pearson	,287**	1
	Sig. (bilatérale)	,006	
	N	91	91

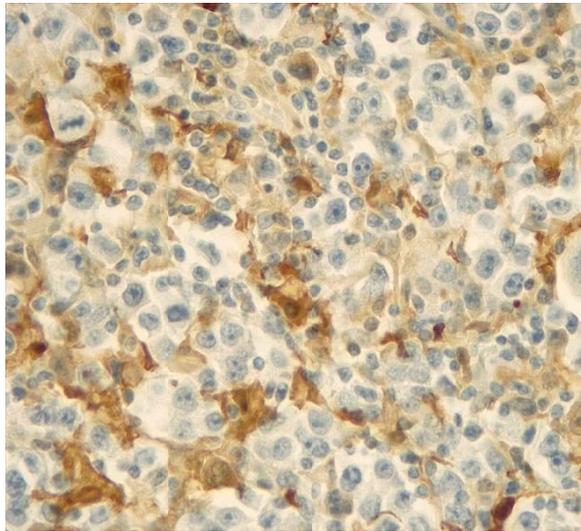
**\*\*.** La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).



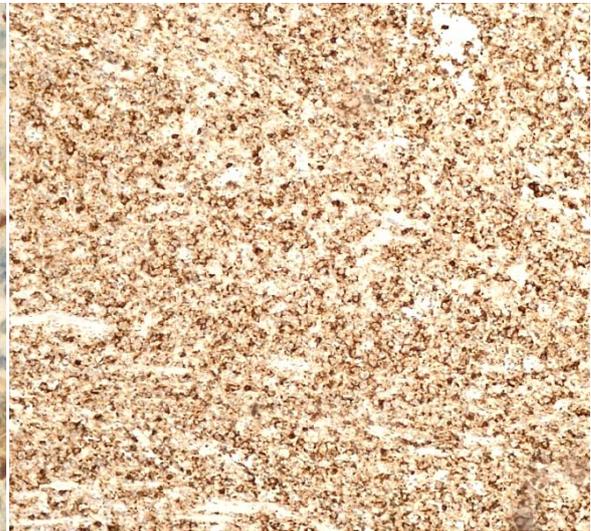
**A : EBV+ PD-1me GX4**



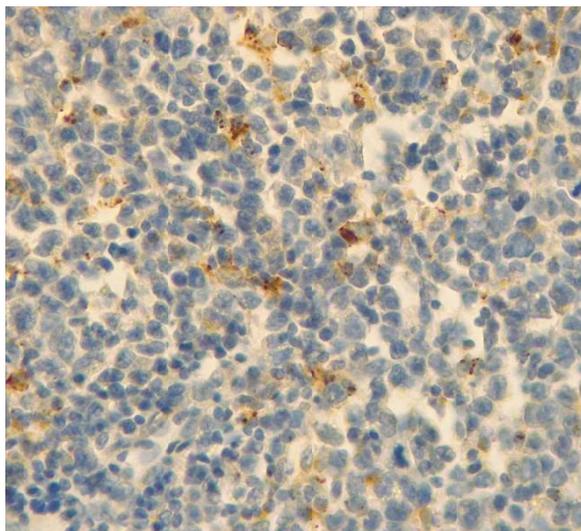
**B : EBV+ PD-1me GX10**



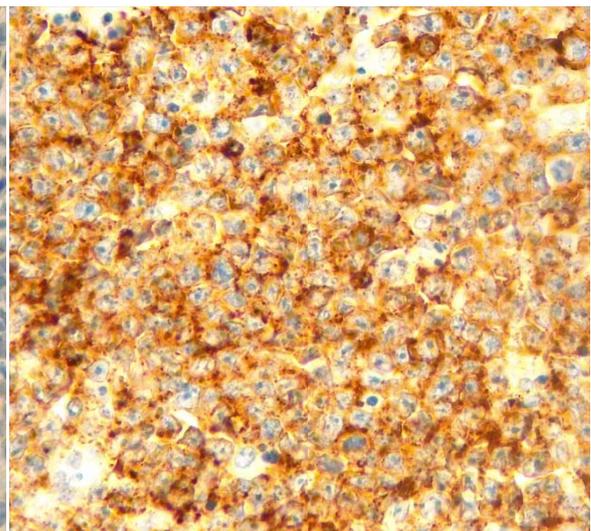
**C : EBV+ PD-1me GX40**



**D : EBV+ PD-1t GX10**



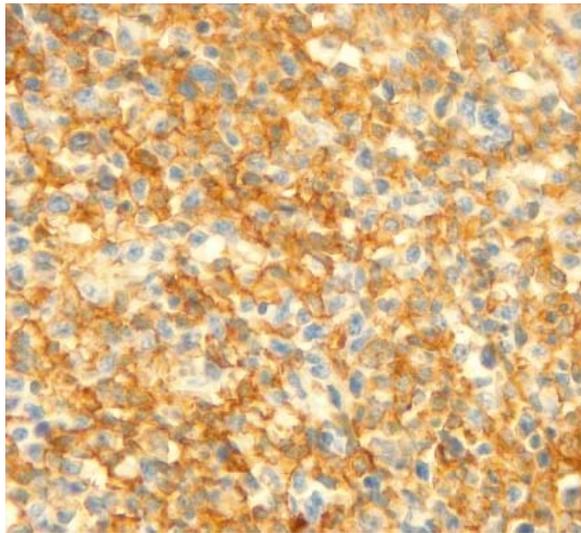
**E : EBV- PD-1me GX10**



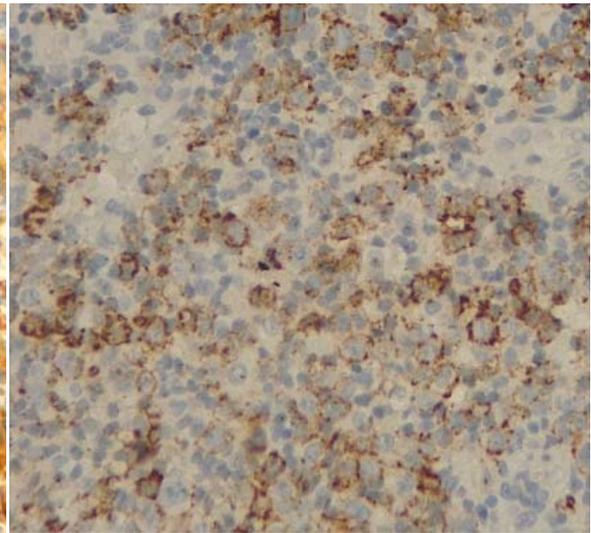
**F : EBV- PD-1t GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 94: Expression du PD-1**



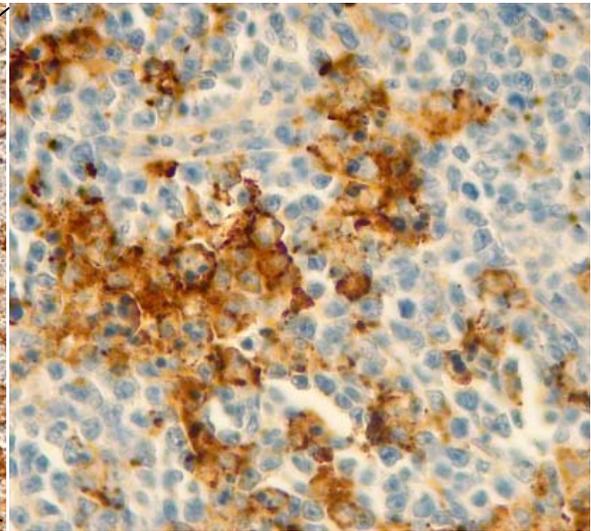
**A : EBV+ PD-L1 t GX40**



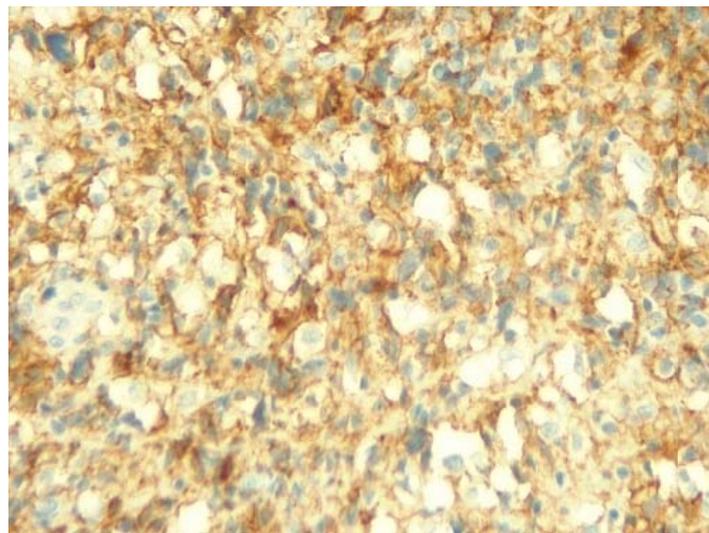
**B : EBV+ PD-L1 me GX40**



**C : EBV- PD-L1 me GX10**



**D : EBV- PD-L1me GX40**



**E : EBV- PD-L1t GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

**Figure 95: Expression du PD-L1**

#### IV.2.5 Facteurs histo-pronostiques

L'analyse bivariée a montré une différence significative de l'expression du c-MYC et P53 par les cellules lymphomateuses  $p < 0,0001$ . Celle-ci a été retrouvée dans 100% des LBDGC EBV+ (Tableau 53).

Il n'a pas été constatée de différence significative pour la co-expression du c-MYC et BCL2 entre les deux groupes  $p = 0.66$

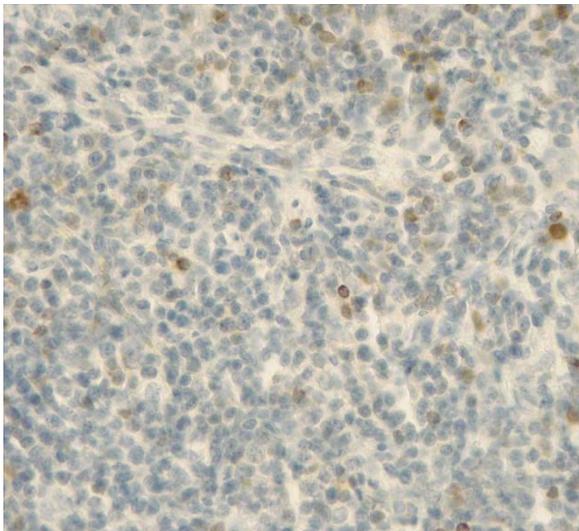
L'expression de l'index de prolifération Ki67 était élevée dans les deux groupes.

Tableau 53 : Analyse bivariée des facteurs histopronostiques

Caractéristiques	Catégories	Total	EBV				p
			EBV+		EBV-		
			n	%	n	%	
BCL2	BCL2-	50	9	69.2	41	52.6	0,26
	BCL2+	41	4	30.8	37	47.4	
		91	13	100	78	100	
c-MYC	c-MYC-	48	0	0	48	61.5	0.000
	c-MYC+	43	13	100	30	38.5	
		91	13	100	78	100	
P53	P53-	53	0	0	53	67.9	0.000
	P53+	38	13	100	25	32.1	
		91	13	100	78	100	
Co-expression c-MYC –BCL2	c-MYC-	48	0	0	48	61.5	0.66
	c-MYC+	43	13	100	30	38.5	
		91	13	100	78	100	



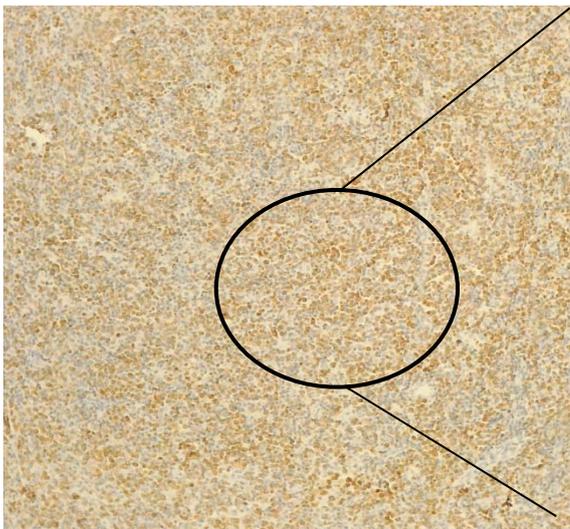
**A : EBV+ BCL2- GX4**



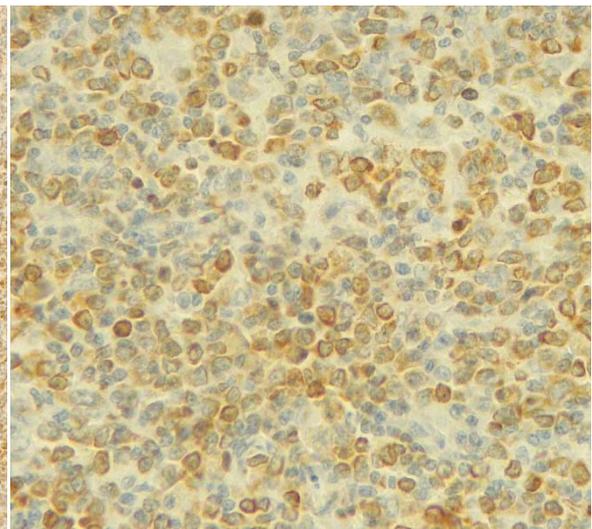
**B : EBV+ BCL2- GX10**



**C : EBV+ BCL2+ GX4**



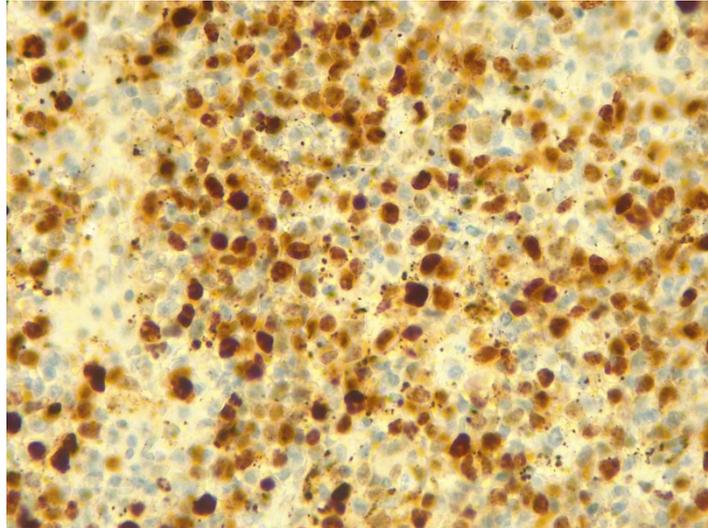
**D : EBV- BCL2+ GX4**



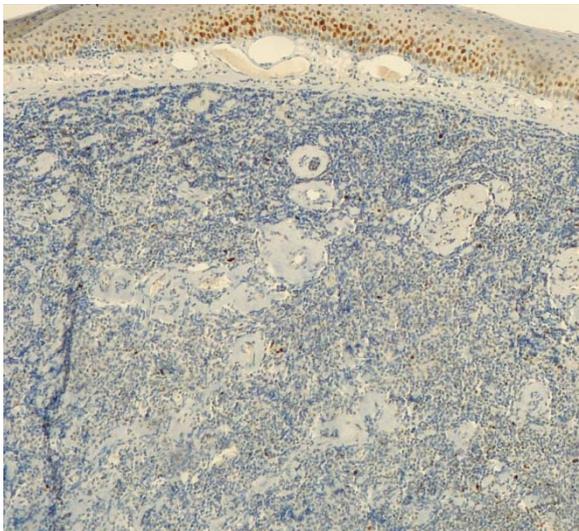
**E : EBV- BCL2+ GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

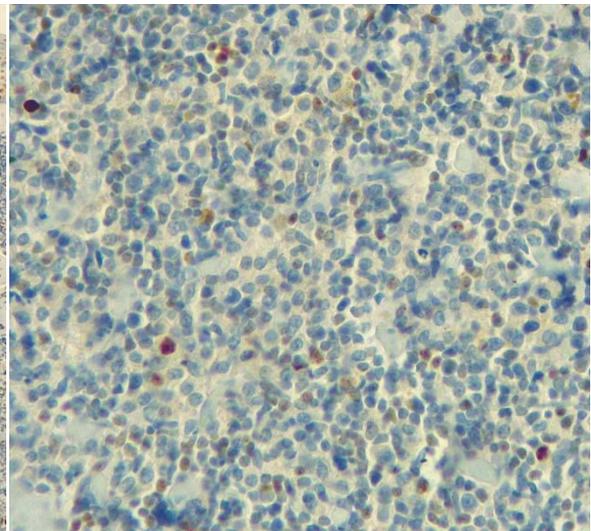
**Figure 96 : Expression du BCL2**



**A : EBV+ c-MYC+ GX40**

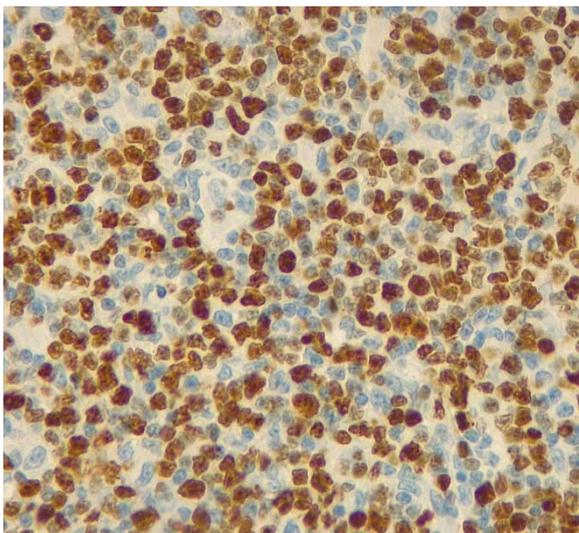


**B : EBV- c-MYC- GX10/Amygdale**

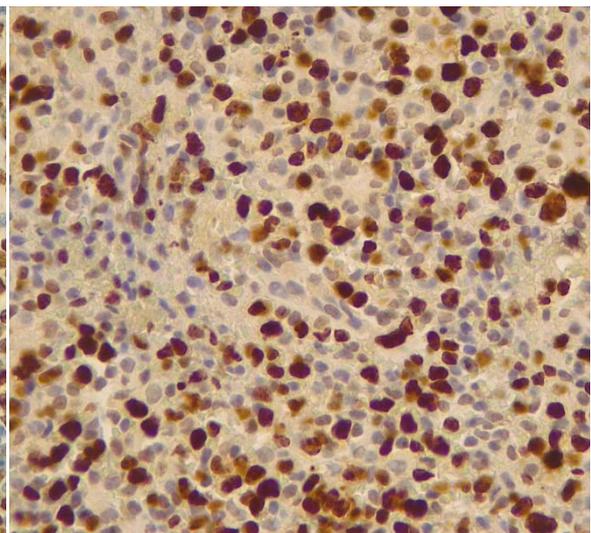


**C : EBV- c-MYC- GX40**

*Figure 97: Expression du c-MYC*



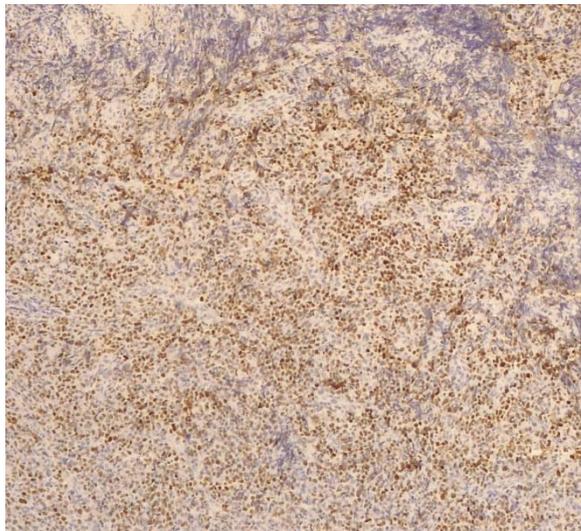
**A : EBV+ Ki67 GX40**



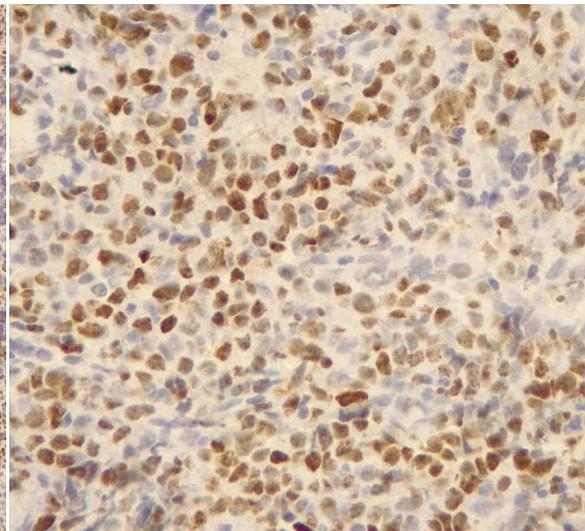
**B : EBV- Ki67 GX40**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

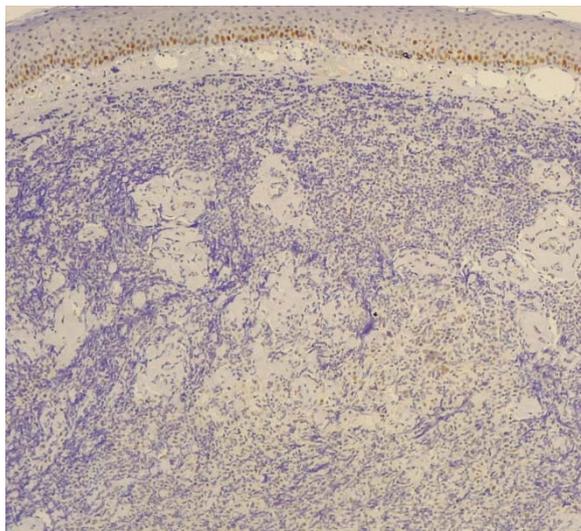
*Figure 98: Expression du Ki67*



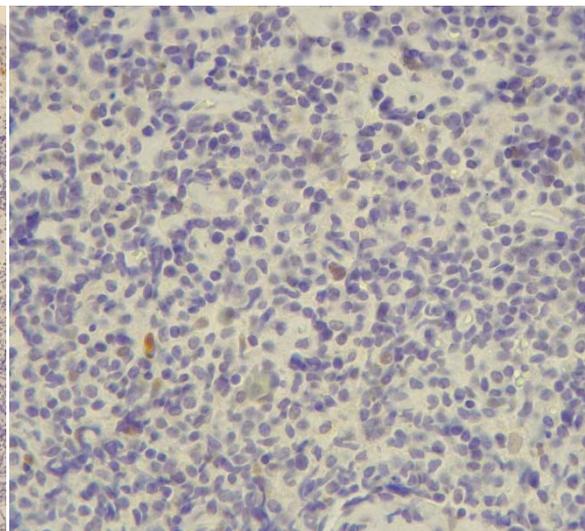
**A : EBV+ P53+ GX10**



**B : EBV+ P53+ GX40**



**C : EBV-P53- GX10/Amygdale**



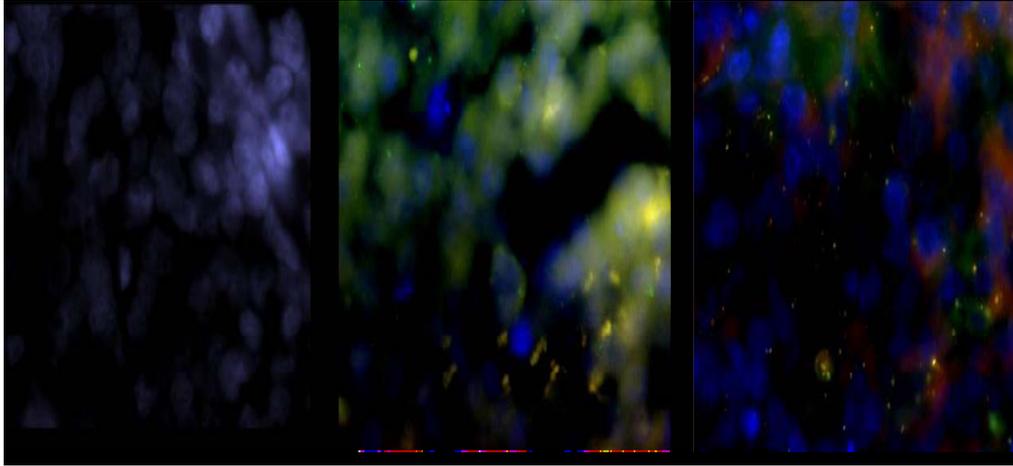
**D : EBV-P53- GX40/Amygdale**

*Microphotographies Dr Nabila Moulai, Service d'Anapath CHU Frantz-Fanon Blida*

*Figure 99: Expression de la P53*

#### IV.2.6 Hybridation in situ par fluorescence FISH

Nous avons réalisé trois tentatives pour la technique FISH, avec des protocoles différents notamment sur la durée de l'enzyme pepsine. Nous avons inclus à chaque tentative les 13 EBV+ et 20 EBV-. Cependant, aucun signal n'est apparu. Il est probable que la fixation à la phase pré-analytique, a donné des résultats non contributifs, sachant que cette technique est sensible à la fixation.



