



Université de Strasbourg
FACULTÉ DE PHARMACIE

N° d'ordre:

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

—

**DIAGNOSTIC INTÉGRATIF DES LYMPHOMES
PRIMITIFS DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL DANS LE
LCR ET INTÉRÊT DE LA DÉTECTION DE LA MUTATION
L265P DU GÈNE *MYD88* SUR L'ADN CIRCULANT PAR
PCR DIGITALE**

Présenté par **Antoine KLAPUCH**

Soutenu le 24 avril 2023 devant le jury constitué de

Professeur Jean-Marc LESSINGER, Président – *PU-PH, CHU de Strasbourg*

Docteur Agathe PRUVOT-DEBLIQUIS, Directeur de thèse – *PH, CH de Mulhouse*

Professeur Laurent MAUVIEUX, Membre du jury – *PU-PH, CHU de Strasbourg*

Docteur Bernard DRENOU, Membre du jury – *PH, CH de Mulhouse*

Docteur Guido AHLE, Membre du jury – *PH, CH de Colmar*

Approuvé par le Doyen et
par le Président de l'Université de Strasbourg

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

Doyen : Jean-Pierre GIES

Directrices-adjointes : Esther KELLENBERGER (enseignement)
Emilie SICK (enseignement)
Pauline SOULAS-SPRAUEL (affaires hospitalières/recherche)

Directeur adjoint-étudiant : Gauthier MARCOT

Professeurs :

Philippe ANDRÉ Bactériologie
Philippe BOUCHER Physiologie
Line BOUREL Chimie thérapeutique
Pascal DIDIER Biophotonique
Saïd ENNAHAR Chimie analytique
Philippe GEORGEL Bactériologie, Virologie
Jean-Pierre GIES Pharmacologie moléculaire
Esther KELLENBERGER Bio-Informatique
Maxime LEHMANN Biologie cellulaire
Eric MARCHIONI Chimie analytique
Francis MEGERLIN Droit et économie pharm.
Yves MELY Physique et Biophysique
Jean-Yves PABST Droit Economie pharm.
Françoise PONS Toxicologie
Valérie SCHINI-KERTH Pharmacologie
Florence TOTI Pharmacologie
Thierry VANDAMME Biogalénique
Catherine VONTHRON Pharmacognosie
Pascal WEHRLÉ Pharmacie galénique

Professeurs-praticiens hospitaliers :

Jean-Marc LESSINGER Biochimie
Bruno MICHEL Pharmaco-économie

Pauline SOULAS-SPRAUEL Immunologie
Geneviève UBEAUD-SÉQUIER
Pharmacocinétique

PAST :

Matthieu FOHRER Pharmacie d'officine
Philippe GALAIS Droit et économie pharm.
Philippe NANDE Ingénierie pharmaceutique
Caroline WILLER - WEHRLÉ Pharmacie
d'officine

Maîtres de Conférences :

Nicolas ANTON Pharmacie biogalénique
Martine BERGAENTZLÉ Chimie analytique
Nathalie BOULANGER Parasitologie
Aurélié BOURDERIOUX Pharmacochimie
Emmanuel BOUTANT Virologie et
Microbiologie
Véronique BRUBAN Physiologie et
physiopath.
Anne CASSET Toxicologie
Thierry CHATAIGNEAU Pharmacologie
Manuela CHIPER Pharmacie biogalénique
Guillaume CONZATTI Pharmacie galénique

Marcella DE GIORGI Pharmacochimie
Serge DUMONT Biologie cellulaire
Valérie GEOFFROY Microbiologie
Gisèle HAAN-ARCHIPOFF Plantes
médicinales
Béatrice HEURTAULT Pharmacie galénique
Célien JACQUEMARD Chémoinformatique
Julie KARPENKO Pharmacochimie
Clarisse MAECHLING Chimie physique
Rachel MATZ-WESTPHAL Pharmacologie
Cherifa MEHADJI Chimie
Nathalie NIEDERHOFFER Pharmacologie
Sergio ORTIZ AGUIRRE Pharmacognosie
Sylvie PERROTEY Parasitologie
Romain PERTSCHI Chimie en flux
Frédéric PRZYBILLA Biostatistiques
Patrice RASSAM Microbiologie
Eléonore REAL Biochimie
Andreas REISCH Biophysique
Ludivine RIFFAULT-VALOIS Analyse du
médicament

Carole RONZANI Toxicologie
Emilie SICK Pharmacologie
Maria-Vittoria SPANEDDA Chimie
thérapeutique
Jérôme TERRAND Physiopathologie
Nassera TOUNSI Chimie physique
Aurélié URBAIN Pharmacognosie
Bruno VAN OVERLOOP Physiologie
Maria ZENIOU Chimiogénomique

Maîtres de conférences-praticiens

hospitaliers :

Julie BRUNET Parasitologie
Nelly ÉTIENNE-SELLOUM Pharmacologie-
pharm. clinique
Julien GODET Biophysique - Biostatistiques

Assistants hospitaliers universitaires :

Damien REITA Biochimie



SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit
dans les préceptes de mon art et de
leur témoigner ma reconnaissance en
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,
ma profession avec conscience et de respecter non
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,
que je sois moi-même honoré
et estimé de mes confrères
et de mes patients.



REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres d'avoir consenti à faire partie de ce jury, ainsi que pour le temps et l'expertise accordés par chacun d'entre eux à ce travail.

Agathe, merci à toi pour ton implication et d'avoir accepté de m'encadrer tout au long de cette thèse qui s'est révélée passionnante et riche en enseignements. Merci de m'avoir accompagné et de m'avoir fait confiance pour sublimer ce projet lors du congrès de la SFH, qui restera une belle et formidable expérience pour moi.

Merci à vous, Dr DRENOU, de nous avoir apporté votre aide et vos compétences précieuses dans l'élaboration de ce travail.

Je remercie également le Dr Guido AHLE de nous avoir permis de mener à bien cette étude. Merci pour votre collaboration et votre disponibilité.

Merci au Pr Jean-Marc LESSINGER d'avoir chaleureusement accepté de présider cette thèse.

Merci au Pr Laurent MAUVIEUX de nous faire l'honneur de sa présence.

À ma famille

Maman, Papa, je ne vous serai jamais assez reconnaissant d'avoir contribué à construire mon avenir tel que je le désirais. Merci pour vos sacrifices, votre confiance, et de m'avoir accompagné tout au long de mes études. Un grand merci pour votre soutien sans failles.

Martin, frérot, merci pour ton éternel sens de l'humour. A mes yeux, ton sens indéniable de la zen-attitude en toute circonstance représente une véritable source d'inspiration.

Je remercie également Ariane, Amadis, Gauvain, ainsi que mes grands-parents, ma marraine, mon parrain, mes oncles, mes tantes et mes cousins de m'avoir soutenu de près ou de loin pendant tout mon parcours professionnel, que j'espère avoir rendus fiers du travail accompli.

Chloé, un grand merci à toi d'être à mes côtés depuis maintenant un certain nombre d'années. Ton sourire et ton éternel optimisme ont toujours été là pour me permettre d'avancer quelles que soient les épreuves traversées ensemble. Merci pour ton soutien sans limites et le bonheur que tu m'apportes au quotidien. Merci à tes parents, Olivia et Denis, ainsi qu'à toute ta famille pour la bienveillance dont ils ont toujours fait preuve.

À mes amis

Merci à Marie-Lou, Philippe, Jean-Baptiste et vos familles d'être présents depuis toutes ces nombreuses années. Que de bons souvenirs bâtis ensemble en grandissant à vos côtés.

Je remercie Jérôme, Maxence, Olivier et Valentine pour ces innombrables moments de rigolade depuis nos années lycée. Merci pour toutes ces journées et soirées passées avec vous.

Merci à la Team Pharma pour tous les instants culinaires, festifs et sportifs passés ensemble. C'était un plaisir de partager ces années de fac' en compagnie d'Alix, Angélique, Audrey, Augustin, Chloé, Damien, Gaëlle, Julien, Louis, Luc, Matthieu, et Mélanie.

Je remercie également l'ensemble des internes (et biologistes pour certains !) que j'ai eu la chance de rencontrer durant mes années d'internat. Merci à Adrien, Antoine, Baptiste, Colleen, Dihia, Elise, Guilaine, Khairollah, Laurent, Louise, Lucie, Marion et Samih d'avoir apporté votre bonne humeur quotidienne au laboratoire.

Aux équipes des laboratoires

Un grand merci à l'ensemble du personnel des laboratoires de Strasbourg, Colmar, Mulhouse, et Saint-Pierre qui m'ont permis de pleinement m'intégrer au sein des équipes respectives. Merci d'avoir contribué à l'agréable ambiance de travail de laquelle j'ai pu profiter.

Carole, je te remercie de m'avoir transmis ton savoir sur la biologie moléculaire. Merci pour ton implication et pour la meilleure compréhension de la PCR digitale que tu m'as offerte.

Merci à Thomas pour ses précieux conseils et son soutien dans l'avancement de la thèse.

Merci à Céline pour son énorme travail grâce auquel j'ai pu articuler mon projet.

Tristan, merci à toi de m'avoir transmis ta passion pour l'Hématologie.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
PARTIE 1 : État des lieux sur les lymphomes du système nerveux central	2
I. GÉNÉRALITÉS	2
A) Définitions et classification	2
B) Sous-types histologiques	2
C) Épidémiologie	3
II. PHYSIOPATHOLOGIE	5
A) Rappels sur la lymphopoïèse B.....	5
1) Développement médullaire des lymphocytes B	5
2) Maturation immunologique ganglionnaire des lymphocytes B	6
B) Lymphomagenèse fondamentale	8
1) Origine cellulaire des PCNSL.....	8
2) Mécanismes de l'atteinte exclusive du SNC	10
C) Pathogénie moléculaire et immunopathologie	12
1) Préambule sur la lymphomagenèse moléculaire	12
2) Activation constitutive de la voie de signalisation de NF- κ B	14
a) Physiologie de la voie NF- κ B.....	14
b) Anomalies génétiques et répercussions immunopathologiques.....	16
3) Altérations génétiques additionnelles	19
D) Mécanismes impliqués chez l'immunodéficient	21
III. PRISE EN CHARGE DES LYMPHOMES DU SNC	22
A) Données pronostiques.....	22
1) Survie des patients	22
2) Scores pronostiques	23
B) Stratégies thérapeutiques	24
1) La chirurgie	24
2) La radiothérapie.....	25
3) La chimiothérapie	25
4) La corticothérapie	26
5) Thérapies ciblées	26
6) Thérapie cellulaire	27
7) Situations particulières.....	28

PARTIE 2 : Outils diagnostiques dans le bilan des lymphomes du SNC29

I. CLINIQUE	29
II. IMAGERIE MÉDICALE.....	30
III. ANATOMOPATHOLOGIE.....	33
A) Prélèvements : biopsies cérébrales et oculaires.....	33
B) Examen anatomopathologique.....	35
1) Histologie	35
2) Immunohistochimie	35
IV. BIOLOGIE	37
A) Prélèvements contributifs	38
1) Cérébraux	38
2) Méningés	39
3) Oculaires.....	39
B) Analyse de la fraction cellulaire	40
1) Cytologie conventionnelle	40
2) Cytométrie en flux	41
3) Biologie moléculaire.....	44
a) Recherche de la mutation <i>MYD88</i> L265P par PCR digitale	44
a.1. Intérêt général de la recherche de la mutation <i>MYD88</i> L265P	44
a.2. Application de la PCR digitale.....	45
b) Recherche de réarrangements clonaux sur les locus IgH, IgK et IgL.....	49
C) Analyse de la fraction acellulaire (surnageant)	52
1) Dosage des interleukines 6 et 10.....	52
2) Recherche de la mutation <i>MYD88</i> L265P par PCR digitale.....	54
a) Concept de biopsie liquide.....	54
b) Application de la biopsie liquide aux tumeurs du SNC.....	58

PARTIE 3 : Etude rétrospective au GHRMSA – Comparaison des performances des différentes techniques biologiques et intérêt de la mutation *MYD88* L265P sur l’ADN circulant du LCR dans le bilan diagnostique des PCNSL..... 61

I. OBJECTIFS	61
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	62
A) Recrutement des patients	62
B) Prélèvements biologiques et sélection des échantillons	62

C) Traitement pré-analytique.....	63
D) Cytologie conventionnelle.....	65
E) Cytométrie en flux.....	65
F) Biologie moléculaire.....	66
1) Extraction de l'ADN.....	66
2) Préparations des échantillons et du mix.....	67
3) Génération des gouttelettes, préparation de la plaque et amplification.....	68
4) Lecture de fluorescence.....	68
5) Interprétation des résultats.....	68
G) Dosage des interleukines IL-10 et IL-6.....	69

III. RÉSULTATS.....70

A) Données démographiques, diagnostiques et biologiques.....	70
B) Taux d'envahissement méningé et performances diagnostiques.....	71
C) Intérêt de la réitération des PL.....	73

IV. DISCUSSION.....74

A) Performances diagnostiques : CC, CMF et IL-10.....	74
1) CC, CMF et taux d'EM.....	74
2) Dosages de l'IL-10 et IL-6.....	76
B) Intérêt de la réitération des PL.....	77
C) Apport de l'étude du statut mutationnel du gène <i>MYD88</i>	80
1) <i>MYD88</i> L265P, un marqueur onco-moléculaire de confirmation.....	80
2) Taux de positivité de la mutation <i>MYD88</i> L265P.....	80
3) Interprétation du couple <i>MYD88</i> cellulaire / <i>MYD88</i> circulant.....	81
a) <i>MYD88</i> sur culot cellulaire et envahissement leptoméningé.....	81
b) Statut <i>MYD88</i> sur LCR et sur biopsie cérébrale.....	82
c) Intérêt de <i>MYD88</i> sur l'ADN circulant.....	82
D) PCNSL et SCNSL.....	84
E) Statut <i>MYD88</i> plasmatique et clones pré-lymphomateux sanguins.....	86
F) Problématique de la contamination sanguine du LCR.....	89
G) Perspectives.....	91

CONCLUSION.....94

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A

ABC : activated B-cells
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN cellulaire
ADNcf : ADN cell free (circulant)
ADNct : ADN circulant tumoral
AID : activated-induced cytidine desaminase
AP-HP : Assistance Publique des Hôpitaux de Paris
Ara-C : cytarabine
ARN : acide ribonucléique

B

BCL : B-cell lymphoma
BCR : B-cell receptor
BHE : barrière hémato-encéphalique
BLNK : B-cell linker protein

C

CARD11 : caspase recruitment domain-containing protein 11
CBA : cytometric bead array
CBTRUS : Central Brain Tumor Registry of the United States
CC : cytologie conventionnelle
CD : cluster de différenciation
CDKN2A : cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CG : centre germinatif
CMF : cytométrie en flux
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
c-MYC : c-myelocytomatosis
CpG : cytosine-phosphate-guanine
CSH : cellules souches hématopoïétiques
CTCs : cellules tumorales circulantes
CXCL13 : chemokine (C-X-C) ligand 13

CXCR5 : chemokine (C-X-C) receptor 5

D

DD : death domain
ddPCR : digital droplet PCR
DLBCL : diffuse large B-cells lymphoma

E

EBV : Epstein-Barr virus
ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
EM : envahissement méningé
ETV6 : E26 transformation-specific family transcription repressor and tumor vasopressor variant 6

F

FSC : forward light scatter

G

GHRMSA : Groupe Hospitalier de la Région de Mulhouse et Sud-Alsace

H

HCC : Hôpitaux Civils de Colmar
HLA : human leukocyte antigen
HMS : hypermutation somatique

I

IELSG : International Extranodal Lymphoma Study Group
IgH : immunoglobulin heavy chain
IgK : immunoglobulin kappa chain
IgL : immunoglobuline lambda chain
IκB : inhibitor of NF-κB

IKK : IκB kinase

IL : interleukine

IRAK : interleukine-1 receptor associated kinase

IRM : imagerie par résonance magnétique

ISOLD : interleukin score for intra-ocular lymphoma diagnosis

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif

J

JAK : janus-associated kinase

L

LB : lymphocyte B

LCR : liquide céphalo-rachidien

LDH : lactate déshydrogénase

LEMP : leucoencéphalopathie multifocale progressive

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LNH : lymphome non hodgkinien

LOC : lymphome oculo-cérébral

LRTBC : liquide de rinçage de trocart de biopsie cérébrale

LT : lymphocyte T

LYN : Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase

LZM : lymphome de la zone marginale

M

MALT : mucosa-associated lymphoid tissues

MALT1 : mucosa-associated lymphoid tissues translocation protein 1

MCD : *MYD88-CD79b*

MFI : intensité de fluorescence moyenne

MGG : May-Grünwald Giemsa

MSKCC : Memorial Sloan Kettering Cancer Center

m-TOR : mammalian target of rapamycin

MTX-HD : méthotrexate à haute dose

MUM1/IRF4 : multiple myeloma oncogene 1/interferon regulatory factor 4

MW : maladie de Waldenström

MYD88 : myeloid differentiation primary response protein 88

N

NF-κB : nuclear factor kappa B

NGS : next-generation sequencing

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAX5 : paired box 5

PCNSL : primary central nervous system lymphoma

PCR : polymerase chain reaction

PIM1 : proviral integration of moloney murine leukemia virus kinase family 1

PL : ponction lombaire

PRDM1 : positive regulatory domain 1

R

RAG : recombination activating gene

S

SCNSL : secondary central nervous system lymphoma

SFK : SRC family kinase

SIDA : syndrome d'immunodéficiences acquise

SNC : système nerveux central

SR : syndrome de Richter

SSC : side light scatter

STAT : signal transducer and activation of transcription

SYK : spleen associated tyrosine kinase

T

TBL1XR1 : transducin β -like 1 X-linked receptor 1

TCR : T-cell receptor

TDM : tomodensitométrie

TdT : terminal deoxynucleotidyl transferase

TEP : tomographie à émission de positons

TIR : toll-interleukine 1 receptor

TLR : toll-like receptor

TNFAIP3 : tumor necrosis factor alpha-induced protein 3

TOX : thymocyte selection-associated HMG box

V

VAF : variant allele frequency

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

W

WT : wild-type

TABLE DES FIGURES

- Figure 1.** Modèle de BCR et mécanismes moléculaires à l'origine de la séquence codante de l'Ig.
- Figure 2.** Différenciation centro-germinative des LB.
- Figure 3.** Développement lymphomateux hypothétique des PCNSL.
- Figure 4.** Physiologie de la voie de signalisation NF- κ B.
- Figure 5.** Courbes de survie des patients regroupés selon le score de l'IESLG.
- Figure 6.** Images typiques d'un PCNSL de l'immunocompétent.
- Figure 7.** Images typiques d'un PCNSL de l'immunodéficient.
- Figure 8.** IRM compatible avec une atteinte leptoméningée extensive de PCNSL.
- Figure 9.** Impact des glucocorticoïdes sur l'IRM.
- Figure 10.** Classification de Hans *et al.* pour les DLBCL.
- Figure 11.** Examen immunohistochimique d'un DLBCL-ABC.
- Figure 12.** Représentation schématique de l'étendue des spectres phénotypiques des PCNSL et des DLBCL systémiques par rapport à l'évolution physiologique du phénotype lymphocytaire B.
- Figure 13.** Aspects morphologiques des PCNSL.
- Figure 14.** Principe du cytomètre en flux.
- Figure 15.** Représentation des différents paramètres cellulaires analysés par CMF.
- Figure 16.** Immunophénotypage d'un LCR envahi par un DLBCL.
- Figure 17.** Principe général de la technique de ddPCR.
- Figure 18.** Résultats de ddPCR d'un patient *MYD88* L265P muté dans le culot cellulaire du LCR.
- Figure 19.** Comparaison des procédures et des performances entre la qPCR et la ddPCR.
- Figure 20.** Modèle du panel de première intention recommandé par BIOMED-2 pour la recherche d'un réarrangement clonal sur le locus IgH, extrait de la notice d'emploi IdentiClone® (*IGH + IGK B-cell clonality assay* – Invivoscribe, 2022).
- Figure 21.** Exemples de profils moléculaires types sur le locus IgH.
- Figure 22.** Sources physiopathologiques de l'ADN circulant.
- Figure 23.** Intérêt du LCR dans la recherche d'ADN circulant tumoral pour les tumeurs du SNC.
- Figure 24.** Gestion pré-analytique des échantillons de LCR au laboratoire.
- Figure 25.** Modèles d'évolution clonale individuelle pour 9 patients de la littérature.

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1. Définition des paramètres de mauvais pronostic selon l'IESLG.

Tableau 2. Panel d'anticorps n°1 employé avec le cytomètre FACSCanto II.

Tableau 3. Panel d'anticorps n°2 employé avec le cytomètre Navios EX.

Tableau 4. Données démographiques et biologiques des 76 patients.

Tableau 5. Données biologiques des 21 PCNSL et taux de positivité.

Tableau 6. Résultats du groupe contrôle et spécificités diagnostiques.

INTRODUCTION

Les lymphomes primitifs du système nerveux central (SNC) désignent une entité lymphomateuse à part selon la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) de 2017. Ils se définissent par une localisation exclusivement centrale, et par l'absence de toute maladie systémique. Bien qu'il s'agisse d'une pathologie rare, l'augmentation de son incidence reste préoccupante, particulièrement chez les individus immunocompétents. De plus, elle montre un pronostic plutôt sombre, et les différentes stratégies thérapeutiques se révèlent à ce jour inefficaces pour rallonger significativement l'espérance de vie des patients.

Alors que les manifestations cliniques éventuelles restent totalement aspécifiques, ce sont les examens d'imagerie médicale qui permettront d'abord de confirmer la présence de lésions au niveau du SNC. Tandis que certains aspects peuvent être caractéristiques d'un lymphome du SNC, ceux-ci ne sont pas suffisants pour confirmer cette étiologie. Actuellement, l'examen anatomopathologique d'un échantillon tumoral demeure le gold standard diagnostique, permettant de caractériser la tumeur et de poser formellement le diagnostic. Le recours à une biopsie tissulaire réalisée par un neurochirurgien est alors indispensable. Un tel geste opératoire n'est cependant pas dénué de risques, et la localisation anatomique de la tumeur peut parfois freiner la démarche diagnostique.

Des alternatives ont d'ores et déjà démontré leurs performances dans l'établissement du diagnostic d'un lymphome du SNC. En effet, la recherche de cellules lymphomateuses par des techniques de biologie médicale peut s'avérer concluante, à travers des prélèvements de liquide céphalo-rachidien (LCR) dont le recueil reste plus aisé qu'une biopsie centrale. Ainsi, la preuve cellulaire cytologique et phénotypique de la présence de cellules malignes dans le compartiment méningé peut se substituer au diagnostic histologique de référence. Toutefois, cette dissémination lymphomateuse méningée étant soumise à une grande variabilité inter- et intra-individuelle, il devient primordial de développer de nouveaux outils dans le but d'améliorer la sensibilité diagnostique des lymphomes primitifs du SNC (PCNSL).

L'étude présentée dans ce rapport a été pilotée par le laboratoire d'Hématologie du Centre Hospitalier de Mulhouse dans le but de comparer les performances dans le LCR des différentes techniques biologiques à disposition. Tout particulièrement, l'intérêt de la recherche par *polymerase chain reaction* (PCR) digitale de la mutation L265P du gène *MYD88*, une mutation fréquemment rencontrée dans les PCNSL, a été évaluée dans le LCR et notamment dans la fraction acellulaire. Les objectifs étaient d'optimiser le diagnostic biologique de cette pathologie en intégrant ce paramètre au bilan initial comprenant la cytologie, la cytométrie en flux et le dosage des interleukines, ainsi que d'évaluer la pertinence de la réitération des prélèvements de LCR chez un même patient.

PARTIE 1 : État des lieux sur les lymphomes du système nerveux central

I. GÉNÉRALITÉS

A) Définitions et classification

Les lymphomes du SNC sont définis comme étant des hémopathies malignes de type lymphomes non hodgkiniens (LNH), localisés au niveau neuro-oculo-méningé. Plus précisément, l'OMS qualifie une atteinte de centrale lorsqu'elle concerne l'encéphale, la moelle épinière, les leptoméninges (arachnoïde et pie-mère) ou encore les yeux. Elle exclut de cette définition les lymphomes de la dure-mère, généralement de type lymphome B des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT) ou de la zone marginale (LZM), ainsi que les lymphomes B intravasculaires à grandes cellules.^{1,2}

L'origine des cellules lymphoïdes malignes permet également de distinguer les lymphomes du SNC primitifs (PCNSL), caractérisés par une localisation extra-nodulaire et exclusivement centrale, des lymphomes du SNC secondaires à la dissémination d'une pathologie lymphomateuse initialement nodulaire ou systémique (SCNSL). Parmi les PCNSL, la classification OMS 2017 des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes (4^{ème} édition révisée) reconnaît uniquement les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) primitifs du SNC comme entité à part entière, les DLBCL représentant près de 95% des PCNSL.¹

Les lymphomes du SNC associés à une immunodéficience, qu'ils soient primitifs ou secondaires, font l'objet d'un groupe indépendant selon la classification OMS 2021 des tumeurs du SNC (5^{ème} édition), regroupant les DLBCL associés au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et les DLBCL positifs au virus d'Epstein-Barr (EBV).²

B) Sous-types histologiques

Les PCNSL englobent différentes catégories histologiques, dont la principale est définie comme une entité en tant que telle dans la classification OMS des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes.¹ En effet, les DLBCL représentent entre 90 et 95% de la totalité des PCNSL.³⁻⁵ Il s'agit précisément de cellules lymphoïdes de lignée B, caractérisées par leur grande taille et de morphologie immunoblastique ou centroblastique.^{1,6} Deux sous-types histologiques peuvent être distingués parmi l'ensemble des DLBCL (systémiques, nodulaires et extra-nodulaires) : les DLBCL possédant une origine centro-germinative (CG), et les DLBCL non centro-germinatifs (non-CG) de phénotype cellulaire B activé (ABC). Tandis que la répartition générale de ces deux sous-types est plutôt équilibrée avec un léger avantage pour le sous type centro-germinatif (approximativement 60% et 40% correspondant respectivement aux DLBCL-CG et DLBCL-ABC en fonction des critères de classification employés⁷), le phénotype ABC est largement prédominant parmi les PCNSL puisqu'il est

rencontré dans près de 78 à 96% des cas selon les études.^{6,8-12} L'existence d'un troisième profil distinct, et l'émergence plus récente de classifications moléculaires pour les DLBCL et les PCNSL explicitées plus loin dans ce mémoire viennent remettre en cause la pertinence de la classification historique CG/ABC.

Les cas de PCNSL restants, beaucoup plus rares, se rencontrent dans des proportions similaires et peuvent correspondre à des lymphomes B indolents, d'autres lymphomes B agressifs (lymphome de Burkitt, lymphome lymphoblastique), des lymphomes inclassables ou encore des lymphomes T tels que les lymphomes anaplasiques.³⁻⁵ Ces derniers surviennent d'ailleurs plus fréquemment dans un contexte d'immunodéficience.¹³ A noter que les lymphomes du SNC de types T, NK, ou B de bas grade, ainsi que les granulomatoses lymphomatoïdes sont définis dans la classification OMS des tumeurs du SNC.² De façon exceptionnelle, un lymphome de Hodgkin peut également se manifester primitivement au niveau du SNC, avec 22 cas rapportés dans la littérature en 2021.^{5,14}

Les caractéristiques cytologiques, phénotypiques et histologiques des DLBCL sont relativement semblables entre les patients immunocompétents et immunodéprimés. La positivité pour l'EBV des cellules lymphomateuses chez l'immunodéficient reste l'unique différence notable, puisqu'elle est retrouvée dans la quasi-totalité des PCNSL de lignée B associés au VIH.^{1,4,15,16}

Concernant les SCNSL, il peut s'agir d'une infiltration soit par un clone cellulaire identique au clone nodulaire ou systémique, soit par un clone agressif résultant de l'évolution du clone initial, et se rapprochant alors des caractéristiques d'un lymphome à grandes cellules, indépendamment du caractère primitif ou secondaire.

C) Épidémiologie

La proportion de lymphomes systémiques évoluant en SCNSL, variable au sein de la littérature, est grandement influencée par l'usage d'une prophylaxie contre les rechutes neuro-méningées et le sous-type histologique incriminé.¹⁷ Il apparaît que 2 à 27% des LNH seraient concernés par une évolution centrale.¹⁸ Ce chiffre est minoré en cas de prophylaxie neuro-méningée et de LNH indolent, tandis qu'il peut avoisiner les 50% en cas de lymphome agressif n'ayant pas bénéficié d'une prophylaxie.^{12,19,20}

Les PCNSL représentent entre 2 à 4% de toutes les tumeurs cérébrales confondues selon les études.^{1,13,21,22} Entre 2014 et 2018, le registre central des tumeurs cérébrales des États-Unis (CBTRUS) a évalué la proportion relative des PCNSL à 6,7% parmi les tumeurs cérébrales uniquement de caractère malin.²³ Ils représenteraient approximativement 1% de l'ensemble des cas de LNH (nodulaires, extra-nodulaires et systémiques inclus) dans la population globale,^{1,3,18,24} et montrent un âge médian au diagnostic de 60 à 67 ans selon les sources,^{1,12,21} ainsi qu'un sex ratio hommes/femmes à 1,5.¹

Avec une incidence globale annuelle de 4.5 pour 1 000 000 d'habitants entre 2014 et 2018,²³ les PCNSL sont considérés comme des pathologies rares selon les critères de l'OMS (taux d'incidence annuelle < 6 pour 100 000).⁹ Ce chiffre confirmé par les données d'autres sources,^{1,12,25} bien que constant durant les deux dernières décennies, ne reflète pourtant pas la dynamique réelle de cette pathologie.