*Photographies Pr Souaad Taoussi CLCC Blida*

*Figure 100: Résultats de la technique FISH*

#### IV.2.7 Analyse multivariée par régression

Les variables associées à la variable dépendante à un seuil  $< 20\%$  (15) ont fait l'objet d'une analyse multivariée par régression logistique dichotomique qui a utilisé la procédure de pas à pas descendant.

Le Khi2 de Mantel Haenszel a été utilisé pour ajuster les variables redondantes liées à la variable dépendante.

Le test de l'indice de Breslow a été utilisé pour mettre une interaction entre les différentes variables (mêmes variables liées au même profil)

Au total, 8 variables binaires ont été introduites dans le modèle (symptômes B, Score IPI, Réponse au traitement, CD30, CD8, FOXP3, C-MYC, P53).

**Le modèle final, a retenu trois variables qui sont la réponse au traitement  $p=0.02$ , l'expression du CD30  $p=0.01$  et CD8  $p=0.03$ .**

Tableau 54 : Analyse multivariée par régression

Catégories		EBV		Analyse bivariée			Analyse multivariée		
		E B V + N (%)	EB V- N (%)	O R	IC à 95 %	p	O R	I C	p
Symptômes B	Absents	6(46.2)	38(48.7)	3.08	0.64-14.9	0.15	-	-	NS
	Présents	7(53.8)	40(51.3)						
IPI score	Faible	3(23.1)	31(39.7)	1.45	0.14-15.15	0.07	-	-	NS
	Intermédiaire Faible	3(23.1)	20(20)						
	Intermédiaire Haut	1(7.7)	15(19.2)						
	Haut	6(46.2)	12(15.4)						
Réponse au traitement	Echec	9(69.2)	25(32.1)	4.77	1.26 - 16.99	0.01			0.02
	RC/RP	4(30.8)	53(67.9)						
CD30	CD30-	9(69.2)	25(32.1)	12.92	3.18 - 52.5	<0.001			0.01
	CD30+	10(76.9)	16(20.5)						
PD-L1 t	PD-L1t-	0	59(75.6)	1.07	0.9-0.96	<0.001			
	PD-L1t +	13(100)	19(24.4)						
Tia1	Faible	0	49(62.8)			<0.001			
	Modérée	5(38.5)	17(21.8)						
	Forte	8(61.5)	12(15.4)						
Perforine	Faible	4(30.8)	62(79.5)	2.4	0.6-8.9	<0.001			
	Modérée	4(30.8)	9(11.5)						
	Forte	7(37.4)	24(30.8)						
CD8	Faible	0	26(33.3)	4	1.6-10	0.04			0.03
	Modérée	6 (46.2)	28(35.9)						
	Forte	7(37.4)	24(30.8)						
NF-κB P50	Non induite	1(7.7)	7(9)	5.6	2.1-15	<0.001	-	-	NS
	Induite	12 (92.3)	71(91)						

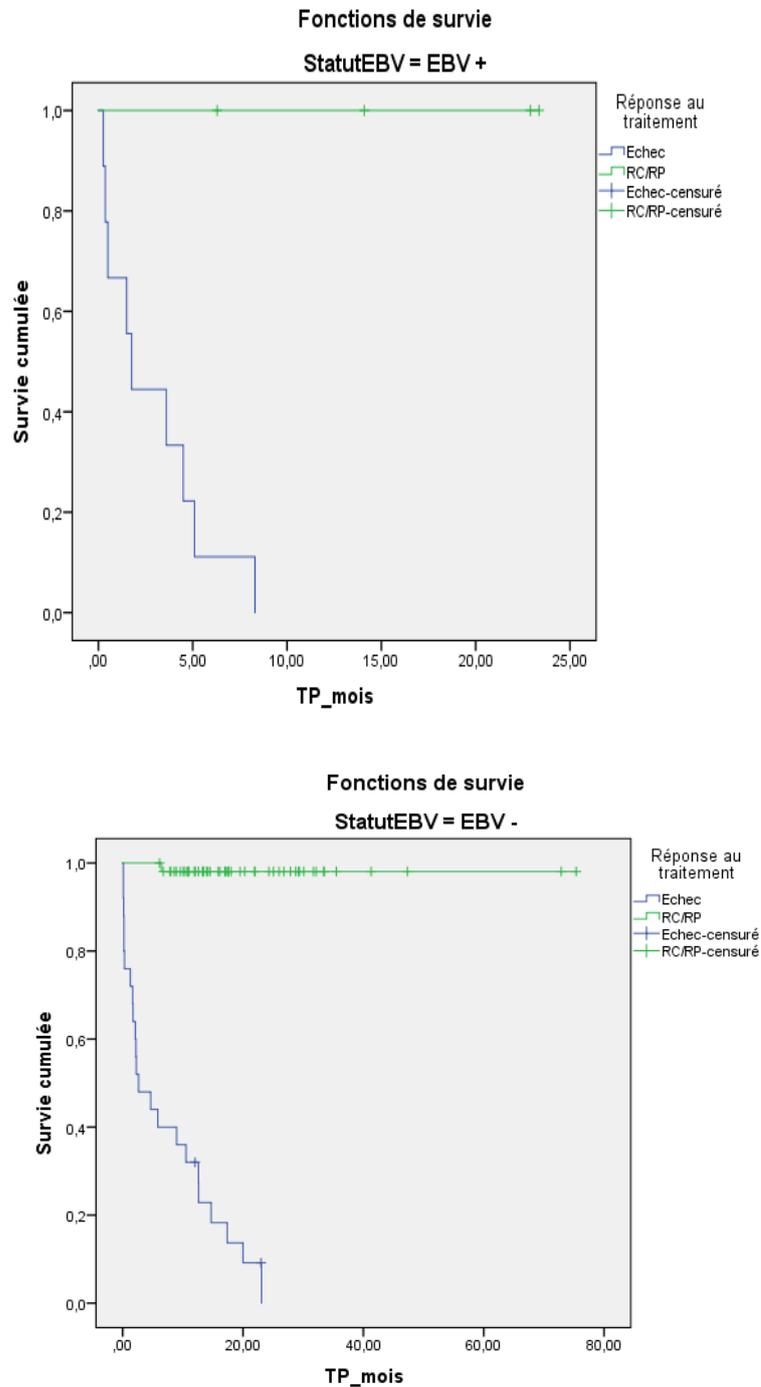
NF-κB P65	Non induite	12(92.3)	3(3.8)	3.1	1.3-7.8	<0.001	-	-	NS
	Induite	1(7.7)	75(96.2)						
STAT3	STAT3-	0	62(79.5)	3.8	1.5-9.3	<0.001	-	-	NS
	STAT3+	13(100)	16(20.5)						
c-MYC	C-MYC-	0	48(61.5)	3.1	1.2-8	<0.001	-	-	NS
	C-MYC+	13(61.9)	30(38.5)						
P53	P53-	0	535(67.9)	3.5	1.4-9.1	<0.001	-	-	NS
	P53+	13(100)	25(32.1)						
IL-6*	EBV+	13	140.38 +/- 99.89			0.002			
	EBV-	78	63.78 +/- 61.06						

\*Test de Mann-Whitney

## IV.2.8 Courbes de survie (variables indépendantes)

### IV.2.8.1 Réponse au traitement

La survie a été significativement associée à la réponse thérapeutique ajustée au statut EBV ( $p=0.0001$ ). La survie en cas d'échec thérapeutique a été de 0% à 10 mois pour les EBV + versus 60% pour les EBV-.

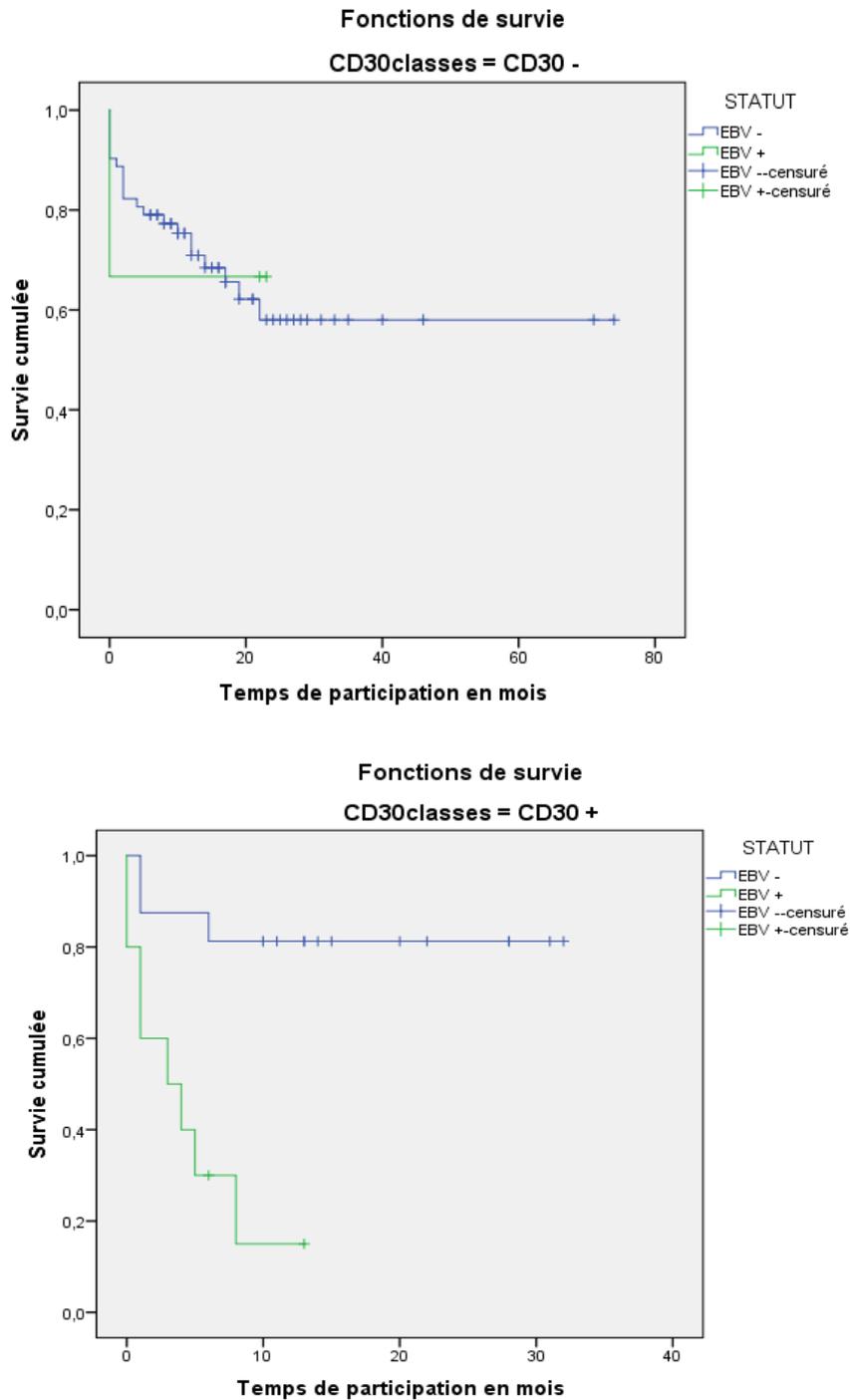


Log Rank (Mantel-Cox) = 0.000

Figure 101 : Taux de survie en fonction de la réponse au traitement

#### IV.2.8.2 CD30

Le taux de survie a été significativement associée à l'expression du CD30 ajusté au statut EBV + ( $p=0.0008$ ).



*Figure 102: Taux de survie en fonction de l'expression de CD30*

#### IV.2.8.3 CD8

La survie n'a pas été significativement associée à l'EBV ( $p=0.25$ ).

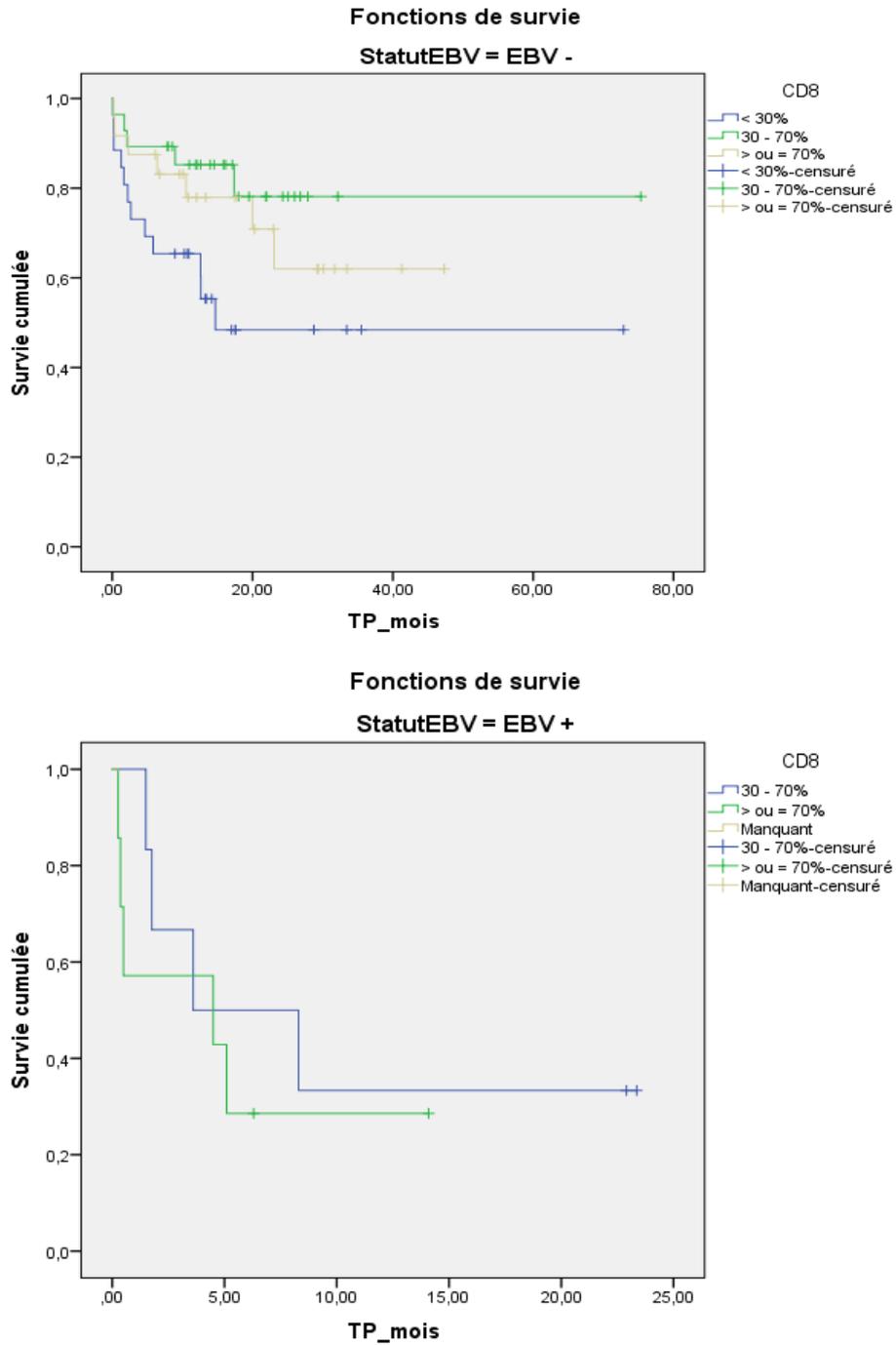


Figure 103: Taux de survie en fonction de l'expression du CD8

# V DISCUSSION

Le LBDGC est un groupe très hétérogène sur le plan clinique, morphologique, phénotypique et moléculaire.

Il représente 30% à 40% de tous les lymphomes<sup>2,9</sup>. D'après le registre des tumeurs d'Alger de l'année 2016<sup>171</sup>, la pathologie maligne au niveau des ganglions lymphatiques et du système hématopoïétique représentaient respectivement :

- les 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> cancers chez la femme avec une fréquence relative de 2.4% et 2.7%.
- chez l'homme, les 8<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> cancers avec une fréquence relative de 3.7% et 3.2%.

Cependant, le type histologique n'a pas été précisé mais, il est le plus fréquent en Algérie d'après une étude multicentrique réalisée en 2014 par un groupe associant de nombreux services de pathologie de la Région Centre d'Algérie et portant sur 206 cas de lymphomes non hodgkiniens<sup>172</sup>, dont la majorité a été diagnostiquée par les membres du comité de lecture des lymphomes de la région centre et revus à Alger en 2012 par des experts hématopathologistes internationaux<sup>172</sup>.

Le LBDGC NOS représentait 52.8% de tous les sous types histologiques.

Comparativement à d'autres séries de l'Europe de l'Ouest et d'Amérique du Nord, il représentait respectivement 36.4% et 34.3%<sup>172</sup>.

La médiane d'âge était de 49 ans en Algérie, 62.5 ans en Europe de l'Ouest et 69 ans en Amérique du Nord.

Allouda a rapporté une série nationale de 124 cas de LBDGC<sup>173</sup> et Mekhlef 57 cas de LBDGC exclusivement ganglionnaires<sup>174</sup> avec une moyenne d'âge de 53 ans et de 54 ans dans les deux séries et une prédominance masculine.

Dans notre série de 162 cas, la moyenne d'âge était de 59 ans et une fréquence de 51% avec une légère prédominance masculine.

D'autres séries notamment, Algéro-Tunisienne de 1432 cas<sup>173</sup>, étude multicentrique de 971 cas regroupant l'Algérie, les pays Orientaux et l'Inde<sup>42</sup>, la série Marocaine de Benayoune<sup>175</sup> et Asiatique<sup>176,177</sup> ont montré un âge moyen plus jeune au moment du diagnostic, respectivement de 52 ans, 59,5 ans, 50 ans, 53 à 57 ans par rapport aux séries Occidentales<sup>178</sup>.

Le siège ganglionnaire était le plus fréquent dans notre série (64%) et de (39%) dans la série de Mekhlef<sup>174</sup>. Le groupe sous moléculaire ABC ou non GCB était de 66% dans la série de Mekhlef<sup>174</sup>, il était de 85% dans la notre, contrairement aux séries Européennes et Américaines où le sous groupe GCB est prédominant variant de 42% à 49 % selon les séries. Nos résultats se rapprochent plus de la série Marocaine de Benayoune<sup>175</sup>, où le sous type ABC est de 84,1%, Japonaise (68%)<sup>34</sup> et Chinoise (78% et 67%)<sup>177,179</sup>.

La fréquence élevée de ce sous type de lymphome, ainsi que l'âge d'apparition plus précoce suggèrent de réaliser d'autres études afin de mieux préciser certains facteurs étiologiques encore inconnus chez nous. Et au vu du profil phénotypique non GC, ABC élevé des séries Algériennes et Maghrébines, nous nous sommes fixés pour objectif principal dans notre travail de thèse, la recherche de la fréquence de l'EBV comme facteur étiologique dans les LBDGC NOS ainsi que son rôle dans la lymphomagenèse et le ME des LBDGC NOS.

En outre, dans la dernière classification, des entités lymphoproliférations B viro-induites liées à l'EBV ont été bien identifiées, soulignant le rôle important de ce virus dans la lymphomagenèse des lymphomes.

L'EBV est endémique au Maghreb, mais, à l'heure actuelle aucune étude de grande envergure sur la prévalence de l'EBV dans les LBDGC n'a été publiée ni même réalisée.

En effet et à ce jour, seules de petites études et des séries de cas ont donné des résultats disparates en ce qui concerne des taux de prévalence de 4-5% dans les pays occidentaux<sup>17,180</sup> à 10%-15% en Asie et Amérique du Sud<sup>19,181</sup>. Les raisons de cette différence ne sont pas claires, mais certains facteurs virologiques (souche EBV) et génétiques (HLA) joueraient un rôle<sup>20</sup>.

La plus forte prévalence (14,9%) et (28%) a été rapportée au Pérou<sup>13,78,124</sup>. Elle est de 8% dans notre série, la rapprochant des séries Asiatiques. Cependant la plupart de ces études ont été réalisées chez les sujets âgés.

Depuis la première publication rapportée par Oyama et al en 2003<sup>10</sup> de 22 cas de LBDGC EBV+ chez des patients, sans antécédent de déficit immunitaire et âgés de plus de 50 ans, d'autres publications Japonaises et Coréennes ont montré une prévalence de 8-10%<sup>124,182</sup> chez des sujets âgés, sans précision du statut immunitaire.

Le LBDGC EBV+ a été ensuite introduit dans la classification OMS 2008<sup>11</sup> comme entité provisoire sous le terme de « LBDGC EBV+ du sujet âgé ». Le critère d'âge retenu était de 50 ans et plus.

L'étude réalisée par Tracy et al<sup>180</sup> publiée en 2018 a été la première analyse prenant en compte les critères de la nouvelle classification OMS 2016, chez les sujets immunocompétents dans une large cohorte de patients Nords Américains. La prévalence était de 4.4% (16/362).

Ces résultats étaient similaires à l'étude d'Ok et al<sup>17</sup> en 2014, sans discrimination d'âge dans les pays Occidentaux regroupant l'Europe et l'Amérique du nord où la prévalence était de 4% (28 /732).

Dans la série Chinoise de Lu et al<sup>181</sup> en 2015, la prévalence était 10.4% (26/250) et de 14% (32/250) avec des cut off de 20% et 50% pour l'EBER, celle-ci a été recherchée chez les sujets jeunes comme chez les sujets âgés ( 50 ans et plus).

La seule étude réalisée sur la prévalence de l'EBV dans les LBDGC en Europe de l'Est est celle de Ziarkiewicz et al en 2016<sup>183</sup> en Pologne ; elle était de 12,2% (9/74) tout âge confondu et de 9.5% (7/44) chez les sujets âgés.

Dans la dernière étude Péruvienne de Beltran et al en 2018<sup>16</sup>, la prévalence était de 28% (33/117), cependant elle a été estimée seulement chez les sujets de plus de 60 ans.

Les autres études de prévalence dans les séries Mexicaines, Péruviennes et Turques ont été réalisées seulement chez les sujets âgés ainsi que les premières séries Coréennes,

Chinoises, Japonaises et Occidentales. Les taux de prévalence constatés ont été les suivants :

- Pérou de 14.9% (28/188),
- Mexique 7% (9/136),
- Turquie 5.3% (18/340),
- Corée 8.1-8.9% (34/380 et 18/222),
- 4.7% au Nord de la Chine (10/222),
- Japon 11.4% -8.7%-6.9% (13/114, 156/1792,14/225),
- 7.4% (16/217) en Arabie Saoudite.

Hofscheier et al<sup>19</sup> ont comparé la prévalence entre le Mexique et l'Allemagne chez les sujets âgés, la prévalence en Allemagne était de 2% ( 4/169) (**Tableau 55**).

*Tableau 55 : Etudes comparatives des différentes prévalences selon les variations géographiques avec cut off d'Eber*

<b>Auteur</b>	<b>Pays</b>	<b>Année</b>	<b>Catégorie d'âge</b>	<b>Prévalence</b>	<b>Cut off d'Eber</b>
<b>Kuze<sup>184</sup></b>	Japan	2000	Sujets âgés	11.4 %(13/114)	Non spécifié
<b>Oyama<sup>182</sup></b>	Japan	2007	Sujets âgés	8.7% (156/1792)	Non spécifié
<b>Park<sup>124</sup></b>	Corée	2007	Sujets âgés	8.9% (34/380)	20%
<b>Hoeller<sup>185</sup></b>	Suisse/Italie/Autriche	2010	Sujets âgés	3.1% (8/258)	10%
<b>Uner<sup>186</sup></b>	Turquie	2011	Sujets âgés	6.7% (12/178)	Non spécifié
<b>Beltran<sup>13</sup></b>	Pérou	2011	Sujets âgés	14.9% (28/188)	20%
<b>Hofscheier<sup>19</sup></b>	Mexique	2011	Sujets âgés	7% (9/136)	20%
<b>Hofscheier<sup>19</sup></b>	Allemagne	2011	Sujets âgés	2.4% (4/167)	20%
<b>Bavi<sup>187</sup></b>	Arabie saoudite	2011	Sujets âgés	7.4% (16/217)	Non spécifié
<b>Pan<sup>188</sup></b>	Chine du Nord	2012	Sujets âgés	4.7% (10/212)	50%
<b>Ahn<sup>40</sup></b>	Corée	2013	Sujets âgés	8.1% (18/222)	10%
<b>Chang<sup>189</sup></b>	Taiwan	2013	Sujets âgés	16.9% (15/106)	20%
<b>Sato<sup>41</sup></b>	Japan	2014	Sujets âgés	6.9% (14/225)	30%
<b>Ok<sup>17</sup></b>	Amérique du nord/Europe	2014	Tout âge	4% (28/732)	10%

<b>Lu<sup>181</sup></b>	Chine	2015	Tout âge	10.4% (26/250) 14% (32/250)	20%  50%
<b>Hong<sup>14</sup></b>	Corée	2015	Tout âge	8.4% (48/571)	20%
<b>Ziarkiewicz<sup>183</sup></b>	Pologne	2016	Tout âge	12,2% (9/74)	5%
<b>Beltran<sup>16</sup></b>	Pérou	2018	Sujets âgés	28% (33/117)	20%
<b>Tracy<sup>180</sup></b>	Amérique du nord	2018	Tout âge	4.1% (16/362)	20%
<b>Notre série</b>	<b>Algérie</b>	<b>2019</b>	<b>Tout âge</b>	<b>8% (13/162)</b>	<b>20%</b>

Dans notre série, le taux de prévalence de 8% (13/162) a été estimée selon les critères de la dernière classification OMS 2016<sup>2</sup> sans discrimination d'âge.

A notre connaissance, c'est la première étude en Algérie ; elle n'a pas été multicentrique même si le recrutement au sein du CHU de Blida a concerné plusieurs régions d'Algérie, notamment le centre, le sud et l'ouest.

La limite de notre étude a été dictée de fait, par la non disponibilité de la sonde EBER dans les services de pathologie ; ce qui a été un obstacle à la réalisation d'une étude multicentrique. Cette dernière serait souhaitable, afin de mieux estimer cette prévalence et confirmer cette fréquence de 8%.

Le Cut off de l'EBER n'a toujours pas été standardisé. Toutes ces études de prévalence ont été réalisées avec un seuil différent (**Tableau 55**), il variait selon les séries en étant fixé à 5%<sup>183</sup>, 10%<sup>17,40</sup> ; 20%<sup>14,16,19,124,180,181,189</sup> ; 50 %<sup>188,190</sup>.

Ces résultats peuvent être dus à une différence de cohortes objectives, notamment de seuils et l'hétérogénéité géographique de l'infection à l'EBV.

Le seuil de positivité dans notre série a été fixé à 20% sur la base de nombreuses publications réalisées avec ce cut off. Le pourcentage de transcrits d'EBERs variait dans notre série de 20% à 100%. 20 % d'expression a été retrouvée chez un seul patient (n=1) et a été confirmé par deux techniques d'HIS. Cette positivité a été recherchée au niveau des cellules lymphoïdes tumorales, et distinguée par la possible expression au niveau des cellules péri-tumorales et intra-tumorales (petits lymphocytes et immunoblastes activés), qu'on retrouve communément dans les lymphomes T et le LHC.

Cette expression par les cellules microenvironnementales du LBDGC EBV- a été rapportée pour la première fois par Quintanilla-Martinez et al (1997)<sup>191</sup> dans une étude comparative chez des patients Mexicains et Allemands. Les cellules EBV+ du ME des

LBDGC EBV- ont été retrouvées chez les patients Mexicains (7/136, 5,1%) et les patients Allemands (1/169, 0,6%).

Plus tard, Stuhlmann-Laeisz et al (2015)<sup>192</sup>, ont montré également une expression <10% de cellules de morphologie blastoïde péri- et intra-tumorales dans 04 cas de LBDGC EBV-. Ces auteurs ont expliqué cette expression par l'échappement immunitaire des cellules B non néoplasiques dû à une immunosuppression induite par le lymphome dans le ME, mais les implications cliniques ne sont pas encore claires<sup>192</sup>.

Récemment, l'équipe de Kato (2017)<sup>193</sup> a comparé les caractéristiques clinico-pathologiques de 30 LBDGC EBV+ et 29 et 604 LBDGC EBV- avec et sans cellules du ME EBV + (âge médian d'apparition de 71, 67 et 62 ans, respectivement). Les 30 patients LBDGC EBV+ et les 29 patients, porteurs de cellules positives EBV + péri-et intra-tumorales faciles à distinguer des cellules lymphoïdes tumorales, avaient un IPI haut et intermédiaire dans plus de 60% des cas et une atteinte pulmonaire significativement plus élevée<sup>193</sup>.

En outre, les patients LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- porteurs de cellules EBV + dans le ME, avaient un pronostic plus sombre que les patients sans cellules EBV + détectables (survie globale médiane [SG] 100 et 40 mois vs non atteintes,  $p < 0,01$ ). Ces patients traités par du Rituximab ont présenté des courbes de survie chevauchantes (OS,  $p = 0,77$ , survie sans progression,  $p = 1,0$ ).

Cette équipe Japonaise a conclu que le LBDGC EBV-, avec des cellules EBV + dans le ME, présente des caractéristiques cliniques similaires à celles du LBDGC EBV +. Elles seraient liées à la sénescence immunitaire du ME liée à l'âge. Ces cellules ont été retrouvées chez des patients âgés. Et dans cette étude, la prévalence de l'EBV (4.4%) était similaire à la série Mexicaine de Quintanilla-Martinez (5.1%). Ceci peut refléter la plus grande susceptibilité des populations Asiatiques et Mexicaines à l'infection EBV. La prévalence de LBDGC EBV+ est également épidémiologiquement plus élevée chez ces populations que dans les populations occidentales.

Des investigations supplémentaires avec un grand nombre de patients devraient à l'avenir clarifier la signification clinico-pathologique et biologique des cellules B non néoplasiques EBV +, afin de permettre un traitement codifié.

L'HIS est la technique gold standard et est obligatoire pour le diagnostic du LBDGC EBV+. Elle permet aussi de le définir. La variabilité des seuils de positivité des différentes études publiées notamment 10% et 20% est discutable et pose le problème de la possible expression de l'EBV par les cellules B non néoplasiques péri et intra-tumorales.

C'est pour cela que Nicolae et al<sup>15</sup> ont suggéré d'utiliser une valeur seuil > 90% de cellules tumorales. Hofscheier et al<sup>19</sup> ont également suggéré d'utiliser un cut off > 80%. Ce débat concernant le seuil de positivité reste ouvert.

Il n'existe pas à l'heure actuelle de critères définissant ce seuil, ce qui constitue une limite à l'estimation réelle de cette prévalence.

D'autres études notamment moléculaires sur de grandes séries pourraient mieux définir à l'avenir ce seuil de positivité. Un double marquage HIS EBER et IHC CD79a peut être réalisé en cas de doute. Le CD79a étant moins exprimé dans ce type de lymphome, ce que l'équipe de Kato a réalisé dans 08 cas<sup>193</sup>.

Dans notre travail de thèse nous n'avons pas pu établir ou proposer un cut off, vu le faible échantillonnage, de même que dans les séries publiées.

L'expression des différents marqueurs des voies de lymphomagenèse réalisés dans notre étude, dans le but d'identifier ce virus comme un des facteurs étiologiques du lymphome, était homogène mais les résultats abortifs de notre étude cytogénétique par technique FISH (causes : défaut de fixation, non disponibilité du formol tamponné à 10%, non disponibilité d'outils moléculaires) dont les résultats auraient été plus significatifs, ne nous a pas permis d'explorer encore mieux cette voie.

Des recommandations concernant les procédés de fixation des tissus avec formation de tout le personnel impliqué dans le circuit du prélèvement doivent être mises en œuvre ainsi que la généralisation du formol tamponné à 10% à tous les services de pathologie. Ceci permettrait de réaliser à l'avenir des études moléculaires chez nous et surtout de ne pas passer à côté de résultats faux négatifs ou faux positifs.

L'âge n'est plus un critère majeur dans les LBDGC EBV+ NOS chez les sujets immunocompétents d'où sa définition comme entité définitive dans cette dernière révision de la classification<sup>2,13,15</sup>.

Beltran (2011) et Cohen (2014) ont été les premiers à rapporter des cas chez les sujets jeunes (< 50ans), avec un cut off d'EBERs respectivement de 10% et 20%<sup>18,194</sup>.

La première étude sur la prévalence de l'EBV chez les sujets jeunes a été publiée par Hong et al, elle était de 6.7% (13/195)<sup>14</sup> avec un seuil de positivité de 20%. Par la suite, Nicolae et al ont rapporté la plus grande série de sujets jeunes immunocompétents dont l'âge était < 45 ans avec un cut off d'EBERs à 90%<sup>15</sup>. Les caractéristiques clinico-pathologiques de ces patients jeunes ont été discutés. Ces auteurs avaient suggéré qu'il pourrait s'agir d'une entité clinico- pathologique qui ne serait pas limitée aux patients âgés. Par ailleurs, quelques séries pédiatriques ont été également publiées<sup>14,15,195,196</sup>.

07 cas de LBDGC EBV+ pédiatriques ont été rapportés dans la région de Baghdad dans une série Irakienne de 231 lymphomes pédiatriques chez des enfants immunocompétents<sup>12</sup>. L'incidence chez les sujets jeunes et les enfants est probablement sous-estimée au vu des faibles cohortes publiées.

L'âge de survenue est plus précoce dans les séries Sud-Américaines, par rapport aux séries Asiatiques et Occidentales<sup>17,19,158,180,182,197</sup>.

- Dans notre série, nous avons choisi de classer nos patients en sujets jeunes <50 ans et âgés  $\geq 50$  ans en référence à toutes les publications antérieures<sup>10,13,14,16,19,40,41,78,124,180,181,183,185,187-189,189,198</sup> et pour mieux individualiser la proportion de sujets jeunes par rapport aux sujets âgés dans notre population.

La moyenne d'âge des LBDGC EBV+ était de 59 ans avec une légère prédominance féminine chez les sujets âgés ( $\geq 50$  ans) et masculine chez les sujets

jeunes (<50ans). 10 (76%) de nos patients étaient âgés de plus de 50 ans et 3 (14%) d'âge inférieur à 50 ans. Dans les séries Asiatiques, Sud-Américaines, Européennes et Nord-Américaines, il existait une prédominance masculine chez le sujet âgé.

Hong et al ont montré une faible prévalence de 6,7% de l'EBV dans les LBDGC chez les sujets jeunes par rapport aux sujets âgés 9.3% (35/376)<sup>14</sup>. Dans notre série une prévalence de 14% chez les sujets jeunes a été observée.

Les LBDGC EBV+ touchent le plus souvent les hommes surtout dans la catégorie des sujets jeunes<sup>20,78</sup>. Les sujets jeunes présentent dans 89% des cas une atteinte ganglionnaire, posant des problèmes de diagnostic différentiel avec le LHC<sup>17,20</sup>.

Contrairement, aux jeunes, l'atteinte extra-ganglionnaire est observée dans plus de 30% des cas chez les sujets âgés. La localisation ganglionnaire a été la plus fréquente dans notre série (77%), et (23%) de siège extra-ganglionnaire. Sur les 10 sujets âgés de notre série 7 (70%), ont présenté une atteinte ganglionnaire. Les patients jeunes avaient dans 100% des cas une atteinte ganglionnaire.

Contrairement aux premières publications, les dernières séries ont rapporté une localisation ganglionnaire prédominante<sup>10,164,194,199</sup>. Nos données sont donc concordantes avec les données de la littérature.

Il a été également démontré, que le pronostic et la réponse thérapeutique sont meilleurs chez les sujets jeunes. Les sujets de plus de 50 ans, ont une survie plus courte après un traitement conventionnel par R-CHOP<sup>78</sup>.

-Le LBDGC EBV+ NOS est considérée actuellement comme une entité clinico-pathologique distincte dans la dernière classification révisée de l'OMS 2016<sup>2</sup> chez les sujets immunocompétents quel que soit l'âge.

Sur le plan histologique, nous avons classé nos 13 cas de LBDGC EBV+ selon les critères histopathologiques de Montes et Moreno<sup>29</sup>, qui sont à la base de leur classification actuelle dans la 4<sup>ème</sup> édition révisée de l'OMS 2016<sup>2</sup>.

Le sous type polymorphe LBDGC like, a été retrouvé dans 6 cas (46,2%) et suivi du sous type monomorphe dans 4 cas (30,8%) et polymorphe Hodgkin –like dans 3 cas (23,1%).

Nos résultats sont concordants avec les données de la littérature, ou le sous type polymorphe est le plus fréquent<sup>20</sup>.

Dans 100% des cas, nous avons retrouvé un aspect en ciel étoilé, ainsi que des cellules de Reed Sternberg et Hodgkin like, dans 50% une architecture nodulaire, et dans 30% une nécrose géographique.

Le sous type polymorphe LBDG like a été noté chez les sujets jeunes comme chez les sujets âgés. Cette constatation a été également observée dans les séries Asiatiques où il n'existait pas de prédominance d'un sous type par rapport à l'âge<sup>78</sup>.

Sur le plan morphologique, la distinction entre le sous type monomorphe et polymorphe n'a pas d'impact pronostic clinique<sup>182</sup>. De plus cet aspect histologique peut se voir dans les LBDGC EBV-.

Le diagnostic différentiel se pose essentiellement avec le LHC surtout dans la variante polymorphe Hodgkin-like. Le LHC est également caractérisé par un fond granulomateux composé, de petits lymphocytes, plasmocytes, éosinophiles et histiocytes. L'une des principales différences est que, dans le LHC les cellules néoplasiques représentent généralement environ 0.1%-10% de l'infiltrat cellulaire<sup>2</sup>. Ces cellules malignes co-expriment CD30 et fréquemment CD15. L'expression du CD15 est généralement négative dans le LBDGC EBV+<sup>20</sup>. Aussi, les cellules de Reed-Sternberg et Hodgkin sont négatives au CD45, et le CD20 est moins exprimé<sup>2</sup>. Le LHC peut également être associé à l'expression de l'EBV, bien que cette expression soit très variable en fonction du sous type histologique. Le sous-type scléro-nodulaire montre une positivité à l'EBER dans 10 à 40%, tandis que le sous-type à cellularité est positif à l'EBER dans 75% des cas<sup>2</sup>. D'où la nécessité d'intégrer les données cliniques, et d'interpréter le profil immunohistochimique dans son contexte.

Sur le plan phénotypique, les cellules lymphoïdes tumorales ont exprimé les marqueurs B (CD20, OCT-2 et BOB-1) dans 100% de nos 13 cas. L'expression de PAX5 a été notée dans 84,6% des cas et une absence d'expression de CD79a a été constatée dans 69,8 % des cas. Cette absence d'expression de CD79 a été notée essentiellement dans le sous type polymorphe. Ces données rejoignent les données de la littérature<sup>2,20</sup>.

Le phénotype sous moléculaire activé, non GCB ou ABC, a été retrouvé dans 100% de nos cas concordant avec les données de la littérature de toutes les séries publiées à ce jour<sup>10,19,158,181,182</sup>. Le phénotype ABC est prédominant dans ce sous type de lymphome. L'expression de BCL6 était négative dans 100% des cas. L'expression de BCL6 est variable, négative dans la majorité des articles<sup>2,182</sup>.

53,8% (7) de nos patients ont présenté une latence de type III (LMP1+, EBNA2+). Cependant, elle a été constatée chez 70% des sujets âgés. 100% des sujets jeunes ont exprimé une latence de type II (LMP1+, EBNA2-).

La latence de type III est observée chez les patients atteints de mononucléose et dans les lymphoproliférations EBV post transplantation et les sujets VIH.

La latence de type II est observée dans le LHC, le lymphome T/NK extra- ganglionnaire de type nasal, l'UCNT et également dans les lymphoproliférations EBV post transplantation et chez les sujets VIH.

Tous nos patients étaient des sujets immunocompétents, sans aucun antécédent de déficit immunitaire. Nos résultats sur le profil de latence rejoignent ceux de la littérature. Les deux types de latences II et III ont été retrouvées dans les quelques publications sur le profil de latence associé au LBDGC EBV+<sup>19,182,185,192,193,195,200</sup>.

La latence de type III a été plus observée chez les sujets âgés et les cas pédiatriques<sup>195</sup>; d'où la nécessité de préciser le statut immunitaire. La présence d'un réarrangement des gènes des Ig peut être une aide au diagnostic différentiel. La latence de type II a été plus observée chez les sujets jeunes<sup>15</sup>

Bien que l'implication pronostique de la latence de type III reste à confirmer, il est très probable que les patients porteurs de celle-ci, avaient un statut d'immunodépression. Le pronostic est généralement sombre dans ce cas. Selon cette hypothèse, Stuhlmann-Laeisz et al ont démontré, dans une importante cohorte de patients Européens, que ceux atteints de lymphomes EBNA2-positifs, qui représentaient un tiers des patients, présentaient une survie globale beaucoup plus faible, un stade clinique avancé et un IPI élevé<sup>192</sup>.

Dans une plus petite série de 14 patients EBV+, Sato et al ont démontré que le taux de survie des patients avec un profil de latence de type III était plus faible que celui des patients atteints de latence de type II<sup>41</sup>. De plus, les patients atteints de latence de type III sont décédés moins d'un an après le diagnostic, même lorsqu'ils ont été traités par du Rituximab. Par ailleurs, le LBDGC gastrique à EBV + semblait résister à la chimiothérapie conventionnelle particulièrement chez les patients présentant une latence de type III<sup>192</sup>. Cependant, la positivité d'EBNA2 n'a pas montré de valeur pronostique dans l'étude d'Ok et al réalisée dans une série de jeunes patients, dont la moitié provenait des États-Unis<sup>78</sup>. Parmi nos cas, une patiente (n=1) LBDGC EBV+ de siège gastrique avec une latence de type III est décédée rapidement.

Nos résultats rejoignent ceux de Sato et al, nous avons constaté une différence significative entre le profil de latence de type II et III par rapport à la réponse au traitement et à la survie avec un  $p=0,009$ . La latence de type III semble liée à une faible réponse au traitement et à un faible taux de survie.

Il apparaît ainsi de plus en plus important dans la physiopathologie des LBDGC d'évaluer la présence ou non d'une association au virus EBV par HIS afin de rechercher des transcrits EBERs dans les cellules lymphoïdes tumorales ainsi que déterminer le type de latence.

L'expression du CD15 dans les LBDGC EBV+ a été rapportée dans 23% des cas dans une seule étude<sup>15</sup>. Elle était négative dans 100% de nos cas. Cette expression a été réalisée de façon systématique devant la présence de cellules Reed –Sternberg –like, posant un problème de diagnostic différentiel avec un LHC. Il est souhaitable de réaliser ce marqueur de façon systématique, afin d'éliminer un LHC.

Sur le plan clinique, dans notre série, les LBDGC EBV+ ont présenté une symptomatologie B fréquente (84.6%), un stade clinique avancé (84.6%), un IPI haut (46.2%), et un faible taux de réponse au traitement et de survie (69.2%), concordant avec les données de la littérature<sup>2,20,200</sup>.

Nos résultats ont montré une différence significative entre les deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- sur le score IPI ( $p=0.07$ ) ; celui-ci était haut chez les patients présentant un LBDGC EBV+ (46.2%) et la réponse au traitement R-CHOP ( $p=0.01$ ) ainsi que sur le taux de survie ( $p=0.01$ )

En revanche, nous n'avons pas constaté de différence significative pour les paramètres : âge ( $p=0.86$ ), sexe ( $p=0.29$ ), symptomatologie B ( $p=0.15$ ) et le stade clinique ( $p=0.34$ ) entre les deux groupes LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-.

Le stade clinique avancé (III et IV) a été constaté chez nos patients quelque soit le statut de l'EBV, 84.2% chez les LBDGC EBV+ et 69.2% chez les EBV- comparativement aux séries occidentales de 50%<sup>2</sup>, possiblement en rapport avec le retard diagnostique.

Plusieurs études ont montré que les LBDGC EBV+ du sujet âgé avaient un pronostic inférieur par rapport aux LBDGC EBV-<sup>17,19,29,40,41,83,181</sup>. L'évolution clinique est souvent agressive avec un taux de survie médiane de 2 ans et un taux de survie globale à 5 ans d'environ 25%<sup>31,124,182</sup>.

D'autres publications ont également montré que la réponse au traitement par R-CHOP chez les patients jeunes était médiocre<sup>18,124,190,200</sup>. Cependant, l'étude de Hong et al (6.7%, 13/195) a révélé que les patients LBDGC EBV+ avaient un résultat similaire à ceux qui étaient LBDGC EBV- quelque soit l'âge<sup>14</sup>.

En l'absence de seuil uniforme pour la positivité de l'EBER, certaines publications ont attribué des résultats incohérents aux différentes valeurs de seuil utilisées dans diverses études<sup>14,17,40,198,201,202</sup>.

Toutefois, en appliquant la valeur seuil de 20% la plus fréquemment utilisée, notre étude a indiqué que les patients LBDGC EBV+ présentaient un score IPI haut et un faible taux, de réponse au traitement et de survie.

La survie chez nos patients a été significativement associée à l'EBV ( $p=0.0001$ ). La moyenne de survie a été de 50,14 IC [41.6-58.6] pour les EBV – versus 8,9 [3,6-14,1]. Elle a été faible pour les lymphomes associés à l'EBV (la survie à 10 mois à 29% EBV+ versus 87% EBV -).

Nous avons comparé nos résultats avec les quelques publications récentes de séries comparatives avec analyse multivariée des caractéristiques clinico-pathologiques des deux groupes LBDGC EBV+ et EBV- traités par R-CHOP sans discrimination d'âge ; même si pour le moment une seule étude a été réalisée selon les critères de la classification révisée 2016, celle de Tracy et al<sup>180</sup> (**Tableau 56**).

*Tableau 56: Différentes études comparatives des caractéristiques cliniques des LBDGC EBV+ et EBV-*

<b>Auteur</b>	<b>Pays</b>	<b>Année</b>	<b>N</b>	<b>Caractéristiques cliniques</b>
<b>Beltran</b>	Pérou	2011	8	Différence significative chez les sujets âgés
<b>Ahn<sup>40</sup></b>	Corée	2013	18	Différence significative chez les sujets âgés
<b>Ok<sup>17</sup></b>	Amérique du nord/Europe	2014	28	Pas de différence significative
<b>Sato<sup>41</sup></b>	Japan	2014	14	Différence significative chez les sujets âgés
<b>Lu<sup>181</sup></b>	Chine	2015	35	Sexe (homme), stade clinique, IPI, Mauvaise réponse au traitement, dans les deux catégories d'âge et un cut off différent 20% et 50%
<b>Hong<sup>14</sup></b>	Corée	2015	14	Différence significative chez les sujets âgés
<b>Tracy<sup>180</sup></b>	Amérique du nord	2018	16	Pas de différence significative/
<b>Notre série</b>	<b>Algérie</b>	<b>2019</b>	<b>13</b>	<b>Score IPI, Réponse au traitement et survie</b>

Dans l'étude de Tracy et al, la cohorte initiale était de 1081 patients, 711 ont été exclus pour tissus insuffisants dans les blocs.

Aucune différence significative n'a été trouvée pour l'Indice de performance selon ECOG, les stades d'Ann Arbor, les taux de LDH et le score IPI et aucune sur l'impact pronostic<sup>180</sup>.

Ces résultats contrastaient avec les caractéristiques cliniques défavorables des patients asiatiques LBDGC EBV+<sup>181</sup>.

Seulement deux études Asiatiques antérieures, celles de Sato et Ahn ont été réalisées dans l'ère de R-CHOP et ont montré que le statut EBV avait un impact sur le pronostic qui était plus sombre dans cette population Asiatique<sup>40,201</sup>.

À noter dans l'étude de Tracy que le groupe EBV + avait une proportion légèrement plus élevée de patients âgés de moins de 50 ans (42% EBV+ contre 19% EBV -;  $p = 0,053$ ; si on inclut les patients immunodéprimés, 31% contre 18%;  $p = 0,19$ ).

Néanmoins, cette étude a révélé que le LBDGC EBV+ était associé à une fréquence plus élevée d'atteinte de la moelle osseuse (43,8% contre 18,5%;  $p = 0,03$ ).

Que l'atteinte médullaire soit associée à un pronostic inférieur ou favorable, respectivement n'a pas été précisé<sup>180</sup>.

Ces conclusions concordaient avec les conclusions d'études antérieures menées par Ok et al<sup>17</sup> impliquant 732 patients de tous âges provenant de pays Occidentaux, regroupant l'Amérique du Nord et des pays Européens. Ces auteurs ont suggéré que la variation génétique géographique dans le génome de l'EBV devrait être considérée comme un facteur de cette différence. La faible prévalence aussi dans les pays Occidentaux pourrait avoir un faible impact sur le pronostic.

La sérologie EBV a été réalisée chez seulement 27 patients, 4 EBV+ et 22 EBV-. Celle-ci n'est pas demandée systématiquement par les hématologistes aux patients en pratique quotidienne. Dans le cadre de notre travail de thèse, nous avons demandé à nos collaborateurs cliniciens de la prescrire dans le but de la corréler à l'expression de l'EBER dans le tissu. Cependant, celle-ci a été réalisée dans 27 cas.

La sérologie EBV (IgM) a été positive chez 84% patients EBV - et 100% des patients EBV+, il n'existait pas de différence significative entre les deux groupes  $p=0.82$ . La sérologie EBV peut être positive chez des patients EBV-, sans corrélation avec la positivité de l'EBER dans le tissu. Sa signification semble liée plus à un état d'immunodépression lié à la maladie. Elle est utile dans les cas pédiatriques, où la morphologie lors d'une virose peut être trompeuse et poser problème de diagnostic différentiel avec un LHC.