Premièrement, l'incidence des PCNSL associés à une immunodéficience, notamment chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) au stade SIDA, est plus élevée que l'incidence chez les immunocompétents. Environ 2 à 6% des patients victimes du VIH développaient un PCNSL avant l'ère des traitements antirétroviraux,³ représentant alors entre 12 et 15% de l'ensemble des LNH diagnostiqués dans cette population.^{15,16} Avec les autres DLBCL, le lymphome de Burkitt et le lymphome de Hodgkin, les PCNSL font partie des LNH les plus fréquemment observés chez les immunodéprimés.^{16,25} Tandis que les PCNSL de l'immunocompétent concernent la population de plus de 50-60 ans, les PCNSL de l'immunodéprimé concernent plutôt les patients âgés de 20 à 40 ans.^{3,16}

Deuxièmement, bien que l'incidence globale (immunocompétents et immunodéprimés compris) soit contrôlée de nos jours, elle n'a pas toujours été stable par le passé. Elle a connu un accroissement majeur dans les années 80 et 90, pour atteindre un pic à près de 10 cas pour 1 000 000 d'habitants en 1995, incontestablement relié à l'épidémie de VIH qui a sévi durant cette même période.^{25,26} 47,2% des lymphomes du SNC diagnostiqués entre 1990 à 1995 concernaient d'ailleurs des patients porteurs du VIH, faisant ainsi de cette infection un facteur de risque majeur de PCNSL.¹⁶ Grâce à l'avènement des thérapies antirétrovirales en 1996 et aux campagnes de santé publique relatives à la prévention des infections sexuellement transmissibles, l'incidence globale des lymphomes du SNC a connu un déclin jusqu'en 1998,^{25,26} avant de se stabiliser annuellement aux alentours de 4 à 6 cas pour 1 000 000.^{5,25}

Troisièmement, la part des PCNSL est fortement influencée par l'âge des patients. Contrairement aux patients plus jeunes (20 à 59 ans) très peu concernés par les PCNSL avant l'épidémie du VIH, les patients de plus de 60 ans étaient d'ores et déjà touchés par cette pathologie. Les tranches d'âge présentant la plus forte incidence au moment du pic étaient les 30-39 ans ainsi que les 70-79 ans. Les patients de moins de 19 ans ont toujours été les plus épargnés par les PCNSL.²⁶ L'incidence globale des lymphomes du SNC chez les 20-59 ans a rapidement chuté après 1995 s'expliquant probablement par le déclin de l'incidence du VIH, ce qui n'était pas le cas chez les plus de 60 ans pour lesquels l'incidence des PCNSL est restée quasi stable. Ainsi, grâce au succès des thérapies antirétrovirales, l'incidence des PCNSL a considérablement diminué chez les porteurs du VIH, mais elle tendrait actuellement à se stabiliser voire à s'accroître chez les immunocompétents, et notamment chez les plus de 60 ans.^{6,9,12,25,26}

II. PHYSIOPATHOLOGIE

A) Rappels sur la lymphopoïèse B

1) Développement médullaire des lymphocytes B

Le développement des lymphocytes B (LB) démarre dans la moelle osseuse (organe lymphoïde primaire des LB) à partir d'un progéniteur lymphoïde commun, lui-même issu d'une cellule souche hématopoïétique (CSH). Cette première étape ontogénique est caractérisée par l'édition progressive d'un récepteur cellulaire B (BCR) de surface, dont la structure s'apparente à celle d'une immunoglobuline (Ig) greffée à la membrane du lymphocyte, et dont le rôle réside dans la reconnaissance de divers antigènes. La constitution protéique du BCR comprend deux chaînes lourdes (codées par le locus IgH porté par le chromosome 14), chacune associée à une chaîne légère de type kappa ou lambda (codées par les locus IgK et IgL portés respectivement par les chromosomes 2 et 22). Elles sont toutes composées d'une partie constante et d'une partie variable, dont la séquence résulte d'une combinaison génétique des gènes *variability*, *diversity* et *join* (V_H , D_H et J_H) pour la chaîne lourde (*Heavy*) et uniquement des gènes V_K/V_L et J_K/J_L pour les chaînes légères kappa et lambda. Le BCR est ancré à la membrane lymphocytaire via les deux chaînes lourdes, et grâce à deux corécepteurs dimériques transmembranaires, composés des sous-unités de type cluster de différenciation (CD) 79A et 79B (figures 1a et 1b).²⁷⁻²⁹

Tandis que la partie constante influencera les fonctions effectrices du BCR ou de l'Ig, c'est la diversité structurelle de la partie variable qui va contribuer dans un premier temps à la reconnaissance de très nombreux épitopes antigéniques. Le BCR possède ainsi deux sites de reconnaissance, chacun étant composé de la partie variable d'une chaîne légère et de la partie variable d'une chaîne lourde. La recombinaison VDJ résulte donc d'un processus génétique par le biais duquel des séquences de taille variable sont successivement coupées et réassemblées par un système complexe comprenant différentes enzymes : les enzymes recombinases, notamment RAG1 et RAG2, responsables des coupures du double brin d'acide désoxyribonucléique (ADN) ; des exonucléases, avec un rôle d'élimination des nucléotides excédentaires ; des désoxynucléotidyl transférases, notamment la TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*), responsables de l'ajout de nucléotides terminaux avant l'étape de jonction des séquences ; des ADN-ligases, enzymes de réparation de l'ADN et de réassemblage des séquences. La séquence VDJ finale codant la partie variable des chaînes d'Ig résulte ainsi de réarrangements purement aléatoires impliquant les gènes V , D et J , à l'origine du répertoire diversifié et polyclonal de LB (figure 1b). A partir de tests de reconnaissance des antigènes exogènes et du soi, l'intégralité des lymphocytes générés subira des étapes de sélection négative (élimination ou anergisme des cellules autoréactives) et de sélection positive (conservation des cellules tolérées avec un programme de reconnaissance BCR-médié satisfaisant, moyennant parfois une réédition du BCR pour limiter l'autoréactivité).²⁷⁻²⁹

A sa sortie de la moelle osseuse, le LB périphérique a donc achevé sa maturation cellulaire, mais bien qu'il puisse reconnaître un panel d'antigènes significatif à l'aide d'un prototype de BCR, il demeure naïf d'un point de vue immunitaire et pourra poursuivre sa maturation immunologique dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate et MALT).²⁷⁻²⁹

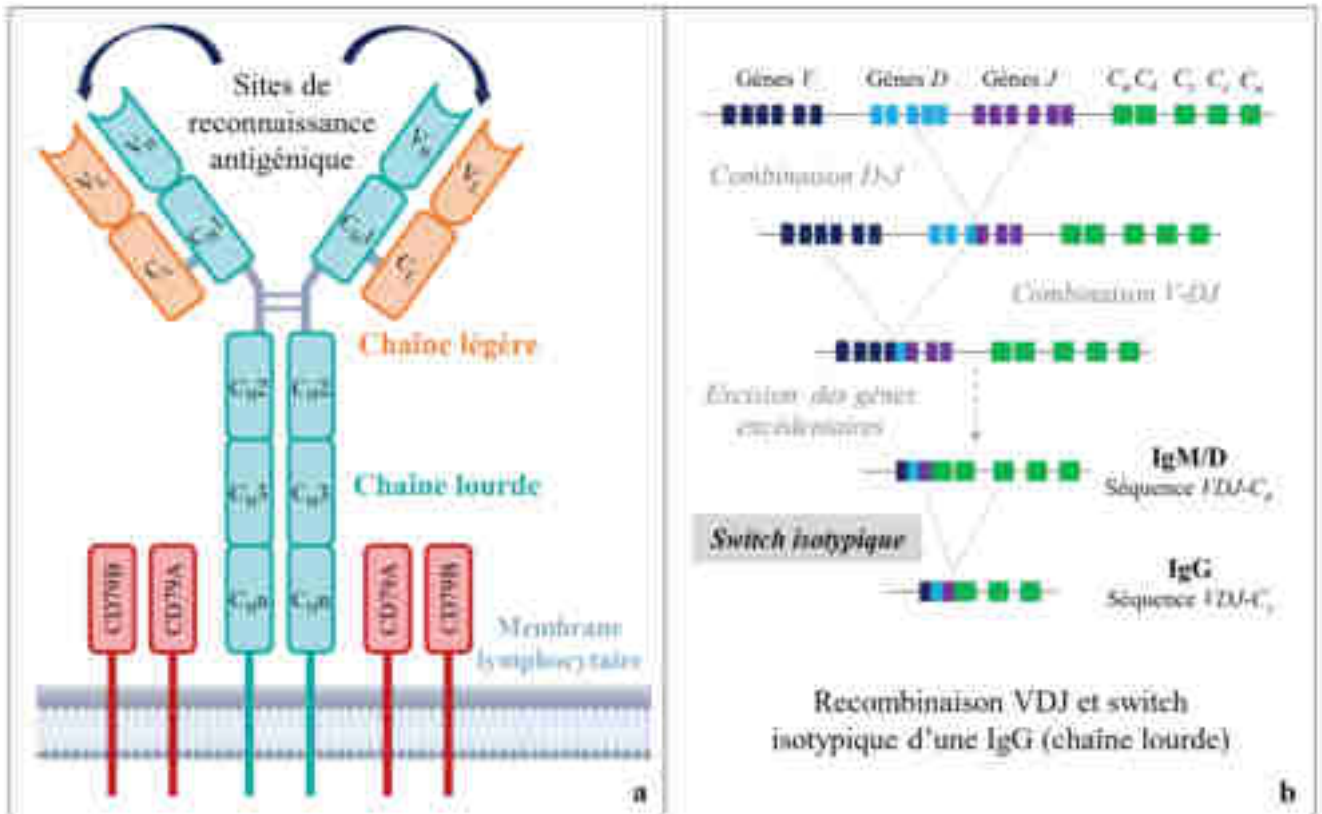


Figure 1. Modèle de BCR et mécanismes moléculaires à l'origine de la séquence codante de l'Ig.

(1a) Le BCR correspond à une Ig ancrée à la membrane cellulaire du LB, dotée de 2 corécepteurs dimériques (sous-unités CD79A et CD79B). Les 2 chaînes lourdes (en bleu) sont reliées entre elles par une région charnière, et reliées chacune à une chaîne légère (en orange) par des ponts disulfures. Chaque chaîne possède une partie variable (domaines V_H et V_L) responsable de la liaison antigénique, et une partie constante, composé de plusieurs domaines (C_H ou C_L) selon l'isotype.

(1b) La partie variable des chaînes lourdes est codée par un locus génétique résultant d'une combinaison aléatoire entre les gènes V, D et J. Cette séquence est associée à un gène C codant pour la partie constante. Tandis qu'un LB naïf exprime simultanément des IgM et des IgD (C_μ et C_δ), la commutation isotypique au cours de la maturation immunologique aboutit potentiellement à une Ig de classe différente par utilisation d'un autre gène C (ici, isotype G codé par C_γ).

2) Maturation immunologique ganglionnaire des lymphocytes B

Après un premier contact antigénique, les LB pourront poursuivre leur développement soit au sein de structures dédiées dénommées follicules lymphoïdes et se trouvant à l'intérieur des ganglions lymphatiques, soit de façon extra-folliculaire et devenir rapidement des plasmocytes de courte durée de vie (figure 2). Avec la collaboration des lymphocytes T (LT) helper CD4 et de cellules dendritiques folliculaires présentatrices d'antigènes, la majorité des LB sanguins vont amorcer leur maturation immunologique dans les follicules ganglionnaires en s'accumulant et en formant progressivement des

centres germinatifs (CG). Le CG peut se distinguer en deux zones principales : une zone sombre concentrée en cellules B centroblastiques à haute activité de prolifération, et une zone claire au sein de laquelle les centroblastes finiront par pénétrer pour se différencier en centrocytes. Par un phénomène de sélection antigénique et de maturation d'affinité, les centrocytes pourront soit retourner dans la zone sombre pour reprendre leur développement, soit entamer leur différenciation en LB mémoires ou en plasmocytes de longue durée de vie et quitter alors le CG. Cette maturation immunologique repose majoritairement sur deux processus génétiques.²⁷⁻²⁹

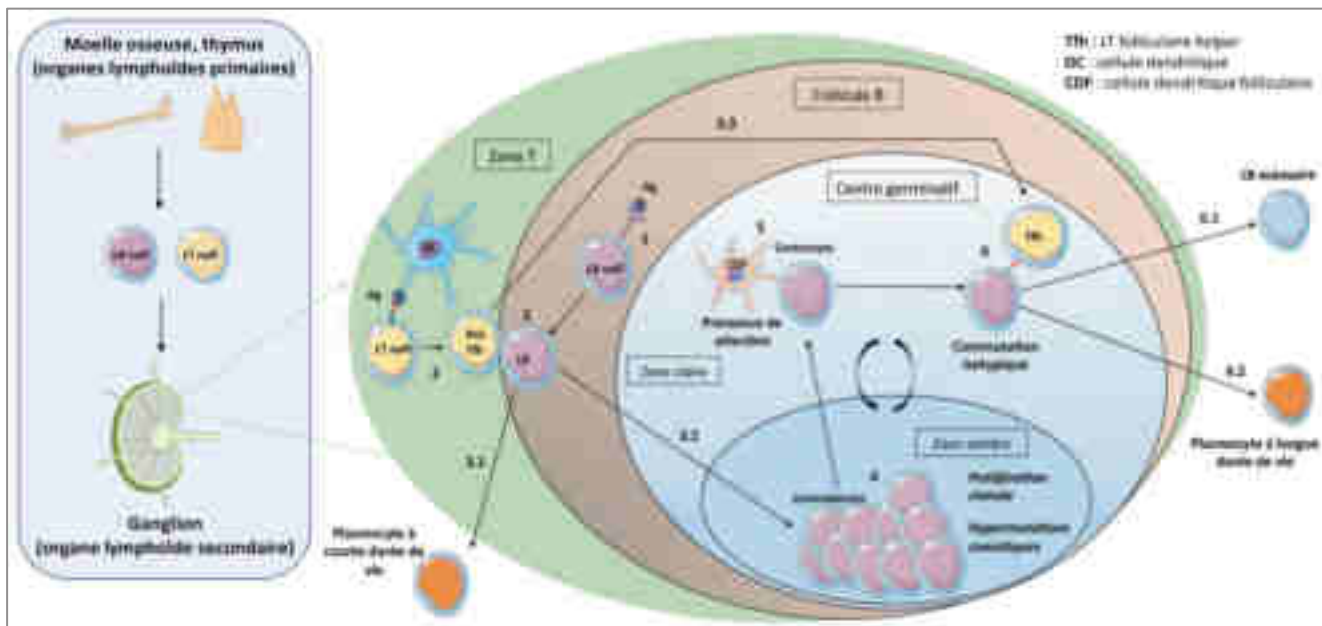


Figure 2. Différenciation centro-germinative des LB.²⁷ Les lymphocytes naïfs (n'ayant pas encore reconnu d'Ag) sont issus des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse exclusivement pour les LB, moelle osseuse puis thymus pour les LT). Ils peuvent alors patrouiller entre la circulation périphérique et les organes lymphoïdes secondaires. Les LB localisés dans le follicule B du parenchyme ganglionnaire sont capables de reconnaître un Ag sous forme libre (1). Pour bénéficier de l'aide d'un LT helper CD4, ce dernier devra au préalable avoir réagi avec le même Ag fourni par une cellule dendritique présentatrice d'Ag dans la zone T (2). Ce n'est qu'après l'activation du LB et du LT (différencié alors en pré-LT folliculaire helper) que ces deux acteurs pourront former une synapse immunologique dans le but d'enclencher la maturation immunologique du LB (3). Celui-ci peut alors poursuivre son développement de façon extra-folliculaire pour devenir rapidement un plasmocyte à courte durée de vie sécrétant d'IgM (3.1), ou à l'intérieur du follicule lymphoïde en formant un CG (3.2). Le LB se différencie alors en centroblaste et entame une première étape de prolifération clonale dans la zone sombre du CG, au cours de laquelle auront lieu les réactions d'hypermutation somatique (HMS) dans le but d'optimiser l'affinité antigénique (4). Les centroblastes se dirigent vers la zone claire du CG et deviennent des centrocytes qui subiront un processus de sélection antigénique à partir des cellules dendritiques folliculaires afin de vérifier la fonctionnalité du BCR nouvellement édité (5). En cas de reconnaissance antigénique partielle, les centrocytes peuvent retourner dans la zone sombre pour retenter le processus d'HMS (plusieurs cycles sont parfois nécessaires) ou rentrer en apoptose si les étapes n'aboutissent pas à un BCR performant. Lorsqu'un BCR optimal a été conçu, le LB pourra amorcer le switch isotypique des Ig grâce à la coopération du LT folliculaire helper mature réquisitionné au début de la réaction CG (6). Le LB peut ainsi se différencier en lymphocyte mémoire dont le rôle sera de patrouiller en périphérie dans l'attente d'une rencontre ultérieure avec l'Ag (6.1), ou en plasmocyte à longue durée de vie sécrétant de l'Ig commutée qui se logera dans la moelle osseuse (6.2).

D'une part, l'hypermutation somatique (HMS) aura pour objectif de moduler finement l'affinité antigénique du BCR par des modifications ponctuelles (et successives si besoin) d'une seule base d'ADN. L'activation de ce processus sera amorcée par l'enzyme AID (*activated-induced cytidine desaminase*), via la désamination d'une cytidine en base uracile. Cette dernière étant localisée de façon normale dans l'acide ribonucléique (ARN) mais anormale dans l'ADN, cette substitution va permettre d'introduire des mutations ponctuelles dans la partie variable des chaînes. Les complexes de réparation de l'ADN seront responsables de corriger et recouvrir l'intégrité de la séquence génétique. L'HMS peut également survenir au sein de gènes n'appartenant pas au locus IgH. De façon analogique au développement médullaire, les LB seront soumis à des phénomènes de sélections négative et positive.²⁷⁻²⁹

D'autre part, la commutation isotypique assurera la diversité fonctionnelle des BCR et des futures Ig qui en résulteront et qui seront sécrétées par les plasmocytes. Les Ig appartiennent à différentes classes (M, D, G, A et E) déterminées respectivement par les gènes C_μ , C_δ , C_γ , C_α et C_ϵ codant la partie constante des chaînes, et orientées dans le temps par les profils cytokiniques et moléculaires propres à chaque réaction immunitaire. Alors que les LB naïfs n'expriment à leur surface que des IgM et des IgD, la commutation de classe (ou switch isotypique) contribuera à affiner les fonctions effectrices des Ig en modifiant leur classe (figure 1b). A l'instar de la recombinaison VDJ, c'est la recombinaison de locus génétiques bien précis qui définira la classe de l'Ig, également sous la dépendance de l'enzyme AID. Tandis que les plasmocytes de développement extra-folliculaire de courte durée de vie ne sécrètent que des IgM, les plasmocytes issus des CG sont capables de sécréter l'ensemble des isotypes d'Ig. Par ailleurs, ces deux phénomènes ne sont pas uniques dans le temps et peuvent potentiellement se reproduire sur les mêmes cellules lors d'un stimulus immunitaire ultérieur.²⁷⁻²⁹

B) Lymphomagenèse fondamentale

1) Origine cellulaire des PCNSL

Il a été démontré que les DLBCL nodulaires et systémiques comprenaient finalement différents sous-types cellulaires ou génétiques. Sur la base de leur phénotype analysé par immunohistochimie, les DLBCL ont pu être catégorisés soit de phénotype centro-germinatif (DLBCL-CG), soit de phénotype cellulaire B activé (DLBCL-ABC), de répartitions variables selon les critères de classification propres à chaque étude.³⁰⁻³² Tandis que les cellules de type CG restent encore pleinement en cours de maturation immunologique, les cellules de type ABC ou non-CG correspondent à des lymphocytes de stade maturatif plus tardif, désignant des cellules dites « activées » : il peut s'agir de cellules CG tardives et prêtes à quitter le centre germinatif, de cellules plasmablastiques (futurs plasmocytes), ou encore de cellules post-CG ayant achevé leur processus de maturation immunologique (cellules mémoires). Tandis que les DLBCL-CG sont caractérisés par des réactions d'HMS massives encore actives ainsi qu'une commutation isotypique achevée, les DLBCL-ABC présentent des stigmates d'HMS certes massive

mais aboutie, une immunoglobuline hautement mutée, et une absence complète de switch isotypique, à l'origine d'une expression exclusive d'IgM et d'IgD. Bien que ces cellules lymphomateuses soient matures sur les plans cellulaire et immunologique, les DLBCL-ABC se caractérisent néanmoins par un blocage de différenciation marqué. L'activation de la voie de signalisation impliquant le *nuclear factor-kappa B* (NF-κB) semble également témoigner du caractère activé des DLBCL-ABC.^{1,28,33}

En plus de l'intérêt purement biologique, une telle distinction possède également une dimension pronostique, puisqu'il a été prouvé que les DLBCL-ABC présentaient une survie significativement plus courte que les DLBCL-CG.^{13,31,32}

L'étude du profil génétique des tumeurs à l'aide de puces à ADN (*microarrays*) constitue une deuxième méthode de classification des DLBCL.^{7,32,34,35} Alors qu'elle permet de bien distinguer les DLBCL-CG des DLBCL-ABC à partir d'un panel de gènes exprimés dans l'un ou l'autre de ces deux sous-types, elle offre l'extraction d'un troisième sous-type qualifié d'inclassable en raison d'un profil moléculaire trop hétérogène et différent par rapport aux deux profils précédents. Une tendance identique à celle obtenue par immunohistochimie était observée en termes de pronostic, avec un troisième groupe de pronostic équivalent à celui des DLBCL-ABC.^{32,34,35} Ce troisième groupe de DLBCL représenterait entre 11 et 18% des DLBCL, ramenant ainsi les DLBCL-CG à 50-56% des cas, et les DLBCL-ABC à 29-32% des cas selon les études et selon les gènes analysés.^{7,32}

Hormis les discordances entre les deux méthodes quant à la distinction des DLBCL-CG et DLBCL-ABC, l'existence d'un troisième sous-type génétique apporte un biais dans la classification binaire phénotypique, puisque les DLBCL y appartenant sont obligatoirement reclassés dans un des deux sous-types immunohistochimiques.^{7,32} Hans *et al.* ont été les premiers à évaluer la corrélation de ces deux méthodes de classification. Bien que des discordances restent inévitables, celles-ci n'ont cependant pas impacté le pronostic qui avait été attribué aux cas concernés, validant ainsi l'utilisation de l'immunohistochimie et des deux sous-types principaux en routine.³² D'autres travaux ont également montré que les deux méthodes de classification étaient relativement bien corrélées sur le plan diagnostique.⁷

Concernant les PCNSL, une discrimination histologique semble plus complexe à établir. Bien que la classification immunohistochimique soit appliquée aux DLBCL du SNC et révèle une très grande majorité de DLBCL-ABC (78 à 96% des cas selon les études),^{6,8-12} il se pourrait que cet algorithme soit utilisé à tort dans le cadre des PCNSL. L'analyse du profil génétique de 21 PCNSL a permis d'avancer certains éléments de réponse quant à l'origine de ces cellules tumorales.³⁶

D'une part, les DLBCL du SNC présentent bel et bien des similitudes avec les DLBCL nodulaires ou systémiques. D'autre part, les PCNSL semblent être parfaitement répartis entre les trois profils génétiques évoqués plus haut à partir de la classification moléculaire des DLBCL. Ceci pourrait présager d'une entité unique au sein des PCNSL (dont le profil génétique s'étendrait sur l'ensemble du spectre

génomique des DLBCL systémiques), plutôt que de sous-types bien distincts. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus en immunohistochimie qui sont majoritairement en faveur de PCNSL de type ABC. Cependant, la comparaison avec les profils moléculaires des différentes populations de LB folliculaires sains a révélé que les cellules de PCNSL étaient plus proches du génotype des cellules mémoires (bien que la maturation au stade de cellules post-CG ne soit pas aboutie) et donc de type ABC, que des cellules de type CG. Ceci pourrait potentiellement expliquer que la majorité des sous-types de PCNSL rencontrés selon la classification anatomopathologique soit de type DLBCL-ABC.¹¹ Pourtant, certains éléments des PCNSL orientent également vers une origine centro-germinative, telle que l'HMS encore active ou encore l'expression du *B-cell lymphoma-6* (BCL-6), marqueur avéré de CG.

Ainsi, sur le plan ontogénique, les PCNSL correspondraient à un stade cellulaire recouvrant principalement les cellules B centro-germinatives tardives et les cellules B post-CG précoces (précisions phénotypiques détaillées dans la partie du diagnostic anatomopathologique). Ils possèderaient de ce fait une origine centro-germinative plus ou moins ancienne, et partageraient des caractéristiques communes avec les DLBCL-CG (HMS actives en cours, expression de BCL-6) et les DLBCL-ABC (absence de commutation isotypique, blocage de différenciation, expression de marqueurs cellulaires d'activation, activation de la voie de signalisation NF- κ B).^{11,22,33}

Plus récemment, le mode de classification des DLBCL basé sur le sous-type cellulaire d'origine (CG ou ABC) a été remis en question par diverses études indépendantes ayant élaboré une classification moléculaire innovante en associant la recherche de mutations somatiques récurrentes, d'anomalies de nombre de copies de gènes d'intérêt, et de réarrangements chromosomiques. Il semblerait que les DLBCL puissent donc être distingués selon 5 à 7 groupes moléculaires, aux profils génétiques et pronostiques différents.³⁷⁻³⁹ Ceci pourrait traduire les variabilités pronostique et d'efficacité thérapeutique observées avec la classification binaire historique CG/ABC, d'autant plus que certains groupes semblent être plutôt représentés par un sous-type cellulaire que par l'autre. Bien que les auteurs s'accordent globalement sur l'existence de ces entités moléculaires et l'équivalence de certains groupes entre les études indépendantes, d'autres données restent insuffisamment robustes pour justifier l'abandon de la classification historique au profit de la classification moléculaire.⁴⁰ Un des groupes moléculaires semble néanmoins être fortement voire exclusivement impliqué dans le développement de DLBCL extra-nodaux, dont ceux affectant le SNC et les testicules.³⁷⁻³⁹

2) Mécanismes de l'atteinte exclusive du SNC

L'atteinte exclusive du SNC (qui définit les PCNSL) fait actuellement l'objet de multiples controverses concernant les mécanismes physiopathologiques impliqués. Tout d'abord, le SNC représente un territoire anatomique immunologiquement privilégié, puisque l'accès aux différents acteurs du système

immunitaire (cellules présentatrices d'antigène, LT et LB entre autres) y est relativement restreint par la protection naturelle que forme la barrière hémato-encéphalique (BHE). Il s'agit donc d'un environnement de choix pour les cellules tumorales, qui pourront ainsi survivre de façon localisée en échappant au système immunitaire.¹⁹ Le SNC peut donc être qualifié de sanctuaire immunologique, au même titre que les testicules et les territoires oculaires, qui de ce fait demeurent étroitement liés entre eux. L'extension de DLBCL testiculaires ou oculaires primitifs au SNC est d'ailleurs déjà rapportée dans des cas de rechutes.¹

En sachant que les profils génétiques des cellules lymphomateuses traduisent de manière formelle un processus de sélection antigénique qui serait à l'origine des aberrations moléculaires et de leur caractère malin, plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer le développement des PCNSL.¹⁹ La question principale est de savoir si les LB acquièrent leur caractère malin avant ou après pénétration dans le SNC, ou bien en deux temps.^{19,41}

Une première hypothèse est que les clones malins pourraient être issus d'une maturation lymphocytaire B anormale ayant lieu exclusivement à l'intérieur des organes lymphoïdes (moelle osseuse, ganglions lymphatiques périphériques), avec pour conséquence une expansion systémique des cellules lymphomateuses. Les processus de défense anti-tumorale périphériques permettraient naturellement d'éliminer le contingent mineur de clones malins, à l'exception de ceux qui se seraient logés aléatoirement dans un sanctuaire immunologique tel que le SNC, et qui continueraient d'y proliférer, à l'abri du système immunitaire.

Une seconde hypothèse consisterait à dire que l'expansion des cellules malignes au SNC pourrait survenir, non pas par le fruit du hasard, mais à partir de l'acquisition d'un tropisme élevé pour le SNC lors d'une maturation anormale dans les ganglions. Les clones seraient donc naturellement destinés à rejoindre le SNC pour continuer de s'y développer.

Une dernière hypothèse avance le fait que les clones de PCNSL pourraient résulter d'événements oncogéniques se produisant exclusivement au niveau du SNC, à la suite d'un passage massif de LB sains à travers une BHE altérée, lors d'épisodes infectieux ou inflammatoires cérébro-méningés par exemple. Un contingent de ces cellules B pourrait persister dans le SNC après résolution de l'épisode aigu, et acquérir progressivement des aberrations génétiques ne pouvant être résolues efficacement par les défenses anti-tumorales physiologiques en raison de la localisation immunologiquement privilégiée.