L'ADN du virus EBV présent dans le plasma (virémie), signe de réactivation du virus et d'échec possible du contrôle viral par les lymphocytes T CD8 +, a été associé au vieillissement<sup>203</sup>. Un groupe Chinois d'étude a notamment découvert que l'ADN détectable de l'EBV dans le sang total, considéré comme un indicateur de la présence de virions dans le sang périphérique, était un biomarqueur pronostique plus fort que la recherche de transcrits EBERs par HIS dans les tissus pour le diagnostic ; de plus, dans le suivi des patients après une chimiothérapie, l'ADN du virus EBV dans les échantillons de sang total s'est révélé utile pour prédire l'évolution clinique<sup>199,203</sup>.

Ils avaient noté une concordance entre l'ADN de l'EBV dans le sang total et l'EBER par HIS.

Le CD30 (Ki-1) est une protéine membranaire de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNF). L'expression du CD30 est corrélée à l'activation des cellules B et T. Depuis sa description initiale au début des années quatre-vingt, l'antigène CD30 a été associé principalement au lymphome de Hodgkin classique et au lymphome anaplasique à grandes cellules. L'expression du CD30 est limitée à une petite

population de lymphocytes B et T activés, de cellules NK et à de rares monocytes et éosinophiles activés<sup>204</sup>.

Des études récentes ont montré que l'expression du CD30 est associée à un mauvais pronostic chez les patients avec un IPI intermédiaire haut et haut<sup>22</sup>. Cependant, il ya des constatations contradictoires concernant l'impact pronostique de la positivité du CD30 par les cellules tumorales. Les seuils assez variables utilisés dans les différentes études ainsi que les critères de sélection hétérogènes pourraient expliquer les différentes implications pronostiques de ce marqueur. Actuellement, le cut off proposé est de 20%<sup>205,206</sup>. La positivité du CD30 a été plus observée dans le sous type moléculaire non GC ABC. Aussi, il a été démontré que son expression serait liée à un réarrangement de c-MYC<sup>49</sup>.

La fréquence élevée d'expression de CD30 dans les LBDGC EBV+ dans la littérature nous a mené à la rechercher systématiquement devant tout LBDGC NOS.

Dans notre série, il existait une différence significative entre l'expression du CD30 LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- ( $p < 0.001$ ). Le CD30 a été positif dans 76.9% des LBDGC EBV+ et 20.5% des LBDGC EBV-. De façon générale, il a été exprimé dans 70% des LBDGC de sous type moléculaire non GC ABC. L'analyse de corrélation bivariée par le test de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression d'EBER et l'expression du CD30 ( $r = 0,367$ ,  $p < 0.000$ ). Le CD30 est significativement associé au statut EBV et la survie chez les patients à la fois positifs au CD30 et à l'EBV a montré un taux de survie très bas Log Rank (Mantel-Cox)=0.0008. Nos données sont concordantes avec les données de la littérature.

Et au final, l'analyse multivariée par régression Cox a retenu une des variables indépendantes : le CD30 ( $p = 0.03$ ).

Ces caractéristiques pathologiques et moléculaires distinctes ont été observées dans des études antérieures Occidentales et Asiatiques<sup>15,17,19,170,181</sup>.

Fait intéressant, dans l'étude d'Ok et al, bien qu'il n'y ait pas de différence significative dans la survie des patients avec ou sans LBDGC EBV+, les patients avec une expression à la fois de EBV + et du CD30 avaient un résultat significativement plus médiocre<sup>17,47</sup>, également observé par Slack et al dans une étude sur des patients immunocompétents de la Colombie-Britannique<sup>170</sup>. Ok et al ont conclu que l'infection à EBV n'est pas prédictive d'un mauvais pronostic dans les pays développés Occidentaux si le CD30 n'est pas exprimé. Il s'agissait de la première étude exhaustive portant sur ce groupe de patients<sup>170</sup>. Elle fournit une justification solide au traitement ciblé sur la voie d'activation du CD30 pour ces patients positifs à la fois au CD30 et à l'EBV. Ce constat a été également relevé dans notre étude, en plus de la différence significative du taux de survie dans les deux groupes.

Avec l'avènement du Brentuximab vedotin (BV) qui est un anticorps conjugué dirigé contre le CD30, approuvé par la FDA pour une utilisation dans le LHC en rechute et le lymphome anaplasique à grandes cellules en rechute. De nombreuses publications

concernant son utilité dans d'autres tumeurs malignes, telles que le LBDGC, le mycosis fongoïde, le syndrome de Sézary, les lymphomes T, le lymphome primitif médiastinal et les lymphoproliférations post-greffe sont en cours<sup>207</sup>. Dans le LBDGC NOS, une étude en phase II est en cours d'évaluation<sup>207</sup>. Il serait une option thérapeutique pour les LBDGC EBV+, mais à l'heure actuelle aucune étude n'a été publiée dans ce sens.

Un des objectifs principaux de notre travail de thèse a été d'étudier les voies de lymphomagenèse de L'EBV dans le but de prouver son implication dans les LBDGC EBV+ comme facteur principal.

L'EBV participe aux mécanismes de la lymphomagenèse grâce à l'expression des protéines de latence qui détournent au profit du virus les mécanismes cellulaires normaux de l'homéostasie. Parmi les protéines de latence, la protéine LMP-1 est responsable d'une grande partie des effets cancérigènes du virus. En effet, l'activation constitutive de LMP-1 aboutit à la dérégulation des voies de signalisation cellulaire, dont les voies d'activation du facteur de transcription NF-κB.

Les voies de signalisation NF-κB, JAK/STAT3 et IL-6 ont été étudiées vu la disponibilité des anticorps par technique IHC déjà évaluées par d'autres auteurs et à défaut de la non disponibilité d'outils moléculaires notamment le NGS et la GEP. A noter qu'à notre connaissance aucune publication sur la voie de signalisation IL-6 dans les LBDGC EBV+ n'a été réalisée à ce jour.

La protéine NF-κB fonctionnelle existe sous forme de dimères composés de molécules de classe I et de classe II. Les molécules de classe I, p50 et p52, contiennent des régions de localisation nucléaire sans action de transcription<sup>114</sup>. Les molécules de classe II, p65 (RelA), RelB et c-Rel possèdent un domaine d'activation de la transcription. L'accumulation nucléaire du dimère p50 / p65 ou p50 / c-Rel est observée dans la voie canonique. En comparaison, les dimères p52 / RelB se déplacent vers le noyau dans la voie alternative<sup>113</sup>. Une augmentation significative de l'expression de p50 dans les LBDGC EBV+ suggère que l'activation de NF-κB se produit par la voie canonique<sup>21</sup>.

Étant donné que l'activation de NF-κB est plus courante dans les LBDGC de type non GC ABC, l'expression nucléaire des composants canoniques de NF-κB dans les LBDGC EBV+ suggère une activation de NF-κB induite par l'EBV dans les cellules tumorales<sup>21</sup>. Dans les LBDGC ABC, l'activation de NF-κB est due soit à l'auto-activation du signal CD40, soit à une mutation de NF-κB. Parmi lesquelles les mutations de TNFAIP3 (A20) ou MYD88 (la plus fréquente avec 39% des LBDGC-ABC). L'induction de la voie NF-κB est due à l'expression de LMP1 principale oncoprotéine de l'EBV. L'inhibition de NF-κB induit l'apoptose<sup>187</sup>.

Et dans cette hypothèse, nous avons recherché l'expression du facteur de transcription NF-κB par son expression au niveau des cellules lymphoïdes tumorales essentiellement par deux marqueurs de la voie canonique : NF-κB P50 et NF-κB P65. Lorsque cette

voie est induite, on a observé une expression nucléaire par les cellules lymphoïdes tumorales et cytoplasmique lorsqu'elle n'a pas été induite.

Il a été noté une différence significative entre les LBDGC EBV+ et EBV-  $p < 0.001$ . P50 a été exprimé dans 91% des LBDGC EBV+ et P65 dans 96.2% des LBDGC EBV-.

Cette constatation a été également rapportée par Montes-Moreno et al, où l'expression nucléaire de P50 était significative entre les deux groupes EBV+ et EBV- avec un  $p < 0.001$ <sup>29</sup>. Aussi, Ok et al ont évalué par technique IHC l'expression des composants de NF- $\kappa$ B (p50, p65 et c-Rel). L'expression de p50 était plus communément observée dans le LBDGC EBV+ comparé au LBDGC EBV - (65,2% contre 35,9%,  $p = 0,007$ ).

En revanche, l'expression de p65 et c-Rel n'a montré aucune différence entre les deux groupes suggérant ainsi que la voie canonique est activée en utilisant à la fois la dimérisation et p65 et c-Rel partenaires pour p50<sup>17</sup>. La p65 dans notre série n'a pas démontrée son rôle dans les LBDGC EBV+, c'est peut-être du à la variabilité de l'anticorps utilisé.

Nos résultats par technique IHC et les résultats des deux publications suggèrent une induction de la voie canonique par EBV. Cependant, Ok et al ont montré aucune corrélation significative de LMP1 ou EBNA2 avec aucune des molécules de NF- $\kappa$ B ( $P > 0,05$ ).<sup>17</sup>

L'expression de CD40 a été également estimée, cependant elle n'était pas discriminative entre les deux groupes puisque qu'elle a été exprimée dans 100% des cas.

Le CD40 est une glycoprotéine transmembranaire de type I appartenant à la superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale (TNFRs). Il est exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques, principalement les cellules B, et les cellules non hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales et les fibroblastes<sup>208</sup>.

Le CD40 joue un rôle important dans la réponse immunitaire humorale. Son engagement avec son ligand CD154 induit la prolifération et la différenciation des cellules B, la commutation isotypique des anticorps, la formation du centre germinatif, l'augmentation de la génération de cellules B mémoire et la survie des cellules B.

D'autres études ont démontré son implication dans la mort cellulaire. La signalisation via CD40 conduit à une mort rapide des cellules B, principalement observée dans les lignées de cellules B transformées par l'EBV alors qu'il est bien documenté que son engagement sur des cellules B immatures les protège de la mort induite via le récepteur des cellules B (BCR)<sup>208</sup>. Il n'est cependant pas connu si l'effet apoptotique du CD40 se produit dans des lignées de lymphocytes B qui ne sont pas transformées par EBV.

Des études ont montré que la surexpression de c-MYC augmentait la prolifération induite par le virus de la latence III de l'EBV en fonction de NF- $\kappa$ B<sup>122</sup>. In vitro, l'induction de c-MYC a augmenté la prolifération de lymphocytes B, activation de MYD88 dépendante de TLR9, avec diminution de l'apoptose. Dans le modèle de souris  $\lambda$ c-Myc transgénique présentant une surexpression de c-MYC dans les cellules B,

l'activation in vivo de MYD88 par la splénomégalie induite par TLR9 était liée à une entrée accrue de cellules B en phase S<sup>96</sup>.

La signalisation CD40 continue dans les cellules B et le transgène  $\lambda$ -Myc développe des lymphomes très agressifs présentant les caractéristiques de LBDGC activés (ABC).

Les principales signatures de profils d'expression génique de ces tumeurs étaient celles de la prolifération et du métabolisme énergétique. Ces résultats suggèrent que c-MYC est un co-transformateur de NF- $\kappa$ B.<sup>122</sup>

David A et al ont montré que la surexpression de c-MYC conduit à la prolifération des cellules B immortalisées en programme de latence III, d'une manière dépendante de NF- $\kappa$ B<sup>122</sup>. c-MYC apparaît comme un acteur majeur de la prolifération des cellules B immortalisées par l'EBV. Cela expliquerait pourquoi NF- $\kappa$ B est associé à des lymphomes tant indolent qu'agressif et ouvre de nouvelles perspectives sur la possibilité de thérapies combinatoires ciblant à la fois le programme de prolifération de c-MYC et les voies d'activation de NF- $\kappa$ B dans les LBDGC EBV+<sup>96</sup>.

Pour cela, nous avons réalisé une corrélation entre NF- $\kappa$ B P50 et c-MYC par le test de Pearson qui a montré une corrélation significative entre les deux ( $r=0,272$   $P=0.009$ ). Le facteur de transcription c-MYC est significativement associé à la voie canonique NF- $\kappa$ B.

La voie JAK-STAT3 a été évaluée par technique IHC et ceci par l'expression de l'AC STAT3 Thyr 705 dans sa forme phosphorylée (p STAT3) ; son expression nucléaire intense dont le cut off a été déterminé à 40% selon les données de la littérature et a été retrouvée dans 100% des LBDGC EBV+.

Il a été constaté une différence significative  $p<0,001$  entre les LBDGC EBV+ et LBDGC EBV-. La voie de signalisation JAK-STAT3 a été exprimée dans 100% des cas par les LBDGC EBV+ et dans 20.5% des LBDGC EBV- par le facteur de transcription phosphorylé STAT3.

Cette différence a été également rapportée par Ok et al par technique d'IHC. STAT3 était plus communément exprimé dans les LBDGC EBV+ par rapport aux LBDGC EBV- (56,5% contre 34,9%,  $p=0,044$ ). Cependant, STAT3 n'a pas montré de corrélation significative avec LMP1 (Test de Pearson  $> 0,05$ )<sup>17</sup>.

Le STAT3 est l'un des sept membres de la famille du STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STA5a, STA5a, STAT5b, et STAT6) facteurs de transcription, et réside dans une zone inactive dans le cytoplasme des cellules non stimulées. L'activation de STAT3 est médiée par la phosphorylation d'une substance particulière résidu de tyrosine (Tyr 705), qui favorise la dimérisation par l'interaction du domaine phosphotyrosine-SH2<sup>209</sup>.

Le STAT3 dimérisé migre vers le noyau et agit comme un facteur de transcription. L'activité constitutive STAT3 peut être vue dans les cancers du sein, du poumon, du pancréas et de la prostate<sup>210</sup>. Les études ont montré que STAT3 peut être activé par LMP1<sup>211,212</sup>. De plus, EBNA2 s'est avéré être un co-activateur transcriptionnel de

STAT3<sup>213</sup>. Les résultats pourraient confirmer qu'un effet synergique de la LMP1 et EBNA2 est nécessaire lors de l'activation de STAT3.

p STAT3 peut interagir physiquement avec le dimère NF-κB p50/p65 et le dimère NF-κB peut recruter de l'acétyl transférase d'histone p300. Par la suite, p300 peut activer l'acétylate activé (phosphorylé) p65 et augmenter sa rétention nucléaire de manière à prolonger l'activité transcriptionnelle de la NF-κB<sup>209</sup>.

Notre étude a montré que le LBDGC EBV+ est un sous-type génétiquement unique avec une activation accrue des voies canoniques NF-κB et JAK / STAT. Même si, cette conclusion a été constatée par Ok et al, cependant la prévalence de l'EBV dans leur cohorte de 732 patients Occidentaux a été faible de 4% et notre étude présente un échantillonnage plus faible. Une étude de grande envergure doit être envisagée afin de mieux l'individualiser. D'autant plus que ces voies représentent de nouvelles options thérapeutiques.

LMP1 stimule également les voies MAPK, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) -Akt et les voies kinase c-Jun-N-terminal (JNK)/AP1. L'activation de toutes ces voies favorisera la prolifération et la survie cellulaire<sup>115</sup>.

Les études par GEP ont montré que le LBDGC EBV+ est distinct du LBDGC EBV- au niveau moléculaire. Les gènes distinctement régulés dans le LBDGC EBV+ participent à l'activité accrue de NF-κB, prolifération cellulaire, progression du cycle cellulaire et métabolisme cellulaire. Pendant ce temps, les gènes régulés négativement suggèrent une possible résistance à la chimiothérapie, un mauvais pronostic et EBV associé à l'expression du CD30<sup>17,21</sup>. Ce que nous avons constaté dans notre étude.

Enfin les études antérieures réalisées par technique cytogénétique FISH à la recherche de translocations majeures impliquant IgH, c-MYC, BCL6 et BCL2 ont suggéré que les altérations fréquemment observées dans les LBDGC NOS sont rarement observées dans les LBDGC EBV+.<sup>20</sup> Ces résultats ont été constatés essentiellement chez les personnes âgées. Aucune étude ne prenant en compte les sujets jeunes n'a été réalisée à ce jour ; ce qui nous avait poussé à la réaliser secondairement dans notre étude, malheureusement cette technique n'a pas pu aboutir.

L'IL-6 est une cytokine de la phase aiguë de l'inflammation. Ubiquitaire, elle est produite par les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes, les macrophages, les cellules mésothéliales, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les kératinocytes et diverses cellules tumorales. Elle se lie au récepteur de l'IL-6 (IL-6R), existant sous deux formes□: soluble ou membranaire. Ce récepteur est composé de deux chaînes alpha se liant à l'IL-6 et de deux chaînes bêta – gp130 –, agissant comme transducteur de signal. Le complexe IL-6□/□IL-6R□/□gp130 est capable d'activer les deux voies de signalisation intracellulaires, STAT3 et MAPK, via l'activation de JAK<sup>212</sup>.

Le rôle possible de l'IL-6 dans une croissance autocrine des myélomes a été déjà étudié<sup>214</sup>. En outre, l'IL-6 pourrait jouer un rôle dans la pathologie liée à L'EBV puisqu'elle favorise l'établissement in vitro de lignées lymphoblastoïdes B induites par ce virus.

Dans les carcinomes du nasopharynx, IL-6 est liée à l'expression de l'oncoprotéine virale LMP-1. A son tour, LMP-1 induit la production de l'IL-6 via l'activation de STAT3 induisant d'une manière autocrine l'expression de LMP-1. Enfin, l'IL-6 induit l'expression de NOS2 via NF- $\kappa$ B.<sup>215</sup> . En revanche, Villavicencio et al ont montré que la surexpression de la NOS2 pouvait inhiber l'expression de l'IL-6 et l'activation de STAT3<sup>216</sup> .

Aussi, les études ont montré le rôle de l'IL-6 dans l'entretien chronique de la prolifération des lymphocytes B est une cible thérapeutique potentielle.

Dans cette hypothèse, nous nous sommes intéressé à étudier cette voie de signalisation IL-6, dont le rôle d'activation des deux voies NF- $\kappa$ B et JAK / STAT3 a été bien établi dans les carcinomes.

Dans notre étude, il a été noté une différence significative de l'expression d'IL-6 entre les LBDGC EBV+ et EBV-  $p=0,002$ . Cependant, son expression différait. Elle a été notée essentiellement par les cellules lymphoïdes tumorales et le ME dans les LBDGC EBV+ et par seulement le ME des LBDGC EBV-.

L'analyse de corrélation bivariée par le test de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression d'IL-6 et STAT3 ( $r=0,368$ ,  $p<0.000$ ) et entre l'expression d'IL-6 et NF- $\kappa$ B P 50 ( $r=0,272$ ,  $p=0.009$ ).

Nous suggérons que l'IL-6 a rôle clé dans la lymphomagenèse des LBDGC EBV+ L'expression d'IL-6 par les cellules lymphoïdes tumorales et par les cellules du ME activerait les facteurs de transcription STAT3 et NF- $\kappa$ B P50.

L'expression notée dans le ME essentiellement des LBDGC EBV- pourrait être attribuée à l'induction de IL-17 cytokine clé des cellules Th17, a effet pro-tumoral. L'IL-17 induit l'expression de l'IL-6 par les cellules tumorales et dans le stroma qui à son tour active le facteur de transcription STAT3 régulant positivement les gènes de survie et de l'angiogénèse<sup>141</sup> .

A l'ère de l'immunothérapie, la compréhension des mécanismes d'échappement des cellules lymphoïdes tumorales au contrôle du système immunitaire parait de plus en plus cruciale.

Des progrès considérables ont été réalisés dans la caractérisation des cellules immunitaires au sein des cancers. La majorité des travaux ont été réalisés par technique IHC grâce au développement d'anticorps monoclonaux performants dirigés contre des sous-populations de plus en plus spécifiques au plan phénotypique comme au plan fonctionnel.

Ces travaux ont porté essentiellement sur les tumeurs solides, carcinomes ou mélanomes, mais peu dans les lymphomes.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à étudier la composition et le phénotype du ME des LBDGC EBV+.

L'étude de ce ME a pour objectif de fournir une meilleure compréhension du rôle de l'EBV dans la lymphomagenèse des LBDGC.

Et dans le but de caractériser ces TIL, nous avons étudié :

- L'expression des marqueurs Pan T : CD3 et CD5,
- Le profil cytotoxique,
- Le profil immunomodulateur (Treg),
- Et les inhibiteurs des points de contrôles immunitaires dont les publications sont de plus en plus nombreuses.

Les marqueurs Pan T : CD3 et CD5 ont été exprimés de façon quasi égale dans les deux groupes. Il n'existait pas de différence significative de leur expression par rapport au statut EBV. Cette constatation a été également notée dans des publications antérieures<sup>217</sup>.

Les TIL CD3+ et CD5+ étaient la population T prédominante n'ayant pas d'impact quelque soit le statut EBV.

Ainsi, nous n'avons pas constaté l'expression du CD5 par les cellules lymphomateuses dans les deux groupes dont l'expression doit être recherchée impérativement devant tout LBDGC selon les recommandations actuelles de la classification OMS<sup>2</sup>.

Concernant le profil cytotoxique, nous avons noté une différence significative entre les LBDGC EBV+ et LBDGC EBV- avec un p significatif des différents marqueurs de cytotoxicité CD8 p=0,0077, Granzyme B p<0,0001, Tia1 p<0,0001, Perforine p<0,0005.

Il n'a pas été constaté de différence significative pour les marqueurs des TIL reg CD4 (p=0.49), CD25 (p=0.26), FOXP3 (p=0.06) ainsi que la cytokine TGF-β (p=0.29) entre les deux groupes.

Le profil T reg a un rôle immunosuppresseur dans les lymphomes quelque soit le statut de l'EBV.

Quant aux immunecheckpoints, il a été observé une différence significative de l'expression de PD-L1 par les cellules lymphomateuses p<0,0001. Cette expression a été retrouvée dans 100% des LBDGC EBV+ et dans 24.4% des LBDGC EBV-.

Le PD-1 exprimé par les cellules lymphoïdes tumorales n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes p=0.261.

L'expression du récepteur PD-1 et de son ligand PD-L1 a été également observée au niveau des cellules microenvironnementales dans tous les cas avec des pourcentages variables.

Cependant, dans notre travail nous nous sommes focalisés essentiellement sur l'expression de PD-1 par les lymphocytes du ME et leur relation avec les TIL régulateurs. L'expression de ce dernier a montré une différence significative entre les deux groupes EBV+ et EBV- avec un p<0.0001.

Peu d'articles sur l'étude des caractéristiques des cellules non tumorales des LBDGC EBV+ ont été publiés à ce jour.

Cohen et al (2017) ont été les premiers à réaliser une étude dans ce sens, prenant en compte les critères de la dernière classification de l'OMS.<sup>164</sup>

Les publications antérieures ont été réalisées chez les sujets âgés, mais avant la nouvelle définition de cette entité dans la classification OMS 2016, certains auteurs ont comparé le phénotype du ME, entre les sujets jeunes et âgés<sup>15,194</sup>.

Dans les LBDGC EBV+ du sujet âgé, la sénescence du système immunitaire lors du processus de vieillissement jouerait un rôle majeur dans la lymphomagenèse. C'est un processus associé à l'immunité physiologique. Un vieillissement caractérisé par une série de changements dans la fonction de l'organisme du système immunitaire :

- La dérégulation de la réponse des lymphocytes T,
- l'atrophie thymique,
- une réduction de l'incidence de l'infection par l'apparition de nouvelles cellules T,
- le développement de cellules mémoire anergiques,
- la perte de l'immunosurveillance

Les déficiences dans la production de cytokines, ainsi que dans le répertoire des récepteurs des lymphocytes T sont des processus qui sont associés à la sénescence du système immunitaire. Ce qui explique l'incidence élevée de ce type de lymphome chez les sujets âgés<sup>10,218</sup>.

Chez les sujets jeunes, il a été démontré dans une publication portant sur 46 patients LBDGC EBV+, une dysrégulation des points de contrôle immunitaires, de l'axe PD-1 / PD-L1 réalisant un environnement immunitaire inhibiteur et tolérogène.<sup>15</sup>

Les lymphomes associés à l'EBV utilisent divers mécanismes pour supprimer les réponses des cellules T<sup>219</sup>. Néanmoins, de nombreuses publications, sur plusieurs types de lymphomes à l'exception du LHC, ne différencient pas la présence de l'EBV. Cette distinction est importante car, plusieurs différences telles que la composition du ME immunitaire de la tumeur pourraient exister.

Nous avons comparé nos résultats avec la seule étude publiée à l'heure actuelle sur les LBDGC EBV+, celle de Cohen et al<sup>164</sup>. Ces auteurs ont étudié l'association entre l'infection tumorale par l'EBV, les caractéristiques cliniques et l'expression d'un certain nombre de marqueurs cellulaires, de cytokines et de chimiokines dans le ME tumoral par des techniques moléculaires et immunohistochimiques, afin de mettre en lumière certains aspects de la relation entre l'infection, l'immunité de la tumeur et l'hôte<sup>164</sup>.

Leurs résultats sur le profil d'expression des gènes de cytokines et de chimiokines ont révélé qu'une des caractéristiques les plus notables dans les LBDGC EBV+ est la régulation positive de la cytokine immunosuppressive l'IL-10, notée à la fois par les cellules tumorales et le ME. Aucune différence statistiquement significative n'a été détectée en fonction du statut EBV.

Dans notre série, nous avons plutôt étudié la cytokine immunosuppressive TGF $\beta$ , principale cytokine exprimée par les Treg Th3.

TGF $\beta$  joue un rôle crucial dans l'établissement de leurs effets immunosuppresseurs dans le ME tumoral et a un rôle dans la régulation de la survie, la différenciation, la prolifération et l'apoptose des cellules.

Nos résultats sont comparables aux résultats de Cohen, puisque aucune différence significative n'a été notée entre les deux groupes EBV+ et EBV-. TGF $\beta$  a été également exprimé à la fois par les cellules lymphomateuses et le ME.

Les études réalisées sur le LHC EBV+ ont montré une augmentation similaire de l'expression des gènes de cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGF $\beta$ )<sup>220</sup>. Quant à l'expression des TIL reg CD4+, CD25+ et leur facteur de transcription FOXP3, nos constatations sont également concordantes, aucune différence significative n'a été notée quelque soit le statut de l'EBV.

Plusieurs études ont associé le nombre élevé de Treg dans les tumeurs des patients cancéreux avec la progression tumorale, la métastase et une diminution de la survie<sup>144</sup>. Dans le ME, les Treg peuvent être recrutées ou induites par différents mécanismes<sup>141</sup>.

En effet, les Treg peuvent être recrutées vers le site tumoral via la cytokine CCL-22, produite dans le ME. Mais les Treg peuvent être également induites à partir des cellules T naïves par le TGF- $\beta$ .

Cohen et al n'ont pas trouvé pour l'expression du transcrit de l'IL-10, ni CCL20 ni IFN $\gamma$ , ni analysé la moindre preuve d'association avec la présence d'EBV, contrairement à ce qui avait été décrit dans les études du LHC in vitro.

De plus, l'absence de différences dans la population de lymphocytes T, en particulier concernant Treg, analysée entre le ME des LBDGC EBV + et les LBDGC EBV- renforce les résultats sus-mentionnés.

Ainsi, leurs observations et les résultats de notre série suggèrent que le profil immunosuppresseur induit par les TIL reg n'est pas nécessairement modifié par la présence du virus. Sachant que la cohorte de patients dans la série de Cohen a été de 102 LBDGC avec une prévalence d'EBV à 12.6% (12 /102).

La fonction suppressive dans les lymphomes en général a été classée en quatre groupes:

- (a) Tregs suppresseurs,
- (b) Tregs malins,
- (c) Tregs tuant directement les tumeurs,
- (d) Tregs incompetents.

La classification en quatre groupes est significative dans la prédiction du pronostic et la conception d'immunothérapies à base de Tregs pour le traitement de ces lymphomes<sup>152</sup>. Dans les LBDGC, le profil Treg est celui de Treg killers ou la cytotoxicité anti-tumorale est renforcée.

Les résultats préliminaires pour l'expression de FOXP3 dans les LBDGC EBV- sont contradictoires, possiblement expliqués par le faible nombre de publications réalisées.

Dans un modèle de régression de Cox, en tenant compte des résultats cliniques par stades et âges, les nombres de FOXP3 + Treg ont été de signification pronostique indépendante pour la maladie dans les LBDGC-GC<sup>152</sup>.

En revanche, les Tregs sont de mauvais pronostic dans les LBDGC-non GC, ABC. La raison de ces divergences reste obscure, les auteurs ont suggéré que l'expression de FOXP3 + par les cellules Th1 activées pourrait fournir une explication<sup>152</sup>.

Une étude récente publiée en 2017 a montré que le nombre de FOXP3+ Tregs, était un marqueur de bon pronostic dans les LBDGC<sup>167</sup>.

Des recherches supplémentaires sont nécessaires sur l'utilité de Tregs comme facteurs pronostic et dans les stratégies thérapeutiques des LBDGC.

Inversement, comme on pouvait s'y attendre, un profil de ME à prédominance cytotoxique, caractérisé par un nombre élevé de lymphocytes T CD8 + et d'expression de Granzyme B, de perforine et de Tia1 a été observé dans notre série avec une différence statistiquement significative entre les EBV+ et les EBV-.

Nos résultats, similaires avec ceux de Cohen, n'ont été évalués que pour l'expression de CD8 et de Granzyme B<sup>164</sup>.

Perforine et Tia1 sont des marqueurs cytotoxiques à action cytolytique à la fois des LT cytotoxiques et des cellules NK activés.

Leur évaluation dans notre travail, a été motivée par une publication antérieure dans les LBDGC NOS associant ces deux protéines avec CD8 et CD56 dont les résultats ont montré dans une cohorte de 195 LBDGC NOS, que la présence d'un faible pourcentage de TIL Tia1 dans le ME des LBDGC était associée à un bon pronostic<sup>165</sup>.

Les LT cytotoxiques sont un composant essentiel du système immunitaire. Ces cellules sont responsables de la destruction des cellules tumorales, des cellules infectées par un virus et du contrôle des infections virales persistantes et réactivantes, soit par la sécrétion d'interféron- $\gamma$  et/ou la destruction de la cellule hôte par apoptose.

La mort d'une cellule est induite par l'excrétion de Perforine et de sérines protéases comme les granzymes qui sont contenus dans des granules intracellulaires et activent diverses voies de signalisation aboutissant à l'apoptose de la cellule cible.

Parmi ces granzymes, le Granzyme B est l'un des principaux inducteurs de l'apoptose ; il est exclusivement délivré dans le cytoplasme des cellules cibles par la perforine<sup>221</sup>.

Il est clair que le virus EBV est capable de moduler le ME échappant ainsi au contrôle du système immunitaire par une importante réponse cytotoxique<sup>222</sup>.

La présence d'infections persistantes, telles que le virus EBV ou d'autres antigènes persistants, induit également un phénomène appelé épuisement immunitaire, qui contribue à la perte de l'immuno-surveillance et il pourrait en résulter une prolifération incontrôlée de lymphocytes B infectés par l'EBV<sup>194</sup>.

Dans notre modèle d'analyse multivariée par régression Cox, le CD8 a été retenu comme variable indépendante avec un  $p=0.03$ .

Ce profil cytotoxique du ME semble faire partie des mécanismes de lymphomagenèse dans les LBDGC EBV+.

Ainsi, la cellule tumorale peut échapper à la lyse par une cellule cytotoxique T CD8+ selon différents mécanismes :

- comme la non-reconnaissance (via la diminution ou l'absence d'expression de molécules du CMH de classe I),
- mais aussi, par l'échappement via l'expression de certaines molécules — les immune-checkpoints —, dont l'attachement à leur récepteur sur les cellules immunitaires module et/ou inhibe la réponse immune.

L'interaction entre le récepteur PD-1 (exprimé par les lymphocytes T et B) et son ligand PD-L1 (exprimé par les cellules tumorales et par les cellules immunitaires et notamment par les CPA) induit une inhibition des lymphocytes T effecteurs et l'augmentation de l'activité des cellules T régulatrices jouant ainsi un rôle clé dans l'échappement tumoral à la réponse immunitaire. De ce fait, la stratégie d'utilisation d'anticorps ciblant ces différentes molécules du verrou immunologique comme les anti-PD-1 et anti-PD-L1 est parfaitement légitime dans les LBDGC<sup>77</sup>.

PD-L1 peut être exprimé par les cellules tumorales et par les cellules du ME comme les macrophages, tandis que PD-1 est habituellement restreint aux TIL<sup>156,166</sup>.

L'expression de PD-1 est décrite presque exclusivement dans les TIL du ME des LBDGC<sup>223,224</sup>. De rares observations ont cependant décrit dans un faible pourcentage de cas, l'expression de PD-1 à la surface des cellules lymphomateuses et la possible co-expression de PD-1 et de PD-L1 par les mêmes cellules tumorales<sup>224</sup>.

Dans notre série, l'expression de :

- ✓ PD-L1 a été notée dans 100% des cellules lymphoïdes tumorales EBV+ et 24.4% des cellules lymphoïdes tumorales EBV-.
- ✓ Le PD-1 a été exprimé par 15.4% des LBDGC EBV+ et 6.4% des LBDGC EBV-.

Cependant, la différence d'expression dans les TIL du ME a été significative entre les deux groupes avec un  $p<0.0001$ .

Kiyasu et al ont rapporté que le nombre de TIL PD-1+ était plus élevé dans les LBDGC du groupe GC, et inversement corrélé au nombre de cellules tumorales et/ou immunes PD-L1+, mais ces résultats sont controversés<sup>156</sup>.

La fréquence d'expression de PD-L1 dans les LBDGC est de l'ordre de 20% à 30%, mais dépend du seuil de positivité retenu (celui-ci allant de  $\geq 5\%$  à 30%) et du compartiment cellulaire analysé, tumoral ou environnemental.

Nos résultats sont concordants avec les données de la littérature avec un seuil de positivité à 30%.

Une méta-analyse publiée très récemment (2019), a indiqué que l'expression de PD-L1 par les cellules lymphomateuses est significativement associée à une survie globale inférieure chez les patients LBDGC NOS<sup>39</sup>.

Les analyses de sous-groupes ont démontré que l'expression de PD-L1 était un marqueur de mauvais pronostic dans les populations Asiatiques, en particulier chez les Chinois. Une des raisons de ces différences pourrait être la diversité génétique parmi les différentes ethnies. En outre, cette équipe a constaté que le rôle pronostique de PD-L1 dans LBDGC a démontré une importance accrue lorsque le cut off de 30% est utilisé<sup>39</sup>.

Malgré ces réserves quant au seuil et de ce fait la variabilité de fréquence d'expression de PD-L1 dans les LBDGC, les données de la littérature sont concordantes sur la fréquence plus élevée de cellules tumorales PD-L1+ dans les LBDGC de phénotype non GC<sup>156,224</sup> ainsi que l'association forte entre l'expression de PD-L1 et la présence d'EBV<sup>156</sup>.

Ce dernier résultat est en accord avec d'autres études visant à analyser le lien entre lymphoprolifération et EBV comme dans les LBDGC EBV+ (100% de cellules tumorales PD-L1+)<sup>20,23</sup>, dans les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (SLPT) EBV+ (60% de cellules tumorales PD-L1+), ou dans les lymphomes plasmablastiques EBV+ (20% de cellules tumorales PD-L1+)<sup>84,156</sup>. Toutefois, dans les SLPT et les lymphomes plasmablastiques, la positivité de PD-L1 a été également rapportée dans des tumeurs EBV-.

Ainsi nos résultats sur l'expression de PD-L1 dans 100% de nos cas est similaire aux données de la littérature.

Par ailleurs, l'infection par EBV induit une activation constitutive de la voie AP1 et de ses composants cJUN et JUN-B activant directement le promoteur de PD-L1 ou via l'activation de JAK3-STAT5<sup>77</sup>.

Le facteur de transcription STAT3 est connue pour induire l'uprégulation de l'expression de PD-L1<sup>155</sup>. Une récente publication (2018) par l'équipe de Kwon a mis en évidence l'implication clinico-pathologique de PD-L1 et l'expression du facteur de transcription phosphorylé pSTAT3<sup>154</sup>, influant sur une survie inférieure.

L'altération génique et l'expression protéique de PD-L1 et de pSTAT3 étaient étroitement liées dans LBDGC et plus notées dans le sous-type non-GCB. En plus de la signification clinique connue de pSTAT3, l'expression des cellules immunitaires de PD-L1 avait également une valeur clinique liée à pSTAT3. Ces résultats peuvent fournir également une nouvelle stratégie immunothérapeutique.

L'analyse de corrélation bivariée par le test de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression de PD-L1 et STAT3 ( $r=0,287$ ,  $p=0.006$ ) dans notre série,

sachant aussi que la majorité de nos lymphomes étaient de sous type non GC ABC, corroborant ainsi les résultats de Kwon<sup>154</sup>.

Quan et al (2015) ont démontré que le nombre de cellules T effectrices / mémoire et de cellules PD-1 positives infiltrant les LBDGC (EBV + et EBV-) sont plus élevés que leurs homologues dans le sang périphérique indiquant ainsi une inhibition ou une fuite immunitaire malgré la présence d'EBV. De plus, il a également été démontré que les cellules lymphoïdes EBV + augmentaient l'expression de PD-1 sur les cellules T, réduisaient leur prolifération et la sécrétion de plusieurs cytokines *in vitro*<sup>38</sup>.

PD-1 est exprimé par les TIL dans le ME dans plusieurs hémopathies malignes, notamment: le lymphome folliculaire et le lymphome de Hodgkin.<sup>223</sup>

Il a déjà été démontré que le nombre de PD-1 + TIL est corrélé à un mauvais pronostic dans les tumeurs solides<sup>225,226</sup> tandis que la présence d'un nombre élevé de PD-1 + TIL était facteur pronostique favorable chez les patients atteints de LBDGC NOS<sup>156</sup>.

Cohen et al, ont démontré que les TIL PD-1+ élevé fournissent un environnement tolérogène, qui peut inhiber la réponse immunitaire locale spécifique de la tumeur.

Cette expression a été associée à une survie inférieure. Ces auteurs ont suggéré que cet environnement immunosuppresseur dans un contexte d'une infection à EBV pourrait affecter la réponse immunitaire cytotoxique locale virale spécifique et probablement la survie du patient<sup>164</sup>.

Dans cette hypothèse, nous avons corrélé dans notre travail l'expression de PD-1 et de FOXP3. Le score de corrélation de Pearson a montré une corrélation significative entre l'expression de PD-1 et FOXP3 ( $r=0,56$ ,  $p<0.0001$ ) avec une régression linéaire. Nos résultats renforcent l'hypothèse émise par Cohen selon laquelle une réponse cytotoxique spécifique de l'EBV peut entraîner une inhibition de cette réponse immunitaire, par les cellules PD-1 +, entraînant ainsi une survie inférieure.

Par conséquent, la régulation de l'immunosuppression induite par l'EBV en inhibant le PD-1 et ses ligands pourrait non seulement améliorer les résultats de l'immunothérapie, mais également améliorer l'efficacité du traitement conventionnel du LBDGC NOS.

D'autres études *in vitro* et *in vivo* seront nécessaires pour évaluer les effets du ME tolérogène dans le contexte de la réponse cytotoxique spécifique de l'EBV dans les LBDGC et leur impact clinique.

Dans notre travail de thèse, l'analyse de l'immunophénotype du ME des LBDGC EBV+ en comparaison aux LBDGC EBV- a montré que le ME des LBDGC EBV+ a des caractéristiques spécifiques associées à un immunophénotype immunosuppresseur avec une augmentation des cellules T CD8 + et des cellules effectrices cytotoxiques : Granzyme B, Perforine et Tial.

Cependant, cette réponse spécifique co-existe avec un milieu tolérogène, par l'expression de PD-1, dans le ME des LBDGC EBV +.

Nous avons également estimé dans notre travail, les facteurs histo-pronostiques connus dans les LBDGC NOS.

On a noté une différence significative de l'expression de c-MYC et P53 par les cellules lymphomateuses entre les LBDGC EBV+ et EBV-  $p < 0,0001$ .

Leur expression a été constatée dans 100% des LBDGC EBV+.

Il n'a pas été constaté de différence significative pour l'expression de BCL2  $p = 0.26$  ainsi que la co-expression de c-MYC et BCL2 entre les deux groupes  $p = 0.66$ .

L'expression de l'index de prolifération Ki67 était élevée dans les deux groupes.

Une seule étude publiée en 2017 a été réalisée évaluant l'impact clinique de l'expression de ces 4 marqueurs dans les LBDGC NOS dans une cohorte de 97 LBDGC NOS<sup>227</sup>. Cependant cette étude a une limite d'être rétrospective. Celle-ci a démontré que l'expression de ces 4 marqueurs était corrélée à un mauvais pronostic et un taux de survie faible.

BCL2 est une protéine régulatrice de l'apoptose. Elle est exprimée de manière hétérogène dans les LBDGC NOS. Dans les LBDGC GC la t(14,18) translocation est impliquée, contrairement aux LBDGC non GC ABC où une amplification génique et une uprégulation de la transcription est responsable de son expression. Les LBDGC GC exprimant BCL2 présentent une faible réponse au traitement R-CHOP classique par rapport aux LBDGC non GC. Elle a été exprimée dans 30.8% des LBDGC EBV+ et 47.4% des LBDGC EBV-.

La protéine c-MYC est exprimée jusqu'à 30% des LBDGC NOS. L'expression de c-MYC ne semble pas être corrélée à un mauvais pronostic, mais plutôt la co-expression de c-MYC et BCL2 semblent indiquer une survie globale faible et sans maladie<sup>51</sup>. C'est pour cela qu'elle doit faire partie actuellement du panel d'anticorps dans les LBDGC NOS ; cette co-expression est recommandée par la classification OMS 2016<sup>2</sup>.

De plus, la co-expression c-MYC – BCL2 semble avoir une incidence plus élevée dans les LBDGC non GC ABC et apparaît comme facteur pronostic plus important que la COO<sup>51</sup>.

L'expression de c-MYC a été retrouvée dans 100% des LBDGC EBV+ et 38.5% des LBDGC EBV-. Nos résultats sont concordants avec les données de la littérature, et comme nous l'avions susmentionné, l'expression élevée de c-MYC est corrélée au statut EBV, et est incriminée dans le processus de lymphomagenèse de ce dernier.

La co-expression c-MYC-BCL2 a été retrouvée dans 23.1% des LBDGC EBV+ et 17.9% des LBDGC EBV-. Cette co-expression a été significative sur la survie globale des patients dans le travail de thèse de Mekhle<sup>f</sup><sup>174</sup>.

P53, en revanche, joue un rôle controversé en tant que marqueur pronostic, comme le montrent les résultats de plusieurs études. Cette discordance peut être expliquée par des seuils différents de positivité ou une taille réduite de l'échantillon<sup>24,75</sup>. Cependant, les

études récentes avec un seuil de positivité  $> 30\%$  était en corrélation avec un taux de survie globale faible et de survie sans maladie<sup>4,75</sup>. Son expression a été notée dans 100% des LBDGC EBV+ et 32.1% des LBDGC EBV-.

Cette forte expression dans les LBDGC EBV+ serait probablement due plus au taux de survie plus bas que celui notée dans les LBDGC EBV-. Cette hypothèse doit être aussi vérifiée par une étude pronostique. D'autant plus qu'une seule publication antérieure, celle de Song et al a démontré une expression élevée de ces marqueurs histopronostiques dans les LBDGC EBV+<sup>23</sup>.

L'index de prolifération Ki67, malgré de nombreuses tentatives de corrélation de son expression à d'autres marqueurs biologiques ou à certains résultats cliniques et thérapeutiques, n'a pas été concluante. C'est plus un marqueur utile pour le diagnostic en routine<sup>228</sup>

Dans l'analyse multivariée par régression cox, le modèle final a retenu trois variables indépendantes qui sont la réponse au traitement  $p=0.02$ , l'expression du CD30  $p=0.01$  et du CD8 avec un  $p=0.03$  qui sont liées au statut EBV, et semblent être discriminatives entre les deux groupes EBV+ et EBV-.

Ces résultats sont concordants avec les publications Asiatiques et Sud-Américaines.

# **VI CONCLUSION**

Le LBDGC EBV+ est un lymphome agressif peu commun associé à un pronostic plus défavorable à l'ère de la chimio-immunothérapie. Des études en cours ont montré que l'EBV a un impact sur l'environnement de personnes d'origines ethniques différentes. Les patients de l'Asie, d'Amérique latine et d'Europe de l'Est semblent avoir une survie relativement faible, alors que les patients Nord-Américains n'ont montré aucune différence de survie par rapport aux patients atteints de LBDGC EBV-.

Sa prévalence est encore sous-estimée car, il n'y a toujours pas d'étude de grande envergure dans ce sens et l'hybridation in situ EBER n'est pas réalisée systématiquement devant une morphologie d'un lymphome à grandes cellules.

L'absence de déficit immunitaire est un critère majeur pour porter ce diagnostic.

La prévalence de l'EBV dans les LBDGC est estimée à 8% dans notre série, rejoignant les séries Asiatiques. Celle-ci reste élevée par rapport aux pays Occidentaux et l'incidence des LBDGC est considérable avec un âge plus jeune dans notre pays d'après les différentes études Algériennes publiées ainsi que dans notre travail de thèse. Ceci suggère de rechercher d'autres facteurs étiologiques, liés à ce type de lymphome et surtout de réaliser des études multicentriques afin de confirmer ou de déterminer cette prévalence.

Le cut off à 20% largement publié peut être utilisé si l'expression des transcrits EBERs est notée dans les cellules lymphomateuses, et surtout ne pas confondre cette expression avec les cellules microenvironnantes qui peuvent exprimer l'EBV.

Les sujets âgés sont plus touchés par rapport aux sujets jeunes avec une légère prédominance féminine chez les sujets âgés et masculine chez les sujets jeunes.

La localisation est le plus souvent ganglionnaire.

Le LBDGC EBV+ NOS est une entité clinico-pathologique distincte. L'OMS reconnaît qu'il existe un polymorphisme histologique avec, un continuum allant d'une prolifération polymorphe à une prolifération diffuse de grandes cellules, avec souvent un aspect en ciel étoilé sur un fond réactif doté de nombreux petits lymphocytes ou histiocytes ; la nécrose est fréquente. Le sous type polymorphe LBDGC like avec présence d'un ciel étoilé et aspect nodulaire avec parfois de la nécrose ainsi que la présence de cellules Reed Sternberg et Hodgkin like a été le plus constaté dans notre série.

Cet aspect morphologique peut être problématique en routine. Cependant, la recherche de l'expression du CD15 dans tous les cas peut aider à éliminer un LHC.

Ces lymphomes sont essentiellement de phénotype non GC, ABC qui est lié à un mauvais pronostic et à un stade clinique avancé.

Le type de latence II est plus fréquent chez les sujets jeunes et III chez les sujets âgés.

Notre étude a montré que le LBDGC EBV+ est un sous-type génétiquement unique avec une activation accrue des voies canoniques NF- $\kappa$ B et JAK / STAT3, c-MYC et IL-6. Cette dernière voie n'a toujours pas été explorée ou publiée.

L'expression de NF- $\kappa$ B et de STAT3 phosphorylé et IL-6 est observée de manière plus importante en comparaison aux LBDGC EBV- ce qui suggère de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous avons également démontré que l'immunophénotype du ME réalisé dans le but de mieux comprendre les mécanismes de la lymphomagenèse des LBDGCB EBV+ et la connaissance du mécanisme de résistance aux traitements a des caractéristiques spécifiques associées à un immunophénotype immunosuppresseur avec une augmentation des cellules T CD8 + et des cellules effectrices cytotoxiques : Granzyme B, Perforine et Tia1.

Cependant, cette réponse spécifique coexiste avec un milieu tolérogène par, l'expression de PD-1 dans le ME des LBDGC EBV+ en plus de l'expression du PD-L1 dans 100% des cas.

Cette constatation ouvre la voie à l'utilisation des inhibiteurs des immune-checkpoints comme cible thérapeutique surtout à l'ère de l'immunothérapie.

La recherche de l'expression de CD30 paraît de plus en plus importante en routine. Cette expression dans les LBDGC EBV+ est liée à un taux de survie plus faible et à une mauvaise réponse au traitement suggérant une justification solide au traitement ciblé sur la voie d'activation de CD30 pour ces patients positifs à la fois au CD30 et à l'EBV. Les progrès dans la connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la lymphomagenèse du LBDGCB EBV+ a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques pour le traitement de ces lymphomes, suggérant de nouvelles possibilités d'améliorer le pronostic de ces patients.

Une connaissance précise des voies immunologiques ciblées par les nouvelles biothérapies est nécessaire pour que le clinicien puisse apprécier au mieux les indications de ces traitements.

Les 3 variables indépendantes (CD30, réponse au traitement et CD8) retenues par le modèle final, dans notre analyse multivariée par régression sont fortement discriminatives dans les deux groupes LBDGC EBV+ et EBV-.

Notre étude est en grande partie conforme aux conclusions antérieures et apporte de nouvelles considérations aux hématologues au cours de leur pratique. Cependant, ces résultats doivent être confortés dans une cohorte plus élevée avec un traitement homogène, le seuil de positivité de l'EBV par technique HIS et la définition des sous-types histologiques LBDGC EBV+ doivent être mieux considérés.

Ainsi, la fréquence élevée du LBDGC NOS dans notre pays et tous les facteurs étudiés dans notre série, dont la plupart sont considérés comme facteurs pronostiques dans les LBDGC NOS, nous poussent à réaliser une étude pronostique multicentrique, permettant ainsi d'ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques.