L'idée que des remaniements moléculaires aient pu survenir suite à une stimulation antigénique au sein même du SNC semble peu probable au premier abord, étant donné l'accès restreint aux cellules immunitaires, et l'absence de ganglions lymphatiques et donc de centres germinatifs dans ce territoire.^{19,33,42} Il a cependant été démontré que le BCR de certaines cellules lymphomateuses de PCNSL étaient capables de reconnaître des antigènes exprimés physiologiquement dans le SNC. Ceci pourrait

justifier non seulement leur confinement dans ce territoire précis, mais également l'existence d'une stimulation antigénique continue locale responsable de la prolifération et de la survie des cellules malignes, potentiellement à l'origine d'aberrations moléculaires, et ce malgré le statut immunologiquement privilégié du SNC.⁴¹ Avec l'évidence de phénomènes actifs d'HMS encore en cours au sein des clones de PCNSL (preuve de l'incapacité de ces lymphocytes à achever leur processus centro-germinatif), la question d'un microenvironnement immunitaire local se pose alors.³³ A défaut de follicules lymphoïdes véritables et de structures spécialement dédiées telles que les ganglions, les différentes cellules du tissu cérébral (astrocytes, oligodendrocytes, neurones, cellules épendymaires, cellules endothéliales, macrophages etc...) pourraient jouer un rôle crucial dans les processus immunitaires cérébraux. Avec l'aide de LT helpers, ce microenvironnement contribuerait ainsi à une lymphomagenèse d'origine extra-nodale au sein de ce qui pourrait être potentiellement qualifié de centre germinatif ectopique.^{33,41,43}

Un confinement sélectif et simultané de clones malins au niveau du SNC, développés exclusivement au sein des organes lymphoïdes périphériques, et résultant d'un phénomène purement aléatoire semble peu probable. En revanche, la participation mutuelle au développement oncogène de ces lymphocytes des ganglions périphériques dans un premier temps, et du SNC dans un second temps n'est pas exclue (figure 3). Cette théorie expose alors la notion de clones pré-lymphomateux qui transiteraient temporairement par la circulation générale, mais qui ne donneraient pas lieu pour autant à un lymphome systémique. Le tropisme cérébral des clones pourrait être acquis en périphérie, soit par reconnaissance directe des antigènes du SNC, ou bien par mimétisme épitopique avec d'autres antigènes extra-SNC. Les clones poursuivraient ensuite leur développement malin dans le SNC à l'abri du système immunitaire, et malgré tout au sein d'un microenvironnement de soutien et de stimulation antigénique via un BCR polyréactif et hautement muté. Un processus d'HMS ectopique, accru et aberrant, ainsi que l'accumulation d'aberration moléculaires en seraient les conséquences, aboutissant aux cellules lymphomateuses terminales.^{33,41,43}

C) Pathogénie moléculaire et immunopathologie

1) Préambule sur la lymphomagenèse moléculaire

La recombinaison VDJ, l'HMS et la commutation isotypique désignent les trois processus génétiques cruciaux dans le développement immunologique des LB. Ils impliquent de multiples cassures d'ADN rapidement réparées par des systèmes enzymatiques adaptés. De toute évidence, il s'agit là d'évènements pourvoyeurs de mutations génétiques, qui ne sont potentiellement pas toutes correctement prises en charge par les systèmes physiologiques de réparation de l'ADN. Les dommages de l'ADN consécutifs pourraient alors représenter de véritables évènements oncogéniques initiateurs d'un développement lymphomateux. En plus des mutations ponctuelles induites, les remaniements structuraux pourraient

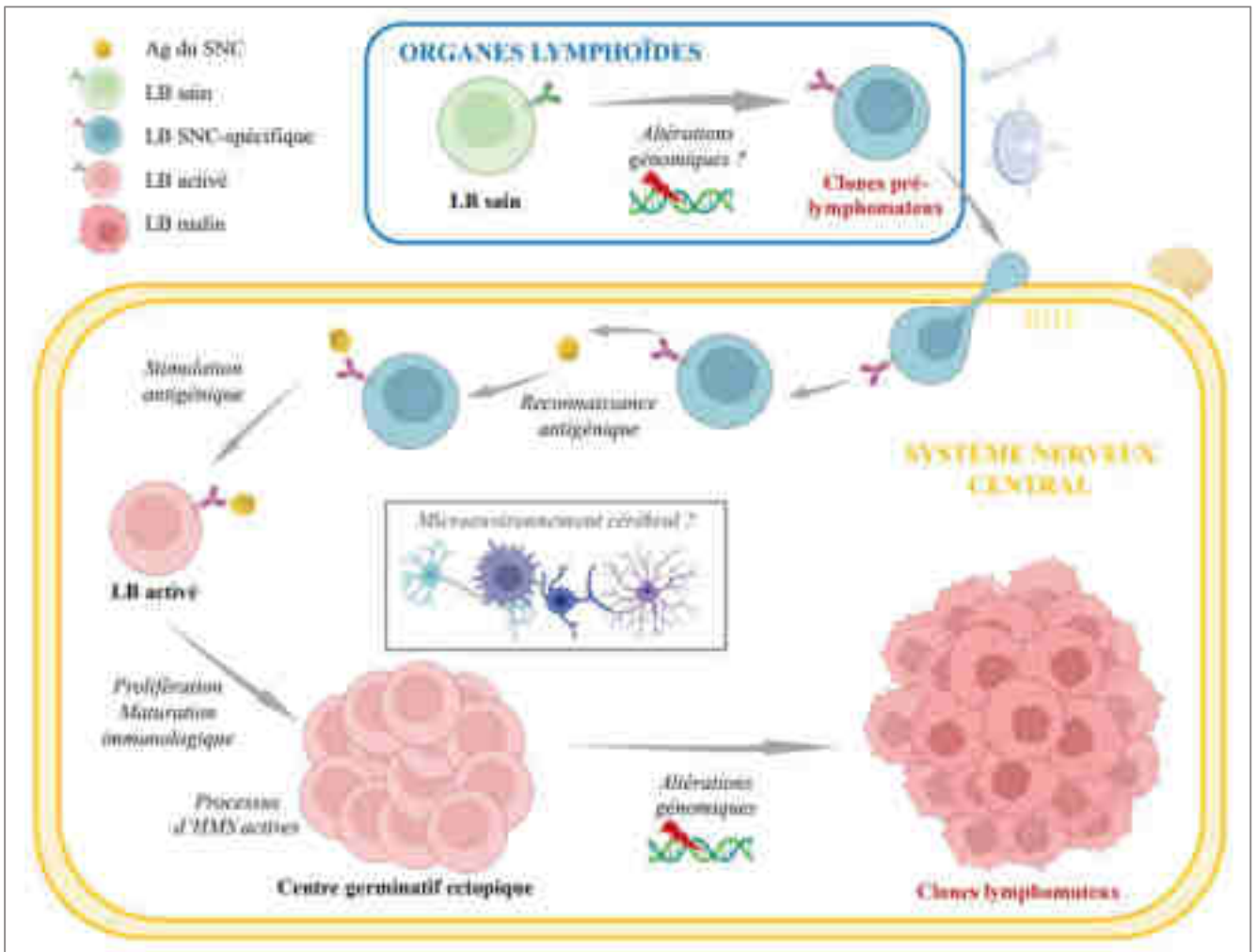


Figure 3. Développement lymphomateux hypothétique des PCNSL. La spécificité du BCR pour les Ag du SNC serait acquise lors du développement physiologique des LB dans les organes lymphoïdes, soit à partir d'aberrations moléculaires, soit à partir d'une sélection positive de LB reconnaissant un Ag du soi. L'acquisition de cette caractéristique peut avoir lieu directement dans la moelle osseuse au moment de l'ontogénie B, ou bien dans les ganglions lors de la maturation de LB naïfs. Cette propriété confère à ce clone dit « pré-lymphomateux » non seulement un tropisme pour le SNC, mais également un potentiel important de stimulation antigénique à l'intérieur-même de ce sanctuaire immun. Après avoir traversé la BHE, le LB pourra reconnaître l'Ag spécifique et s'engager dans une voie de maturation immunologique par formation de centres germinatifs extra-nodulaires, en coopération éventuelle avec un microenvironnement cérébral (macrophages, astrocytes, oligodendrocytes, neurones). La stimulation antigénique abondante, les réactions massives d'HMS et les remaniements moléculaires engendrés aboutiront potentiellement à des aberrations génomiques, à l'origine de la transformation des LB en véritables clones lymphomateux.

favoriser l'apparition de translocations aberrantes, fréquemment rencontrées dans les lymphomes. A titre d'exemple, le promoteur du locus IgH (chaîne lourde codée par le chromosome 14) est très souvent impliqué et exerce une activation constitutive et anormale du deuxième gène transloqué. Il peut s'agir de la translocation t(11;14) typique des lymphomes du manteau (expression accrue de la cycline D1 codée par le chromosome 11), de la t(14;18) des lymphomes folliculaires (expression accrue de l'anti-apoptotique BCL-2 codé par le chromosome 18) ou encore de la t(8;14) des lymphomes de Burkitt

(expression accrue du proto-oncogène c-MYC codé par le chromosome 8). Les enzymes RAG et AID semblent être en grande partie responsables de ces aberrations moléculaires, puisqu'il a été prouvé que les mutations engendrées par l'enzyme AID étaient souvent localisées au niveau des points de cassure des translocations aberrantes.^{28,29,44}

Cependant, l'origine de ces anomalies génétiques reste encore méconnue pour la plupart. De plus, certaines d'entre elles ne seraient pas nécessairement consécutives aux trois processus majeurs cités ci-dessus, notamment en ce qui concerne la question de l'HMS, bien que celle-ci ne soit pas restreinte au locus IgH. Les spéculations concernant la récurrence notable de certaines mutations restent débattues, puisque les mécanismes moléculaires impliqués mériteraient des études additionnelles afin de mieux élucider leurs rôles et leurs étiologies.^{1,42,45}

2) Activation constitutive de la voie de signalisation de NF-κB

La voie de signalisation du NF-κB est couramment incriminée dans les hémopathies malignes. Bien que de nombreuses autres voies puissent être impliquées dans les processus lymphomateux, et souvent de façon conjointe, la voie du NF-κB est fréquemment mise en cause dans les DLBCL-ABC, et par analogie dans les PCNSL. Il s'agit en effet d'un facteur de transcription nucléaire essentiel dans la stimulation des cellules immunitaires et dans le déclenchement des réactions immunitaires et inflammatoires, dont l'expression est principalement modulée par la voie du BCR et la voie des récepteurs toll-like (TLR), schématisées sur la figure 4. Une hyperactivation chronique et constitutive de la voie NF-κB joue un rôle prépondérant dans le développement et la survie des cellules malignes.^{8,13,28,33,41,42,46}

a) Physiologie de la voie NF-κB

Lors d'un contact entre un antigène et le site de reconnaissance du BCR membranaire lymphocytaire, la signalisation cellulaire est initiée grâce aux CD79A et CD79B (corécepteurs du BCR), via la phosphorylation de résidus tyrosine localisés dans leur domaine intra-cytoplasmique nommé ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Ce mécanisme est opéré grâce au recrutement d'une kinase de la famille SRC (SFK), de la kinase SYK (*spleen associated tyrosine kinase*) et de la kinase LYN. Il en découle une cascade de signalisation impliquant différents acteurs (notamment des kinases, dont la tyrosine kinase de Bruton, BTK), des réactions de phosphorylation et d'ubiquitinylation successives, et aboutissant à l'activation d'un complexe multiprotéique édifié à partir de la protéine de soutien CARD11. Ce complexe entraîne l'activation du complexe kinasique IKK (IκBα kinase), qui conduira à la phosphorylation, l'ubiquitinylation et la dégradation de la protéine IκBα (inhibiteur de NF-κB) par le protéasome, permettant ainsi la translocation nucléaire de NF-κB jusque dans le noyau, où il sera alors en mesure d'exercer son activité de facteur transcriptionnel sur les multiples gènes cibles.

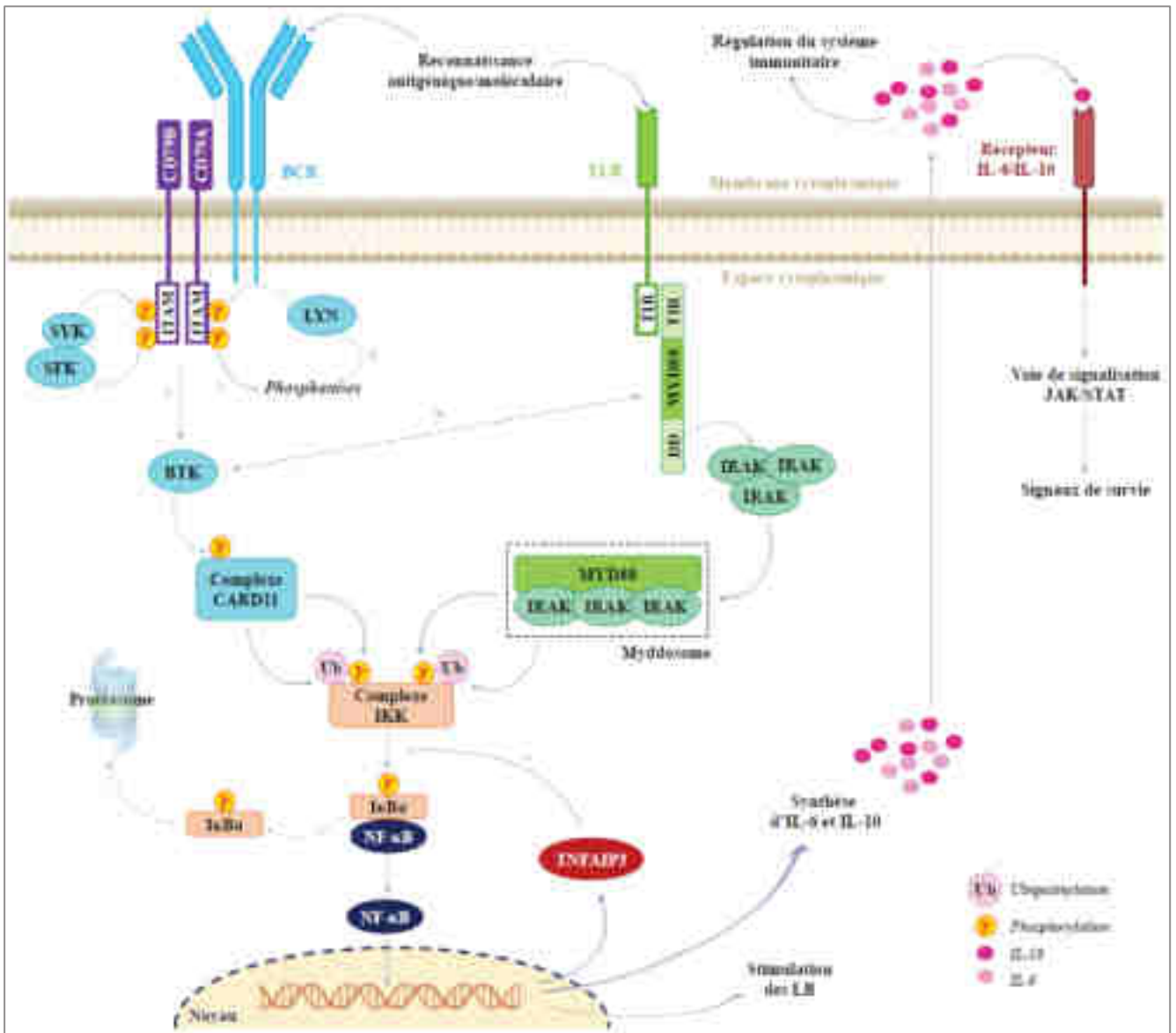


Figure 4. Physiologie de la voie de signalisation NF-κB.

Des mécanismes homéostatiques de rétrocontrôle contribuent à réguler l'activation de la voie de signalisation de NF-κB. La protéine TNFAIP3 (ou A20), dont la transcription est induite par NF-κB lui-même provoque la restauration de IκBα et le blocage de la translocation nucléaire de NF-κB. Aussi, la phosphorylation des motifs ITAM des molécules CD79 entraîne le recrutement de la kinase LYN, dont l'action aboutira progressivement à la déphosphorylation des motifs ITAM et à l'inactivation du BCR par l'intermédiaire de phosphatases.^{28,42,46}

Une seconde voie peut être responsable de l'activation de NF-κB. Les TLR constituent une famille de récepteurs fondamentaux de l'immunité innée portés par les leucocytes, et chargés de reconnaître des motifs moléculaires associés aux différents agents infectieux, en coopération avec le BCR. Tandis que les TLR membranaires reconnaissent les composés lipo-peptido-saccharidiques, les TLR endosomaux correspondent à des senseurs de matériel génétique (ADN, ARN). Leur activation s'opère grâce à leur

domaine intra-cytoplasmique *toll-interleukin 1 receptor* (TIR), dénommé ainsi en raison de la ressemblance entre les domaines intra-cytoplasmiques des TLR et des récepteurs à l'interleukine-1 (IL-1). Celui-ci est alors chargé de recruter des protéines adaptatrices afin d'enclencher la cascade de signalisation, telles que MYD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*).⁴⁶⁻⁴⁸

Cet adaptateur a été initialement découvert en 1990 comme étant surexprimé exclusivement dans les précurseurs myéloïdes lors des étapes de différenciation terminale médiées par l'IL-6, d'où son appellation.⁴⁹ Ce n'est que quelques années plus tard que les techniques d'analyse génomique ont permis de prouver que MYD88 était également exprimé dans d'autres tissus anatomiques, dont les cellules lymphoïdes.⁵⁰ MYD88 est mobilisé par la plupart des TLR et est composé de trois domaines principaux : un domaine N-terminal appelé domaine de mort ou *death domain* (DD), un domaine intermédiaire, et un domaine TIR C-terminal qui interagira avec le domaine TIR du TLR. Le domaine DD permettra le recrutement successif de kinases associées au récepteur de l'IL-1 (IRAK), formant un complexe dénommé « myddosome ». Son rôle final, via la phosphorylation d'autres intermédiaires, sera de conduire à la dégradation de la protéine I κ B α , et ainsi à l'activation de NF- κ B.⁴⁶⁻⁴⁸ Il a également été suggéré que MYD88 pouvait agir par l'intermédiaire de la BTK. Ceci pourrait présager d'une coopération synergique entre la voie des TLR et celle du BCR dans l'activation de la voie NF- κ B.⁵¹⁻⁵³ De plus, la formation même d'un supercomplexe composé du BCR, du TLR et de MYD88 ne semble pas exclue dans la coordination de la voie NF- κ B, notamment dans des contextes lymphomateux tels que les DLBCL-ABC ou les PCNSL.^{53,54}

Le NF- κ B contribue à la transcription de gènes codant des molécules essentielles au développement et à l'interaction des leucocytes afin d'initier les réactions immunitaires. Parmi elles se trouvent des membres de la famille des cytokines, les interleukines 10 et 6 (IL-10 et IL-6), partenaires indispensables pour établir une coordination entre les cellules immunitaires, sécrétées par les LB mais également par les LT helper et les monocytes/macrophages. Tandis que l'IL-6 exerce plutôt une action pro-inflammatoire, l'IL-10 qualifiée de cytokine anti-inflammatoire a pour rôle de réguler le système immunitaire et d'inhiber les fonctions immunologiques des différents acteurs. De plus, leur action autocrine sur les LB induit l'expression de signaux de survie via la voie de signalisation JAK/STAT.^{8,28,46,55,56}

b) Anomalies génétiques et répercussions immunopathologiques

Au total, plusieurs intermédiaires peuvent potentiellement être touchés par des mutations ponctuelles et déréguler la voie de signalisation du NF- κ B, sans pour autant que l'HMS en soit la cause. Une revue de la littérature par l'équipe de Hiemcke-Jiwa *et al.* a permis d'évaluer la proportion de PCNSL concernés par chacune des mutations possibles.⁸ *CD79B* et *MYD88* sont globalement les gènes le plus souvent mutés dans les cohortes de PCNSL, avec des prévalences respectives de 20 à 83%, et de 28 à 94%. Ces

mutations sont rencontrées dans des proportions moindres chez les DLBCL nodulaires et systémiques, les DLBCL-ABC arborant plus souvent ces anomalies que les DLBCL-CG. Cette dernière constatation peut potentiellement s'expliquer par le fait que la voie NF- κ B est physiologiquement impliquée dans le programme de différenciation des cellules B en cellules activées et en plasmocytes, d'où l'expression de marqueurs d'activation tels que MUM1/IRF4. Par ailleurs, ces deux mutations sont fréquemment associées dans les PCNSL, laissant présager une interaction étroite entre les voies du BCR et des TLR dans la lymphomagenèse.^{8,12,13,42,46}

Une mutation hotspot est identifiée à la position Y196 pour *CD79B*, présente dans près de 95% des mutations de ce gène,⁴² plus précisément au niveau du motif ITAM. Le résidu tyrosine peut être substitué de façon non préférentielle par plusieurs autres acides aminés,⁴² et les conséquences biologiques sont encore discutées. Cette mutation pourrait d'une part limiter l'internalisation du BCR, augmentant ainsi son expression en surface du lymphocyte, et favorisant sa stimulation. D'autre part, elle pourrait réduire le recrutement de la kinase LYN et donc le rétrocontrôle négatif de la voie NF- κ B. Les deux mécanismes aboutissent à une hyperactivation constitutive de la voie NF- κ B.^{28,46}

Concernant *MYD88*, une mutation hotspot est également identifiée en position 265, représentant près de 93% des mutations rencontrées dans ce gène.⁴² De type faux-sens, elle induit le remplacement d'une leucine préférentiellement par une proline (L265P), consécutivement à la substitution d'une thymine par une cytosine en position 794 de l'ADN codant (c.794T>C).⁴² Cette anomalie se localise dans le domaine TIR de la protéine et est à l'origine d'un recrutement excessif de MYD88 par les TLR. Elle lui confère ainsi un gain de fonction via la surexploitation des kinases IRAK et du myddosome, aboutissant à l'exacerbation de la dégradation de I κ B α , et donc de l'activation de la voie NF- κ B.^{8,46-48} Cette anomalie pourrait également être à l'origine d'une interaction directe et d'une suractivation de la BTK.⁵¹⁻⁵⁴ Le caractère souvent isolé de cette mutation pourrait signifier qu'il s'agit d'une mutation driver initiatrice de processus malins, et ne résultant pas d'une HMS aberrante.^{13,42} Nakamura *et al.* ont également observé que parmi les PCNSL co-mutés en *MYD88* et *CD79B* (approximativement 50% des cas), la fréquence allélique de la mutation de *MYD88* était nettement plus élevée que celle de *CD79B*. La mutation de *MYD88* pourrait donc apparaître plus précocement que celle concernant *CD79B*.⁴² Il a également été montré que les mutations ponctuelles survenant au sein de ces deux gènes pourraient correspondre à des mutations driver ou événements clonaux survenant précocement lors de la lymphomagenèse des DLBCL, contrairement à d'autres gènes dont les altérations seraient plutôt qualifiées de sous-clonales car survenant plus tard au cours de l'évolution du lymphome.³⁷

Les nouvelles méthodes de classification moléculaire de DLBCL ont mis en évidence un sous-type commun dénommé « cluster 5 »,³⁷ « MCD » (*MYD88-CD79B*),³⁹ ou encore « *MYD88* » selon les

études,³⁸ équivalent et très reproductible en termes de caractéristiques moléculaires et pronostiques. De manière intéressante, ce profil génétique présente la co-mutation pour les gènes *MYD88* et *CD79B*, apparaît plutôt associé au sous-type ABC et serait fortement impliqué dans le développement de DLBCL extra-nodaux, dont ceux affectant le SNC et les testicules. De la même façon que pour les DLBCL, une classification moléculaire des PCNSL a été envisagée récemment.⁵⁷ L'analyse multi-omique a révélé quatre entités distinctes de PCNSL de caractéristiques cliniques et pronostiques différentes, dont les données génétiques ont également été intégrées aux algorithmes de classification des DLBCL précédemment évoqués. Contrairement à ce que pouvaient présager les études initiales, une atteinte du SNC pourrait ne pas être exclusive aux DLBCL du groupe C5/MCD/*MYD88*, puisque le profil génétique des PCNSL semble chevaucher plusieurs groupes moléculaires définis pour les DLBCL. De plus, la classification des PCNSL selon quatre clusters prouve que des caractéristiques génétiques sont spécifiques et non partagées par l'ensemble des PCNSL. Des études supplémentaires restent donc indispensables pour une meilleure compréhension des données moléculaires concernant les DLBCL et les PCNSL, et pour une éventuelle utilisation future de ces classifications innovantes.

Une mutation du gène *CARD11* est retrouvée dans 6 à 30% des PCNSL selon les études, à des localisations variables dont certaines plus fréquentes que d'autres. Elle semble aussi plus représentée que dans les DLBCL systémiques, et confère un gain de fonction à la protéine traduite. A l'instar de la mutation de *MYD88*, elle conduit à une phosphorylation accrue de I κ B α et à l'activation constitutive de NF- κ B.^{8,28,46} Le gène *TNFAIP3* est vraisemblablement muté dans 3 à 56% des PCNSL.⁸ Bien que la perte de fonction attribuée par la mutation puisse être à l'origine d'un rétrocontrôle avorté et de l'hyperactivation de la voie NF- κ B au sein des DLBCL systémiques, sa pertinence dans les PCNSL reste controversée.^{42,46} D'autres molécules participant à la signalisation NF- κ B peuvent arborer des mutations génétiques de façon plus relative, telles que TBL1XR1 (régulateur transcriptionnel de la voie NF- κ B), MALT1 (constituant du complexe recruté par CARD11) ou encore BLNK (protéine adaptatrice de la BTK).^{1,8,28,42,46}

Outre l'implication évidente des anomalies moléculaires dans le développement des PCNSL, la synthèse accrue et locale d'IL-10 dans l'humeur vitrée ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) a été démontrée à plusieurs reprises dans les cas des PCNSL et notamment des lymphomes oculo-cérébraux (LOC) ou des lymphomes oculaires primitifs isolés. Cette observation pourrait être associée à l'activation chronique de la voie NF- κ B, et indirectement aux différentes mutations qui en sont responsables, avec pour conséquence la génération de quantités anormalement élevées d'IL-10. La prédominance de cette cytokine anti-inflammatoire serait également liée au à une sécrétion anormale de la part des LB et LT physiologiques, dérégulés par les cellules lymphomateuses. De plus, l'IL-10 jouerait un rôle prépondérant dans la lymphomagenèse par le détournement de ses effets physiologiques au profit des

clones malins. En effet, l'exacerbation des signaux de survie via la voie JAK/STAT, l'augmentation d'expression de l'inhibiteur apoptotique BCL-2, ainsi que l'inhibition des fonctions effectrices des cellules immunitaires favorisent conjointement la prolifération anormale, la résistance à l'apoptose et l'échappement au système immunitaire des LB concernés, les transformant alors en véritables cellules lymphomateuses.^{8,28,46,55,56}

En conclusion, l'hyperactivation de la voie de signalisation NF- κ B semble être un élément physiopathologique majeur dans les processus lymphomateux, et particulièrement dans le cadre des PCNSL. Plusieurs hypothèses relatives à cette divergence entre DLBCL systémiques et PCNSL ont été avancées. Pour rappel, le SNC étant un véritable sanctuaire immunologique, l'environnement des clones malins reste au départ peu propice à la stimulation antigénique pourtant indispensable au développement des cellules lymphomateuses. La théorie suivante rejoint celle relative à la reconnaissance d'antigènes du SNC par les BCR des clones.⁴¹ Les mutations de certains gènes impliqués dans la voie NF- κ B pourraient être consécutives à une pression de sélection, dont l'objectif serait de compenser le déficit de stimulus antigéniques locaux par une activation aberrante mais constitutive de cette voie de signalisation. De cette façon, les cellules malignes seraient en mesure de poursuivre leur développement tout en échappant au système immunitaire. Ceci pourrait expliquer que les DLBCL systémiques, par nature plus exposés aux signaux moléculaires, cytokiniques et antigéniques que les PCNSL, ne soient pas autant concernés par les anomalies génétiques de la voie NF- κ B.⁴²

3) Altérations génétiques additionnelles

Des mutations ponctuelles affectant les gènes d'autres voies de signalisation peuvent également survenir, dont les conséquences variées mais complémentaires contribuent à la survie des cellules lymphomateuses : perte d'activité de gènes suppresseurs de tumeurs (*CDKN2A* ou *PRDM1*), dérégulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire (*PIMI*, *ETV6*, *TOX*), activation de proto-oncogènes majeurs (*c-MYC*), ou encore surexpression d'inhibiteurs apoptotiques (*BCL-2*).^{1,8}

Un processus aberrant d'HMS est fréquemment opéré sur les locus IgH (chromosome 14) et BCL-6 (chromosome 3), aboutissant à diverses translocations chromosomiques avec des gènes encore non identifiés. Bien que les proto-oncogènes incriminés soient souvent similaires entre les DLBCL du SNC et les DLBCL extra-cérébraux, les translocations restent différentes. Celles impliquant IgH (t(11;14), t(8;14)), *c-MYC* (t(8;22), t(2;8)) ou *BCL-2* (t(14;18)) ne sont pas observées dans les PCNSL et témoignent donc d'autres points de cassure.^{1,58} L'hyperexpression du gène *BCL-2* pourrait d'ailleurs être associée à un gain de la région 18q21, plutôt que d'une translocation t(14;18).⁵⁹

Outre l'introduction de mutations ponctuelles, d'autres mécanismes peuvent être responsables de la dérégulation du programme cellulaires des LB sains, tels que les altérations épigénétiques (notamment la méthylation de l'ADN conduisant à des anomalies transcriptionnelles), ou encore le gain ou la perte de matériel génétique (insertions ou délétions de régions chromosomiques).^{1,29}

L'implication préférentielle du gène *VH4-34* dans les réarrangements VDJ clonaux a été notifiée pour les PCNSL. Il est d'autant plus intéressant de savoir que celui-ci demeure rarement mis à contribution lors des phénomènes de recombinaison au sein des LB normaux. Il semblerait que ce gène confère des propriétés auto-réactives aux LB, conduisant ainsi à une sensibilité accrue du BCR aux stimulus antigéniques, sans qu'un superantigène ne soit clairement identifié. Un tel mécanisme, au même titre que l'hyperactivation de la voie NF- κ B, contribuerait à la stimulation continue et donc au développement des cellules lymphomateuses, malgré le caractère immunoprivilégié du SNC.^{33,43,60,61}

L'absence de commutation de classe des Ig des PCNSL est démontrée par la présence exclusive d'IgM et d'IgD à la surface des clones par études phénotypique et génotypique. Elle pourrait hypothétiquement s'expliquer par la délétion des gènes *C* codant pour les autres isotypes d'Ig, ou par la délétion de régions chromosomiques au sein du locus S_{μ} , indispensable aux réarrangements moléculaires à l'origine du switch isotypique. Le microenvironnement immun cellulaire et cytokinique pourrait également être impactant sur le déclenchement du processus de commutation de classe. Une autre théorie consiste à dire que l'expression unique d'IgM et d'IgD pourrait résulter d'un programme de différenciation de cellules B simplement destinées à devenir des lymphocytes mémoires de type IgM/IgD, plus rapidement opérationnels face à un stimulus antigénique.⁶²

Des pertes d'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH, ou *human leucocyte antigen*, HLA) de classe I et II ont été relevées sur les DLBCL testiculaires et cérébraux par immunohistochimie,⁶³ corroborées par la preuve d'une perte de matériel génétique au niveau des locus codant notamment pour les HLA de type II.⁵⁹ Ces structures membranaires, présentes sur la majeure partie des cellules immunitaires dont les LB, possèdent un rôle fondamental dans la présentation de fragments antigéniques et dans la coopération intercellulaire en vue du déclenchement des réactions immunitaires. Les HLA de type I interagissent avec les LT CD8 cytotoxiques, et les HLA de type II avec les LT CD4 helper, qui contribueront entre autres à stimuler la réponse lymphocytaire T CD8. Ainsi, la perte d'expression de tels systèmes par les cellules malignes leur offre la capacité de ne pas être reconnues et détruites par les LT CD8, et ainsi d'échapper au système immunitaire.^{13,41} Il semblerait que ce défaut d'expression soit caractéristique des DLBCL cérébraux et testiculaires. La présence de LT CD8 relativement plus importante au sein de ces deux organes pourrait justifier ce phénomène évolutif de la part des cellules malignes.⁶³

D) Mécanismes impliqués chez l'immunodéficient

Comme évoqué précédemment, la quasi-totalité des PCNSL du sujet infecté par le VIH sont positifs à l'EBV. Il s'agit d'une caractéristique vraisemblablement spécifique aux PCNSL de l'immunodéficient, aucunement rapportée chez des individus immunocompétents.^{1,4,15,16} Il est donc légitime de se demander dans quelle mesure et de quelle façon l'EBV intervient-il dans le développement des PCNSL.

La cellule faisant office de réservoir pour ce virus n'est autre que le LB. Après un premier contact avec l'EBV, celui-ci persistera à vie au sein de l'organisme, sous forme d'infection latente et complètement silencieuse, excepté en cas de réactivation virale. C'est d'ailleurs pour cette raison que le taux de séropositivité dans la population mondiale est supérieur à 90%, tous statuts immunitaires confondus, avec une primo-infection survenant généralement au cours de l'enfance ou de l'adolescence. Ce virus est en effet un grand pourvoyeur de diverses affections malignes, son potentiel cancéreux provenant de plusieurs protéines à activité oncogène. Il peut être responsable de lymphomes B par transformation directe de ses cellules hôtes (DLBCL, lymphome de Burkitt, PCNSL, lymphome de Hodgkin),^{16,25,29} mais également de lymphomes T et NK, de cancers épithéliaux gastriques ou de cancers du nasopharynx.⁴⁴

Pourtant, ce sont particulièrement les immunodéficients qui s'avèrent concernés par les pathologies induites par l'EBV, alors que les immunocompétents sont épargnés et ne semblent pas réellement touchés par les lymphomes médiés par l'EBV. Il est maintenant bien établi que des populations lymphocytaires T CD4 spécifiques des cellules B infectées par l'EBV sont générées lors d'une infection, permettant ensuite la destruction des cellules infectées par les lymphocytes cytotoxiques. Bien que cela ne conduise pas à l'éradication complète du virus de l'organisme, cette immunité adaptative permet toutefois de contrôler ses effets néfastes. Etant donné que la lymphopénie T CD4 constitue la conséquence biologique majeure chez les patients infectés par le VIH, l'absence d'une population spécifique de l'EBV sera à l'origine d'une dérégulation de la balance immunitaire dont le virus tirera profit. Son potentiel oncogène sera donc nettement moins régulé chez les immunodéficients, et les cellules B malignes pourront potentiellement se loger dans des sanctuaires immunologiques tels que le SNC et donner ainsi naissance à un PCNSL. Il est intéressant de noter que les PCNSL surviennent souvent avec des taux de LT CD4 plus faibles que les LNH systémiques.¹⁶

La répression de la réponse lymphocytaire dans cette population serait d'ailleurs à l'origine de bien d'autres affections malignes médiées par des virus oncogènes, à savoir le sarcome de Kaposi (herpès virus 8) ou bien les cancers du col de l'utérus (papillomavirus). Néanmoins, l'incidence de ces dernières a montré une forte diminution avec l'avènement de l'arsenal thérapeutique antirétroviral, contrairement à l'incidence des PCNSL chez les immunodéficients dont le déclin est plus modéré.¹⁵ Ceci laisse à penser

que les populations lymphocytaires T CD4 spécifiques de l'EBV pourraient être perdues de façon irréversible chez les sujets touchés par le VIH, malgré une restauration globale de l'immunité après thérapie antirétrovirale, d'où le développement perpétuel de PCNSL en dépit des traitements.¹⁶

III. PRISE EN CHARGE DES LYMPHOMES DU SNC

A) Données pronostiques

1) Survie des patients

Parmi les patients atteints de PCNSL et n'ayant bénéficié d'aucun traitement, la survie globale médiane ne serait pas plus élevée que 4 mois.²¹ Bien que les progrès thérapeutiques aient considérablement amélioré la survie globale des patients depuis les années 1970 (notamment par l'introduction du méthotrexate à haute dose dans les années 1990), les lymphomes cérébraux restent des pathologies de sombre pronostic.¹² A partir des données entre 2001 et 2017, le CBTRUS a établi que la survie globale médiane des PCNSL, toutes tranches d'âges confondues, était seulement de 15 mois, et que les taux de survie à 1 an, 5 ans et 10 ans étaient alors respectivement de 54,4%, 36,7% et 28,6%. Lorsque les catégories d'âge sont analysées individuellement, les taux de survie des patients de plus de 40 ans (90% des cas de PCNSL) apparaissent proches des chiffres ci-dessus, tandis que les 15-39 ans montrent de meilleurs taux de survie, notamment sur le long terme (53,4% et 49,3% à 5 ans et 10 ans respectivement).²³

Des survies médianes de 12 mois,⁶⁴ 25 mois,²¹ 26 mois,¹² et jusqu'à 48 mois¹³ ont également été rapportées dans la littérature pour les PCNSL. Ces résultats, soumis à d'importants biais de sélection, peuvent en effet varier d'une étude à l'autre en fonction de la population étudiée, de la répartition des âges, du statut immunitaire, de la période de l'étude ainsi que des traitements utilisés. A titre d'illustration, les survies médianes établies par Norden *et al.* dans les populations immunocompétentes et immunodéficientes séropositives au VIH, sur une même période, ont été respectivement de 12 mois et de 2 mois, faisant du VIH un facteur de mauvais pronostic.⁶⁴ De plus, les progrès thérapeutiques ont contribué à approximativement doubler l'espérance de vie des patients sujets à un PCNSL : des années 1970 aux années 2000-2010, la survie médiane serait passée de 7,5 mois à 14 mois selon Norden *et al.*,⁶⁴ ou encore de 12,5 mois à 26 mois selon Correia *et al.*¹² Les PCNSL des sujets VIH ont également connu une nette amélioration de leur pronostic avec l'instauration des traitements anti-rétroviraux.^{15,16}

La majorité des rechutes de PCNSL surviennent dans le compartiment cérébral, et dans les 2 premières années qui suivent le diagnostic. A l'inverse des DLBCL systémiques, les rechutes neurologiques peuvent encore se déclarer jusqu'à 10 ans après l'arrêt des traitements, imposant donc un suivi à long

terme pour ces patients.¹² Les PCNSL semblent présenter un pronostic plus défavorable que les DLBCL nodulaires.⁸ En revanche, les SCNSL semblent être de pronostic plus sombre que les PCNSL.¹² Aussi, parmi les PCNSL de type DLBCL, la survie sans progression semble être significativement plus faible chez les DLBCL non centro-germinatifs (qui représentent la grande majorité des cas), en comparaison aux DLBCL centro-germinatifs.^{7,12,13,31,32}

2) Scores pronostiques

L'évaluation individuelle du pronostic des patients doit faire partie intégrante de leur prise en charge, et est effectuée en amont de l'initiation des traitements afin d'adapter la stratégie thérapeutique. Bien que de multiples modèles aient vu le jour, il n'existe actuellement aucun outil consensuel ou universel, et leur confrontation ne permet pas d'extraire une méthode optimale en raison des nombreuses limites des études (faibles effectifs, caractéristiques des patients variables, études rétrospectives ou monocentriques).⁶⁵ Deux approches se détachent néanmoins et semblent être les plus couramment utilisées en pratique pour définir le pronostic des PCNSL.⁶⁵⁻⁶⁷

Le premier score est celui proposé par l'*International Extranodal Lymphoma Study Group* (IELSG), basé sur 5 paramètres : l'âge ; le score de performance issu de l'*Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG), reflétant l'état général du patient et basé sur le niveau de ses capacités physiques et de son autonomie, échelonné de 0 à 5 (du meilleur au plus mauvais) ; le taux sérique de lactate déshydrogénase (LDH) ; la concentration protéique du LCR ; l'atteinte des structures cérébrales profondes (noyaux gris centraux, corps calleux, tronc cérébral, cervelet). Chaque variable est qualifiée de bon ou mauvais pronostic selon les critères précisés dans le tableau 1.

Paramètres	Mauvais pronostic
Âge	> 60 ans
Score ECOG	2 à 4
LDH sériques	Elevées
Protéines du LCR	> 0,45 g/L pour les moins de 60 ans > 0,6 g/L pour les plus de 60 ans
Atteinte des structures cérébrales profondes	Confirmée

Tableau 1. Définition des paramètres de mauvais pronostic selon l'IELSG.

En additionnant les critères défavorables, un score final est obtenu permettant de définir trois groupes pronostiques selon le taux de survie à 2 ans. Des scores de 0 à 1, de 2 à 3, et de 4 à 5 sont associés respectivement à un taux de survie à 2 ans de 80% ± 8%, 48% ± 7%, et 15% ± 7% (figure 5).⁶⁸

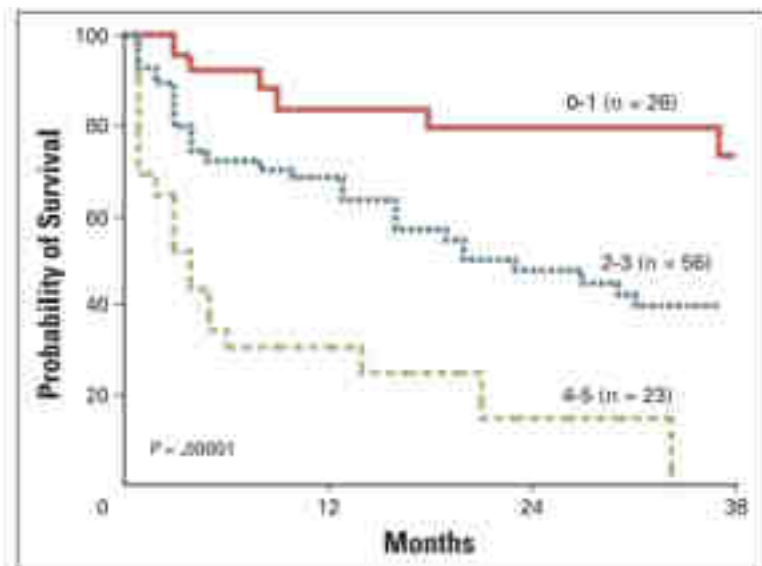


Figure 5. Courbes de survie des patients regroupés selon le score de l'IESLG.

105 patients sont répartis en fonction de leur score pronostique. Respectivement, 26, 56 et 23 patients présentent 0 à 1 (courbe rouge), 2 à 3 (courbe bleue) ou 4 à 5 (courbe verte) facteurs pronostiques défavorables.^{68,69}

Le deuxième score a été développé par le *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (MSKCC). Il se base sur l'âge des patients ainsi que le score de performance de Karnofsky (KPS), gradé de 0 à 100 (du plus mauvais au meilleur), équivalent au score ECOG mais présentant 11 catégories. Un âge > 50 ans, ainsi qu'un KPS < 70 sont considérés comme étant des facteurs pronostiques défavorables. Trois groupes pronostiques sont alors établis selon la survie médiane à 2 ans. Un âge ≤ 50 ans, un âge > 50 ans associé un KPS ≥ 70, et un âge > 50 ans associé à un KPS < 70 sont associés respectivement à une survie médiane de 8,5 ans, 3,2 ans et 1,1 ans.⁷⁰

A l'image de ces deux stratégies employées, l'âge et le score de performance sont les deux paramètres le plus communément utilisés pour définir le pronostic des PCNSL en raison de leur forte valeur pronostique.^{65,67} Des marqueurs émergents, notamment d'ordre moléculaire, sont également en cours d'évaluation afin de pouvoir octroyer ou non un caractère défavorable à certaines mutations génétiques.⁶⁵

B) Stratégies thérapeutiques

Diverses approches thérapeutiques peuvent être proposées dans le cadre des lymphomes du SNC. Elles se basent sur des recommandations nationales telles que celles émanant du Réseau Expert National des LOC, fondé en 2011 et sous la tutelle de l'Institut National du Cancer, dont les actions consistent notamment à optimiser la prise en charge des patients, et à élaborer des projets de recherche scientifique pour mieux comprendre cette pathologie.⁷¹

1) La chirurgie

Bien qu'il soit légitime d'envisager une résection chirurgicale de la tumeur cérébrale, cette option n'est pas recommandée. Même si la plupart des tumeurs restent en apparence focales et bien délimitées, leur caractère diffus et infiltratif limite l'efficacité de la manœuvre.^{4,5} Des complications neurologiques, ainsi que des rechutes lymphomateuses très précoces post-chirurgicales ont été rapportées, et aucun bénéfice

thérapeutique ni pronostique n'a été prouvé.^{4,19} Le rôle de la chirurgie pourrait éventuellement être reconsidéré pour les lésions uniques, superficielles et faciles d'accès, avec un risque théorique faible de comorbidités, mais en aucun cas pour les lésions plus profondes ou diffuses.⁴ Actuellement, l'unique place de la chirurgie réside dans un cadre purement diagnostique, à travers une biopsie stéréotaxique et non une résection tumorale.^{19,22}

2) La radiothérapie

La radiothérapie du cerveau entier a été considérée comme le traitement de premier choix des lymphomes cérébraux jusqu'au début des années 1990, avec un taux de rémission complète très satisfaisant. Néanmoins, le contrôle de la pathologie au long terme s'est avéré médiocre, avec des rechutes très fréquentes. Le recours aux rayonnements ionisants seuls et en traitement d'induction a donc été abandonné pour l'associer à la chimiothérapie, et notamment au méthotrexate à haute dose (MTX-HD). Cette nouvelle modalité de traitement a bel et bien permis d'améliorer non seulement la survie globale, mais également la survie sans progression. Malheureusement, l'association de la radiothérapie avec le MTX-HD a révélé de fréquentes complications neurotoxiques (déficits cognitifs, démences), vraisemblablement imputées à la radiothérapie,⁷² qui ne peut être utilisée focalement en raison du caractère diffus de la tumeur, d'où la nécessité de l'irradiation du cerveau entier.¹⁶ Ces éléments ont donc motivé une diminution des doses et du recours à cette stratégie thérapeutique. C'est la raison pour laquelle la radiothérapie est aujourd'hui réservée uniquement au traitement de consolidation, chez un nombre restreint de patients, en première ligne ou en cas de rechute. Le pronostic des patients n'a pas été impacté par le retrait de la radiothérapie en traitement d'initiation.^{4,5,12,19,21}

3) La chimiothérapie

La chimiothérapie possède une place primordiale dans la prise en charge des PCNSL. En revanche, du fait de la localisation de ces tumeurs, la problématique principale consiste à administrer des molécules et des doses adaptées afin de traverser la BHE et de pouvoir atteindre les cellules malignes. Or, la plupart des agents chimiotoxiques ne possèdent pas une capacité de pénétration suffisante pour être utilisée dans les formes cérébrales. C'est pourquoi l'association de cyclophosphamide, vincristine et doxorubicine (protocole CHOP), employée massivement dans les LNH systémiques, n'a pas démontré de bénéfice clair au profit des lymphomes du SNC.^{4,13,19}

La cytarabine (Ara-C, analogue pyrimidique inhibiteur de la synthèse d'ADN), et le méthotrexate (MTX, inhibiteur de la synthèse de folates et donc de l'ADN) sont dotés d'une meilleure capacité de pénétration de la BHE, raison pour laquelle elles sont privilégiées en traitement de première ligne et souvent associées.¹⁹ Afin d'optimiser la biodisponibilité dans le compartiment cérébral, le MTX est administré à de fortes doses (> 1 g/m² de surface corporelle). Avec sa diffusion rapide à travers la BHE, des doses

de 3 g/m² semblent être optimales,^{4,19} tout en limitant l'apparition d'effets indésirables, en particulier néphrotoxiques.¹⁹ Il est également indiqué en tant que prophylaxie neuro-méningée dans le cadre des LNH systémiques.¹² Avec l'Ara-C également employée haute dose (2 g/m²), ces deux molécules constituent une polychimiothérapie de choix dans le traitement d'initiation des PCNSL, mais aussi en tant que consolidation ou rattrapage en cas de rechute.¹⁹

Des agents alkylants ou des anthracyclines peuvent malgré tout compléter cet arsenal. Il est également possible d'administrer du rituximab (anticorps monoclonal dirigé contre le CD20 des LB), utile dans la plupart des hémopathies lymphoïdes B matures systémiques, mais qui présente une faible capacité de pénétration de la BHE et dont l'intérêt dans les PCNSL reste controversé.^{5,19} De la même façon, une greffe autologue de CSH précédée d'un conditionnement myéloablatif à base de chimiothérapie à haute dose peut être envisagée en fonction des situations, particulièrement chez les sujets jeunes.^{4,19}

Les chimiothérapies intrathécales, bien que ne faisant pas l'objet de recommandations consensuelles, sont parfois instaurées selon les pratiques courantes, afin d'amener les agents toxiques au plus proche de la tumeur, les structures cérébrales et nerveuses étant enveloppées par du LCR. Leur intérêt reste cependant débattu selon les articles, puisque les hautes doses de MTX et d'Ara-C permettent de pallier au moins en partie à la problématique de la biodisponibilité cérébrale. De plus, l'efficacité des thérapies intrathécales pourrait être influencée par la présence ou non d'une infiltration leptoméningée, qui ne concerne qu'une partie des patients.^{4,12,19}

4) La corticothérapie

Les glucocorticoïdes présentent un intérêt thérapeutique non négligeable dans les lymphomes du SNC. Leur excellente capacité de diffusion à travers la BHE, ainsi que leur efficacité sur les LB en font de bons candidats, pouvant être administrés en association avec une chimiothérapie. En induisant l'apoptose des cellules B malignes corticosensibles, ils entraînent une régression efficace de la tumeur lymphomateuse. C'est aussi pourquoi il est impératif de ne pas initier une corticothérapie avant de poser le diagnostic, au risque de masquer un lymphome du SNC par disparition de la masse à l'imagerie, et des cellules malignes dans les différents prélèvements anatomiques et biologiques.^{4,9,19,22,73} Seule une situation d'urgence vitale justifie une instauration immédiate de ce traitement (hypertension intracrânienne, effet de masse, œdème cérébral).^{8,12,19}

5) Thérapies ciblées

La compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués offre également l'opportunité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Ainsi, il est possible d'intervenir sur de nombreux intermédiaires des voies de signalisation incriminées dans les PCNSL, dont certains font déjà

l'objet de médicaments sur le marché, mais ne présentant pas nécessairement d'autorisation de mise sur le marché dans les PCNSL.

Les thérapies ciblées innovantes peuvent agir sur la voie du BCR par inhibition de différentes kinases comme la BTK (Ibrutinib), dont l'efficacité a d'ores et déjà été démontrée dans d'autres LNH-B, ou encore les kinases SFK et SYK.^{12,28} Naturellement, une mutation du gène *CD79B* conduisant à la suractivation de la voie NF- κ B entre autres via la BTK confère une sensibilité satisfaisante à l'Ibrutinib, au même titre que la mutation isolée L265P de *MYD88* qui pourrait aussi impliquer l'activité de la BTK. En revanche, les patients présentant une co-mutation pour *CD79B* et *MYD88* semblent répondre encore plus efficacement à cet inhibiteur que lorsque ces deux mutations sont isolées. Ceci témoigne donc de la coopération physiologique majeure entre la voie du BCR et celle des TLR,⁷⁴⁻⁷⁶ potentiellement liée au rôle intermédiaire commun de la BTK pour ces deux voies et à la présence d'un supercomplexe impliquant le BCR, le TLR et MYD88.⁵¹⁻⁵⁴

Bien que des molécules inhibant directement l'activité de MYD88 aient pu être évaluées,⁵² aucune thérapie ciblée contre cette protéine n'est actuellement validée. Les composants des complexes mutliprotéiques recrutés par MYD88 ou CARD11 (MALT1) peuvent également être ciblés, ainsi que la translocation nucléaire de NF- κ B directement, par inhibition du complexe IKK ou du protéasome (Bortézomib) afin de limiter la dégradation de I κ B α . Des inhibiteurs de BCL-2, BCL-6 ou d'autres voies de signalisation (mTOR) peuvent également être suggérés.^{12,28}

6) Thérapie cellulaire

Stratégie de seconde ligne d'ores et déjà validée dans d'autres hémopathies lymphoïdes dont les DLBCL systémiques, les *chimeric antigen receptor* (CAR)-T cells pourraient également représenter une alternative de choix pour les lymphomes du SNC.⁷⁷ Il s'agit de lymphocytes T autologues prélevés individuellement pour chaque patient par aphérèse, et modifiés génétiquement afin d'exprimer un récepteur antigénique chimérique dirigé contre le CD19, un marqueur lymphocytaire B exprimé par les cellules malignes. Le but est alors d'éliminer les clones lymphomateux à l'aide du propre système immunitaire du patient. Les cellules viables sont conditionnées sous forme d'une suspension cellulaire pour perfusion et ré-administrées au même patient à la suite d'une chimiothérapie lymphodéplétive afin de favoriser l'expansion des CAR-T cells. Actuellement, les spécialités commerciales existantes sont l'Axicabtagene ciloleucel (Axi-cel), le Tisagenlecleucel (Tisa-cel) et le Lisocabtagene (Liso-cel). Cette thérapie de deuxième ligne plutôt dédiée aux lymphomes du SNC réfractaires ou en rechute ne semble pas induire autant d'effets indésirables que les chimiothérapies. Néanmoins, la durée de réponse n'apparaît malheureusement pas optimale pour l'intégralité des patients, d'où l'intérêt éventuel de

l'associer à d'autres thérapies ciblées ou immunothérapies, ou encore d'une administration intra-cérébro-ventriculaire de la suspension cellulaire.

7) Situations particulières

L'âge des patients est un paramètre essentiel dans le choix de la thérapeutique. Si la population jeune (pédiatrique et adulte) présente un meilleur pronostic et une meilleure tolérance aux traitements, il en est autrement pour la population plus âgée (> 60 ans). Trouver l'équilibre entre une efficacité thérapeutique optimale, et un nombre limité d'effets secondaires demeure la problématique principale chez ces patients. C'est d'ailleurs pourquoi la radiothérapie cérébrale, confirmée comme étant promotrice de complications neurologiques, est plutôt réservée aux populations jeunes.⁴

En cas de lymphome primitif intra-oculaire, une approche thérapeutique locale est prioritairement envisagée mais reste controversée. Une vitrectomie peut être proposée si elle est accompagnée d'une chimiothérapie intra-vitréenne, à base de MTX par exemple. La radiothérapie locale peut également être employée. Dès lors qu'une atteinte du SNC s'associe à l'atteinte oculaire, la stratégie thérapeutique s'oriente plutôt vers les chimiothérapies systémiques évoquées plus haut.^{12,78}

Dans le cadre des SCNSL, l'atteinte cérébrale doit être ciblée à l'aide des différentes options citées ci-dessus, notamment le MTX-HD par voie générale. S'agissant d'une rechute centrale d'un LNH systémique, il peut être judicieux d'ajouter un protocole de type CHOP.¹²

Les modalités de traitement restent relativement similaires chez les immunodéficients. Pour les patients sous immunosuppression chronique (maladie auto-immune, transplantation d'organes), le traitement immunosuppresseur doit être réadapté pour ne pas favoriser le développement du PCNSL.⁴ Concernant les patients positifs au VIH, la radiothérapie du cerveau entier pose la même problématique que précédemment. La polychimiothérapie est souvent basée sur le MTX-HD. Le rituximab reste très peu utilisé par manque de preuve d'efficacité, et de par sa toxicité accrue chez les patients avec un faible taux de LT CD4.¹⁶ Les recommandations britanniques de prise en charge des pathologies malignes chez les patients VIH stipulent que : les thérapies antirétrovirales doivent être instaurées sans délai en cas de diagnostic de PCNSL si le patient n'était pas encore traité ; le MTX-HD et l'Ara-C-HD doivent être privilégiées chez les patients avec un score de performance suffisant ; la radiothérapie du cerveau entier est plutôt utilisée en alternative à polychimiothérapie pour les patients sujets à une toxicité trop importante.⁷⁹

PARTIE 2 : Outils diagnostiques dans le bilan des lymphomes du SNC

I. CLINIQUE

Initialement, les PCNSL touchent préférentiellement l'étage encéphalique, tout particulièrement le cerveau (hémisphères cérébraux et espaces supra-tentoriels, régions péri-ventriculaires, corps calleux) et parfois le cervelet.^{1,18,22} Les atteintes isolées d'autres territoires (nerfs crâniens, atteintes spinales, oculaires ou leptoméningées) demeurent plus rares au diagnostic.^{19,20} Parmi les SCNSL, les études s'accordent pour affirmer que les atteintes parenchymateuses et leptoméningées restent privilégiées.^{18,20} Cependant, et en raison de la proximité anatomique étroite entre ces différents organes, jusqu'à 20 à 25% des patients avec une atteinte cérébrale développeront une forme oculaire et donc un LOC,^{1,9,16,19} et 15 à 20% présenteront une infiltration leptoméningée.^{9,22,80} Cette dernière composante est caractérisée par des techniques anatomopathologiques, biologiques ou neuroradiologiques. Bien que le taux de dissémination méningée des PCNSL varie selon les études et selon la méthode diagnostique, la revue de la littérature effectuée par Kiewe *et al.* a confirmé que les travaux rapportent majoritairement un envahissement du LCR chez 16 à 21% des PCNSL, et que des taux plus occasionnels de 7%, 12% et 42% ont également rapportés.⁸¹ Ces données justifient donc l'intérêt de réaliser systématiquement un examen clinique oculaire ainsi qu'une analyse biologique du LCR. Les formes oculaires étant essentiellement liées à une infiltration lymphomateuse de l'humeur aqueuse, de l'humeur vitrée ou de la rétine, une étude biologique de ces fluides peut aussi être envisagée.⁸

La symptomatologie observée est la conséquence directe et mécanique de la masse tumorale composée de cellules lymphomateuses, et va donc dépendre de la localisation de celle-ci et des lésions engendrées. Dans le cas d'une localisation cérébrale, les manifestations peuvent être multiples et variées : il est possible de constater des déficits cognitifs (perte de mémoire), des signes d'hypertension intra-crânienne (céphalées, nausées, baisse de l'acuité visuelle), des déficits neurologiques (aphasie, hémiparésies, ralentissements psychomoteurs), des confusions, des états de léthargie, ou encore des convulsions.^{8,12,16,19,22} Les PCNSL étant de localisation focale, ils n'entraînent pas les symptômes généraux des LNH systémiques, à savoir l'altération de l'état général (asthénie, amaigrissement, anorexie), les sueurs nocturnes et la fièvre.^{69,82}

Pour les patients sujets à une localisation oculaire, seule la moitié d'entre eux semblerait présenter des symptômes.¹⁹ Une vision floue et des yeux « flottants » en sont des manifestations caractéristiques,^{4,19} signant un tableau clinique aspécifique d'une uvéite non résolue par les corticoïdes locaux, sans pour autant présager de son origine. L'infiltration oculaire peut être recherchée ou évaluée à l'aide de

différents examens ophtalmologiques, parmi lesquels peuvent être cités l'examen du fond d'œil à l'aide d'une lampe à fente, l'angiographie fluorescente, ou la tomographie en cohérence optique.⁸

Les manifestations cliniques citées ci-dessus restent relativement similaires entre les PCNSL de l'immunocompétent et de l'immunodéprimé, ainsi qu'entre les PCNSL et les SCNSL.⁸ Bien que fréquemment rencontrés en cas de PCNSL, ces signes ne sont en aucun cas spécifiques de cette pathologie, d'où la difficulté de discriminer les différentes hypothèses diagnostiques à partir des seuls arguments cliniques. En pratique, ce sont ces derniers qui motivent la réalisation d'examens complémentaires afin d'orienter le diagnostic, et notamment les examens d'imagerie médicale ainsi que les examens biologiques. Ils permettent également d'établir un diagnostic différentiel afin d'exclure les autres étiologies possibles à ces symptômes. Parmi celles-ci sont fréquemment citées les autres tumeurs cérébrales hématopoïétiques et non hématopoïétiques, les métastases secondaires à un cancer solide, les causes infectieuses (tuberculomes, toxoplasmoses cérébrales), les tumeurs histiocytaires, ou encore les pathologies inflammatoires (sarcoïdoses, vascularites, sclérose en plaques).^{4,19,22}

II. IMAGERIE MÉDICALE

Les examens d'imagerie médicale constituent un des éléments majeurs dans le bilan diagnostique des PCNSL, afin de confirmer ou non la présence d'une masse tumorale focale au niveau encéphalique, potentiellement compatible avec un lymphome cérébral. Parmi les deux techniques de choix conventionnelles, à savoir le scanner cérébral par tomodensitométrie (TDM) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébrale, la seconde semble offrir les meilleures performances notamment en termes de sensibilité et de précision.^{4,15}

Chez les immunocompétents (figure 6), les lésions observées sont uniques dans la majorité des cas (40 à 80% selon les articles), et multiples pour les 20 à 40% des cas restants.^{3,4} Elles sont principalement localisées au niveau des hémisphères cérébraux (en particulier le lobe frontal), puis moins fréquemment au niveau des régions périventriculaires, du corps calleux, et des noyaux gris centraux. Plus rarement, le tronc cérébral et le cervelet peuvent également être incriminés, ainsi que la moelle épinière de façon plus exceptionnelle.^{3,18} La grande majorité des cas présente au moins une lésion en contact avec une structure contenant du LCR, favorisant l'envahissement leptoméningé.³ Les lésions montrent classiquement un aspect homogène avec prise de contraste nette et brillante. Au scanner sans injection de produit de contraste, elles apparaissent plutôt iso- à hyperdense. A l'IRM, elles sont iso- à hypointenses en comparaison à la substance grise sur les images pondérées en T1. En T2, il est possible d'apercevoir des lésions hypo-, iso- ou hyperintenses. Une prise de contraste linéaire périvasculaire est fortement

évoquatrice de PCNSL.^{3,18} Un œdème péri-lésionnel est observé dans la plupart des cas, mais d'intensité moindre que pour les œdèmes constatés dans le cadre de tumeurs cérébrales non hématopoïétiques.^{3,4}

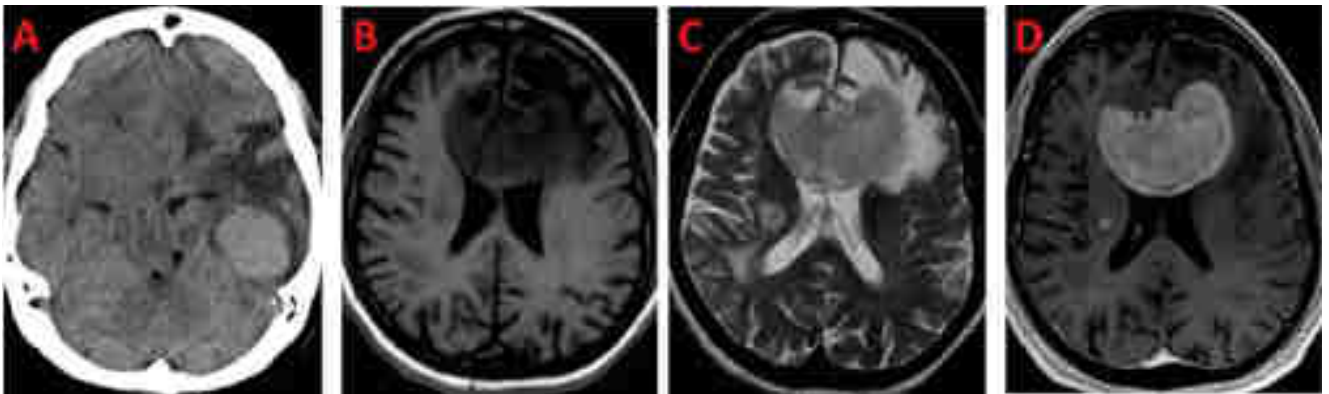


Figure 6. Images typiques d'un PCNSL de l'immunocompétent.³ Chez un premier patient, la masse unique apparaît homogène et hyperdense au scanner sans prise de contraste, accompagnée d'un œdème périlésionnel (A). Chez un second patient, l'IRM révèle une masse hypointense par rapport à la substance grise en T1 (B) et en T2 (C), avec prise de contraste intense et homogène (D). Un œdème périlésionnel est également visible (B, C, D).

Les immunodéficients sont très souvent caractérisés par des lésions multiples (30 à 80% des cas selon les études).^{15,18} Par ordre de fréquence, les noyaux gris centraux et le corps calleux sont souvent impliqués, suivis par le lobe frontal.^{3,18} Les lésions apparaissent plus hétérogènes, souvent nécrotiques ou hémorragiques, avec une prise de contraste clairsemée, ou classiquement en périphérie de la zone centrale de nécrose non réhaussée (prise de contraste en anneau).^{3,9,15} Elles sont plutôt iso- à hypodenses au scanner sans injection de produit de contraste. Un effet de masse ainsi qu'un œdème péri-lésionnel plus volumineux sont caractéristiques (figure 7).^{3,15}

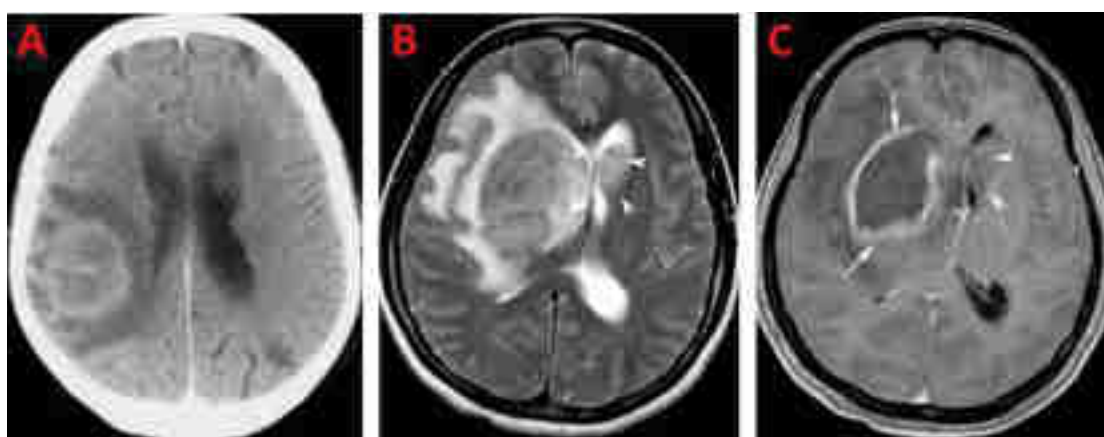


Figure 7. Images typiques d'un PCNSL de l'immunodéficient.^{3,18} Chez un premier patient, la masse unique montre au scanner une prise de contraste hétérogène avec un réhaussement périphérique en anneau (A). Chez un second patient, l'IRM révèle en T2 plusieurs lésions (B) : une lésion large et diffuse impliquant le ganglion basal droit et l'hypothalamus, et une lésion du noyau caudé gauche (pointes de flèche), toutes deux accompagnées d'un œdème périlésionnel. L'injection de gadolinium (C) révèle une prise de contraste en anneau, uniquement périphérique sur la première lésion (flèches), et une absence de prise de contraste sur la deuxième lésion (pointes de flèche).