**Les points forts** de ce travail sont : première étude de prévalence de l'EBV dans les LBDGC en Algérie et au Maghreb, nombreux anticorps utilisés par technique automatique de pointe avec contrôles dont certains n'ont pas encore été publiés ou peu documentés. D'autres voies de lymphomagenèse ont été étudiées.

**Les limites** : étude unicentrique, durée moyenne de suivi des patients, faible cohorte de patients EBV- traités par R-CHOP étudiés et non disponibilité d'outils moléculaires.

# **VII RECOMMENDATIONS**

Au terme de ce travail de recherche et compte tenu des points forts identifiés et des limites essentiellement matérielles rencontrées, il nous semble opportun d'indiquer des pistes d'amélioration qui assureraient un approfondissement de la connaissance (*ou investigation*) du LBDGC NOS ainsi que l'identification de schémas thérapeutiques plus performants :

- Réaliser une étude multicentrique afin de mieux estimer la prévalence de l'EBV.
- Intégrer la recherche de transcrits EBERs par HIS en routine, ou au plus devant une architecture diffuse ou nodulaire, aspect en ciel étoilé, nécrose, cellules de Reed Sternberg like (Proposition d'un algorithme décisionnel (**Annexe 8, Figure 106**)). Le cut off de 20% peut être utilisé si les cellules lymphomateuses sont exprimées.
- Réaliser une étude pronostique sur les LBDGC NOS et intégrer tous les facteurs étudiés ainsi que le statut EBV comme facteur pronostic.
- Mettre en place un groupe d'étude des LBDGC en Algérie, intégrant cliniciens et pathologistes experts en hématopathologie.
- Améliorer le pronostic des patients atteints de LBDGC NOS par des campagnes de sensibilisation des médecins généralistes.
- Réaliser la sérologie EBV de façon systématique surtout chez les sujets jeunes
- Explorer toutes les voies de lymphomagenèse ainsi que les inhibiteurs des points de contrôle immunitaires dont les résultats sont prometteurs dans les nouvelles stratégies thérapeutiques dans ce type de lymphome.

# ANNEXES

## Annexe 1

**CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE FRANTZ-FANON BLIDA**

**SERVICE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE**

**Pr. W. OUAHIOUNE**

**Fiche d'Hématopathologie/ Données Cliniques**

Nom :.....	Prénom: .....	Sexe ; H, F.
Nom de jeune fille : .....	N° de dossier	
□□□□□□		
Age : .....	N° d'examen	
□□□□□□		
Hôpital/clinique :.....	Préleveur:	
.....		
Hématologiste : .....		
Date du prélèvement : □□□ / □□□ / □□□□□	Siège du ganglion :.....	
Heure de la biopsie ou de la biopsie exérèse .....	Heure de mise dans le formol .....	
RCP : <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui	Date : □□□ / □□□ / □□□□□	
Cytoponction <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui	Résultats.....Prélèvement pour cytogénétique <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui	
Biopsie antérieure <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui	Diagnostic.....Lieu 1 <sup>ère</sup> Lecture .....	
N° Anapath.....		
Traitement antérieur <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui	Préciser.....	
<b>Renseignements Cliniques :</b>		
Antécédents du patient : Notion de déficit immunitaire.....		
ADP périphériques, ADP profondes Taille.....	Siège ..... Syndrome tumoral	
Splénomégalie Hépatomégalie Etat général.....	Fièvre Sueurs Amaigrissement	
Echographie <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui	Résultats .....	
TDM : Thoracique <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui	Abdominale <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> oui	
Résultats.....		

**Examen ORL.....**

**PBO** non oui **Résultats** .....N°  
**Anapath.....**

**StadeClinique**

.....

**ScoreIPI**

.....

**Réponse**

**thérapeutique**

.....

**Cytométrie en flux**non oui **Résultats : Score de**  
**Matutes.....**

**Biologie: Hb ..... GB ..... % Lympho ..... Plaq ..... PhosphAlc .....Gamma G:**

**VS ..... LDH ..... Coombs direct ..... Sérologie : EBV**  
**.....HépatiteB.....**

**Hépatite C.....HIV.....**

## Annexe 2

**CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE FRANTZ-FANON BLIDA**

**SERVICE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE**

**Pr. W. OUAHIOUNE**

**Fiche d'Hématopathologie/ Données Anatomopathologiques**

**Nom :.....**

**Prénom: .....**

**Sexe ; H, F.**

**Nom de jeune fille : .....**

**N° de dossier**

□□□□□□

**Age : .....**

**N° d'examen**

□□□□□□

**Hôpital/clinique :.....**

**Préleveur:**

.....

**Hématologiste : .....**

**Date du prélèvement : □□ / □□ / □□□□** **Siège du ganglion :.....**

**Heure de la biopsie ou de la biopsie exérèse ..... Heure de mise dans le formol .....**

**RCP : non oui Date : □□ / □□ / □□□□**

**Cytoponction non oui Résultats.....Prélèvement pour cytogénétique non oui**

**Biopsie antérieure non oui Diagnostic.....Lieu 1<sup>ère</sup> Lecture .....**

**N° Anapath.....**

**Sous ..... type**

**histologique.....**

**Sous type moléculaire CGB ou ABC**

.....

**%**

**d'EBER.....**

.....

**Type de latence II ou**

**III.....**

**Type de voie NF-κB classique ou alternative**  
 .....  
**Positivité de**  
**STAT3.....**  
**Phénotype des cellules**  
**tumorales.....**  
**Phénotype du microenvironnement tumoral**  
 .....  
**% d'expression de PDL1 des cellules tumorales et du microenvironnement**  
**tumoral.....**  
**Expression de CD30 et**  
**CD15.....**  
**Facteurs**  
**histopronostiques.....**  
 .....  
**Conclusion**  
 .....

## Annexe 3 : Classification d'Ann Arbor modifiée

Stade	
<b>I</b>	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire ou d'une seule structure lymphoïde extra-ganglionnaire (IE)
<b>II</b>	Atteinte de 2 aires ganglionnaires ou plus du même côté du diaphragme, éventuellement associée à une seule atteinte extra-ganglionnaire de contiguïté (IIE)
<b>III</b>	Atteintes ganglionnaires de part et d'autre du diaphragme, éventuellement associée à une atteinte splénique (III S), atteinte d'un seul organe extra-ganglionnaire de contiguïté (IIIE)
<b>IV</b>	Atteintes extra-ganglionnaire distincte d'une localisation extra-ganglionnaire contiguë

### Signes généraux, absents (A)

#### Présence d'un ou plusieurs signes généraux

#### (B) :

- Fièvre supérieure 38°C pendant plus d'une semaine sans infection documentée
- Amaigrissement de plus de 10 % du poids du corps au cours des six derniers mois
- Sueurs nocturnes profuses obligeant le patient à se changer

#### X : Masse tumorale volumineuse :

- masse médiastinale de diamètre égal ou supérieur au tiers du diamètre transverse thoracique au niveau du disque intervertébral T5-T6 (rapport MT > 0.33 sur un cliché thoracique de face)
- ou masse ganglionnaire égale ou supérieure à 10 cm

#### E : Atteinte d'un seul viscère contigu ou situé à proximité d'un territoire ganglionnaire atteint

#### S : Si atteinte splénique

## Annexe 4 : Index Pronostic International

Index pronostique international (IPI): Facteurs défavorables	
• Age	≥ 60 ans
• Localisations extraganglionnaires	≥ 2
• Stade d'Ann Arbor	> 2
• LDH	> Normale
• Indice de performance selon l'ECOG	≥ 2
Index pronostique international adapté à l'âge (aaIPI): facteurs défavorables	
• Stade d'Ann Arbor	> 2
• LDH	> Normale
• Indice de performance selon l'ECOG	≥ 2

L'IPI permet de distinguer 4 groupes en fonction du nombre de facteurs présents :

Nombre de facteurs	Risque
0-1	<b>Faible</b>
2	<b>Intermédiaire faible</b>
3	<b>Intermédiaire haut</b>
4-5	<b>Haut</b>

**Indice de performance selon ECOG : L'état général du patient est évalué par un score de gravité croissante élaboré par l'ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), qui va conditionner l'intensité du traitement.**

Stade I	Une seule aire ganglionnaire atteinte
Stade IE	Atteinte d'un seul territoire extra-ganglionnaire
Stade II	≥ deux (02) aires ganglionnaires atteintes d'un même côté du diaphragme
Stade IIE	Préciser le nombre d'aires ganglionnaires atteintes par II(1) et II(2) Associé à une atteinte extra-ganglionnaire de contiguïté
Stade III	Atteinte ganglionnaire sus et sous diaphragmatique
Stade IIIS	Associé à une atteinte splénique
Stade IIIE	Associé à une atteinte extra-ganglionnaire localisée
Stade IIIES	Associé à une atteinte extra-ganglionnaire et splénique
Stade IV	Existence d'une atteinte viscérale : cutanée, digestive, foie, poumon, moelle osseuse, os avec ou sans atteinte ganglionnaire

*Tableau 57 : Classification d'Ann Arbor modifiée Classification d'Ann Arbor modifiée.*

A	Absence des signes cliniques d'évolutivité
B	Présence d'au moins un des signes cliniques d'évolutivité
a	Absence de syndrome inflammatoire
b	Présence d'un syndrome inflammatoire
X	Présence d'une masse bulky
E	Présence d'une atteinte viscérale de contiguïté
S	Si atteinte splénique

*Tableau 58: Echelle d'activité selon l'ECOG*

ECOG 0	Absence de symptômes
ECOG 1	Sujet symptomatique, mais pouvant poursuivre une activité ambulatoire normale
ECOG 2	Sujet alité moins de 50% de la journée
ECOG 3	Sujet alité plus de 50% de la journée
ECOG 4	Sujet alité en permanence, nécessitant une aide pour les gestes quotidiens

L'IPI permet de distinguer quatre (04) groupes pronostiques en fonction du nombre de facteurs présents.

*Tableau 59: IPI standard*

Variable	Facteur défavorable	Score IPI	Pronostic
Age	> 60 ans	0-1	Faible
Taux de LDH	Elevé	2	Intermédiaire faible
ECOG	2 ou plus	3	Intermédiaire haut
Ann Arbor	III ou IV	4-5	Haut
Nombre d'organes atteints	2 ou plus	Un (01) point par facteur défavorable	

## Annexe 5 : Préparation des prélèvements *tissulaires*

*Tableau 60 : Protocole de déshydratation et inclusion en paraffine des tissus Automate ST404*

	Solution	Durée d'immersion	Température (T°)
<b>Rinçage</b>	PBS	/	T° ambiante
	PBS	/	T° ambiante
<b>Déshydratation</b>	Ethanol 80%(v/v)	30 min	T° ambiante
	Ethanol 95 %(v/v)	60 min	T° ambiante
	Ethanol 95%(v/v)	60 min	T° ambiante
	Ethanol 100%(v/v)	60 min	T° ambiante
	Ethanol 100%(v/v)	60 min	T° ambiante
	Ethanol 100%(v/v)	30 min	T° ambiante
	Xylène (sous agitation)	30 min	T° ambiante
	Xylène (sous agitation)	60 min	T° ambiante
<b>Eclaircissement</b>	½ Paraffine- ½Xylène	60 min	60°C
	Paraffine liquide	24 heures	60°C

*Tableau 61 : Protocole de coloration à l'Hématoxyline-Eosine des coupes histologiques*

	<b>Solution</b>	<b>Durée d'immersion</b>
	Xylène	2 min
<b>Déparaffinage</b>	Xylène	2 min
	Xylène	2 min
	Ethanol absolu	2 min
	Ethanol absolu	2 min
<b>Réhydratation</b>	Ethanol absolu	2 min
	Eau distillée	2 min
	Hématoxyline de Harris	2 min
	Eau	2 min
	Acide chlorydrique 0,001% (v/v)	2 min
<b>Coloration</b>	Ammoniaque 0,001%(v/v)	2 min
	Eosine	2 min
	Ethanol absolu	2 min
	Ethanol absolu	2 min
	Ethanol absolu	2 min
<b>Déshydratation</b>	Xylène	2 min
	Xylène	2 min
	Xylène	2 min
<b>Montage lame et lamelle</b>		

## Annexe 6 : Anticorps utilisés pour l'étude et technique d'HIS

*Tableau 62 : Principaux anticorps utilisés dans les LBDGC NOS*

AC	Clone	Dilution	Technique /Démassage	Durée d'incubation	Révélation	Expression
CD20	L26	RTU	Benchmark/CC1 Standard (64 minutes)	32 min	Ultraview Polymère/HRP 2 étapes	Membranaire
CD79a	JCB11	RTU	Benchmark /CC1 Standard (64 minutes)	32 min	Ultraview polymère HRP 2 étapes	Cytoplasmique
PAX5	Dak-Pax5 EP156	RTU	Manuelle/ Autocuisseur 40 min	40 min	Envision polymère HRP / 2 étapes	Nucléaire
BOB-1	SP92	RTU	Manuelle/ Autocuisseur 40 min	40 min	Envision polymère HRP / 2 étapes	Nucléaire
OCT-2	MRQ-2	RTU	Manuelle/ Autocuisseur 40 min	40 min	Envision polymère HRP / 2 étapes	Nucléaire
CD10	56C6	RTU	Bond III/ 20 min	30 min	Polymère Bond refine HRP / 3 étapes	Membranaire
BCL6	G/A18	RTU	Benchmark /CC1 Standard (64 minutes)	32 min	Optiview Ventana/ 3étapes	Nucléaire
MUM1	MRQ-48	RTU	Manuelle/ Autocuisseur 40 min	40 min	Envision polymère HRP / 2 étapes	Nucléaire

### Hybridation in situ chromogénique (CISH)

Le kit de détection contient un anticorps primaire et un anticorps secondaire conjugué à de la biotine, tous deux conjugués à de la phosphatase alcaline (AP) utilisée comme enzyme chromogène. Au cours du processus de coloration bleue par ISH, la sonde marquée à la fluorescéine s'hybride à des séquences d'ARN cible spécifiques dans les cellules ou les tissus. Cette étape est suivie de l'addition d'un conjugué enzymatique streptavidine-phosphatase alcaline qui se lie à la biotine présente sur l'anticorps secondaire. La sonde marquée à la fluorescéine est alors visualisée à l'aide de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) et de chromogène nitro-bleu de tétrazolium (NBT), qui produit un précipité bleu rapidement détecté par microscopie optique

Tableau 63 : Protocole de technique d'hybridation in situ EBER sur automate Ventana Benchmarck Ultra

Déparaffinage	72°
CC2 T° 82° 4 Min	Moyen
ISH Protéase 3	4 min
Sonde INFORM EBER Probe	10 min
Révélation	U INFORM iVIEW Blue ISH
Contre coloration	Red Counterstain II 4 min

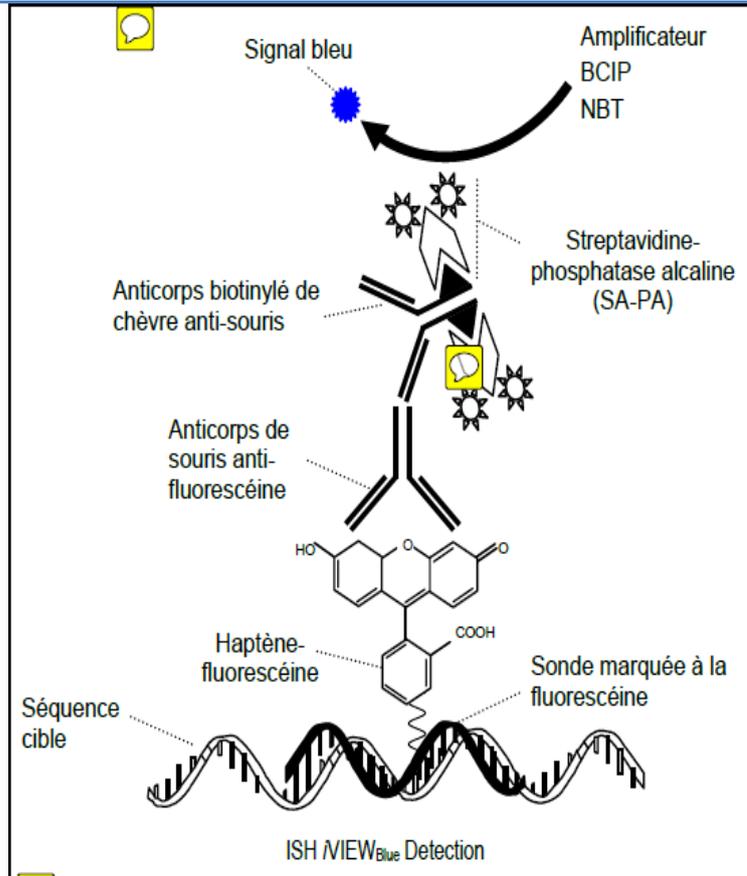


Figure 104: Principe de l'hybridation in situ CISH

*Tableau 64 : Marqueurs du profil de latence*

<b>AC</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution</b>	<b>Technique /Démassage</b>	<b>Durée d'incubation</b>	<b>Révélation</b>	<b>Expression</b>
<b>LMP1</b>	CS.14	RTU	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	16 min	Ultraview HRP 2 étapes	Cytoplasmique
<b>EBNA2</b>	Polyclonal	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Optiview + amplification, 3 étapes	Nucléaire

*Tableau 65 : Principaux marqueurs des voies de la lymphomagenèse*

<b>AC</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution</b>	<b>Technique /Démassage</b>	<b>Durée d'incubation</b>	<b>Révélation</b>	<b>Expression</b>
<b>NF-κB P65</b>	Polyclonal	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 léger 20 min	12 min	Optiview amplification 3 étapes	Nucléaire
<b>NF-κB P50</b>	Polyclonal	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 étendu 94 min	40 min	Optiview + amplification 3 étapes	Nucléaire
<b>STAT3 thyr 705</b>	B-7	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Optiview + amplification 3 étapes	Nucléaire
<b>CD40</b>	E3701	RTU	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Ultraview HRP/2 étapes	Membranaire
<b>IL-6</b>	10C12	1/100	Manuelle Autocuisseuse PH 6 Déclère	24 heures	HiDEF HRP cell marque /2 étapes	Membranaire

*Tableau 66 : Principaux marqueurs du phénotype du microenvironnement tumoral*

<b>AC</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution</b>	<b>Technique /Démassage</b>	<b>Durée d'incubation</b>	<b>Révélation</b>	<b>Expression</b>
<b>CD3</b>	Polyclonal	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 léger 20 min	12 min	Optiview + amplification 3 étapes	Nucléaire
<b>CD5</b>	Polyclonal	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 étendu 94 min	40 min	Optiview + amplification 3 étapes	Nucléaire
<b>CD4</b>	B-7	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Optiview + amplification 3 étapes	Nucléaire
<b>CD8</b>	E3701	RTU	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Ultraview HRP/ 2 étapes	Membranaire
<b>Granzyne B</b>	Polyclonal	RTU	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Ultraview HRP/ 2 étapes	Granulations cytoplasmiques
<b>Tia1</b>	2G9A105	1/100	Manuelle/ Autocuiseur 30 min	40 min	Hidef HRP cell marque / étapes	Granulations cytoplasmiques
<b>Perforine</b>	MRQ-23	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Ultraview HRP/ 2 étapes	Granulations cytoplasmiques
<b>CD25</b>	4C9	RTU	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	40 min	Ultraview HRP/ 2 étapes	Nucléaire
<b>FOX P3</b>	236A/E7	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 étendu 90 min	40 min	Ultraview HRP/ 2 étapes	Nucléaire
<b>TGF-β</b>	TB21	1/100	Bond III/20 min PH6	40min	Bond Refine HRP/3 étapes	Cytoplasmique
<b>PD-L1</b>	CAL10	1/100	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Optiview + amplification 3 étapes	Membranaire
<b>PD-1</b>	NAT105	RTU	Benchmark Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Ultraview HRP/ 2 étapes	Membranaire

*Tableau 67 : Marqueurs histopronostiques*

<b>AC</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution</b>	<b>Technique /Démassage</b>	<b>Durée d'incubation</b>	<b>Révélation</b>	<b>Expression</b>
<b>BCL2</b>	124	RTU	Benchmarck Ultra Ventana/ CC1 léger 20 min	32 min	Ultraview HRP/ 2 étapes	Nucléaire
<b>c-MYC</b>	Y -69	RTU	Benchmarck Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	40 min	Optiview + amplification 3 étapes	Nucléaire
<b>P53</b>	Do-7	RTU	Bond III/40 min PH6	20 min	Polymère refine Bond HRP /3 étapes	Nucléaire
<b>Ki-67</b>	SP6	RTU	Benchmarck Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	32 min	Ultraview HRP/ 2 étapes	Nucléaire

*Tableau 68 : CD15 et CD30*

<b>AC</b>	<b>Clone</b>	<b>Dilution</b>	<b>Technique /Démassage</b>	<b>Durée d'incubation</b>	<b>Révélation</b>	<b>Expression</b>
<b>CD15</b>	MMA	RTU	Bond III/40 min PH9	20 min	Polymère refine Bond HRP /3 étapes	Cytoplasmique
<b>CD30</b>	Ber-H2	RTU	Benchmarck Ultra Ventana/ CC1 standard 64 min	16 min	Optiview + amplification 3 étapes	Nucléaire

## Hybridation in situ en fluorescence (FISH)

Nous avons utilisé 4 sondes pour l'hybridation in situ en fluorescence : (BCL2, BCL6, MYC et IgH).

*Tableau 69: Protocole de technique d'hybridation in situ FISH*

<b>Prétraitement</b>	Préchauffage du citrate de sodium 0.01M (PH=6) à 96C°-98C° pour rompre les liaisons covalentes, et incubation des lames pendant 15 minutes suivies de 2 lavages à 3mn à température ambiante.
<b>Digestion protéolytique</b>	Pepsine à HCL 0.01M concentration finale de 0.025% à 37C°, durée d'incubation 30 min, suivi d'un lavage au Wash buffer
<b>Déshydratation</b>	Ethanol à 70%, 85% et 100% pendant 1min
<b>Préparation des sondes</b>	Dépôt manuel de 10 µl par lame. Sceller au Fixogum autour de la lamelle.
<b>Co-dénaturation et hybridation</b>	Noyaux cibles et sondes sont dénaturés ensemble 5 minutes à 80°C dans notre Thermobrite, puis incubés toute la nuit à 37C° dans le Thermobrite
<b>Lavages stringents</b>	Wash Buffer à 72C° Pendant 2 min 200 ml dans le tampon de lavage Wash Buffer □, incubation pendant 2 min à température ambiante sans agiter
<b>Déshydratation</b>	Bains d'éthanol croissants pendant une minute puis séchage rapide à l'air
<b>Contre coloration</b>	Application de 16 µl de contre-colorant DAPI puis déposer la lamelle en verre. Le DAPI peut être dilué dans un diluant contre-colorant pour obtenir la concentration souhaitée. (1ml de d'éluent DAP + 0.5ml de DAPI)

## FISH : Principe

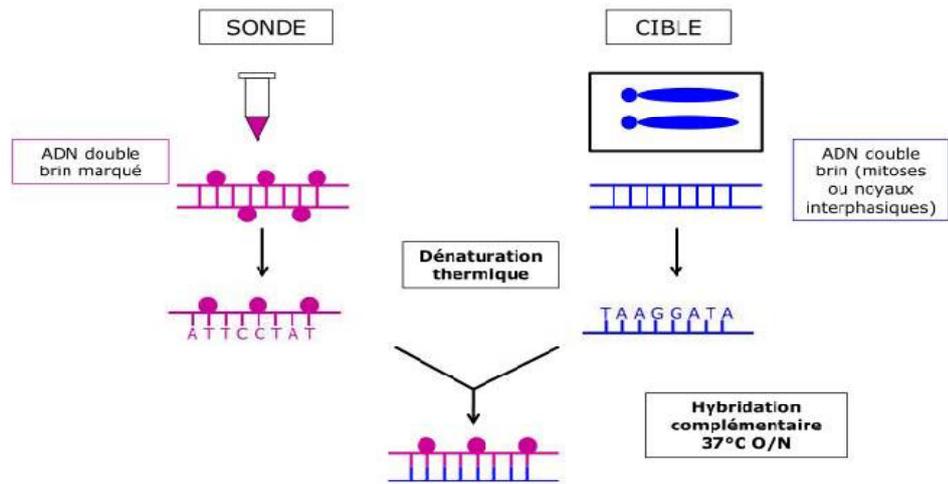


Figure 105: Principe de l'hybridation in situ FISH

Tableau 70: Tissus de contrôles négatifs et positifs

Anticorps	Témoin positif	Témoin négatif
CD20	Amygdale	Plasmocytome
CD79a	Amygdale	Epithélium amygdale
PAX5	Amygdale	Epithélium amygdale
BOB-1	Amygdale	Epithélium amygdale
OCT-2	Amygdale	Epithélium amygdale
CD10	Rein	Epithélium amygdale
BCL6	Amygdale	LBDGC BCL6-
MUM11	Amygdale	ADK
LMP1	L Hodgkin	Amygdale
EBNA2	SLP EBV+	Amygdale
NF-κB P65	ADK prostate	Poumon
NF-κB P50	ADK prostate	Poumon
STAT3 thyr 705	Amygdale	Epithélium amygdale
CD40	Amygdale	Epithélium amygdale
IL-6	Amygdale	Epithélium amygdale
CD3	Amygdale	Cellules B de l'amygdale-
CD5	LLC/B	Centre germinatif de l'amygdale
CD4	Amygdale	Lymphome de Hodgkin
CD8	Amygdale	CG
Granzyme B	Amygdale	CG
Tia1	Amygdale	CG
Perforine	Amygdale	CG
CD25	Amygdale	CG
FOXP3	Amygdale	CG
TGF-β	Amygdale	Epithélium amygdale
PD-L1	Amygdale	Appendice epithélium
PD1	Amygdale	Epithélium amygdale
BCL2	Amygdale	CG
c-MYC	Prostate	CG
P53	Amygdale	CG
Ki-67	Amygdale	CG
CD15	Lymphome de Hodgkin	Amygdale
CD30	Lymphome de Hodgkin	Amygdale
EBER	Carcinome indifférencié du nasopharynx	Amygdale

## Annexe 7 : Protocole d'IHC technique manuelle

### Préparation des coupes tissulaires :

Des coupes de 5 µm des blocs de paraffine sont faites l'aide d'un microtome sous forme de rubans qui seront déposés dans un bain marie puis étalés et séchés sur une lame.

### Déparaffinage:

Les lames sont mises à l'étuve à 37°C pendant 24 heures ou à 56°C pendant une heure puis dans des bains d'alcool comme suit :

- 2 bains de Xylène pendant 10 minutes

- 5 bains d'alcool de concentrations décroissantes : 100%(10min), puis 90%(5min), 70% et 50% (1min) pour la réhydratation des tissus

### Restauration antigénique :

On ajoute une solution d'EDTA à pH = 9 ou du citrate à pH= 6 selon l'anticorps utilisé afin de rompre les liaisons chimiques créés par le formol lors de la fixation.

Nous avons utilisé une restauration antigénique à la chaleur à 95 °C pendant 30 minutes pour certains Anticorps et ceci en technique manuelle.

On effectue deux lavages dans un tampon pendant 5 minutes. On laisse les lames refroidir à température ambiante pendant 20 minutes puis on les rince à l'eau distillée pendant 5 minutes.

### Blocage des peroxydases endogènes :

On procède par l'élimination du tampon de lavage en excès en tapotant et essuyant soigneusement le contour de l'échantillon pour éliminer tous le liquide restant et maintenir le réactif à l'intérieur de la zone spécifiée par utilisation d'un crayon hydrophobe.

Ensuite une solution de peroxydase blocking est ajoutée au tissu pendant 5 minutes.

Puis rinçage des lames 2 fois par la solution de lavage pendant 5min.

### Incubation de l'anticorps primaire :

✓ On élimine le tampon de lavage en excès en tapotant les lames.

✓ On ajoute 100 µl de la solution d'anticorps primaire pour recouvrir l'échantillon et on laisse incuber à la température correspondante à l'AC.

✓ L'incubation varie selon l'anticorps utilisé.

✓ Les lames sont lavées 2 fois pendant 5 minutes par la solution de lavage.

Application du complexe polymère couplé à la peroxydase :

✓ On ajoute le polymère couplé à la peroxydase et on laisse incuber pendant 30 minutes puis on procède au lavage 2 fois pendant 5 minutes.

✓ On applique par la suite 100 µl de la solution de DAB qui réagit avec la peroxydase (HRP) et transforme le DAB en un produit coloré qui ce dernier donne une couleur brune.

✓ On laisse incuber pendant 5 minutes puis on rince à l'eau distillé 3 fois pendant 5 minutes. La contre-coloration :

✓ On ajoute à nos lames de l'hématoxyline de Mayer: 3minutes.

✓ On rince à l'eau de robinet pendant 3 minutes et à l'eau distillé pendant 5 minutes.

✓ La déshydratation des tissus est réalisée par la suite dans 4 bains d'alcool pendant 5 minutes chacun dans un ordre croissant de concentration (70%, 90 % et 2 bains100%) et dans 3 bains de xylène pendant 3 minutes.

### Montage :

On colle des lamelles par-dessus grâce à la résine synthétique afin de préserver les préparations tissulaires.

## **Annexe 8 : Algorithme décisionnel devant tout LBDGC de novo chez les sujets immunocompétents**

Architecture diffuse ou nodulaire, aspect en ciel étoilé, nécrose, cellules de Reed Sternberg like



CD20, CD79a, CD3, CD5, CD30 et CD15, BCL6, CD10 et MUM1



Hybridation in situ EBERs avec cut off de 20%, si positive

Faire LMP1 et EBNA2 pour le profil de latence

Faire systématiquement BCL2, P53 et c-MYC

*Figure 106 : Arbre décisionnel dans les LBDGC NOS*

## Références bibliographiques

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet*. 1964;1(7335):702-703.
2. SH S, E C, NL H, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-Tumours/Who-Classification-Of-Tumours-Of-Haematopoietic-And-Lymphoid-Tissues-2017>. Accessed October 23, 2018.
3. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- $\kappa$ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717-721. doi:10.1038/nature07968
4. Hans CP. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004;103(1):275-282. doi:10.1182/blood-2003-05-1545
5. Ichiki A, Carreras J, Miyaoka M, et al. Clinicopathological Analysis of 320 Cases of Diffuse Large B-cell Lymphoma Using the Hans Classifier. *J Clin Exp Hematol*. 2017;57(2):54-63. doi:10.3960/jslrt.17029
6. Dybkær K, Bøgsted M, Falgreen S, et al. Diffuse large B-cell lymphoma classification system that associates normal B-cell subset phenotypes with prognosis. *J Clin Oncol*. 2015;33(12):1379-1388. doi:10.1200/JCO.2014.57.7080
7. Xie Y, Pittaluga S, Jaffe ES. The Histological Classification of Diffuse Large B-cell Lymphomas. *Semin Hematol*. 2015;52(2):57-66. doi:10.1053/j.seminhematol.2015.01.006
8. Li S, Young KH, Medeiros LJ. Diffuse large B-cell lymphoma. *Pathology*. 2018;50(1):74-87.
9. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization (WHO) classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016:100-2016.
10. Oyama T, Ichimura K, Suzuki R, et al. Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *The American journal of surgical pathology*. 2003;27(1):16-26.
11. Stein H, Warnke RA, Chan WC. Diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*.:233-237.
12. Uccini S, Al-Jadiry MF, Scarpino S, et al. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in children: a disease reminiscent of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Human Pathology*. 2015;46(5):716-724. doi:10.1016/j.humpath.2015.01.011

13. Beltran BE, Castillo JJ, Morales D, et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a case series from Peru. *American journal of hematology*. 2011;86(8):663–667.
14. Hong JY, Yoon DH, Suh C, et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma in young adults: is this a distinct disease entity? *Ann Oncol*. 2015;26(3):548-555. doi:10.1093/annonc/mdu556
15. Nicolae A, Pittaluga S, Abdullah S, et al. EBV positive large B cell lymphomas in young patients: a nodal lymphoma with evidence for a tolerogenic immune environment. *Blood*. 2015:blood–2015.
16. Beltran BE, Quiñones P, Morales D, et al. Response and survival benefit with chemoimmunotherapy in Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Hematological Oncology*. 2018;36(1):93-97. doi:10.1002/hon.2449
17. Ok CY, Li L, Xu-Monette ZY, et al. Prevalence and clinical implications of Epstein–Barr virus infection in de novo diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(9):2338–2349.
18. Beltran BE, Morales D, Quiñones P, Medeiros LJ, Miranda RN, Castillo JJ. EBV-positive diffuse large b-cell lymphoma in young immunocompetent individuals. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2011;11(6):512–516.
19. Hofscheier A, Ponciano A, Bonzheim I, et al. Geographic variation in the prevalence of Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a comparative analysis of a Mexican and a German population. *Modern Pathology*. 2011;24(8):1046.
20. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Young KH, Chavez JC, Sotomayor EM. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified: 2018 update on diagnosis, risk-stratification and management. *American Journal of Hematology*. 2018;93(7):953-962. doi:10.1002/ajh.25112
21. Montes-Moreno S, Odqvist L, Diaz-Perez JA, et al. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly is an aggressive post-germinal center B-cell neoplasm characterized by prominent nuclear factor-kB activation. *Modern Pathology*. 2012;25(7):968.
22. Hao X, Wei X, Huang F, et al. The Expression of CD30 Based on Immunohistochemistry Predicts Inferior Outcome in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Batra SK, ed. *PLOS ONE*. 2015;10(5):e0126615. doi:10.1371/journal.pone.0126615
23. Song W, Liu MG, Zhang JB, Zhang JJ, Sun MM, Yu QK. Mechanism of action of EBV, Bcl-2, p53, c-Myc and Rb in non-Hodgkin’s lymphoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(6):1093–7.
24. Xie Y, Bulbul MA, Ji L, et al. p53 expression is a strong marker of inferior survival in de novo diffuse large B-cell lymphoma and may have enhanced negative effect with MYC coexpression: a single institutional clinicopathologic study. *American journal of clinical pathology*. 2014;141(4):593–604.

25. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*. 2007;120(4):435–446.
26. Ishikawa C, Senba M, Mori N. Induction of I $\kappa$ B- $\zeta$  by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and CD30. *International journal of oncology*. 2015;47(6):2197–2207.
27. Ishikawa E, Tanaka T, Shimada K, et al. A prognostic model, including the EBV status of tumor cells, for primary gastric diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Cancer Med*. 2018;7(7):3510-3520. doi:10.1002/cam4.1595
28. Auclair H. Etude des homologies phénotypiques et fonctionnelles des lymphocytes B en latence III de l'EBV avec les cellules B régulatrices, implication de l'axe PD-1/PD-L1. :293.
29. Montes Moreno S, Odqvist L, Diaz Perez J, et al. EBV POSITIVE DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA OF THE ELDERLY IS AN AGGRESSIVE B CELL NEOPLASM WITH A POST GERMINAL CENTER B CELL PHENOTYPE AND CHARACTERIZED BY NFKB PATHWAY ACTIVATION. EVALUATION OF A WESTERN SERIES OF 47 CASES. *ANNALS OF ONCOLOGY*. 2011;22:117–117.
30. Battle-Lopez A, Gonzalez de Villambrosia S, Nuñez J, et al. Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: diagnosis, difficulties and therapeutic options. *Expert review of anticancer therapy*. 2016;16(4):411–421.
31. Gibson SE, Hsi ED. Epstein-Barr virus–positive B-cell lymphoma of the elderly at a United States tertiary medical center: an uncommon aggressive lymphoma with a nongerminal center B-cell phenotype. *Human pathology*. 2009;40(5):653–661.
32. Shkoda A, Town JA, Griese J, et al. The Germinal Center Kinase TNK1 Is Required for Canonical NF- $\kappa$ B and JNK Signaling in B-Cells by the EBV Oncoprotein LMP1 and the CD40 Receptor. *PLOS Biology*. 2012;10(8):e1001376. doi:10.1371/journal.pbio.1001376
33. Hojer C, Frankenberger S, Strobl LJ, et al. B-cell Expansion and Lymphomagenesis Induced by Chronic CD40 Signaling Is Strictly Dependent on CD19. *Cancer Research*. 2014;74(16):4318-4328. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3274
34. Kusumoto S, Kobayashi Y, Sekiguchi N, et al. Diffuse large B-cell lymphoma with extra Bcl-2 gene signals detected by FISH analysis is associated with a “non-germinal center phenotype.” *Am J Surg Pathol*. 2005;29(8):1067-1073.
35. Xing W, Dresser K, Zhang R, et al. PD-L1 expression in EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic features and prognostic implications. *Oncotarget*. 2016;7(37):59976-59986. doi:10.18632/oncotarget.11045
36. Xu-Monette ZY, Zhou J, Young KH. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. *Blood*. 2017:127–2017.

37. Kwon MJ, Kim K-C, Nam ES, et al. Programmed death ligand-1 and MET co-expression is a poor prognostic factor in gastric cancers after resection. *Oncotarget*. 2017;8(47):82399.
38. Quan L, Chen X, Liu A, et al. PD-1 blockade can restore functions of T-cells in Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma in vitro. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136476.
39. Qiu L, Zheng H, Zhao X. The prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a meta-analysis. *BMC Cancer*. 2019;19. doi:10.1186/s12885-019-5466-y
40. Ahn J-S, Yang D-H, Duk Choi Y, et al. Clinical outcome of elderly patients with Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma treated with a combination of rituximab and CHOP chemotherapy. *American journal of hematology*. 2013;88(9):774–779.
41. Sato A, Nakamura N, Kojima M, et al. Clinical outcome of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in the rituximab era. *Cancer science*. 2014;105(9):1170–1175.
42. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, et al. Relative frequency of non-Hodgkin lymphoma subtypes in selected centres in North Africa, the middle east and India: a review of 971 cases. *British Journal of Haematology*. 2016;172(5):699-708. doi:10.1111/bjh.13876
43. Yao Z, Deng L, Xu-Monette ZY, et al. Concordant bone marrow involvement of diffuse large B-cell lymphoma represents a distinct clinical and biological entity in the era of immunotherapy. *Leukemia*. 2018;32(2):353-363. doi:10.1038/leu.2017.222
44. Korkolopoulou P, Vassilakopoulos T, Milionis V, Ioannou M. Recent advances in aggressive large B-cell lymphomas: a comprehensive review. *Advances in anatomic pathology*. 2016;23(4):202–243.
45. Brudno J, Tadmor T, Pittaluga S, Nicolae A, Polliack A, Dunleavy K. Discordant bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2016;127(8):965-970. doi:10.1182/blood-2015-06-651968
46. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, et al. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998;92(9):3152-3162.
47. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013;121(14):2715-2724. doi:10.1182/blood-2012-10-461848
48. Xu J, Oki Y, Saksena A, et al. CD30 expression and prognostic significance in R-EPOCH-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hum Pathol*. 2017;60:160-166. doi:10.1016/j.humphath.2016.10.009

49. Wang XJ, Seegmiller AC, Reddy NM, Li S. CD30 expression and its correlation with MYC rearrangement in de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2016;97(1):39-47. doi:10.1111/ejh.12680
50. Georgiou K, Chen L, Berglund M, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2016;127(24):3026-3034. doi:10.1182/blood-2015-12-686550
51. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, 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.* 2012;30(28):3452-3459. doi:10.1200/JCO.2011.41.0985
52. Yamaguchi M, Seto M, Okamoto M, et al. De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: a clinicopathologic study of 109 patients. *Blood.* 2002;99(3):815-821.
53. Xu-Monette ZY, Tu M, Jabbar KJ, et al. Clinical and biological significance of de novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma in Western countries. *Oncotarget.* 2015;6(8):5615-5633. doi:10.18632/oncotarget.3479
54. Yoon DH, Choi DR, Ahn HJ, et al. Ki-67 expression as a prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab plus CHOP. *Eur J Haematol.* 2010;85(2):149-157. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01467.x
55. Tang Y-L, Zhou Y, Cheng L-L, Su Y-Z, Wang C-B. BCL2/Ki-67 index predict survival in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Oncol Lett.* 2017;14(3):3767-3773. doi:10.3892/ol.2017.6577
56. 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):503-511. doi:10.1038/35000501
57. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002;346(25):1937-1947. doi:10.1056/NEJMoa012914
58. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, et al. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood.* 2005;105(5):1851-1861. doi:10.1182/blood-2004-07-2947
59. Schmidt-Hansen M, Berendse S, Marafioti T, McNamara C. Does cell-of-origin or MYC, BCL2 or BCL6 translocation status provide prognostic information beyond the International Prognostic Index score in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab and chemotherapy? A systematic review. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(10):2403-2418. doi:10.1080/10428194.2017.1287364
60. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5494-5502. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0113

61. Visco C, Li Y, Xu-Monette ZY, et al. Comprehensive gene expression profiling and immunohistochemical studies support application of immunophenotypic algorithm for molecular subtype classification in diffuse large B-cell lymphoma: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Leukemia*. 2012;26(9):2103-2113. doi:10.1038/leu.2012.83
62. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*. 2011;43(9):830-837. doi:10.1038/ng.892
63. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol*. 2015;52(2):67-76. doi:10.1053/j.seminhematol.2015.01.005
64. Offit K, Lo Coco F, Louie DC, et al. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 1994;331(2):74-80. doi:10.1056/NEJM199407143310202
65. Jardin F, Ruminy P, Bastard C, Tilly H. The BCL6 proto-oncogene: a leading role during germinal center development and lymphomagenesis. *Pathol Biol*. 2007;55(1):73-83. doi:10.1016/j.patbio.2006.04.001
66. Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G, et al. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell*. 2005;7(5):445-455. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.037
67. Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, et al. NFkappaB activity, function, and target-gene signatures in primary mediastinal large B-cell lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 2005;106(4):1392-1399. doi:10.1182/blood-2004-12-4901
68. Jost PJ, Ruland J. Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood*. 2007;109(7):2700-2707. doi:10.1182/blood-2006-07-025809
69. Dobashi A. Molecular Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Exp Hematop*. 2016;56(2):71-78. doi:10.3960/jslrt.56.71
70. Molina TJ, Canioni D, Copie-Bergman C, et al. Young patients with non-germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma benefit from intensified chemotherapy with ACVBP plus rituximab compared with CHOP plus rituximab: analysis of data from the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte/lymphoma study association phase III trial LNH 03-2B. *J Clin Oncol*. 2014;32(35):3996-4003. doi:10.1200/JCO.2013.54.9493
71. Karube K, Enjuanes A, Dlouhy I, et al. Integrating genomic alterations in diffuse large B-cell lymphoma identifies new relevant pathways and potential therapeutic targets. *Leukemia*. 2018;32(3):675-684. doi:10.1038/leu.2017.251
72. Morin RD, Mungall K, Pleasance E, et al. Mutational and structural analysis of diffuse large B-cell lymphoma using whole-genome sequencing. *Blood*. 2013;122(7):1256-1265. doi:10.1182/blood-2013-02-483727

73. Zhang J, Grubor V, Love CL, et al. Genetic heterogeneity of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(4):1398-1403. doi:10.1073/pnas.1205299110
74. Young KH, Weisenburger DD, Dave BJ, et al. Mutations in the DNA-binding codons of TP53, which are associated with decreased expression of TRAILreceptor-2, predict for poor survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110(13):4396-4405. doi:10.1182/blood-2007-02-072082
75. Xu-Monette ZY, Wu L, Visco C, et al. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2012;120(19):3986-3996. doi:10.1182/blood-2012-05-433334
76. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2313-2323. doi:10.1056/NEJMoa0802885
77. Burroni B, Broudin C, Damotte D, Laurent C. Les immune-checkpoints dans les hémopathies. *Annales de Pathologie*. 2017;37(1):101-110. doi:10.1016/j.annpat.2016.12.005
78. Ok CY, Ye Q, Li L, et al. Age cutoff for Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma—is it necessary? *Oncotarget*. 2015;6(16):13933-13945.
79. Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S, et al. Age related EBV associated lymphoproliferative disorder—a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma: the Western experience. *Blood*. 2011:110-2010.
80. Okamoto A, Yanada M, Inaguma Y, et al. nfk. *Hematological oncology*. 2017;35(1):87–93.
81. Ok CY, Papiathomas TG, Medeiros LJ, Young KH. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood*. 2013;122(3):328-340. doi:10.1182/blood-2013-03-489708
82. Adam P, Bonzheim I, Fend F, Quintanilla-Martínez L. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphomas of the elderly. *Advances in anatomic pathology*. 2011;18(5):349–355.
83. Kato H, Karube K, Yamamoto K, et al. Gene expression profiling of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly reveals alterations of characteristic oncogenetic pathways. *Cancer Sci*. 2014;105(5):537-544. doi:10.1111/cas.12389
84. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res*. 2013;19(13):3462-3473. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0855

85. GAULARD P. Other iatrogenic immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 2008:350-351.
86. Song JY, Pittaluga S, Dunleavy K, et al. Lymphomatoid granulomatosis--a single institute experience: pathologic findings and clinical correlations. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(2):141-156. doi:10.1097/PAS.0000000000000328
87. Pope JH, Horne MK, Scott W. Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer*. 1968;3(6):857-866.
88. Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968;59(1):94-101.
89. Ecker DJ, Sampath R, Willett P, et al. The Microbial Rosetta Stone Database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents. *BMC Microbiol*. 2005;5:19. doi:10.1186/1471-2180-5-19
90. Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry Mosc*. 2014;79(13):1635-1652. doi:10.1134/S0006297914130124
91. Leroy B, Gillet L, Vanderplasschen A, Wattiez R. Structural Proteomics of Herpesviruses. *Viruses*. 2016;8(2). doi:10.3390/v8020050
92. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(10):757.
93. Paulson EJ, Fingerroth JD, Yates JL, Speck SH. Methylation of the EBV genome and establishment of restricted latency in low-passage EBV-infected 293 epithelial cells. *Virology*. 2002;299(1):109-121.
94. Hadinoto V, Shapiro M, Greenough TC, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. *Blood*. 2008;111(3):1420-1427. doi:10.1182/blood-2007-06-093278
95. Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol*. 2005;15(1):3-15. doi:10.1002/rmv.441
96. Kaiser C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*. 1999;73(5):4481-4484.
97. Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus entry. *J Virol*. 2007;81(15):7825-7832. doi:10.1128/JVI.00445-07
98. Nemerow GR, Cooper NR. Virus receptors on lymphoid cells. *Meth Enzymol*. 1987;150:548-558.

99. Moore MD, DiScipio RG, Cooper NR, Nemerow GR. Hydrodynamic, electron microscopic, and ligand-binding analysis of the Epstein-Barr virus/C3dg receptor (CR2). *J Biol Chem.* 1989;264(34):20576-20582.
100. Sorem J, Jardetzky TS, Longnecker R. Cleavage and Secretion of Epstein-Barr Virus Glycoprotein 42 Promote Membrane Fusion with B Lymphocytes. *J Virol.* 2009;83(13):6664-6672. doi:10.1128/JVI.00195-09
101. Li BM, Ji ZW, Liu ZS, Zeng Y. Epstein-Barr virus in synergy with tumor-promoter-induced malignant transformation of immortalized human epithelial cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1997;123(8):441-446.
102. Middeldorp JM, Brink AATP, van den Brule AJC, Meijer CJLM. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;45(1):1-36.
103. Jones JF, Williams M, Schooley RT, Robinson C, Glaser R. Antibodies to Epstein-Barr virus-specific DNase and DNA polymerase in the chronic fatigue syndrome. *Arch Intern Med.* 1988;148(9):1957-1960.
104. Montpellier C, Crepieux P, Quatannens B, et al. Homologous T and B cells immortalized in vitro by the Epstein-Barr virus exhibit differential genetical and functional features. *Int J Oncol.* 1997;11(1):87-96.
105. Groux H, Cottrez F, Montpellier C, et al. Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood.* 1997;89(12):4521-4530.
106. Haverkos BM, Huang Y, Gru A, et al. Frequency and clinical correlates of elevated plasma Epstein-Barr virus DNA at diagnosis in peripheral T-cell lymphomas. *Int J Cancer.* 2017;140(8):1899-1906. doi:10.1002/ijc.30566
107. Tabiasco J, Vercellone A, Meggetto F, Hudrisier D, Brousset P, Fournié J-J. Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J Immunol.* 2003;170(12):5993-5998. doi:10.4049/jimmunol.170.12.5993
108. Gosselin J, Menezes J, D'Addario M, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha transcription by Epstein-Barr virus. *Eur J Immunol.* 1991;21(1):203-208. doi:10.1002/eji.1830210130
109. Savard M, Bélanger C, Tardif M, Gourde P, Flamand L, Gosselin J. Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol.* 2000;74(6):2612-2619. doi:10.1128/jvi.74.6.2612-2619.2000
110. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2001;1(1):75-82. doi:10.1038/35095584
111. Tangye SG, Palendira U, Edwards ESJ. Human immunity against EBV-lessons from the clinic. *J Exp Med.* 2017;214(2):269-283. doi:10.1084/jem.20161846
112. Miyamoto S, Verma IM. Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Adv Cancer Res.* 1995;66:255-292.

113. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-362. doi:10.1016/j.cell.2008.01.020
114. Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, et al. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci*. 1997;110 ( Pt 3):369-378.
115. Chanut A. Rôle des voies d'activation classique et alternative du facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B dans la prolifération et la protection contre l'apoptose induites par l'oncoprotéine LMP-1 du virus d'Epstein-Barr. :146.
116. Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):318-330. doi:10.1016/j.semcancer.2006.07.015
117. Pelengaris S, Khan M, Evan GI. Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*. 2002;109(3):321-334.
118. Nowakowski GS, Czuczman MS. ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2015:e449-457. doi:10.14694/EdBook\_AM.2015.35.e449
119. Cai Q, Medeiros LJ, Xu X, Young KH. MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. *Oncotarget*. 2015;6(36):38591-38616. doi:10.18632/oncotarget.5774
120. Valera A, López-Guillermo A, Cardesa-Salzman T, et al. MYC protein expression and genetic alterations have prognostic impact in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Haematologica*. 2013;98(10):1554-1562. doi:10.3324/haematol.2013.086173
121. Schauer SL, Wang Z, Sonenshein GE, Rothstein TL. Maintenance of nuclear factor-kappa B/Rel and c-myc expression during CD40 ligand rescue of WEHI 231 early B cells from receptor-mediated apoptosis through modulation of I kappa B proteins. *J Immunol*. 1996;157(1):81-86.
122. David A, Arnaud N, Fradet M, et al. c-Myc dysregulation is a co-transforming event for nuclear factor- $\kappa$ B activated B cells. *Haematologica*. 2017;102(5):883-894. doi:10.3324/haematol.2016.156281
123. Young LS, Dawson CW, Eliopoulos AG. Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. *Biochem Soc Trans*. 1999;27(6):807-812.
124. Park S, Lee J, Ko YH, et al. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2007;110(3):972-978.
125. Li X, Bhaduri-McIntosh S. A Central Role for STAT3 in Gammaherpesvirus-Life Cycle and -Diseases. *Front Microbiol*. 2016;7. doi:10.3389/fmicb.2016.01052

126. Schreiber RD. Cancer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Cancer Immun.* 2005;5 Suppl 1:1.
127. Cron L, Allen T, Febbraio MA. The role of gp130 receptor cytokines in the regulation of metabolic homeostasis. *J Exp Biol.* 2016;219(Pt 2):259-265. doi:10.1242/jeb.129213
128. Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(9):703-718. doi:10.1038/nrd2805
129. Khanna R, Burrows SR, Neisig A, Neefjes J, Moss DJ, Silins SL. Hierarchy of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-cell responses in individuals carrying different subtypes of an HLA allele: implications for epitope-based antiviral vaccines. *J Virol.* 1997;71(10):7429-7435.
130. Heslop HE. Biology and treatment of Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005:260-266. doi:10.1182/asheducation-2005.1.260
131. Middeldorp JM, Pegtel DM. Multiple roles of LMP1 in Epstein-Barr virus induced immune escape. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(6):388-396. doi:10.1016/j.semcancer.2008.10.004
132. Bhardwaj N. Harnessing the immune system to treat cancer. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1130-1136. doi:10.1172/JCI32136
133. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 2008;27(45):5904-5912. doi:10.1038/onc.2008.271
134. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942-949. doi:10.1038/nm1093
135. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(11):1746-1752. doi:10.1200/JCO.2008.17.9036
136. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* 1996;17(3):138-146.
137. Romagnani S, Parronchi P, D'Elia MM, et al. An update on human Th1 and Th2 cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;113(1-3):153-156. doi:10.1159/000237532
138. DuPage M, Bluestone JA. Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(3):149-163. doi:10.1038/nri.2015.18
139. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 1998;188(12):2357-2368. doi:10.1084/jem.188.12.2357

140. Kryczek I, Liu R, Wang G, et al. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res.* 2009;69(9):3995-4000. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3804
141. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):263-274. doi:10.1038/nrc1586
142. Shevach EM. Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50(9):2721-2724. doi:10.1002/art.20500
143. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.* 2009;30(5):626-635. doi:10.1016/j.immuni.2009.05.002
144. Yamaguchi T, Sakaguchi S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol.* 2006;16(2):115-123. doi:10.1016/j.semcancer.2005.11.005
145. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 2005;202(7):919-929. doi:10.1084/jem.20050463
146. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(8):554-567. doi:10.1038/nri2808
147. Kortylewski M, Xin H, Kujawski M, et al. Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2009;15(2):114-123. doi:10.1016/j.ccr.2008.12.018
148. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood.* 2004;104(9):2840-2848. doi:10.1182/blood-2004-03-0859
149. Sica GL, Choi IH, Zhu G, et al. B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity.* 2003;18(6):849-861.
150. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007;13(3):108-116. doi:10.1016/j.molmed.2007.01.003
151. Wang J, Ke X-Y. The four types of Tregs in malignant lymphomas. *J Hematol Oncol.* 2011;4:50. doi:10.1186/1756-8722-4-50
152. Roncador G, Garcia JF, Garcia JF, et al. FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia.* 2005;19(12):2247-2253. doi:10.1038/sj.leu.2403965
153. Vuagnat P, Champiat S. Immunothérapies anti-checkpoints□: aspects fondamentaux. *MISE AU POINT.* 2018:6.

154. Kwon MJ, Rho Y-S, Nam ES, et al. Clinical implication of programmed cell death-1 ligand-1 expression in tonsillar squamous cell carcinoma in association with intratumoral heterogeneity, human papillomavirus, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Hum Pathol.* 2018;80:28-39. doi:10.1016/j.humphath.2018.03.025
155. Thanarajasingam G, Thanarajasingam U, Ansell SM. Immune checkpoint blockade in lymphoid malignancies. *The FEBS journal.* 2016;283(12):2233–2244.
156. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2015;126(19):2193-2201. doi:10.1182/blood-2015-02-629600
157. Gravelle P, Burrioni B, Péricart S, et al. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget.* 2017;8(27):44960.
158. Hong JY, Ko YH, Kim SJ, Kim WS. Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: a concise review and update. *Current opinion in oncology.* 2015;27(5):392–398.
159. Stuhlmann-Laeisz C, Borchert A, Quintanilla-Martinez L, et al. In Europe expression of EBNA2 is associated with poor survival in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leukemia & lymphoma.* 2016;57(1):39–44.
160. Kamperos G, Nikitakis N, Sfakianou A, Avgoustidis D, Sklavounou-Andrikopoulou A. Expression of NF- $\kappa$ B and IL-6 in oral precancerous and cancerous lesions: An immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2016;21(1):e6-13.
161. Stofas A, Levidou G, Piperi C, et al. The role of CXC-chemokine receptor CXCR2 and suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3) in renal cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2014;14:149. doi:10.1186/1471-2407-14-149
162. Zergoun A-A, Zebboudj A, Sellam SL, et al. IL-6/NOS2 inflammatory signals regulate MMP-9 and MMP-2 activity and disease outcome in nasopharyngeal carcinoma patients. *Tumour Biol.* 2016;37(3):3505-3514. doi:10.1007/s13277-015-4186-4
163. Aluko J, Adelusola K, Komolafe A, Olaofe O, Akinyemi H. Immunohistopathological Characterization of Lymphomas and Their Relationship With Epstein-Barr Virus Infection in Obafemi Awolowo University Teaching Hospitals Complex, Ile-Ife, Nigeria. *American Journal of Clinical Pathology.* 2018;150(suppl\_1):S105–S105.
164. Cohen M, Vistarop AG, Huaman F, et al. Cytotoxic response against Epstein Barr virus coexists with diffuse large B-cell lymphoma tolerogenic microenvironment: clinical features and survival impact. *Sci Rep.* 2017;7(1):10813. doi:10.1038/s41598-017-11052-z
165. Hasselblom S, Sigurdadottir M, Hansson U, Nilsson-Ehle H, Ridell B, Andersson P-O. The number of tumour-infiltrating TIA-1+ cytotoxic T cells but not FOXP3+

- regulatory T cells predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2007;137(4):364-373. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06593.x
166. Ahearne MJ, Bhuller K, Hew R, Ibrahim H, Naresh K, Wagner SD. Expression of PD-1 (CD279) and FoxP3 in diffuse large B-cell lymphoma. *Virchows Arch.* 2014;465(3):351-358. doi:10.1007/s00428-014-1615-5
  167. Serag El-Dien MM, Abdou AG, Asaad NY, Abd El-Wahed MM, Kora MAE-HM. Intratumoral FOXP3+ Regulatory T Cells in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017;25(8):534-542. doi:10.1097/PAI.0000000000000335
  168. Cha Z, Gu H, Zang Y, et al. The prevalence and function of CD4+CXCR5+Foxp3+ follicular regulatory T cells in diffuse large B cell lymphoma. *Int Immunopharmacol.* 2018;61:132-139. doi:10.1016/j.intimp.2018.05.025
  169. Chang C-C, McClintock S, Cleveland RP, et al. Immunohistochemical expression patterns of germinal center and activation B-cell markers correlate with prognosis in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(4):464-470.
  170. Slack GW, Steidl C, Sehn LH, Gascoyne RD. CD 30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia. *British journal of haematology.* 2014;167(5):608–617.
  171. Hammouda PD. Registre des Tumeurs de la wilaya d’Alger 2016. :30.
  172. Boudjerra N, Perry AM, Audouin J, et al. Classification of non-Hodgkin lymphoma in Algeria according to the World Health Organization classification. *Leukemia & Lymphoma.* 2015;56(4):965-970. doi:10.3109/10428194.2014.939967
  173. Allouda M. Evaluation du protocole R chop dans le traitement des lymphomes malins non hodghiniens diffus a grandes cellules B chez l’adulte: étude prospective. 2014.
  174. MEKHLEK K. Les lymphomes ganglionnaires diffus à grandes cellules B. Aspects anatomocliniques, immunohistochimiques et profil génétique. December 2017.
  175. Benayoune K. Les lymphome B diffus à grandes cellules. Expérience du laboratoire d’Anatomie Pathologique du CHU Hassan II Fès. A propos de 64 cas. 2015.
  176. Peh S-C, Gan G-G, Lee L-K, Eow G-I. Clinical relevance of CD10, BCL-6 and multiple myeloma-1 expression in diffuse large B-cell lymphomas in Malaysia. *Pathol Int.* 2008;58(9):572-579. doi:10.1111/j.1440-1827.2008.02273.x
  177. Chen Y, Han T, Iqbal J, et al. Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Chinese Patients Immunophenotypic and Cytogenetic Analyses of 124 Cases. *Am J Clin Pathol.* 2010;133(2):305-313. doi:10.1309/AJCP4H6ADGYDZMOA

178. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, et al. Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. *Haematologica*. 2016;haematol–2016.
179. Li T, Medeiros LJ, Lin P, et al. Immunohistochemical profile and fluorescence in situ hybridization analysis of diffuse large B-cell lymphoma in northern China. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134(5):759-765. doi:10.1043/1543-2165-134.5.759
180. Tracy SI, Habermann TM, Feldman AL, et al. Outcomes among North American patients with diffuse large B-cell lymphoma are independent of tumor Epstein-Barr virus positivity or immunosuppression. *Haematologica*. 2018;103(2):297-303. doi:10.3324/haematol.2017.176511
181. Lu T-X, Liang J-H, Miao Y, et al. Epstein-Barr virus positive diffuse large B-cell lymphoma predict poor outcome, regardless of the age. *Scientific reports*. 2015;5:12168.
182. Oyama T, Yamamoto K, Asano N, et al. Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(17):5124-5132. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2823
183. Ziarkiewicz M, Wołosz D, Dzieciatkowski T, et al. Epstein–Barr Virus-Positive Diffuse Large B cell Lymphoma in the Experience of a Tertiary Medical Center in Poland. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2016;64(2):159-169. doi:10.1007/s00005-015-0341-2
184. Kuze T, Nakamura N, Hashimoto Y, Sasaki Y, Abe M. The Characteristics of Epstein-Barr Virus (EBV)-positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Comparison between EBV+ and EBV- Cases in Japanese Population. *Japanese Journal of Cancer Research*. 2000;91(12):1233-1240. doi:10.1111/j.1349-7006.2000.tb00909.x
185. Hoeller S, Tzankov A, Pileri SA, Went P, Dirnhofer S. Epstein-Barr virus–positive diffuse large B-cell lymphoma in elderly patients is rare in Western populations. *Human pathology*. 2010;41(3):352–357.
186. Uner A, Akyurek N, Saglam A, et al. The presence of Epstein–Barr virus (EBV) in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) in Turkey: special emphasis on ‘EBV-positive DLBCL of the elderly.’ *APMIS*. 2011;119(4–5):309-316. doi:10.1111/j.1600-0463.2011.02736.x
187. Bavi P, Uddin S, Bu R, et al. The biological and clinical impact of inhibition of NF-κB-initiated apoptosis in diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). *J Pathol*. 2011;224(3):355-366. doi:10.1002/path.2864
188. Pan Y, Meng B, Zhang H, et al. Low incidence of Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in Tianjin, northern China. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(2):298–303.

189. Chang S-T, Lu Y-H, Lu C-L, et al. Epstein–Barr virus is rarely associated with diffuse large B cell lymphoma in Taiwan and carries a trend for a shorter median survival time. *Journal of clinical pathology*. 2013;jclinpath–2013.
190. Lu C-H, Lee K-F, Chen C-C, et al. Clinical Characteristics and Treatment Outcome in a Taiwanese Population of Patients with Epstein–Barr Virus-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Japanese journal of clinical oncology*. 2014;44(12):1164–1171.
191. Quintanilla-Martínez L, Lome-Maldonado C, Ott G, et al. Primary non-Hodgkin’s lymphoma of the intestine: high prevalence of Epstein-Barr virus in Mexican lymphomas as compared with European cases. *Blood*. 1997;89(2):644-651.
192. Stuhlmann-Laeisz C, Szczepanowski M, Borchert A, Brüggemann M, Klapper W. Epstein-Barr virus-negative diffuse large B-cell lymphoma hosts intra-and peritumoral B-cells with activated Epstein-Barr virus. *Virchows Archiv*. 2015;466(1):85–92.
193. Ohashi A, Kato S, Okamoto A, et al. Reappraisal of Epstein-Barr virus (EBV) in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL): comparative analysis between EBV-positive and EBV-negative DLBCL with EBV-positive bystander cells. *Histopathology*. 2017;71(1):89-97. doi:10.1111/his.13197
194. Cohen M, Narbaitz M, Metrebian F, De Matteo E, Preciado MV, Chabay PA. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma association is not only restricted to elderly patients. *International journal of cancer*. 2014;135(12):2816–2824.
195. Cohen M, De Matteo E, Narbaitz M, Carreño FA, Preciado MV, Chabay PA. Epstein–Barr virus presence in pediatric diffuse large B-cell lymphoma reveals a particular association and latency patterns: Analysis of viral role in tumor microenvironment. *International journal of cancer*. 2013;132(7):1572–1580.
196. Chabay P, Preciado MV. Epidemiology of Epstein-Barr virus-associated pediatric lymphomas from Argentina. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México (English Edition)*. 2016;73(1):47–54.
197. Monabati A, Vahedi A, Safaei A, et al. Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma: is it different between Over and Under 50 Years of Age? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016;17(4):2285-2289. doi:10.7314/APJCP.2016.17.4.2285
198. Uner A, Akyurek N, Saglam A, et al. The presence of Epstein–Barr virus (EBV) in diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) in Turkey: special emphasis on ‘EBV-positive DLBCL of the elderly.’ *Apmis*. 2011;119(4-5):309–316.
199. Okamoto A, Yanada M, Miura H, et al. Prognostic significance of Epstein–Barr virus DNA detection in pretreatment serum in diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer science*. 2015;106(11):1576–1581.

200. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Paydas S, Winer ES, Butera JN. Epstein-barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: what we know so far. *Oncologist*. 2011;16(1):87-96. doi:10.1634/theoncologist.2010-0213
201. Sato A, Nakamura N, Kojima M, et al. Clinical outcome of Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly in the rituximab era. *Cancer Science*. 2014;105(9):1170-1175. doi:10.1111/cas.12467
202. Wada N, Ikeda J, Hori Y, et al. Epstein-barr virus in diffuse large B-Cell lymphoma in immunocompetent patients in Japan is as low as in Western Countries. *Journal of medical virology*. 2011;83(2):317-321.
203. Liang J-H, Lu T-X, Tian T, et al. Epstein-Barr virus (EBV) DNA in whole blood as a superior prognostic and monitoring factor than EBV-encoded small RNA in situ hybridization in diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(6):596-602. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.017
204. Agrawal B, Reddish M, Longenecker BM. CD30 expression on human CD8+ T cells isolated from peripheral blood lymphocytes of normal donors. *J Immunol*. 1996;157(8):3229-3234.
205. Hu S, Xu-Monette ZY, Balasubramanyam A, et al. CD30 expression defines a novel subgroup of diffuse large B-cell lymphoma with favorable prognosis and distinct gene expression signature: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*. 2013;121(14):2715-2724. doi:10.1182/blood-2012-10-461848
206. Campuzano-Zuluaga G, Cioffi-Lavina M, Lossos IS, Chapman-Fredricks JR. Frequency and extent of CD30 expression in diffuse large B-cell lymphoma and its relation to clinical and biologic factors: a retrospective study of 167 cases. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(11):2405-2411. doi:10.3109/10428194.2013.778407
207. Berger GK, McBride A, Lawson S, et al. Brentuximab vedotin for treatment of non-Hodgkin lymphomas: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;109:42-50. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.11.009
208. Aoudjit L. Étude de la mort cellulaire via CD40 et BCR en fonction de l'activation cellulaire. October 2017. <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/19422>. Accessed June 27, 2019.
209. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF-kappaB collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(1):11-19. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.005
210. Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):97-105. doi:10.1038/nrc1275
211. Wang Z, Luo F, Li L, et al. STAT3 activation induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein1 causes vascular endothelial growth factor expression and cellular invasiveness via JAK3 And ERK signaling. *Eur J Cancer*. 2010;46(16):2996-3006. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.008

212. Kung C-P, Meckes DG, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus LMP1 activates EGFR, STAT3, and ERK through effects on PKCdelta. *J Virol.* 2011;85(9):4399-4408. doi:10.1128/JVI.01703-10
213. Muromoto R, Ikeda O, Okabe K, et al. Epstein-Barr virus-derived EBNA2 regulates STAT3 activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378(3):439-443. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.053
214. Ramakrishnan V, D'Souza A. Signaling Pathways and Emerging Therapies in Multiple Myeloma. *Curr Hematol Malig Rep.* 2016;11(2):156-164. doi:10.1007/s11899-016-0315-4
215. Ma N, Kawanishi M, Hiraku Y, et al. Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGFR expression. *Int J Cancer.* 2008;122(11):2517-2525. doi:10.1002/ijc.23415
216. Villavicencio RT, Liu S, Kibbe MR, et al. Induced nitric oxide inhibits IL-6-induced stat3 activation and type II acute phase mRNA expression. *Shock.* 2000;13(6):441-445.
217. Shi Y, Deng L, Song Y, et al. CD3+/CD8+ T-cell density and tumoral PD-L1 predict survival irrespective of rituximab treatment in Chinese diffuse large B-cell lymphoma patients. *Int J Hematol.* 2018;108(3):254-266. doi:10.1007/s12185-018-2466-7
218. Castillo JJ, Beltran BE, Miranda RN, Young KH, Chavez JC, Sotomayor EM. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American journal of hematology.* 2016;91(5):529-537.
219. Morales O, Mrizak D, François V, et al. Epstein-Barr virus infection induces an increase of T regulatory type 1 cells in Hodgkin lymphoma patients. *Br J Haematol.* 2014;166(6):875-890. doi:10.1111/bjh.12980
220. Taylor JG, Gribben JG. Microenvironment abnormalities and lymphomagenesis: Immunological aspects. *Semin Cancer Biol.* 2015;34:36-45. doi:10.1016/j.semcancer.2015.07.004
221. Chamkha H, Li X, Rouvet G, Thiéry J. Perforine, granzyme et granulysine: un trio de choc inducteur de la microptose parasitaire. *Med Sci (Paris).* 2016;32(8-9):708-710. doi:10.1051/medsci/20163208015
222. Dolcetti R. Cross-talk between Epstein-Barr virus and microenvironment in the pathogenesis of lymphomas. *Semin Cancer Biol.* 2015;34:58-69. doi:10.1016/j.semcancer.2015.04.006
223. Muenst S, Hoeller S, Willi N, Dirnhofera S, Tzankov A. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. *Dis Markers.* 2010;29(1):47-53. doi:10.3233/DMA-2010-0725

224. Laurent C, Fabiani B, Do C, et al. Immune-checkpoint expression in Epstein-Barr virus positive and negative plasmablastic lymphoma: a clinical and pathological study in 82 patients. *haematologica*. 2016:haematol-2016.
225. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, et al. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007;13(6):1757-1761. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2599
226. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, et al. Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e82870. doi:10.1371/journal.pone.0082870
227. Pătrașcu AM, Rotaru I, Olar L, et al. The prognostic role of Bcl-2, Ki67, c-MYC and p53 in diffuse large B-cell lymphoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2017;58(3):837–843.
228. He X, Chen Z, Fu T, et al. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014;14:153. doi:10.1186/1471-2407-14-153

## Résumé

Le Lymphome B diffus à grandes cellules EBV+ (LBDGC EBV+) est un lymphome agressif, peu commun, associé à un pronostic plus défavorable à l'ère de la chimio-immunothérapie.

L'EBV a un impact sur l'environnement de personnes d'origines ethniques différentes. Les patients de l'Asie, d'Amérique latine et d'Europe de l'Est semblent avoir une survie relativement faible, alors que les patients Nord-Américains n'ont montré aucune différence de survie par rapport aux patients atteints de LBDGC EBV-.

Sa prévalence est encore sous-estimée car, il n'y a toujours pas d'étude de grande envergure dans ce sens et l'hybridation in situ EBER n'est pas réalisée systématiquement devant une morphologie d'un lymphome à grandes cellules.

L'absence de déficit immunitaire est un critère majeur pour porter ce diagnostic.

La prévalence de l'EBV dans les LBDGC est estimée à 8% dans notre série, rejoignant les séries Asiatiques. Celle-ci reste considérable par rapport aux pays Occidentaux et l'incidence des LBDGC est élevée avec un âge plus jeune dans notre pays d'après les différentes études Algériennes publiées ainsi que dans notre travail de thèse.

Notre étude a montré que le LBDGC EBV+ est un sous-type génétiquement unique, avec une activation accrue des voies canoniques NF- $\kappa$ B et JAK / STAT3, c-MYC et IL-6. Cette dernière voie n'a toujours pas été explorée ou publiée.

L'expression de NF- $\kappa$ B et de STAT3 phosphorylé et IL-6 est observée de manière plus importante en comparaison aux LBDGC EBV- ce qui suggère de nouvelles cibles thérapeutiques.

Nous avons également démontré que l'immunophénotype du microenvironnement réalisé dans le but de mieux comprendre les mécanismes de la lymphomagenèse des LBDGCB EBV+ et la connaissance du mécanisme de résistance aux traitements a des caractéristiques spécifiques associées à un immunophénotype immunosuppresseur avec une augmentation des cellules T CD8 + et des cellules effectrices cytotoxiques : Granzyme B, Perforine et Tia1. Cependant, cette réponse spécifique co-existe avec un milieu tolérogène par, l'expression de PD-1 dans le microenvironnement des LBDGC EBV en plus de l'expression du PD-L1 dans 100% des cas ouvrant ainsi la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques.

**Mots clés :** EBV, Lymphome, NF- $\kappa$ B, CD8, PD-L1.

## Abstract

EBV + diffuse large B cell lymphoma is an aggressive, uncommon lymphoma associated with a poorer prognosis in the era of chemo-immunotherapy.

EBV has an impact on the environment of people from different ethnic origins. Patients from Asia, Latin America and Eastern Europe appear to have relatively low survival, whereas North Americans show no difference in survival compared to patients with diffuse large B cell lymphoma EBV -.

Its prevalence is still underestimated because there is still no large-scale study in this sense and the EBER in situ hybridization is not systematically performed in front of morphology of a large cell lymphoma.

The absence of immunodeficiency is a major criterion for the diagnosis.

The prevalence of EBV in diffuse large cell B lymphoma is estimated at 8% in our series, joining the Asian series. This is still considerable compared to Western countries. The incidence of diffuse large B cell lymphoma is high with a younger age in our country according to the various published Algerian studies as well as our thesis work.

Our study has shown that EBV + diffuse large B cell lymphoma is a genetically unique subtype, with increased activation of the canonical pathways NF- $\kappa$ B and JAK / STAT3, c-MYC and IL-6. This last path has still not been explored or published.

The expression of NF- $\kappa$ B and phosphorylated STAT3 and IL-6 is observed to a greater extent compared with EBV- large B-cell lymphoma, which suggest new therapeutic targets.

We have also demonstrated that immunophenotype of the microenvironment performed in order to understand the mechanism of lymphomagenesis of EBV + diffuse large B cell lymphoma better and knowledge of the mechanism of resistance to treatment has specific characteristics associated with an immunosuppressive immunophenotype with increased CD8 + T cells and cytotoxic effector cells : Granzyme B, Perforine and Tia1. However, this specific response co-exists with a tolerogenic milieu by the expression of PD-1 in the microenvironment of diffuse EBV + large B cell lymphoma in addition to the expression of PD-L1 in 100% of cases, thus opening the pathway to new therapeutic perspectives.

**Key words:** EBV, Lymphoma, NF- $\kappa$ B, CD8, PD-L1.