D'un point de vue purement neuroradiologique, il reste difficile de distinguer un PCNSL d'un SCNSL.⁸ Toutefois, les localisations secondaires concernant plus souvent les leptoméniges que pour les PCNSL, il est possible d'observer des prises de contraste anormales à ce niveau-là ou sur les nerfs crâniens (figure 8).^{3,18} Au même titre que pour les atteintes oculaires, il arrive qu'aucune anomalie ne soit visible à l'imagerie pour les atteintes leptoméningées. Un scanner complet, ou bien un scanner de type tomographie avec émission de positons (PET-Scan) permettront plus aisément d'éliminer une atteinte systémique.⁹

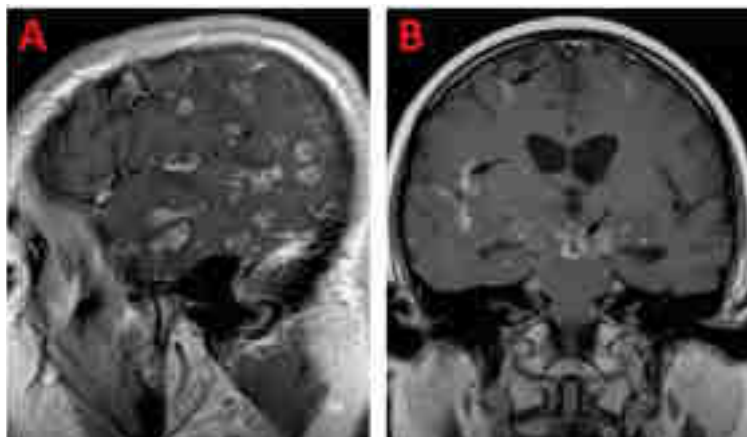


Figure 8. IRM compatible avec une atteinte leptoméningée extensive de PCNSL.³

Présence d'une atteinte leptoméningée diffuse chez deux patients (A et B, flèches). Atteinte additionnelle bilatérale des nerfs trijumeaux chez un des deux patients (B, pointes de flèches).

Des techniques d'imagerie plus avancées peuvent également compléter le bilan neuroradiologique et contribuer au diagnostic différentiel. L'IRM de diffusion, par application de gradients de diffusion, apporte des indications quant à la mobilité des molécules d'eau à travers les structures cérébrales. Les masses lymphomateuses étant relativement denses et hypercellulaires, la diffusion de ces molécules à l'intérieur de la tumeur demeure restreinte et se traduit par un coefficient apparent de diffusion faible, à l'origine d'un signal hyperintense en résonance magnétique. Cette caractéristique permet de différencier une origine lymphomateuse d'un gliome ou d'une métastase qui en général arborent un coefficient de diffusion plus élevé.^{3,4,12,18,83}

L'imagerie de perfusion (par TDM ou IRM) offre différents paramètres relatifs au niveau de vascularisation de la tumeur. La mise à profit des signaux provoqués par les agents de contraste respectifs, au sein d'une analyse dynamique dans le temps et non ponctuelle, permet de cartographier les zones perfusées, et de déterminer les débits de vascularisation ainsi que le volume sanguin cérébral. Les tumeurs lymphomateuses étant moins sujettes aux phénomènes de néovascularisation, elles peuvent être distinguées d'autres tumeurs ou de métastases, promotrices d'une néo-angiogénèse massive.^{3,18,83} La spectrométrie par résonance magnétique repose sur le même principe que l'IRM, mais numérise les signaux obtenus sous forme de spectres, dont l'analyse permet d'obtenir un profil biochimique quantifié. La composition biochimique des tumeurs lymphomateuses présente des caractéristiques particulières qui peuvent conforter le diagnostic, comme la richesse en lipides.^{18,83}

L'imagerie de susceptibilité magnétique consiste à optimiser la technique d'IRM afin de pouvoir rechercher la présence d'éléments non visibles en imagerie conventionnelle. Il peut s'agir de processus de calcification, de micro-vaisseaux ou de microhémorragies, qui dans le cadre des lymphomes du SNC sont plus rares que d'autres tumeurs comme les gliomes.¹⁸

Un PET-Scan classique, qui utilise les propriétés des tumeurs avides en glucose à capter en masse le fluorodésoxyglucose (marqué au ¹⁸Fluor) et ainsi à afficher un signal hyperintense, est capable de distinguer les masses lymphomateuses (au caractère hypermétabolique plus marqué) des gliomes ou des métastases. D'autres techniques d'imagerie métabolique peuvent être employées à l'aide de différents radio-isotopes, tels que la ¹¹C-méthionine (qui permet d'optimiser le contraste entre les structures cérébrales saines et malignes) ou le thallium-201.^{3,18,83}

Bien que les techniques d'imagerie médicale complètent les données cliniques et contribuent à affiner le diagnostic, elles ne sont pas exclusivement suffisantes pour objectiver le statut du patient pour un éventuel lymphome du SNC. D'une part, les examens proposés n'arborescent pas une sensibilité suffisante pour conclure formellement à l'absence d'un PCNSL. D'autre part, le manque de spécificité de l'aspect des lésions rend le diagnostic différentiel complexe. En effet, le caractère bénin, malin, inflammatoire, infectieux, ou dysimmunitaire des lésions cérébrales observées ne peut être identifié sur la simple base des clichés. En raison de leurs similitudes à l'imagerie, la toxoplasmose cérébrale et la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP) restent les deux étiologies différentielles majeures à considérer chez les patients immunodéprimés, d'autant plus qu'il s'agit là des trois causes les plus fréquentes de lésions focales cérébrales dans cette population.^{3,15}

Des outils complémentaires sont donc indispensables afin d'affiner le diagnostic.

III. ANATOMOPATHOLOGIE

A) Prélèvements : biopsies cérébrales et oculaires

L'examen anatomopathologique est aujourd'hui considéré comme le gold standard diagnostique en matière de PCNSL, et repose sur une biopsie de la tumeur par un neurochirurgien.⁸ Il s'agit le plus communément d'une biopsie cérébrale stéréotaxique, réalisée sous anesthésie locale ou générale. En raison de la haute précision qu'impose un tel geste chirurgical, un cadre stéréotaxique est employé non seulement pour immobiliser la tête du patient, mais également pour définir les coordonnées spatiales précises de la tumeur à l'aide d'un repère de référence en trois dimensions. Combiné à une technique neuroradiologique (IRM, scanner), il permettra au chirurgien de déterminer finement la localisation de la tumeur ainsi que la trajectoire du prélèvement. Après une incision cutanée et un forage de la boîte crânienne, un trocart de biopsie peut alors être inséré jusqu'à la cible afin de biopsier le tissu tumoral.⁸⁴

Des vitrectomies, ou encore des biopsies rétinienne peuvent également être effectuées par les ophtalmologues en cas de suspicion de LOC.⁷⁸

Comme précédemment évoqué, l'usage des corticoïdes doit être proscrit dans la mesure du possible avant la réalisation de la biopsie, car leur efficacité peut conduire à une destruction rapide des cellules lymphomateuses, et à une négativation des examens histologiques et biologiques.^{4,9,19,22,73} La disparition des lésions potentiellement visibles à l'imagerie réduit l'efficacité de la biopsie, ce qui contribue aussi au risque de ne pas détecter les clones malins à l'examen anatomopathologique (figure 9). Ainsi, il a été démontré par plusieurs études que près de 50% de PCNSL pouvaient être masqués en cas d'usage des corticoïdes au moment de la biopsie,⁷³ pour une sensibilité initiale de 87 à 91% en ce qui concerne l'examen anatomopathologique.^{73,85}

Pour les patients ayant bénéficié d'un pré-traitement par glucocorticoïdes et dont la biopsie n'aurait pas été concluante, il est de ce fait recommandé de suivre attentivement le patient et de réitérer ultérieurement le geste chirurgical, notamment en cas de réapparition d'une tumeur à l'imagerie.⁴

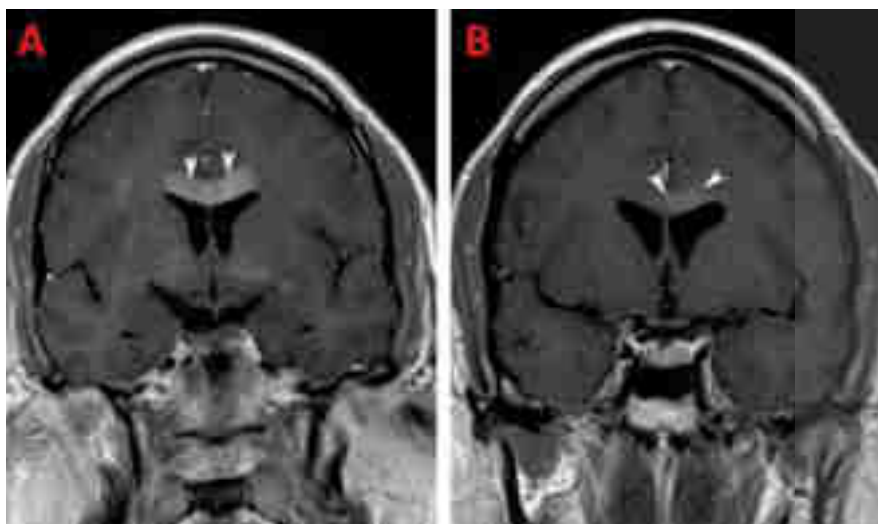


Figure 9. Impact des glucocorticoïdes sur l'IRM.³

Présence d'une lésion du corps calleux avec réhaussement net (A), dont la prise de contraste s'estompe de façon significative après administration des corticoïdes (B).

Ce geste chirurgical présente des risques non négligeables pour le patient. Des hémorragies intracrâniennes ou des déficits fonctionnels font partie des complications fréquemment observées, et qui malheureusement peuvent entraîner le décès du patient pour une minorité d'entre eux.^{8,16} D'autant plus que la localisation plus ou moins profonde de la tumeur peut complexifier la manœuvre, justifiant parfois l'abandon de cette technique. Même si les performances diagnostiques sont optimales, des outils biologiques ont été développés afin de faciliter le diagnostic de PCNSL à partir de prélèvements à moindre risque chirurgical (se référer au chapitre du diagnostic biologique).

Une fois la biopsie réalisée, le prélèvement est immédiatement immergé dans du formol afin de conserver au mieux l'intégrité des cellules et de l'architecture tissulaire.

B) Examen anatomopathologique

Lors de la réception des biopsies au laboratoire d'anatomopathologie, les prélèvements sont imprégnés avec de la paraffine chaude, un milieu d'inclusion dont le but est de former de véritables blocs de tissus paraffinés solides après refroidissement. Ils permettant ainsi la réalisation de coupes fines et de qualité qui seront apposées sur lame, en vue des examens histologiques.

1) Histologie

Après une étape de coloration à l'hématoxyline-éosine, les lames peuvent être observées au microscope optique. Typiquement, une infiltration par des cellules de grande taille correspondant aux cellules lymphomateuses pourra être observée. La morphologie centroblastique ou immunoblastique pourra également être appréciée. Au vu des résultats discordants entre les différentes sources, il semble délicat d'établir une concordance entre la morphologie et le sous-type histologique, probablement en raison de la faible reproductibilité intra- ou inter-opérateurs quant à la lecture microscopique. Tandis qu'une partie des études retrouvent d'une part une morphologie plutôt centroblastique (84 à 90% des cas) chez des PCNSL majoritairement de type ABC (96% des cas),^{6,11} les morphologies centroblastique et immunoblastique ont d'autre part été associées respectivement avec les DLBCL-CG et les DLBCL-ABC.³⁰

En raison du caractère agressif et prolifératif des PCNSL, des cellules en mitose peuvent également être observées. Un contingent de cellules inflammatoires est fréquemment présent, composé alors de lymphocytes réactionnels, de macrophages, de cellules microgliales ou de cellules endothéliales.²²

2) Immunohistochimie

L'analyse immunohistochimique représente la deuxième étape de l'examen anatomopathologique. Celle-ci consiste à étudier des marqueurs phénotypiques cellulaires à l'aide d'anticorps dirigés spécifiquement contre les antigènes d'intérêt. Elle vient compléter l'analyse cytologique pure et offre ainsi une meilleure sensibilité de détection des cellules malignes.²²

La mise en évidence des cellules marquées passe par le biais d'une réaction enzymatique sur le substrat chromogène couplé à l'anticorps. Chaque marqueur est ainsi analysé sur une coupe individuelle. Les antigènes recherchés sont de localisation membranaire, intra-cytoplasmique ou nucléaire. Il peut s'agir par exemple des marqueurs lymphocytaires pan-B (PAX5, CD19, CD20, CD79B), les marqueurs lymphocytaires T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8) ou encore des proto-oncogènes (BCL-2, BCL-6) ou d'autres marqueurs additionnels (CD10, MUM1/IRF4). Le Ki-67, marqueur nucléaire prolifératif, est quantifié sous forme de pourcentage pour apprécier le degré de prolifération des cellules. Le statut des cellules lymphomateuses pour l'EBV peut également être recherché par hybridation *in situ* de sondes spécifiques de son génome. Sa positivité traduit très probablement un PCNSL de l'immunodéficient.

Dans le cadre des DLBCL nodulaires ou systémiques, la classification imaginée par Hans *et al.* en 2004 peut être appliquée afin de distinguer les DLBCL-CG des DLBCL-ABC à l'aide de trois marqueurs.³²

Le CD10 membranaire, présent sur différentes lignées cellulaires (granuleuse, lymphocytaires B et T) correspond à un marqueur centro-germinatif précoce lorsqu'il est présent à la surface des LB.

Le BCL-6, proto-oncogène de type répresseur transcriptionnel et souvent muté dans les lymphomes B, représente également un marqueur centro-germinatif mais d'origine nucléaire. Tout comme le CD10, il n'est progressivement plus exprimé par les stades cellulaires B post-CG.

Quant à la troisième cible, il s'agit de MUM1 ou IRF4, marqueur nucléaire d'activation lymphocytaire, présent chez les cellules B activées (tardives CG, ou post-CG) ainsi que chez les plasmocytes.^{30,32}

Après avoir confirmé la présence d'un infiltrat lymphocytaire B ainsi qu'un aspect morphologique de type DLBCL, la combinaison de ces trois marqueurs permet d'affiner le sous-type histologique (figures 10 et 11). Les DLBCL-CG n'expriment en aucun cas le marqueur d'activation MUM1/IRF4, et expriment au minimum un des deux marqueurs centro-germinatifs (CD10 ou BCL-6). L'absence d'expression de ces deux marqueurs témoigne d'un DLBCL-ABC (ou non-CG), au même titre que la positivité du marqueur MUM1/IRF4 même en cas d'expression de BCL-6 (il s'agit alors de cellules activées centro-germinatives ou post-CG précoces, n'ayant pas totalement abouti leur maturation immunologique, qui ont d'ailleurs été classées séparément ou en tant que telles par certains auteurs^{30,31}).

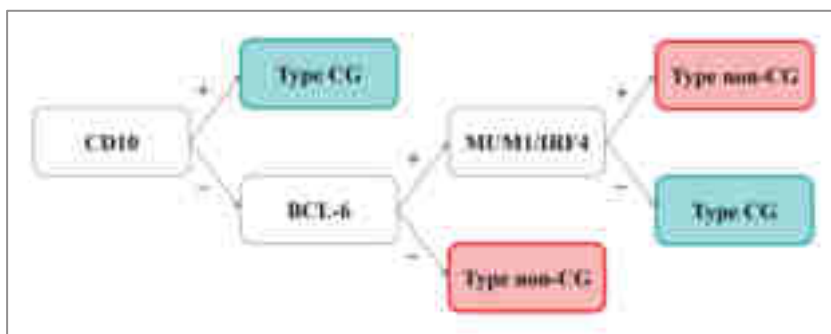


Figure 10. Classification de Hans *et al.* pour les DLBCL.³²

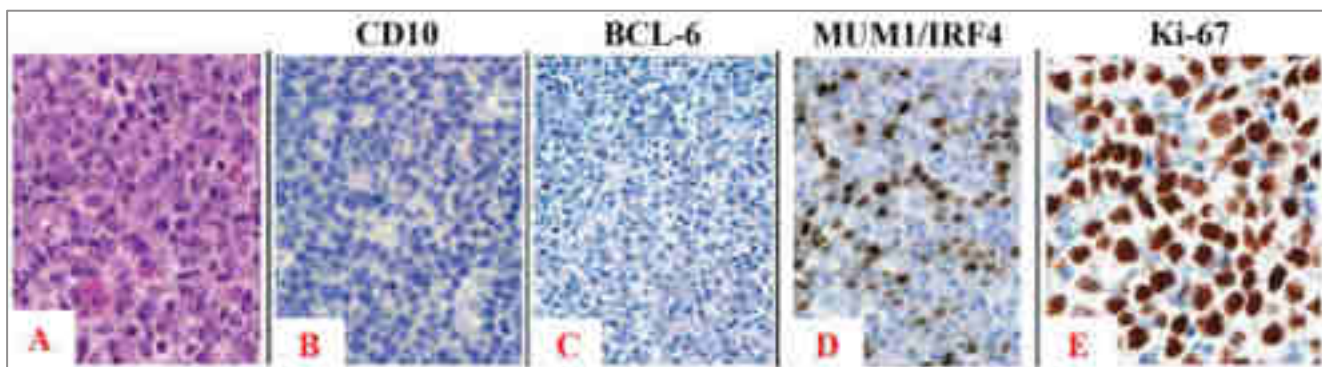


Figure 11. Examen immunohistochimique d'un DLBCL-ABC.⁸⁶ Une première coloration à l'hématoxyline-éosine permet d'apprécier la morphologie des cellules (A). Les marquages immunohistochimiques révèlent un DLBCL CD10 négatif (B), BCL-6 négatif (C), MUM1/IRF4 positif (D), avec un index de prolifération Ki-67 élevé à plus de 80% (E). Les cellules marquées sont colorées en marron, tandis que les cellules négatives sont contre-colorées en bleu pâle.

Parmi les PCNSL, le Ki-67 est fréquemment exprimé à des valeurs supérieures à 70%, jusqu'à 90% pour certains cas, témoignant d'un caractère hautement prolifératif et agressif.^{1,6,10} Le BCL-2 est exprimé dans 55 à 70% des cas,^{1,6,10,11} et souvent de façon hyperexprimée.^{1,10} Le CD138, un autre marqueur d'activation lymphocytaire tardif retrouvé dans les DLBCL-ABC ou marqueur plasmocytaire lorsqu'il est associé à une expression forte du CD38, n'est quasi jamais exprimé dans les PCNSL.^{1,6,11}

Sauf exceptions, le CD10 n'est exprimé tout au plus que par 10% des cas (prédominance moindre que parmi les DLBCL nodulaires et systémiques), BCL-6 est exprimé dans 60 à 84% des cas (de façon équivalente aux autres DLBCL), et MUM1/IRF4 dans 87 à 93% des cas selon les études (bien plus impliqué que dans les autres DLBCL).^{1,6,10,11} Il est à noter qu'à l'inverse des LB centro-germinatifs physiologiques chez lesquels BCL-6 et MUM1/IRF4 sont mutuellement exclusifs, ces deux marqueurs sont coexprimés dans près de la moitié des cas de DLBCL.^{1,11}

Ces résultats attestent bien de la grande majorité de DLBCL-ABC diagnostiqués parmi les PCNSL. Ils rejoignent d'ailleurs les conclusions évoquées antérieurement, à savoir que la voie NF- κ B, par nature impliquée dans le programme de différenciation des LB, est très couramment détournée au profit des clones lymphomateux dans les DLBCL-ABC et les PCNSL.^{8,13,28,33,41,42,46} La problématique énoncée précédemment au sujet de l'origine de ces cellules tumorales est également retrouvée ici, puisqu'une grande partie des PCNSL s'avère non seulement de nature activée (expression de MUM1/IRF4, sans pour autant exprimer le CD138), mais également de nature centro-germinative (co-expression de MUM1/IRF4 et de BCL-6), et diagnostiqués par défaut en tant que DLBCL-ABC sur la base de l'immunohistochimie. L'hypothèse d'une cellule B centro-germinative tardive ou d'une cellule post-CG précoce (et ainsi d'une entité unique plutôt que de deux sous-types distincts) corrobore les résultats obtenus par l'analyse des profils génétiques, et remet bien en question la pertinence de la classification de Hans pour les DLBCL du SNC.^{11,33,36} Un modèle schématique du dynamisme phénotypique, élaboré à partir d'un modèle hypothétique préexistant, a été proposé par Camilleri-Broet *et al.* afin de mieux comprendre la distinction des stades histologiques entre DLBCL systémique et PCNSL (figure 12).¹¹ L'idée d'une entité unique reste toutefois controversée au regard des données moléculaires et des classifications innovantes ayant émergé dans la littérature pour les DLBCL et les PCNSL.^{37-39,57}

IV. BIOLOGIE

Les outils de biologie médicale viennent compléter l'analyse anatomopathologique. Dotés de performances diagnostiques équivalentes voire supérieures car multidisciplinaires, certains d'entre eux et notamment les examens de routine arborent un délai de rendu de résultat bien plus court que l'examen histologique, représentant un avantage de taille dans un contexte de PCNSL.

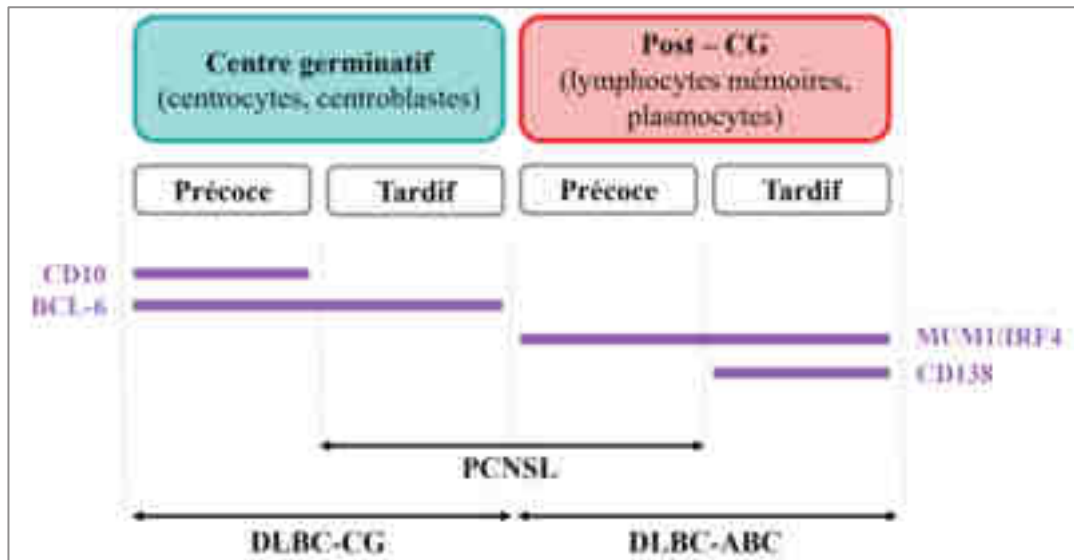


Figure 12. Représentation schématique de l'étendue des spectres phénotypiques des PCNSL et des DLBCL systémiques par rapport à l'évolution physiologique du phénotype lymphocytaire B. Bien que de rares PCNSL expriment le CD10, la majorité d'entre eux expriment le marqueur d'activation MUM1/IRF4, et près de la moitié co-expriment BCL-6, contrairement aux LB physiologiques (profil dynamique matérialisé en violet) et aux DLBCL systémiques ou nodulaires. Ils n'expriment jamais le CD138. Ainsi, les PCNSL se situent à l'interface entre les cellules centro-germinatives tardives et les cellules post-CG précoces.

A) Prélèvements contributifs

1) Cérébraux

La biopsie cérébrale peut également être exploitée au laboratoire de biologie de médecine. L'examen cytologique est réalisé à partir d'une apposition tissulaire sur lame, sans recours à la paraffine. La biopsie ne pouvant être utilisée telle quelle pour les autres examens, il est nécessaire d'imprégner le tissu avec un excès de milieu de culture cellulaire. C'est ce milieu concentré en cellules issues de la biopsie qui sera traité.

Il a aussi été prouvé par l'équipe du Dr. Deblieux du Groupement Hospitalier de la Région de Mulhouse et Sud Alsace (GHRMSA) que les liquides de rinçage du trocart de biopsie cérébrale (LRTBC) pouvaient contribuer au diagnostic puisque les performances se sont révélées au moins équivalentes à celles de l'anatomopathologie tissulaire. Le LRTBC provient de la solution saline utilisée pour séparer la biopsie du trocart, qui est récupérée après la procédure en raison de son enrichissement potentiel en cellules malignes. Cette suspension cellulaire prête à l'emploi ne nécessite donc pas de traitement pré-analytique supplémentaire, et peut facilement être congelée pour des analyses complémentaires.⁸⁷

2) Méningés

Parmi les PCNSL, approximativement 15 à 20% des cas développent une atteinte leptoméningée.^{9,22,80} Ces chiffres reposent cependant sur les résultats toutes techniques confondues (anatomopathologique, biologique, neuroradiologique) et contrastent avec un taux d'envahissement méningé observé de 80% par histopathologie sur une série de patients en post-mortem.⁸⁸ Les techniques conventionnelles d'analyse cellulaire sur LCR pourraient donc souffrir d'un manque de sensibilité considérable, d'où l'intérêt d'une analyse de la fraction acellulaire exposé plus loin.

Un prélèvement de LCR par ponction lombaire (PL) offre malgré tout l'opportunité de diagnostiquer un envahissement leptoméningé lymphomateux, et par extrapolation d'identifier un lymphome du SNC à moindre risque invasif pour le patient, sans avoir recours à la biopsie cérébrale.^{22,85,89} Il s'agit de la matrice de choix dans le bilan d'extension de lésions neuroradiologiques ou de symptômes neurologiques, qui se prête à l'intégralité des analyses biologiques. Cependant, ce milieu très sensible impose une prise en charge la plus rapide possible pour préserver la viabilité des cellules. En raison de la fréquente pauci-cellularité, il est recommandé de prélever dans la mesure du possible de grands volumes de LCR et de répéter les PL en cas de bilan négatif.^{85,89}

Les PL, réalisées ou non sous anesthésie locale en fonction des pratiques de chaque clinicien, présentent un degré d'invasivité relatif en comparaison à une biopsie cérébrale. Elles ne sont cependant pas dénuées de complications. Même si cet incident reste occasionnel, la ponction du LCR peut provoquer un engagement cérébral chez les patients sujets à une hypertension intracrânienne. L'augmentation du gradient de pression suite à la dépression locale créée au niveau de la ponction peut entraîner des complications neurologiques sévères par compression des différentes structures nerveuses.⁸⁵ De rares hématomes méningés et des infections post-PL ont aussi été notifiés. D'autres effets indésirables de gravité moindre peuvent souvent survenir, tels que des douleurs au niveau du dos ou des maux de tête. Néanmoins, l'utilisation d'aiguilles atraumatiques et le caractère passif du recueil du LCR permettent significativement de réduire l'incidence de ces complications post-PL, tout en tolérant des prélèvements de volume important (jusqu'à 30 mL).⁹⁰

3) Oculaires

Pour rappel, des PCNSL avec atteinte oculaire exclusive existent bien qu'ils soient plus rares, et jusqu'à 25% des PCNSL avec atteinte cérébrale développeront une atteinte oculaire. Des ponctions d'humeur vitrée (vitrectomies) ou d'humeur aqueuse peuvent donc également être proposées en cas de suspicion de lymphome oculaire. Sur l'humeur aqueuse, seul le dosage des interleukines pourra être réalisé car il n'existe pas d'envahissement cellulaire de ce liquide. Les échantillons de liquide vitré pur et dilué obtenus lors de la vitrectomie peuvent être exploités par les mêmes analyses biologiques que les prélèvements précédemment évoqués.⁷⁸

B) Analyse de la fraction cellulaire

1) Cytologie conventionnelle

L'étude morphologique des cellules constitue la première étape du bilan biologique en cas de suspicion de PCNSL et le gold standard dans le diagnostic des envahissements leptoméningés lymphomateux.^{22,85,89} La cytologie conventionnelle (CC) est effectuée au microscope optique sur un LCR préalablement cytopspiné et coloré au May-Grünwald Giemsa (MGG). De l'albumine bovine peut être ajoutée lors de la préparation du cytopspin afin de préserver les cellules projetées sur la lame par centrifugation. Cette technique peut également être employée sur des prélèvements biopsiques, des LRTBC ou encore l'humeur vitrée.

Deux aspects cytologiques majeurs de DLBCL peuvent éventuellement être appréciés notamment sur des échantillons tissulaires tels que les ganglions ou le tissu tumoral en lui-même (figure 13). Cette discrimination reste toutefois plus délicate dans des prélèvements de LCR, et plutôt réservée à l'examen anatomopathologique. Les cellules centroblastiques sont de grande taille, au cytoplasme modérément basophile dépourvu de granulations, au noyau régulier et arrondi avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (généralement supérieur à 0,8), à la chromatine fine et souvent pluri-nucléolée. Les cellules immunoblastiques sont également de grande taille, au cytoplasme intensément basophile et dépourvu de granulations, au noyau régulier avec un rapport nucléo-cytoplasmique moindre (inférieur à 0,8), à la chromatine mature et présentant parfois un nucléole unique. Dans le cadre d'un lymphome, il semble difficile d'établir une corrélation entre l'aspect cytologique des cellules anormales (centroblastique ou immunoblastique) et le stade maturatif correspondant (centroblaste de la zone sombre du CG, ou immunoblaste activé quasi post-CG) étant donné les discordances de résultats entre les différentes études.^{6,11,30}

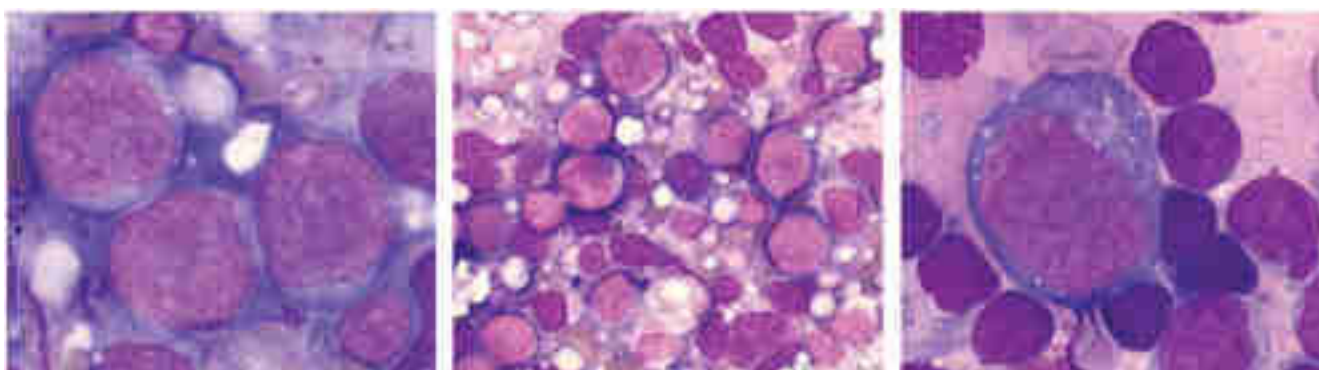


Figure 13. Aspects morphologiques des PCNSL.⁹¹ Le cliché de gauche montre trois cellules centroblastiques, le cliché de droite présente une cellule immunoblastique au rapport nucléo-cytoplasmique plus faible. Le cliché du milieu (objectif plus faible) montre une vue d'ensemble et témoigne de la grande taille et de l'hyperbasophilie des cellules lymphomateuses en comparaison aux autres cellules sanguines.

2) Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) offre la possibilité de déterminer le phénotype des cellules. Tout comme l'immunohistochimie, elle repose sur l'utilisation d'anticorps marqués et dirigés contre des antigènes membranaires, intra-cytoplasmiques ou nucléaires, mais avec une analyse simultanée de plusieurs antigènes (analyse multi-couleurs d'une dizaine d'antigènes en routine) à partir de cellules directement en suspension, et non pas de cellules fixées sur coupes anatomiques. Elle peut être employée sur du sang, d'autres liquides biologiques tels que du LCR ou de l'humeur vitrée, sur une suspension cellulaire émanant d'une biopsie, ou sur des LRTBC. La détection des antigènes ne s'effectue pas grâce à une réaction enzyme-substrat, mais par un processus d'excitation-émission des fluorochromes couplés aux différents anticorps.

Après une étape d'incubation à l'abri de la lumière permettant le marquage des cellules, la suspension est analysée par un cytofluorimètre doté généralement de trois lasers (bleu, rouge et violet) en routine hospitalière. Ceux-ci pourront successivement exciter chacune des molécules de fluorochrome rencontrées lors du passage individualisé des cellules devant les lasers, les cellules étant entraînées grâce à un principe de double focalisation hydrodynamique par l'intermédiaire d'un liquide de gaine. Les fluorochromes sont caractérisés par un spectre d'excitation ainsi qu'un spectre d'émission qui leurs sont propres, à partir desquels les trois lasers permettront l'acquisition d'une dizaine de couleurs, et l'étude de l'expression d'au moins une dizaine de marqueurs. Outre l'utilisation d'anticorps marqués, les paramètres de diffusion de la lumière à 180°C et de réfraction à 90°C offriront respectivement une idée de leur taille (*forward light scatter*, FSC) et de leur structure, granularité ou complexité (*side light scatter*, SSC). Les signaux lumineux composés de photons ainsi émis seront détectés et convertis en signaux numériques par des photodiodes ou photomultiplicateurs (figures 14 et 15).

Bien que les marqueurs fondamentaux étudiés soient relativement communs à ceux analysés par immunohistochimie, la CMF présente l'avantage de pouvoir rechercher un nombre plus important de cibles, qui ne se prêtent pas toutes à la reconnaissance antigène-anticorps sur des coupes anatomiques.²² Alors que l'examen anatomopathologique permet uniquement d'analyser les marqueurs les uns après les autres sur des coupes individuelles (un seul marqueur étudié par coupe), la CMF offre une analyse multidimensionnelle. En effet, une cellule unique est capable de fixer tous les anticorps qui la concernent de façon concomitante, permettant de distinguer clairement les différentes populations cellulaires et d'identifier la combinaison phénotypique de chacune d'entre elles à l'aide des divers anticorps marqués. De plus, le niveau d'expression de chaque marqueur peut être évalué avec précision grâce à la mesure de l'intensité de fluorescence moyenne d'une population (MFI) contrastant avec l'évaluation visuelle semi-quantitative en immunohistochimie.

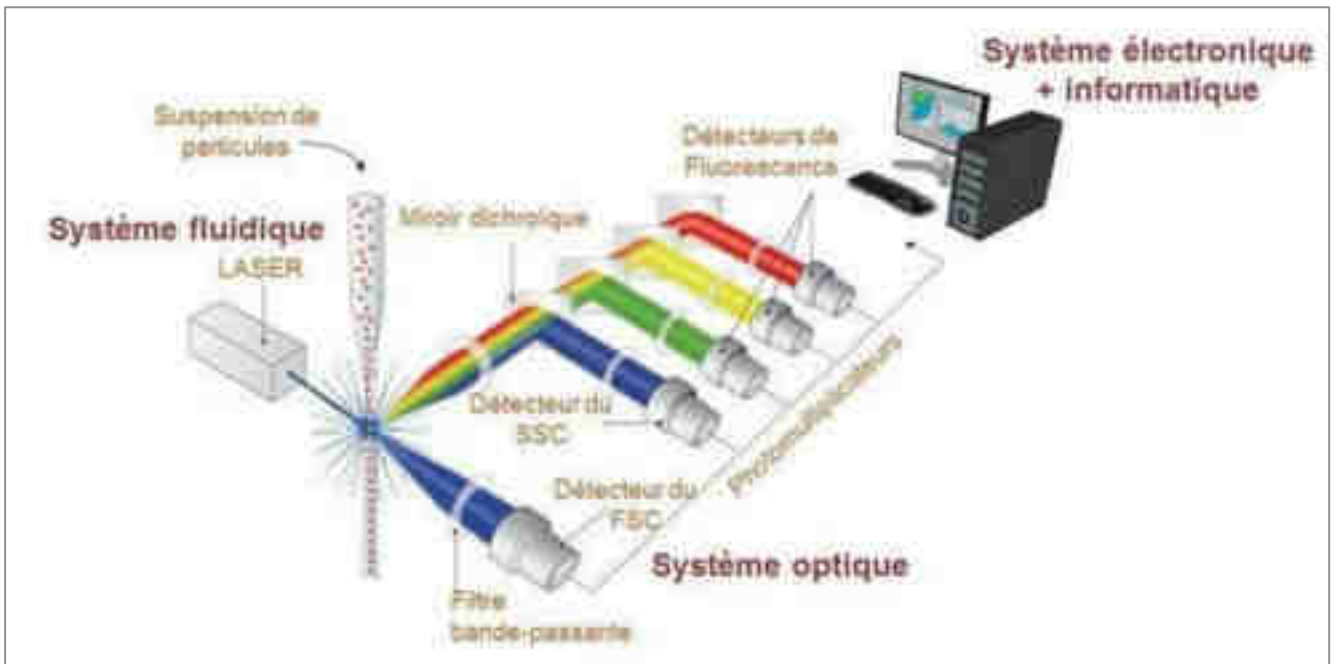


Figure 14. Principe du cytomètre en flux.⁹² Les cellules passent individuellement devant les rayons des trois lasers. Les filtres bande-passante permettent de sélectionner une ou plusieurs longueurs d'onde à analyser sur la lumière émise au niveau de chaque photomultiplicateur. Les trajets des faisceaux lumineux sont dirigés à l'aide des miroirs dichroïques.

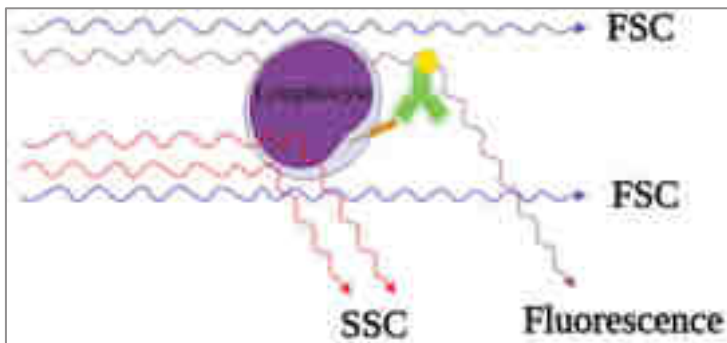


Figure 15. Représentation des différents paramètres cellulaires analysés par CMF.

La taille est déterminée selon la diffusion axiale de la lumière (FSC), et la structure selon la réfraction à 90°C (SSC). Le niveau d'expression des marqueurs (en orange) est reflété par l'émission d'une fluorescence à 90°C grâce aux anticorps marqués.

Classiquement, l'immunophénotypage des PCNSL révèle majoritairement un profil de DLBCL : des cellules de grande taille (FSC élevée comparée aux lymphocytes normaux) ; leur caractère hématopoïétique et leucocytaire mature (marqueur pan-leucocytaire CD45+, marqueur d'immaturation CD34-) ; leur appartenance à la lignée lymphoïde B (CD19+, CD20+, CD79A/B+) ; leur caractère hautement prolifératif (Ki-67 élevé, CD71+). Leur caractère monotypique est prouvé par la restriction isotypique d'une seule chaîne légère (kappa ou lambda). Une population physiologique B apparaît en effet polytypique (ratio kappa/lambda équilibré, souvent plus en faveur des chaînes kappa de l'ordre de 2/1) puisque la sélection de la chaîne légère repose sur un processus purement aléatoire. La priorisation des réarrangements avec une chaîne kappa par rapport à une chaîne lambda explique la balance en faveur des lymphocytes kappa. Une population maligne étant en revanche issue de la prolifération d'un seul et même clone (avec sélection éventuelle de sous-clones), les lymphocytes qui la constituent expriment tous la même chaîne légère. Un exemple d'immunophénotypage est représenté sur la figure 16.

En raison du caractère pathologique des cellules, l'expression et le niveau d'expression des antigènes cités ci-dessus peuvent potentiellement varier de façon anormale. Ces DLBCL peuvent également exprimer de façon aberrante le CD5 (marqueur lymphocytaire T précoce), et surexprimer l'inhibiteur apoptotique BCL-2 en intra-cytoplasmique. Les antigènes CD10, BCL-6 en intra-nucléaire et MUM1/IRF4 permettent de classer les PCNSL comme étant majoritairement de sous-type histologique DLBCL-ABC par extrapolation de la classification de Hans évoquée plus haut. Le CD138 n'est généralement pas exprimé.^{1,9-11}

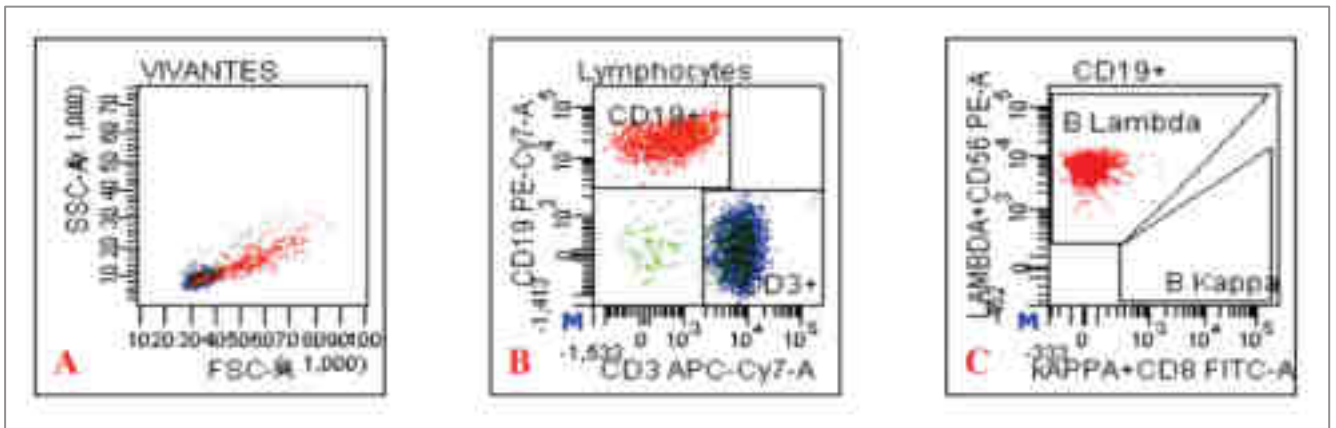


Figure 16. Immunophénotypage d'un LCR envahi par un DLBCL.⁹³ Le graphique (A) présente les évènements cellulaires selon leur granularité (SSC) et leur taille (FSC). Le graphique (B) montre la distribution des populations lymphocytaires (lymphocytes B CD3-/CD19+ en rouge, LT CD3+/CD19- en bleu, lymphocytes CD3-/CD19- en vert). L'analyse de l'expression des chaînes légères de surface sur les LB CD3-/CD19+ révèle une monotypie lambda (C).

D'une part, il a été constaté que les lésions du SNC semblaient fréquemment être adjacentes à des régions en lien avec le LCR, telles que les structures périventriculaires, épendymaires, les surfaces corticales ou la pie-mère.^{3,85} D'autre part, des autopsies de patients décédés atteints de PCNSL ont révélé un envahissement leptoméningé chez 80% d'entre eux.⁸⁸ Or, selon différentes études, la CC permettrait de prouver la présence de cellules lymphomateuses dans le LCR dans seulement 2 à 32% des cas de lymphome du SNC.^{85,89,94} Au vu des éléments précédents, ces données remettent donc en doute la sensibilité de ce gold standard. Un manque de spécificité est également à noter, puisque la distinction morphologique entre des cellules lymphomateuses de type DLBCL et des cellules réactionnelles n'est pas toujours aisée, notamment dans des liquides biologiques différents du sang.⁸⁵

La CMF arbore une meilleure sensibilité que la CC, puisqu'elle est capable de détecter des populations lymphocytaires clonales représentant moins de 1% des cellules totales, ou sur un nombre très faible de cellules. A titre de comparaison, il semblerait que la CC nécessite une fraction de cellules malignes au moins égale à 5% dans le LCR pour espérer détecter la population lymphomateuse. Il apparait donc naturel d'associer systématiquement la CMF à la CC afin d'améliorer la détectabilité d'un

envahissement méningé.^{85,89} Pour illustrer ce propos, Schroers *et al.* ont observé que la CMF permettait de prouver une atteinte leptoméningée dans 23,3% des cas de PCNSL, contre seulement 13,3% des cas avec la CC seule.⁹⁴

Des résultats similaires sont établis pour la détection d'un envahissement leptoméningé chez les SCNSL, plus souvent étudiés que les PCNSL probablement en raison d'une incidence plus élevée : un taux de 25,9% (CC seule) à 37% (ajout de la CMF), avec 1 cas de PCNSL dans la cohorte de 27 patients⁹⁵; une augmentation de sensibilité de 50% avec la CMF (6 patients en CC seule, 9 patients avec l'ajout de la CMF)⁹⁶ ; un taux de 2% (CC seule) à 21,6% (ajout de la CMF) chez des lymphomes agressifs, (DLBCL ou Burkitt)⁹⁷ ; un taux de 5,7% à 22% chez des lymphomes agressifs (DLBCL ou Burkitt principalement)⁹⁸ ; une sensibilité de 16% à 24% sur 62 échantillons⁹⁹ ; un taux de 4 à 10% chez des lymphomes agressifs (DLBCL ou Burkitt principalement).¹⁰⁰ De façon étonnante, ces résultats contrastent avec ceux de Kiewe *et al.* qui ont pu détecter un envahissement leptoméningé chez 11% des PCNSL par CC, contre seulement 3% par CMF. L'usage de glucocorticoïdes préalablement aux analyses biologiques, ainsi que les faibles effectifs de cette étude pourraient expliquer cette discordance, bien que ces limites s'appliquent également à d'autres travaux cités plus haut.⁸¹

3) Biologie moléculaire

a) Recherche de la mutation *MYD88* L265P par PCR digitale

a.1. Intérêt général de la recherche de la mutation *MYD88* L265P

Bien qu'il n'existe à ce jour pas de thérapie ciblée contre la protéine MYD88, la recherche de cette mutation fréquemment incriminée pourrait de ce fait présenter un intérêt dans le diagnostic initial et dans le suivi des lymphomes du SNC, d'autant plus que les résultats cytologiques et immunophénotypiques sont régulièrement d'interprétation délicate.

Il a été démontré à plusieurs reprises que cette mutation hotspot était vraisemblablement spécifique d'un processus lymphomateux. Celle-ci n'est en effet pas retrouvée dans les tissus anatomiques sains, ni dans diverses tumeurs malignes non cérébrales.^{24,101} De façon plus intéressante, elle semble également absente dans les tumeurs cérébrales malignes non hématopoïétiques les plus prédominantes, telles que les glioblastomes.^{42,102,103} Ainsi, en cas de tumeur cérébrale non étiquetée et en l'absence d'argument formel biologique ou anatomopathologique, la mise en évidence de cette mutation au niveau méningé ou cérébral permettrait d'orienter le diagnostic vers une pathologie hématologique lymphomateuse. Elle n'est cependant pas suffisante pour identifier précisément le sous-type de lymphome, puisque les lymphomes lymphoplasmocytaires et les maladies de Waldenström (MW) sont porteurs de la mutation *MYD88* L265P dans près de 90% des cas.^{1,104} Les gammopathies à IgM sont également souvent concernées, ainsi que les DLBCL. Sa détection dans le LCR ne permet donc pas isolément de discriminer

un PCNSL d'une infiltration neuroméningée secondaire à un de ces lymphomes (syndrome de Bing-Neel dans le cas d'une macroglobulinémie de Waldenström).^{89,101}

De plus, sa forte prévalence au sein des PCNSL justifie sa recherche systématique face à une suspicion de tumeur lymphomateuse afin de conforter le diagnostic. La revue de la littérature présentée par Hiemcke-Jiwa *et al.* montre des prévalences de la mutation *MYD88* L265P au sein des PCNSL de 28%, 33%, 36%, 38%, 38%, 60%, 60%, 64%, 67%, 70%, 75%, et 94%.⁸ Des chiffres de 80%, 85% et 88% sont également rapportés dans d'autres travaux.^{13,24,103} Il est à noter que le statut mutationnel a pu être déterminé par des techniques de séquençage (Sanger, NGS, pyroséquençage) ou de PCR (qPCR, ddPCR). La classification histologique des PCNSL mise à part, la prédominance de cette mutation parmi les DLBCL-ABC par rapport aux DLBCL-CG a largement été démontrée.^{8,12,13,24,42,103} De plus, les DLBCL nodulaires et systémiques semblent impliquer moins souvent la mutation *MYD88* L265P, présente dans seulement 15 à 40% des DLBCL-ABC selon les sources,^{8,74,105} comparativement aux DLBCL du SNC ainsi qu'aux autres DLBCL extra-nodulaires.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Sur le plan clinique, une majorité de travaux s'accordent pour considérer la mutation *MYD88* L265P comme un facteur de mauvais pronostic, soit au sein des DLBCL dans leur ensemble,¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ soit directement au sein des PCNSL.⁷⁴⁻⁷⁶ Takano *et al.* ont mis en évidence le caractère pronostique péjoratif conféré par cette mutation mais uniquement chez les patients de plus de 65 ans, sans qu'aucun de ces deux paramètres ne soit isolément associé à un plus mauvais pronostic.⁷⁵ Avec une tendance à diminuer statistiquement la survie globale, certaines études démontrent également une augmentation du risque de progression de la pathologie associée à cette mutation,^{74,105,108} voire de progression neuro-méningée en ce qui concerne les DLBCL n'affectant initialement pas le SNC.¹⁰⁶ En complément de son intérêt diagnostique, un intérêt pronostique pourrait donc se profiler pour la mutation *MYD88* L265P. Néanmoins, des études multicentriques à plus grande échelle sont encore nécessaires afin d'analyser les données pronostiques sur des groupes homogènes de DLBCL et bien distincts en fonction de la localisation anatomique concernée.

a.2. Application de la PCR digitale

Les diverses techniques moléculaires mises à profit afin de détecter la mutation *MYD88* L265P reposent sur le principe général soit de la *polymerase chain reaction* (PCR), soit du séquençage génomique. Seule la PCR digitale en gouttelettes (*digital droplet PCR*, ddPCR), qui a été étudiée dans le cadre de ce mémoire, sera explicitée ici. Le principe de cette technique, proposé pour la première fois en 1999 et développé plus largement à partir des années 2010,¹⁰⁹ se distingue de la PCR quantitative (qPCR) classique par un procédé d'amplification indépendant de chaque brin d'ADN présent dans l'échantillon, isolés à l'intérieur de milliers de microréacteurs individualisés.

La recherche de la mutation est effectuée sur la fraction cellulaire pouvant provenir d'échantillons de sang, mais également de LCR, de liquides vitrés, ou encore de suspensions cellulaires issues d'une biopsie cérébrale ou de LRTBC. Après une étape de lyse cellulaire et une étape d'extraction préalables, l'ADN cellulaire (ADNc) obtenu est préparé avec un milieu réactif pour PCR. Celui-ci est constitué des éléments indispensables à l'amplification génomique, à savoir : un couple d'amorces sens et anti-sens encadrant la séquence d'intérêt ; des nucléotides : l'ADN polymérase permettant l'élongation des brins d'ADN à partir des amorces et des nucléotides ; deux sondes fluorescentes discriminantes des séquences sauvages *wild-type* (WT) et mutées ; du tampon et de l'eau.

La plaque PCR contenant les échantillons est alors placée dans un générateur de gouttelettes, un appareil propre à la technique de ddPCR. A partir d'une huile de génération dédiée, des gouttelettes lipidiques sont formées en incorporant aléatoirement et individuellement un brin d'ADN unique (un génome haploïde), WT ou muté. En pratique, certaines gouttelettes peuvent incorporer plusieurs brins d'ADN, notamment en cas d'excès de matériel génétique. Une fois cette étape terminée et la plaque PCR scellée, la réaction classique de PCR à proprement parler peut être démarrée à l'aide d'un thermocycleur. Une succession d'étapes régies par des programmes bien précis de temps et de température permettra l'amplification indépendante de chacun des brins d'ADN incorporés dans les gouttelettes. Une étape d'activation enzymatique, ainsi qu'un nombre défini de cycles de dénaturation - hybridation – élongation seront nécessaires (figure 17).¹⁰⁹⁻¹¹¹

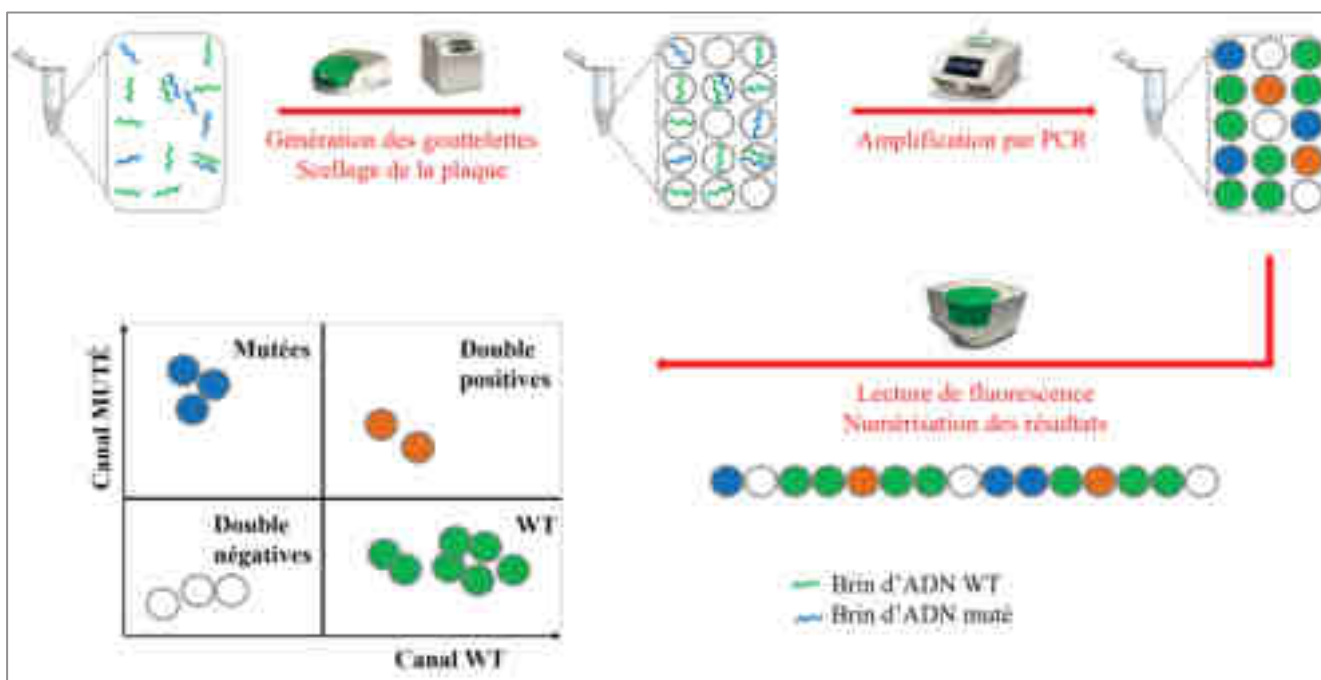


Figure 17. Principe général de la technique de ddPCR.¹⁰⁹

L'amplification étant aboutie, la détection de fluorescence peut être effectuée en point final sur chaque gouttelette grâce à un lecteur, et convertie en données numériques sur des graphiques uni- ou

bidimensionnelles par un logiciel numérique. Il est ainsi possible de connaître le statut génétique de chacune des gouttelettes grâce aux deux sondes fluorescentes. Tandis qu'une partie est qualifiée de WT ou de mutées en fonction de la positivité dans les canaux mutés (*channel 1*) et/ou WT (*channel 2*), il est possible d'observer des gouttelettes doublement positives, ayant incorporé un brin WT et un brin muté. Les gouttelettes dépourvues de matériel génétique seront donc doublement négatives (figures 17 et 18). C'est l'interprétation binaire de la fluorescence qui a d'ailleurs donné le nom de PCR « digitale ». En plus de son intérêt qualitatif, cette analyse permet de calculer la concentration d'ADN muté et WT en copies/ μL à partir du nombre d'évènements positifs et de la loi statistique de Poisson. Il est donc possible d'établir la fréquence allélique de la mutation étudiée (*variant allele frequency, VAF*), en rapportant la quantité d'ADN muté sur la quantité d'ADN total.

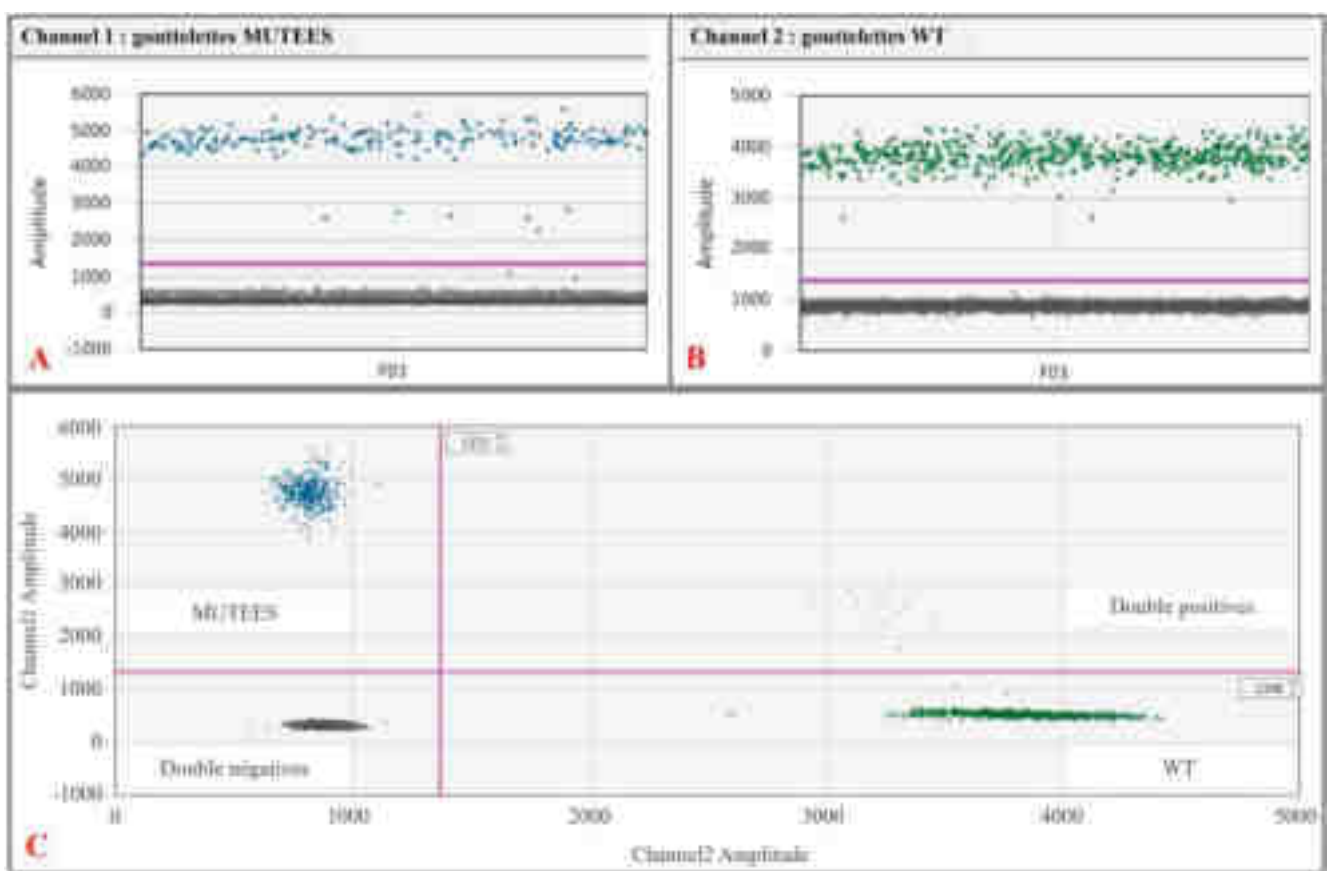


Figure 18. Résultats de ddPCR d'un patient *MYD88 L265P* muté dans le culot cellulaire du LCR.

Les seuils de positivité de fluorescence sont matérialisés par des lignes continues violettes et définis à l'aide de témoins négatifs, WT et mutés. Chaque point correspond à une gouttelette unique. Les graphiques unidimensionnels montrent la présence de gouttelettes mutées détectées dans le canal 1 (points bleus, graphique A) et de gouttelettes WT détectées dans le canal 2 (points verts, graphique B), positionnées dans leur ordre d'apparition en abscisse et selon leur intensité de fluorescence en ordonnée. Les points noirs représentent les gouttelettes doublement négatives dépourvues d'ADN. Le graphique bidimensionnel (C) permet d'analyser sur une même représentation la positivité et l'intensité de fluorescence pour les sondes mutée et WT. Se dégagent ainsi des populations double négative (points noirs), mutée (points bleus), WT (points verts) et double positive (points orange) qui ne peut être identifiée en analyse unidimensionnelle.

Il s'agit là d'une méthode de quantification absolue, par opposition à la qPCR traditionnelle qui se base sur une quantification relative à l'aide d'une gamme d'étalonnage. En s'affranchissant de l'utilisation de calibrateurs, et donc du risque inhérent de leur contamination environnementale, la ddPCR limite la variabilité potentielle entre PCR de l'échantillon et PCR des calibrateurs et affiche alors une meilleure reproductibilité.¹⁰⁹⁻¹¹¹

Les séquences génétiques d'intérêt sont concentrées localement dans chaque microréacteur que représente une gouttelette, grâce au principe de compartimentalisation des brins d'ADN et d'amplification individualisée. D'une part, ce procédé permet de limiter l'impact des éventuels perturbateurs ou inhibiteurs de PCR. D'autre part, il garantit une efficacité d'amplification optimale pour chaque brin d'ADN initial, contrairement à la qPCR où l'intégralité des brins à analyser sont mélangés entre eux, à l'origine d'une variabilité en termes d'amplification de brins. De plus, la concentration focalisée des séquences offre une meilleure capacité de détection de mutations avec une faible fréquence allélique, probablement à l'origine de la sensibilité accrue de la ddPCR par rapport à la qPCR (figure 19).¹⁰⁹⁻¹¹¹ Alors que la qPCR affiche une sensibilité globale de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-4} en fonction de la technique utilisée, la ddPCR révèle une sensibilité au moins égale à 10^{-4} voire 10^{-5} . Le séquençage nouvelle génération ou *next generation sequencing* (NGS) classique révèle quant à lui une sensibilité de l'ordre de 10^{-2} , mais son emploi ne repose pas sur la même stratégie que les techniques de PCR. Son intérêt est fondé sur une étude simultanée de plusieurs gènes au sein d'un même prélèvement et d'une même analyse, tandis que la ddPCR cible une mutation unique au profit d'une meilleure détectabilité.^{109,110,112,113} L'optimisation du NGS à l'aide d'outils moléculaires et informatiques innovants permet d'avoisiner la sensibilité de la ddPCR.¹¹³

Néanmoins, la sensibilité de la ddPCR varie d'abord en fonction de la mutation recherchée, puis également en fonction du nombre de gouttelettes analysées et de la quantité de matériel génétique. Malgré une sensibilité théorique très élevée, il reste possible de méconnaître une mutation si le nombre de séquences génétiques amplifiées est insuffisant, quelle qu'en soit la cause (défaut de qualité ou de conservation du prélèvement, absence de cellules tumorales dans le milieu analysé, variabilité d'excrétion tumorale). Cette problématique est encore renforcée par les volumes particulièrement faibles requis pour cette technique.^{110,111} Malgré tout, l'excellente spécificité de la mutation *MYD88* L265P et la sensibilité très prometteuse de la ddPCR justifient de compléter l'analyse de la fraction cellulaire du LCR par ce test, dans le but d'optimiser la détection d'un envahissement méningé en combinaison à la CC et la CMF.

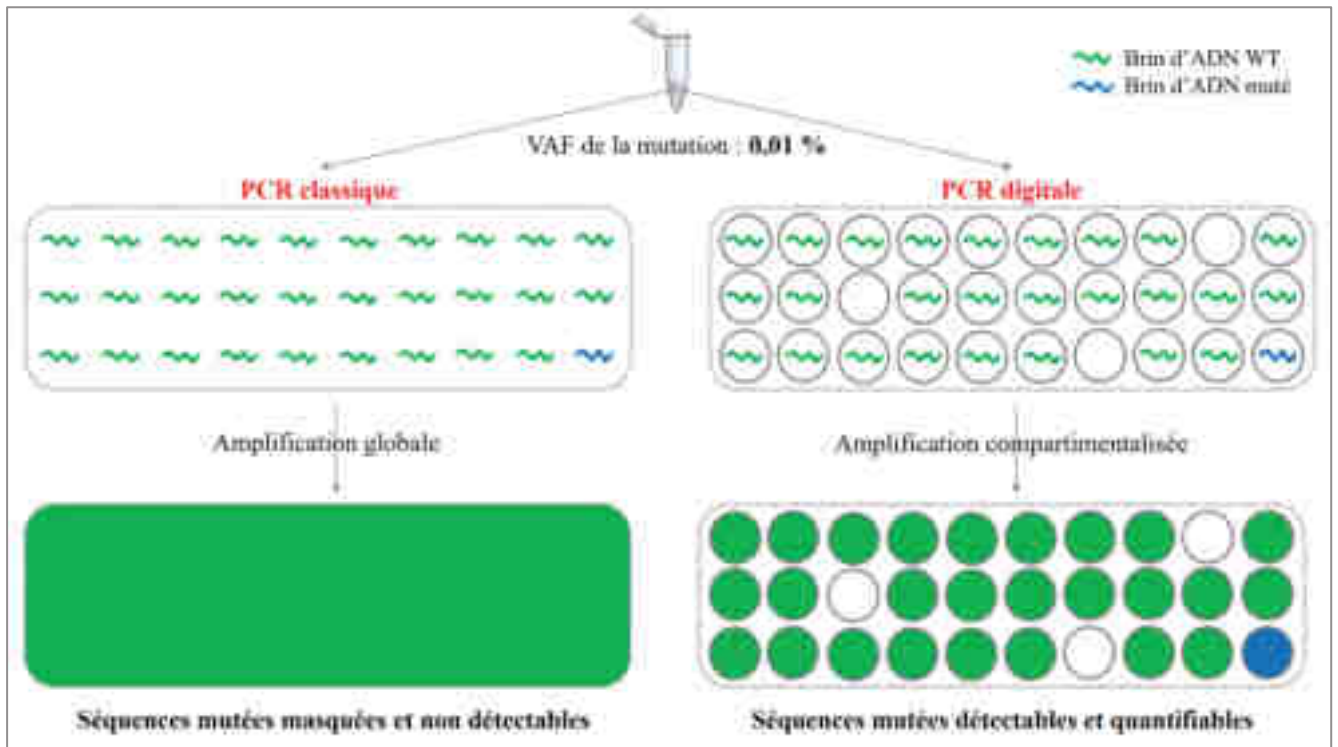


Figure 19. Comparaison des procédures et des performances entre la qPCR et la ddPCR.^{110,112}

b) Recherche de réarrangements clonaux sur les locus IgH, IgK et IgL

L'édition du BCR repose sur de multiples réarrangements entre les gènes codant pour le locus IgH (V_H , D_H et J_H) et pour les locus IgK et IgL (V_K et J_K , V_L et J_L). Ce processus génère une immense diversité structurale au sein du BCR afin de reconnaître un panel suffisamment large d'antigènes. Cette diversité est telle que chaque clone lymphocytaire physiologique peut quasi être considéré comme unique, et qu'il est statistiquement peu probable d'identifier plusieurs clones strictement identiques et indépendants. La présence d'un contingent lymphocytaire B dont les représentants arboreraient un BCR identique témoigne donc d'un processus de sélection non lié au hasard, et ainsi du caractère clonal et malin de cette population.¹¹⁴

Des techniques de biologie moléculaire ont finalement été mises au point afin d'identifier les différentes séquences IgH, IgK et IgL parmi l'intégralité des lymphocytes présents dans le prélèvement (physiologiques et malins), et de détecter d'éventuels réarrangements anormalement prédominants pour être simplement liés à la diversité combinatoire des gènes *VDJ*. Alors que cette méthode diagnostique était initialement réalisée par technique Southern Blot, celle-ci a largement été remplacée par la PCR multiplex, et a plus récemment été développée par technique NGS. Différentes régions de la séquence VDJ peuvent être ciblées à l'aide d'amorces spécifiques, et plusieurs sites d'hybridation sont testés afin d'optimiser au mieux la détection des réarrangements (figure 20). Plusieurs panels diagnostiques sont ainsi recommandés par le consortium EuroClonality (BIOMED-2) de 2012, dont l'objectif consiste à harmoniser les pratiques au sujet de la recherche de clonalité lymphocytaire B mais également T (étude

des réarrangements du *T-cell receptor* – TCR) par PCR, en termes de séquences cibles et d'interprétation biologique.¹¹⁴ Cette méthode est également employée pour la recherche de réarrangements chromosomiques issus de translocations aberrantes ou pour identifier l'hyperexpression de proto-oncogènes.

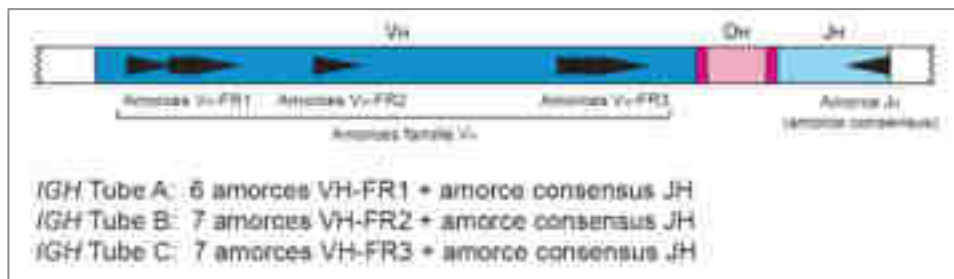


Figure 20. Modèle du panel de première intention recommandé par BIOMED-2 pour la recherche d'un réarrangement clonal sur le locus IgH, extrait de la notice d'emploi IdentiClone® (*IGH + IGK B-cell clonality assay* – Invivoscribe, 2022).^{114,115}

Chacun des trois tubes contient diverses amorces sens en V_H -FR1/2/3 (FR : *framework*) et une amorce anti-sens en J_H afin d'analyser l'intégralité du locus et d'optimiser la détection de réarrangements aberrants. Les amorces sont représentées par les flèches noires.

Après plusieurs cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation de l'ADN, les différents amplicons obtenus sont séparés par une méthode électrophorétique. L'électrophorèse capillaire permet de séparer les réarrangements en fonction de leur taille, et d'en faire une estimation semi-quantitative grâce la détection de fluorochromes incorporés dans les séquences au cours de la PCR. Plusieurs profils peuvent être extraits des résultats bruts et orienteront l'interprétation biologique (figure 21). L'électrophorèse par migration des amplicons sur gel de polyacrylamide ou d'agarose constitue une seconde méthode de séparation. Les fragments géniques sont révélés sous forme de bande grâce à une coloration chimique au bromure d'éthidium ou bromure d'argent.

Un profil polyclonal est matérialisé par une distribution gaussienne de multiples réarrangements de tailles variées, sans que l'un prédomine sur les autres (absence de pic distinct). La présence d'irrégularités dans le profil peut être liée à un prélèvement pauvre en matériel génétique, ou à un profil polyclonal intégrant des clones lymphocytaires réactionnels. De la même façon, un profil présentant des pics distincts mais multiples (profil oligoclonal) traduit un processus immunitaire réactionnel plutôt qu'un processus lymphomateux. En revanche, la présence d'un ou deux pics bien distincts reflète une clonalité anormalement prédominante, en faveur d'un clone lymphocytaire malin. Ces pics monoclonaux peuvent être accompagnés d'un fond polyclonal correspondant à un contingent de lymphocytes sains (figure 21).

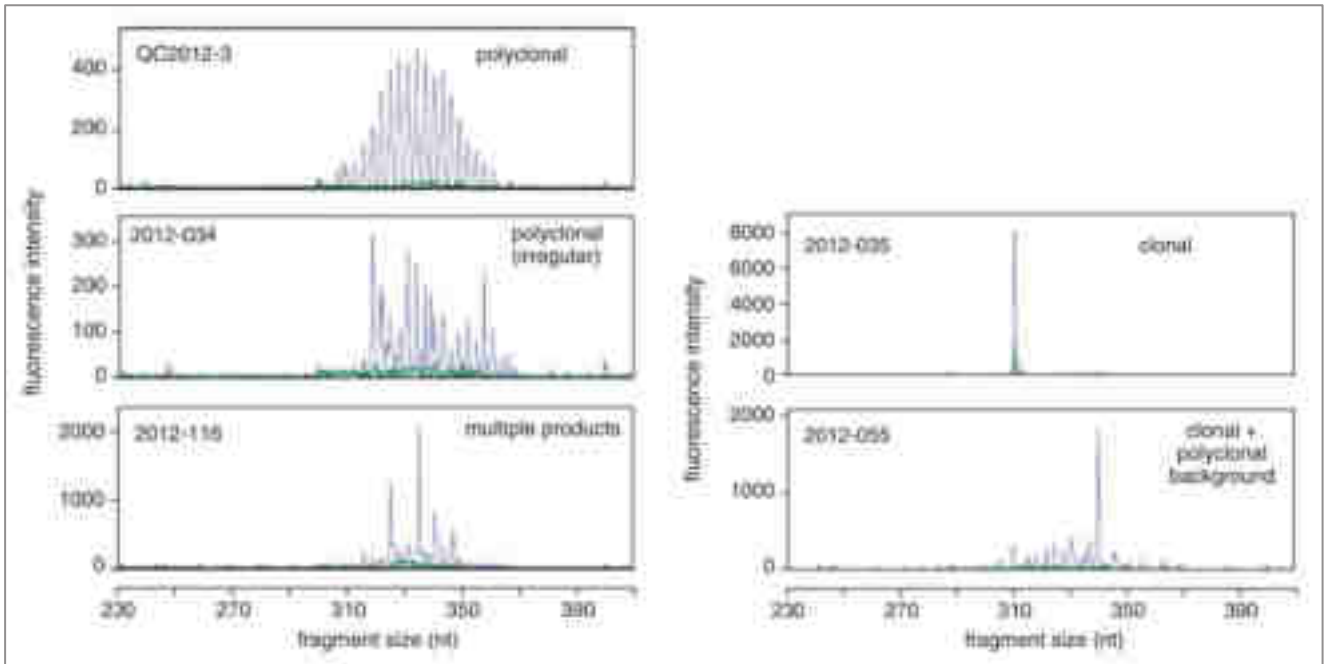


Figure 21. Exemples de profils moléculaires types sur le locus IgH.¹¹⁴ Les différents pics représentent des réarrangements géniques, séparés en fonction de leur taille nucléotidique (abscisse), et quantifiés en unité de fluorescence (ordonnée). Les trois profils de gauche correspondent à des populations lymphocytaires polyclonales ou oligoclonales (réactionnelles) bénignes. Les deux profils de droite traduisent un clone malin, parfois associé à un fond polyclonal.

La recherche de clonalité B ou T présente un réel intérêt, notamment pour les 5 à 15% des lymphomes pour lesquels la cytopathologie ou l’immunophénotypage n’ont pas permis de poser formellement le diagnostic.^{114,116,117} Sous réserve de la quantité de matériel génétique et de la proportion respective des populations bénignes et malignes, la biologie moléculaire possède l’avantage de discriminer les clones lymphocytaires réactionnels des clones malins.^{114,116} En termes de performances diagnostiques, une clonalité B serait retrouvée par PCR dans près de 99% des lymphomes B,¹¹⁷ et plus précisément dans 40 à 100% des DLBCL nodulaires selon les études.¹¹⁶ Outre les paramètres pré-analytiques ainsi que le site de prélèvement anatomique (sang périphérique, moelle osseuse, tissu paraffiné), cette variabilité est principalement liée aux profils mutationnels des DLBCL et donc au choix des séquences génétiques ciblées : ainsi, plus le panel diagnostique devient large, et plus la sensibilité devient meilleure. Le choix du traitement pré-analytique (PCR réalisée après extraction de l’ADN, ou après lyse cellulaire directe sans extraction préalable) semble également influencer les résultats.¹¹⁸ La recherche de clonalité B par NGS offre des performances comparables à la PCR, qui reste la technique la moins onéreuse et la moins fastidieuse sur le plan technique.¹¹⁹

Concernant les DLBCL du SNC, la recherche de clonalité B dans le LCR ne peut s’avérer positive qu’en cas d’envahissement cellulaire leptoméningé. La sensibilité de cette technique dans le LCR pour les PCNSL apparaît donc moindre que pour les DLBCL nodulaires. Une première étude révèle une clonalité positive chez 37,5% de PCNSL (3 patients sur 8) et 42,9% de DLBCL cérébraux secondaires (3/7) au

moment du diagnostic.¹¹⁸ Une seconde étude présente une sensibilité de 54% dans une cohorte intégrant PCNSL et SCNSL, mais parmi des prélèvements souvent multiples pour un même patient (diagnostic initial, rechute, suivi thérapeutique).¹²⁰ Les résultats restent néanmoins bien corrélés avec la CC et la CMF avec quelques cas prouvés grâce à la PCR, bien que des données contradictoires existent également, montrant non seulement une sensibilité de la clonalité B plus faible (de l'ordre de 15%), qui de plus n'excède pas toujours celle de la CC.⁸⁵ Une spécificité très satisfaisante de 97% est retrouvée,¹²⁰ mais de représentativité modeste en raison des effectifs et des populations étudiées. Globalement, les rares cas de faux positifs sembleraient être attribués soit à des contaminations inter-patients plutôt qu'à la complexité de l'interprétation biologique des résultats,¹²⁰ soit à l'amplification du réarrangement d'un LB sain unique au sein d'un prélèvement pauci-cellulaire.⁸⁹

Le consortium EuroClonality recommande d'étudier en première intention le locus IgH complet (V_H-J_H) ainsi que le locus IgK puisqu'ils permettraient de prouver l'existence d'une clonalité B jusque dans 95% des cas (toutes hémopathies lymphoïdes confondues) lorsqu'ils sont utilisés en association. Pour les cas restants, il peut être envisagé de cibler des locus IgH incomplets (D_H-J_H) ainsi que le locus IgL.¹¹⁴ Les résultats faussement négatifs peuvent s'expliquer par l'impact d'une HMS intense, ayant potentiellement des répercussions dans les sites de fixation des amorces du test. L'absence consécutive d'hybridation des amorces et d'amplification des réarrangements lymphomateux justifie donc de diversifier les amorces employées.^{114,116,120} Des prélèvements pauci-cellulaires peuvent également se révéler non contributifs, notamment les LCR, d'où l'intérêt de réitérer les prélèvements et de réaliser les analyses en duplicate.^{118,120}

C) Analyse de la fraction acellulaire (surnageant)

1) Dosage des interleukines 6 et 10

L'intégralité des processus immunitaires (inflammatoires, bénins ou malins) repose sur une communication intercellulaire complexe médiée par les cytokines sécrétées par les différents acteurs de l'immunité, et aux effets physiologiques très variés. L'étude du profil cytokinique apparaît donc comme une piste intéressante dans le diagnostic des affections malignes. Concernant les pathologies lymphomateuses, les dosages de l'IL-10 et de l'IL-6 ont déjà démontré leur utilité, initialement dans les fluides oculaires (humeur vitrée, humeur aqueuse) puis dans le LCR dans le cadre de LOC. Leur dosage est majoritairement effectué par les techniques d'*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) ou de *cytometric bead array* (CBA) dont les principes restent similaires. Les interleukines sont captées par des anticorps de capture spécifiques, fixés soit au fond des puits d'une plaque ELISA, soit sur des billes magnétiques (CBA). Lors d'une deuxième étape, elles sont ensuite reconnues par des anticorps couplés soit à un substrat colorimétrique, chimiluminescent ou fluorescent (ELISA), soit directement à un fluorochrome (CBA). Pour la méthode ELISA, la quantification des cytokines passe alors par une

réaction enzyme-substrat et une détection spectrophotométrique, de luminescence ou fluorimétrique selon le type de substrat utilisé. Pour la méthode CBA, la quantification de la fluorescence passe par une technique de CMF appliquée sur les billes, à l'instar de la CMF leucocytaire.

Les interleukines ne correspondent pas à des éléments cellulaires à proprement parler. Il s'agit de biomarqueurs chimiques « solubles », recherchés dans la fraction acellulaire des différents fluides anatomiques, traduisant un profil type de réaction immunitaire et témoignant indirectement de la présence de certaines cellules. L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire et pro-lymphomateuse, affiche des concentrations dans l'humeur aqueuse et l'humeur vitrée significativement plus élevées lors d'atteintes oculaires d'origine lymphomateuse qu'inflammatoire, à l'inverse de l'IL-6 qui se caractérise par une activité pro-inflammatoire. Ce profil cytokinique, se traduisant donc par un ratio IL-10/IL-6 plus élevé et en faveur de l'IL-10, est caractéristique des lymphomes oculaires et permet ainsi de les distinguer des atteintes purement inflammatoires telles que les uvéites.^{121,122} L'élévation de l'IL-10 proviendrait principalement d'une sécrétion accrue de la part des LT helper, des LB sains et des monomacrophages, bien que l'implication des cellules lymphomateuses dans la sécrétion d'IL-10 (et d'IL-6) via l'activation chronique de la voie NF- κ B ne soit pas exclue.⁸⁹ Les valeurs isolées des dosages d'IL-10 n'étant pas toujours suffisantes pour affirmer ou exclure le diagnostic de LOC, l'intérêt diagnostique hypothétique du ratio IL-10/IL-6 a rapidement été étudié. La valeur seuil du ratio au-delà de laquelle une origine lymphomateuse peut être suspectée, bien qu'historiquement établie à 1, reste cependant controversée. Il a été mis en évidence que les valeurs de ratio calculées pour des lymphomes oculaires, des LOC et des uvéites pouvaient se chevaucher sur un intervalle donné correspondant alors à une « zone grise », ne permettant pas de valider un cut-off optimal.¹²² Un nouveau score diagnostique a été développé, le score ISOLD (*interleukin score for intra-ocular lymphoma diagnosis*), basé sur l'utilisation de deux formules différentes pour l'humeur vitrée et l'humeur aqueuse et intégrant les concentrations en IL-10 et IL-6. Ce score définit quatre catégories de patients en fonction de la probabilité de présenter ou non un lymphome oculaire : lymphome exclu (score < -4,6, probabilité > 99%) ; lymphome probablement exclu (score entre -4,6 et 0, probabilité entre 50 et 99%) ; lymphome probable (score entre 0 et +4,6, probabilité entre 50 et 99%) ; lymphome confirmé (score > +4,6, probabilité > 99%). Cette méthode de calcul affiche une sensibilité de 93% et une spécificité de 95%. Ainsi, elle présente un puissant intérêt pour discriminer les cas discordants au niveau du ratio IL-10/IL-6 (lymphomes avec ratio faible, ou autres diagnostics avec ratio élevé).¹²³

De façon similaire, les performances du dosage de l'IL-10 dans le cadre des lymphomes du SNC ont été évaluées dans le LCR. La littérature révèle une sensibilité de 59 à 96% et une spécificité de 83 à 100%, dont les variabilités s'expliquent notamment par la valeur seuil établie par chaque étude pour confirmer une étiologie lymphomateuse.⁸⁹ Malgré tout, ce paramètre reste très intéressant pour distinguer un

PCNSL d'une autre tumeur cérébrale. Le ratio IL-10/IL-6 apparaît très régulièrement en faveur de l'IL-10 dont la concentration est significativement augmentée, mais aucun cut-off n'est clairement défini, pour les mêmes raisons que dans les fluides oculaires. La concentration d'IL-10 dans le LCR apparaît statistiquement plus élevée dans les PCNSL (incluant les lymphomes cérébraux et les lymphomes oculaires exclusifs) en comparaison aux autres tumeurs cérébrales, et en cas d'invasion leptoméningée par rapport à une atteinte cérébrale isolée. Par ailleurs, l'IL-10 apparaît également positive dans les cas des PCNSL avec atteinte oculaire exclusive, mais vraisemblablement à des concentrations moindres que dans le cas de PCNSL cérébraux. Ceci pourrait s'expliquer soit par une proximité entre cerveau et LCR plus étroite que celle entre œil et LCR, soit par une charge tumorale plus élevée en cas de masse cérébrale (croissance favorisée par l'espace anatomique plus conséquent que dans les yeux).¹²⁴ En plus de l'intérêt diagnostique, le dosage d'IL-10 aurait également une valeur pronostique et une valeur dans le monitoring des patients, puisque sa concentration semble corrélée à l'évolution de la tumeur. Ainsi, ce test s'avère fort utile dans l'évaluation d'une réponse thérapeutique, dans le suivi post-thérapeutique, ainsi que dans la prédiction de rechutes cérébrales, étant donné qu'une ré-augmentation du taux d'IL-10 apparaîtrait plus précocement que la preuve neuroradiologique de la récurrence.⁸⁹ Enfin, la concentration d'IL-10 ne semble pas significativement diminuer en cas de traitement par glucocorticoïdes, probablement du fait qu'il s'agit d'un marqueur indirect de lymphome, plutôt sécrété par des cellules non lymphomateuses moins sensibles à ces molécules.¹²⁴ Le dosage d'IL-10 pourrait donc présenter un avantage de taille par rapport aux techniques cellulaires ou aux techniques ciblant des éléments circulants émanant des cellules cancéreuses, plus sujettes à l'impact des corticoïdes.

2) Recherche de la mutation *MYD88* L265P par PCR digitale

a) Concept de biopsie liquide

Bien que l'analyse de la tumeur elle-même demeure le gold standard pour poser le diagnostic de pathologie maligne, elle requiert inévitablement une biopsie afin de récupérer du matériel tissulaire. D'abord, il s'agit d'une procédure invasive lourde qui nécessite des ressources matérielles et humaines conséquentes, ainsi que du temps et de l'expérience de la part du préleveur, et dont les complications éventuelles ne sont pas négligeables. La localisation spatiale de la tumeur peut aussi compliquer ou même freiner la réalisation de la biopsie. De plus, les tumeurs cancéreuses sont caractérisées par une hétérogénéité intra-tumorale à l'origine de résultats anatomopathologiques variables en fonction de la zone tissulaire prélevée. L'hétérogénéité inter-tumorale en cas de tumeurs multiples ou de métastases peut également être source d'un défaut de représentativité. Une biopsie sur un unique site ne permettra potentiellement pas de caractériser le cancer dans son ensemble. Enfin, le suivi du patient pendant et après traitement à l'aide de cet examen semble compromis, la répétition de biopsies invasives n'étant pas pertinente ni d'un point de vue éthique ni d'un point de vue médical pour les raisons évoquées ci-dessus. Une tumeur localisée au niveau du SNC comme les PCNSL donne encore plus de poids à ces

propos. Il apparaît donc fondamental d'élaborer des stratégies alternatives à la biopsie « solide » afin de pallier les différentes limites exposées.^{125,126}

Le concept de biopsie liquide est alors apparu. Son objectif reste identique à celui d'une biopsie tissulaire, à savoir d'identifier et de caractériser la tumeur, mais à partir de composants biologiques issus de la masse cancéreuse prélevés à distance de celle-ci, et par le biais d'un fluide anatomique plus facile d'accès (sang, LCR, liquide vitré, urines etc...).

Il peut s'agir de cellules cancéreuses à proprement parler, mais qui se seraient détaché de leur tumeur originelle et transiteraient au sein de l'organisme principalement via le sang, notamment dans le cadre d'une dissémination tumorale. Ces cellules tumorales circulantes (CTCs) peuvent donc être recherchées par CC ou CMF. Cependant, leur très faible abondance et leur grande variabilité phénotypique limitent l'intérêt de ce test.

La mise en évidence d'une mutation récurrente oncogénique directement dans l'ADN cellulaire des CTCs peut également contribuer au diagnostic d'un processus malin, mais cela nécessite par définition la présence de cellules tumorales dans l'échantillon, ce qui rejoint la problématique de la rareté des CTCs dans les liquides biologiques. Appliquées aux PCNSL, ces deux options diagnostiques peuvent être assimilées à la recherche des cellules lymphomateuses dans le LCR par CC, CMF ou par la recherche de la mutation cellulaire *MYD88* L265P décrites précédemment. Même si un envahissement leptoméningé est relativement fréquent dans les PCNSL en comparaison à d'autres tumeurs du SNC, la présence de cellules malignes et vivantes est indispensable pour ces différents tests. C'est face à ces différentes problématiques qu'intervient l'étude de l'ADN présent sous forme libre dans le surnageant des différents fluides, par opposition à l'ADNc contenu dans la fraction cellulaire.¹²⁵⁻¹²⁷

La notion d'ADN circulant ou d'ADN *cell free* (ADNcf) est mentionnée pour la première fois en 1948. De l'ADNcf est présent dans l'organisme de tout individu à des concentrations modérées, résultant des processus physiologiques de renouvellement et de mort cellulaire qui aboutissent au relargage de l'ADN initialement cellulaire dans la circulation. Dans un contexte cancéreux, la prolifération accrue et anormale des cellules malignes engendre naturellement une majoration du turn-over cellulaire et des phénomènes apoptotiques et nécrotiques. Malgré la focalisation de la tumeur sur un site anatomique restreint, l'ADNcf relargué en masse est caractérisé non seulement par des concentrations bien plus importantes que chez un individu sain, mais également par une diffusion potentielle à travers l'intégralité de l'organisme, par l'intermédiaire de la circulation générale (figure 22). La présence de quantités élevées d'ADNcf pourrait ainsi témoigner de la présence d'un processus cancéreux, tout en s'affranchissant des problématiques liées à l'hétérogénéité tumorale, puisque l'ADN est relargué quel que soit le profil phénotypique, génétique et spatial des tumeurs. Cependant, d'autres situations peuvent être sources de quantités élevées d'ADNcf : inflammation, infections, traumatismes ou interventions

chirurgicales, exercice physique, grossesse, diabète, insuffisance rénale, ou encore infarctus myocardique. L'ADN circulant dérivé de la tumeur (ADNct), identifié au sein de l'ADNcf total à l'aide d'une mutation récurrente oncogénique, assure alors une sensibilité et une spécificité optimales en tant que biomarqueur pour les cancers.^{113,125-127}

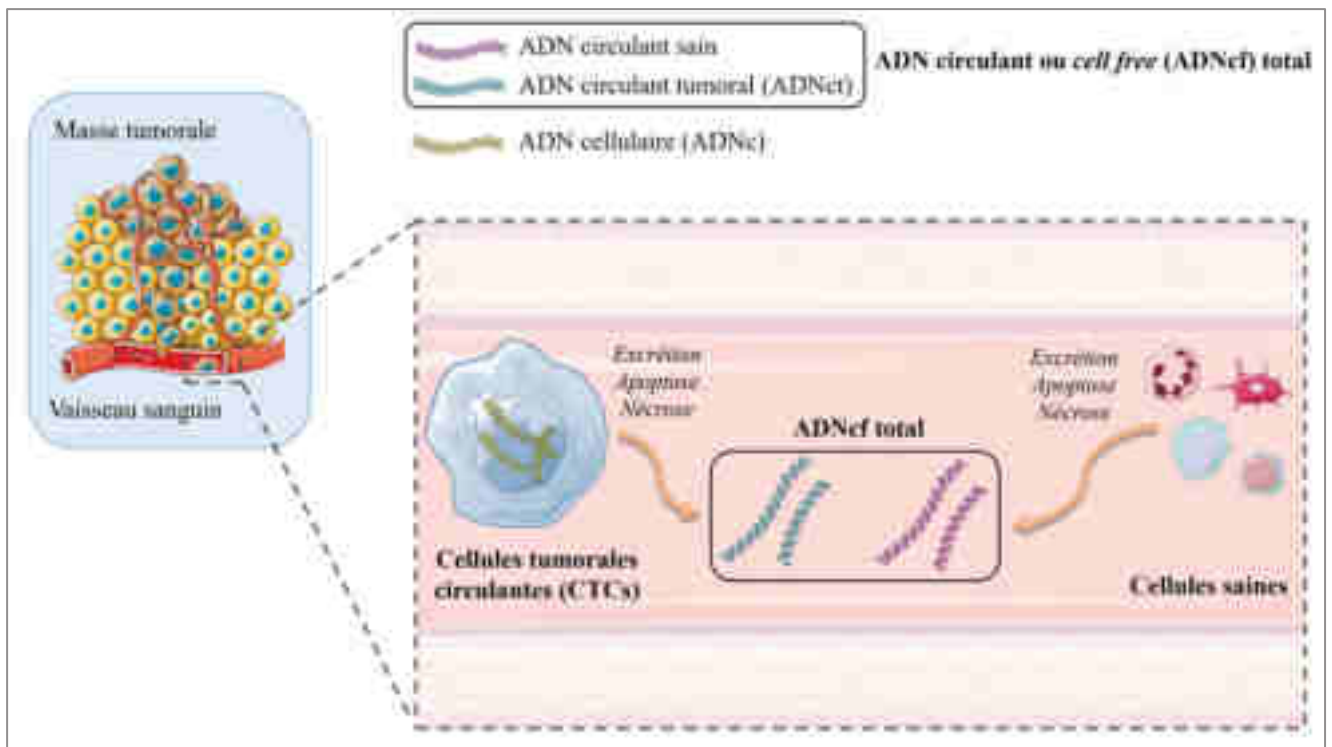


Figure 22. Sources physiopathologiques de l'ADN circulant. La néo-vascularisation induite par la masse tumorale elle-même, indispensable à sa survie, est à l'origine de la dissémination sanguine des cellules malignes. Les CTCs, relativement peu nombreuses dans la circulation sanguine, sont capables de relarguer leur ADN cellulaire (ADNc) suite à des processus d'excrétion, d'apoptose ou de nécrose. Cet ADNc se retrouve alors sous forme libre et circulante dans le sang : on parle d'ADN circulant tumoral (ADNct). Il s'agit là d'une première composante de l'ADNcf total, tandis que l'ADN circulant restant provient de processus physiopathologiques concernant les cellules non cancéreuses. En cas de preuve de l'existence d'une mutation oncogénique récurrente, il devient possible de différencier l'ADNct de l'ADNcf sain.

Etant donné l'abondance relativement faible de l'ADNcf dans les liquides biologiques et la richesse du milieu en composants biologiques autres, des techniques moléculaires de haute sensibilité deviennent indispensables pour espérer détecter l'ADNcf. Alors que des techniques de qPCR ou de séquençage classique sont suffisantes pour analyser le matériel génétique issu directement d'une tumeur, concentrée en cellules et en ADN tumoraux, l'étude de l'ADNcf requiert plutôt l'emploi du NGS optimisé ou de la ddPCR.^{110,112,113}

Finalement, la biopsie liquide, terme couramment associé à la recherche d'ADNcf ou d'ADNct et non à l'analyse des CTCs, permet de pallier les différents inconvénients de la biopsie solide : échantillonnage plus aisé, plus rapide et moins invasif ; meilleure représentativité du cancer dans son ensemble, non

entravée par l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale ; application pour le suivi régulier des patients pendant et après traitement. A l'inverse d'une biopsie solide ou d'une recherche de CTCs, elle ne nécessite pas obligatoirement la présence de cellules dans l'échantillon : l'ADNcf peut être soit excrété par des cellules vivantes soit relargué à partir de cellules mortes, présentes localement ou à distance du site de prélèvement. Il a d'ailleurs été observé que sur une série de 16 patients souffrant de cancers solides variés et présentant de l'ADNct plasmatique, seuls 3 d'entre eux présentaient des CTCs sanguines, et qu'aucun autre cas ne présentait des CTCs sans ADNct détecté.¹²⁸ De plus, la demi-vie de l'ADN circulant étant relativement courte (114 minutes),¹¹³ le résultat de ce test offre un reflet quasi en temps réel de l'évolution de la pathologie cancéreuse. Ce paramètre constitue néanmoins un obstacle de taille à la performance de la biopsie liquide.

La fragilité de l'ADNcf impose des conditions de prélèvement, d'acheminement et de conservation drastiques, avec une prise en charge la plus rapide possible afin de préserver son intégrité et de limiter les résultats faussement négatifs.^{113,126} Par convention, il est recommandé de traiter l'échantillon dans un délai de 2 heures après le prélèvement afin d'une part de préserver une quantité optimale d'ADNcf, et d'autre part de minimiser la lyse prématurée des cellules sanguines. Un tel phénomène engendre une pollution et une dilution de l'ADNcf par l'ADN cellulaire. La quantification de l'ADN circulant tumoral peut alors être potentiellement faussée par la présence de l'ADNc relargué par lors de la lyse cellulaire.

De nouveaux tubes de prélèvements ont alors été spécialement développés afin d'améliorer la conservation de l'ADNcf dans le sang, par stabilisation des leucocytes et par prévention de la dégradation directe de l'ADNcf. Il existe actuellement les tubes *Cell-free DNA BCT*® (Streck), *cfDNA collection tubes*® (Roche Diagnostics), ou encore *PAXgen*® (Qiagen).^{113,129,130} Ces dispositifs innovants offrent une meilleure stabilité de l'échantillon sanguin dans le temps, en autorisant notamment un rallongement de la durée de conservation à température ambiante, ainsi que l'exposition à des températures extrêmes. Ils ont par ailleurs démontré leur supériorité par rapport aux tubes EDTA classiques, au sein desquels le phénomène de lyse cellulaire impacte très rapidement la quantité et la qualité de l'ADN circulant.¹³⁰ Ces tubes confèrent donc un avantage logistique certain pour les services cliniques, qui sont en général contraints d'organiser un acheminement immédiat et manuel du prélèvement au laboratoire. En plus d'améliorer les performances des analyses sur l'ADNcf, l'optimisation de la conservation des échantillons permet ainsi aux personnels médicaux de mieux gérer la prise en charge de ces prélèvements, tout en garantissant leur conformité pré-analytique. Les tubes de conservation *TransFix*® (Cytomark) dédiés aux analyses de CMF ne semblent pas être utilisables pour l'analyse de l'ADNcf dans le plasma en raison d'un processus hémolytique trop importante.¹²⁹

Les différentes méthodes d'extraction semblent aussi impacter l'efficacité de l'isolement de l'ADNcf, et par conséquent la quantité de matériel génétique analysable, d'où l'intérêt d'une standardisation future de cet examen diagnostique.¹¹³

b) Application de la biopsie liquide aux tumeurs du SNC

L'intérêt de la recherche de l'ADNcf dans le sang, plus précisément dans le plasma ou le sérum (fraction acellulaire), ainsi que son application dans le diagnostic initial et dans le monitoring des patients a largement été démontré dans la littérature.^{125,126} Cependant, il a rapidement été constaté que les performances de la biopsie liquide étaient variables en fonction des organes affectés et de leur localisation. Schwaederle *et al.* ont pu détecter de l'ADNct plasmatique par NGS dans 65% des tumeurs n'affectant pas le SNC, et seulement dans 27% des glioblastomes étudiés.¹³¹ De façon similaire, Bettegowda *et al.* ont conclu que la ddPCR permettait d'identifier de l'ADNct dans 82% des cancers métastatiques non cérébraux, dans moins de 50% des médulloblastomes et dans moins de 10% des gliomes non métastatiques.¹²⁸ Il semblerait donc que la restriction spatiale des tumeurs du SNC au cœur d'un environnement immunoprivilégié et protégé par la BHE limite significativement la diffusion de l'ADNcf dans la circulation générale.

Concernant les PCNSL, deux études ont démontré respectivement que 35% et 57% des cas *MYD88* L265P mutés sur le tissu tumoral étaient positifs en biopsie liquide dans le sang, avec une VAF significativement plus élevée dans l'ADN tumoral de la biopsie que l'ADNct.^{24,132} Bien que la VAF établie dans l'ADN circulant plasmatique soit un candidat potentiel au suivi des patients, son intérêt reste débattu. D'abord en raison du fait que cette mutation peut être détectée dans le sang en cas de lymphomes systémiques (MW, MGUS, DLBCL), mais aussi car elle n'est pas nécessairement retrouvée dans le sérum en cas de progression ou de rechute du PCNSL (pouvant s'expliquer par l'expansion d'un sous-clone non muté en *MYD88*).

Compte tenu des éléments ci-dessus, l'hypothèse d'une application de la biopsie liquide dans le LCR a donc rapidement été exploitée. Plusieurs travaux ont mis en évidence l'apport de cet examen sur le surnageant du LCR dans le cadre de tumeurs cérébrales non hématopoïétiques.^{80,127,133} L'analyse de l'ADN circulant du LCR a en effet démontré une meilleure représentativité de la tumeur en comparaison aux résultats sanguins. En cas d'atteinte exclusive du SNC, l'ADNct est plus souvent détecté dans le LCR (dans 74 à 100% des cas selon les études) que dans le plasma, à des fréquences alléliques supérieures (concentration plus élevée en ADNct que dans le plasma), bien que la concentration totale en ADN circulant (tumoral et non tumoral) soit plus importante dans le plasma. La VAF établie dans le LCR semblerait d'ailleurs corrélée avec la charge tumorale, traduisant potentiellement un intérêt dans le monitoring des patients. Des performances comparables entre le LCR et le sang peuvent toutefois

s'observer chez certaines tumeurs du SNC, lorsqu'une composante métastatique extra-cérébrale est présente.^{80,127} Cette différence entre le LCR et le sang peut en partie s'expliquer par le fait que le LCR, en circulant à travers les structures cérébrales, possède une large interface avec les tissus sains et potentiellement les tissus cancéreux (figure 23), à l'inverse du sang, qui de plus, est totalement isolé du LCR par la BHE. Cette hypothèse est confortée par les résultats de Wang *et al.* : 86% des tumeurs adjacentes à des réservoirs de LCR (définies par IRM) révèlent de l'ADNct dans ce liquide biologique ; les 14% restants correspondent à des gliomes de bas grade ; aucun des patients dont la tumeur est intégralement encapsulée dans le parenchyme cérébral ou de la moelle épinière (et ainsi sans contact avec les réservoirs de LCR) ne montre d'ADNct dans le LCR.¹³³

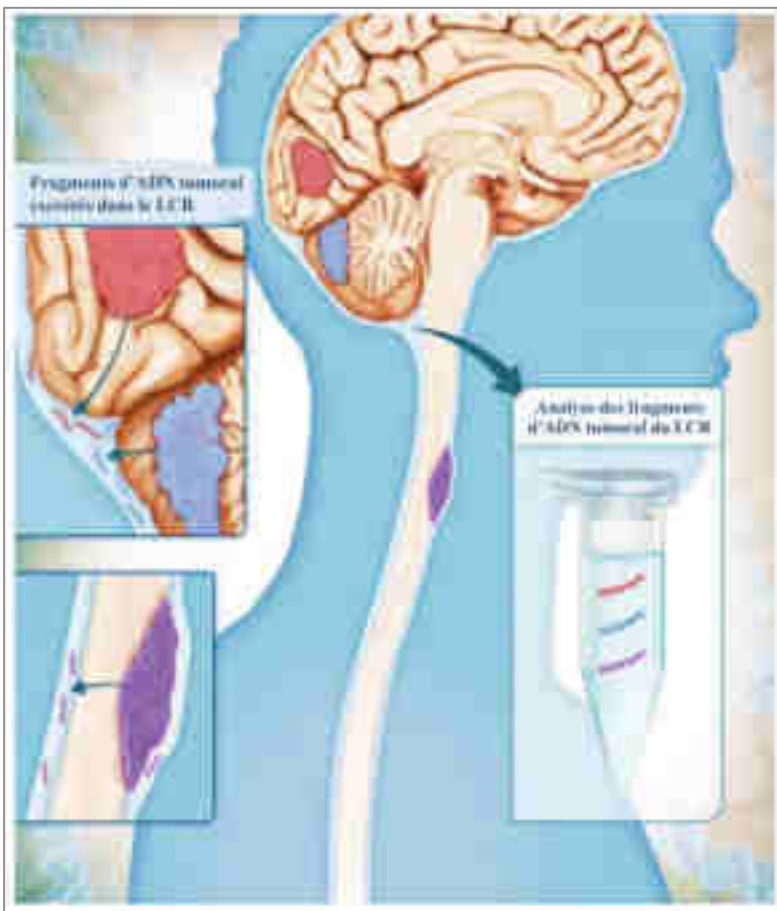


Figure 23. Intérêt du LCR dans la recherche d'ADN circulant tumoral pour les tumeurs du SNC.¹³³

En raison de leur proximité anatomique avec le LCR, les tumeurs du SNC peuvent potentiellement excréter leur ADN dans ce fluide. A titre d'exemple, la recherche d'ADNct dans le LCR est de ce fait justifiée pour des localisations cérébrales (masse rouge), cérébelleuses (masse bleue), spinales (masse violette) ou même oculaires (non représentée), à condition que la tumeur possède une interface avec le compartiment cérébrospinal.

Divers travaux ont également démontré l'intérêt de la recherche de la mutation *MYD88* L265P sur l'ADN circulant du LCR dans le cadre de PCNSL, aussi bien dans les lymphomes cérébraux qu'oculaires.¹³⁴⁻¹³⁹

Parmi les tumeurs *MYD88* mutées (prouvées sur la biopsie tumorale ou sur les cellules lymphomateuses du LCR selon les cas), la biopsie liquide du LCR est revenue positive dans 67% des cas (6/9),¹³⁴ 73% des cas (8/11),¹³⁵ et à deux reprises dans 100% des cas (9/9 et 15/15).^{136,137} La recherche de *MYD88* L265P sur l'ADN circulant du LCR a aussi permis d'améliorer la sensibilité diagnostique dans l'identification des LOC par rapport aux techniques conventionnelles (histologie, cytologie, CMF).^{138,139}

Des fréquences alléliques majorées, comparativement à celles obtenues dans le plasma par d'autres études, ont été mises en évidence, probablement en lien avec la proximité plus étroite entre la tumeur et le LCR. Ceci pourrait expliquer au moins en partie la meilleure détectabilité de la mutation dans l'ADNct du LCR que du sang.^{134,136} Des résultats similaires ont révélé dans une autre étude que parmi 6 patients atteints de PCNSL pour lesquels une biopsie liquide s'est avérée positive, seuls 2 d'entre eux présentaient de l'ADNct dans le plasma, et à des VAF inférieures aux VAF correspondantes dans le LCR. Par ailleurs, les lymphomes systémiques de la cohorte n'ont pas montré d'ADNct dans le LCR, mais uniquement dans le sang.¹³⁸

La corrélation modérée entre la concentration d'ADN circulant (total ou tumoral *MYD88* muté) dans le LCR et le volume tumoral pourrait témoigner de l'utilité de ce paramètre en tant que biomarqueur tumoral de réponse thérapeutique et de suivi.^{136,138} La biopsie liquide présenterait aussi un intérêt prédictif de rechutes localisées au niveau du SNC, puisqu'en plus de sa meilleure sensibilité, une ré-augmentation de la quantité d'ADNct (ciblé par *MYD88* ou d'autres gènes) semble être plus précoce que pour la CC et la CMF dans ce contexte, qu'il s'agisse de PCNSL ou de SCNSL.¹³⁸ Ces deux caractéristiques font de ce test un candidat potentiel pour l'évaluation de la maladie résiduelle.

De plus, la supériorité de l'ADN circulant par rapport à l'ADN cellulaire pour l'évaluation du statut mutationnel *MYD88* a aussi été prouvée. Dans l'étude de Hiemcke-Jiwa *et al.*, seuls 3 cas montrant de l'ADNct dans le LCR présentaient également de l'ADN cellulaire muté (3/6).¹³⁴ Dans l'étude de Rimelen *et al.*, 3 cas présentaient de l'ADNc muté en plus de l'ADNcf (3/8). Il est à noter qu'un unique cas présentait seulement la mutation dans l'ADNc et non dans l'ADNcf.¹³⁵ Ces résultats proviennent notamment du fait que seule une fraction des PCNSL se caractérisent par un envahissement cellulaire leptoméningé (limitant donc la présence de lymphocytes malins mutés dans le LCR), à l'instar de l'ADNct qui peut se répandre à distance des cellules tumorales vivantes ou mortes dont il émane, même en l'absence d'envahissement méningé.

L'intégralité de ces rapports s'accordent pour affirmer que la mutation *MYD88* L265P est hautement spécifique d'un processus lymphomateux.

Les résultats des différents travaux mentionnés ci-dessus témoignent donc de l'importance majeure de l'ADN circulant en matière de marqueur diagnostique et de suivi dans le cadre des PCNSL, lorsqu'il est ciblé par la mutation *MYD88* L265P. La biopsie liquide du LCR semble en effet offrir un bénéfice certain aussi bien dans le diagnostic initial que dans le suivi du patient (réponse thérapeutique, maladie résiduelle). La seconde partie de ce mémoire fait part des performances de ce test par ddPCR évaluées sur une cohorte de 21 PCNSL, ainsi que de sa place au sein du bilan diagnostique initial de cette pathologie, notamment en comparaison aux techniques cytologiques, cytométriques et au dosage des interleukines.

PARTIE 3 : Etude rétrospective au GHRMSA – Comparaison des performances des différentes techniques biologiques et intérêt de la mutation *MYD88* L265P sur l'ADN circulant du LCR dans le bilan diagnostique des PCNSL

I. OBJECTIFS

Ce rapport s'inscrit dans la continuité d'un travail précédemment publié et encadré par le laboratoire d'Hématologie du Groupe Hospitalier de la Région de Mulhouse et Sud-Alsace (GHRMSA), en étroite collaboration avec le service de Neurologie des Hôpitaux Civils de Colmar (HCC) ainsi que le laboratoire d'Oncobiologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg. Menée entre 2016 et 2018, cette étude rétrospective fut une des premières à évaluer l'intérêt de la fraction soluble ou acellulaire du LCR (surnageant) dans le diagnostic des PCNSL en matière de recherche de mutations somatiques, en l'occurrence la mutation *MYD88* L265P. Il a en effet été constaté que cette mutation pouvait être mise en évidence par ddPCR dans l'ADNcf (présence d'ADN circulant tumoral), sans être nécessairement retrouvée dans l'ADNc et alors que la CC et la CMF ne concluaient pas à un envahissement lymphomateux leptoméningé.¹³⁵

L'étude rétrospective ci-présentée, menée entre 2018 et 2022 au laboratoire d'Hématologie du Centre Hospitalier Emile Muller de Mulhouse, vient compléter ces données pionnières à l'aide d'une cohorte de patients plus importante, incluant des PCNSL ainsi que divers diagnostics différentiels. Dans un premier temps, l'objectif était d'évaluer les performances diagnostiques de la ddPCR dans la détection de la mutation *MYD88* L265P sur l'ADNc et l'ADNcf du LCR. Dans un second temps, les résultats de biologie moléculaire ont été confrontés à ceux obtenus par les techniques traditionnelles, à savoir la CC, la CMF, le dosage des interleukines ainsi que l'histopathologie. Le but était d'abord de comparer la capacité à témoigner d'un processus lymphomateux cérébral de la fraction soluble (*MYD88* muté sur ADNcf) à celle de la fraction cellulaire, et de définir si la biopsie liquide permettrait de rattraper des diagnostics de PCNSL non prouvés sur les techniques cellulaires. Actuellement, seule la mise en évidence d'un envahissement méningé cellulaire d'origine lymphomateuse permet de poser le diagnostic de lymphome du SNC par substitution au gold standard anatomopathologique, contrairement au surnageant du LCR dépourvu de cellules tumorales. Enfin, l'intérêt de la répétition des ponctions lombaires (PL) au diagnostic initial a également été évalué afin de savoir si des prélèvements multiples amélioreraient ou non la sensibilité des différentes techniques employées.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

A) Recrutement des patients

Les patients de cette étude rétrospective ont été inclus sur une période allant de janvier 2018 à septembre 2022. Les LCR de la majeure partie des patients chez lesquels un PCNSL était notamment suspecté sur des arguments neuroradiologiques ont été recueillis par le service de Neurologie des Hôpitaux Civils de Colmar, et sous-traités au laboratoire d'Hématologie de Mulhouse pour analyse biologique. En cas de masse cérébrale avérée à l'imagerie et de LCR non contributifs, une biopsie cérébrale stéréotaxique était effectuée, analysée ultérieurement par le service d'anatomopathologie des HCC. Une partie du prélèvement biopsié, ainsi que le LRTBC étaient alors adressés au laboratoire de Mulhouse. Le service d'Hématologie clinique du GHRMSA a également contribué à sélectionner des patients supplémentaires.

B) Prélèvements biologiques et sélection des échantillons

L'intégralité des patients ont bénéficié d'une PL en vue des examens hématologiques du LCR (CC, CMF, dosage des interleukines, recherche de la mutation *MYD88* L265P sur ADNc et ADNcf). Celle-ci était motivée par un faisceau d'arguments fortement évocateurs de PCNSL, variables d'un patient à un autre, incluant fréquemment une imagerie évocatrice ou suspecte à l'IRM cérébrale ou au scanner cérébral, accompagnée ou non de symptômes neurologiques ou ophtalmiques inexplicables. En cas de résultats biologiques non concluants, et dans la mesure du possible, la PL était réalisée à deux voire trois reprises, à des intervalles de temps variables, sans qu'aucun traitement susceptible de modifier le résultat des examens ne soit initié pendant ce laps de temps (notamment chimiothérapie ou corticothérapie).

Durant la période de recrutement, 310 prélèvements de LCR sont parvenus au laboratoire d'Hématologie pour recherche de cellules lymphomateuses, occasionnellement suivis d'une biopsie cérébrale accompagnée ou non d'un LRTBC.

De manière globale, seuls les LCR appartenant à des patients présentant une imagerie typique ou potentiellement en faveur d'un lymphome du SNC ont été conservés. Les patients ayant bénéficié d'une PL sur la base de symptômes neurologiques isolés ont été exclus. Les patients souffrant d'un lymphome périphérique, et par extension les diagnostics de SCNSL (preuve formelle d'une rechute neuro-méningée par un clone identique au clone lymphomateux systémique) ont également été écartés pour ne retenir que les formes primitives de lymphome du SNC. Le diagnostic de PCNSL a reposé soit sur une preuve anatomopathologique sur biopsie tissulaire, soit sur la preuve biologique d'un envahissement cellulaire leptoméningé (CC et CMF positives).

Parmi les PCNSL, seules les PL effectuées dans le cadre d'un bilan diagnostique initial ont été prises en compte. Au regard des objectifs de cette étude, les patients n'ayant bénéficié d'aucune recherche de la mutation *MYD88* L265P sur ADNcf n'ont pas été retenus. Les prélèvements de suivis ou lors de

suspicion de rechute ont été écartés. De plus, les diagnostics de PCNSL posés uniquement sur des arguments neuroradiologiques sans aucune preuve histologique ou biologique ont été exclus de l'étude. Parmi les patients non diagnostiqués pour un PCNSL (groupe contrôle), seules les PL ayant permis au minimum la CC, la CMF et la recherche de la mutation *MYD88* L265P sur ADNc et ADNcf ont été conservés.

Finalement, un total de 104 prélèvements appartenant à 76 patients ont été retenus : 37 LCR issus de 21 patients diagnostiqués en tant que PCNSL, et 67 LCR issus des 55 patients du groupe contrôle.

C) Traitement pré-analytique

Les LCR en provenance des HCC ont été échantillonnés dans des tubes neutres sans additifs et transportés en urgence vers le laboratoire d'Hématologie de Mulhouse, le délai optimal à respecter entre le prélèvement et sa réception étant de 2 heures afin de préserver au mieux la viabilité des cellules (et donc l'ADNc), ainsi que de l'ADNcf. En effet l'ADN sous forme libre demeure largement exposé aux conditions environnementales : sa fragilité impose donc des règles pré-analytiques strictes, et notamment un délai de pré-traitement le plus court possible une fois le prélèvement réceptionné. En cas d'analyse sur l'ADNcf, il était vivement recommandé de prendre en charge l'échantillon dans les 2 heures suivant le prélèvement. Pour des raisons logistiques évidentes, un tel délai restait parfois difficile à respecter pour des prélèvements issus d'un autre centre hospitalier.

La gestion des prélèvements de LCR pour suspicion de PCNSL est effectuée par le secteur de CMF du laboratoire selon le circuit présenté dans la figure 24. En premier lieu, 500 µL de LCR doivent être remis au secteur de cytologie dans le but de réaliser une numération des cellules ainsi que d'apprécier leur morphologie. 100 µL de LCR sont également aliquotés dans un cryotube et congelés à -80°C en vue des dosages cytokiniques (IL-6 et IL-10) par CBA, sous-traités au laboratoire d'Hématologie de l'hôpital Pitié Salpêtrière-Charles Foix de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (AP-HP).

Le volume d'échantillon restant est ensuite centrifugé 5 minutes à 1500 tours/min (380g). La totalité du surnageant, nécessaire pour la recherche d'ADN circulant tumoral, est transférée au secteur de biologie moléculaire. Le culot cellulaire est quant à lui repris dans 300µL de tampon salin PBS (phosphate-buffered saline) et réparti entre le secteur de biologie moléculaire pour la recherche de mutation sur l'ADNc (100µL), et le secteur de CMF pour l'immunophénotypage cellulaire (200µL) : 100µL sont alors destinés au panel d'orientation, et 100µL soit pour acquérir un nombre d'évènements plus élevé, soit pour réaliser un panel complémentaire (analyse des chaînes légères en intra-cytoplasmique ou de marqueurs supplémentaires pour caractériser le lymphome). Les analyses de biologie moléculaire étant différées pour être lancées par séries de patients, le culot remis en suspension dédié à la recherche de la mutation de *MYD88* est directement été congelé à -20°C, tandis que le surnageant est centrifugé une

seconde fois pendant 10 minutes à 16 000g, à une température de +4°C, avant d'être conservé à une température de -80°C.

Etant donné les multiples examens pratiqués sur le LCR, il apparait de façon évidente qu'une PL de qualité est primordiale afin de recueillir un volume suffisamment important, ce qui constitue une problématique majeure pour l'obtention de ce prélèvement précieux.

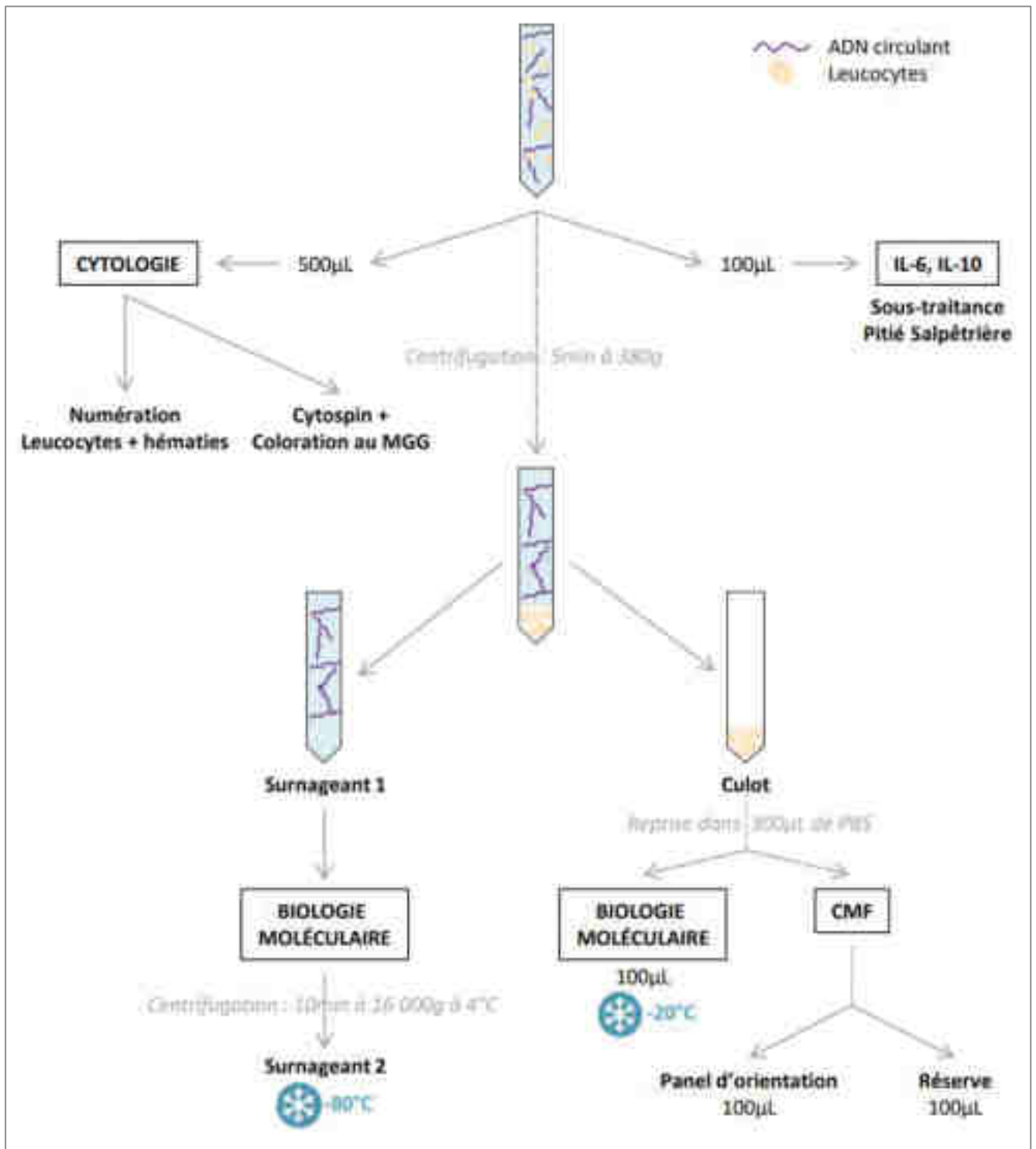


Figure 24. Gestion pré-analytique des échantillons de LCR au laboratoire.

D) Cytologie conventionnelle

L'étude cytologique du LCR comprend l'évaluation de son aspect macroscopique, le comptage manuel des hématies et des leucocytes à l'aide d'une cellule de type Kovaslide®, et l'analyse morphologique des cellules préalablement fixées et colorées au microscope. Pour ce faire, un volume recommandé de 200 µL de LCR (pur ou dilué selon la cellularité) est d'abord additionné à 50µL de sérum albumine bovine à 30%, cytospiné 8 minutes à 600 tours/min puis coloré au May-Grünwald Giemsa à l'aide d'un colorateur automatique de type SmartColor® (Biosynex). La présence d'une cellule suspecte de malignité (taille moyenne à grande, noyau irrégulier et nucléolé, cytoplasme basophile) est suffisante pour qualifier le résultat de positif. Les résultats des frottis sanguins ne montrant que des cellules lysées non identifiables sont qualifiés d'ininterprétables.

E) Cytométrie en flux

Les échantillons les plus anciens de la cohorte ont été analysés sur un cytomètre en flux 8 couleurs de type FACSCanto II® (3 lasers) par l'intermédiaire du logiciel FACSDiva® (BD Biosciences), tandis que les échantillons plus récents ont été analysés sur un cytomètre 10 couleurs de type Navios EX® (3 lasers) à l'aide du logiciel Kaluza C® (Beckmann Coulter). Les deux systèmes d'analyse ont été comparés et la concordance des résultats obtenus a été validée au préalable.

Un premier panel d'orientation élaboré pour la recherche de pathologies lymphoïdes, et basé sur la stratégie Euroflow est réalisé à partir de la première suspension de culot cellulaire (100 µL). Les panels n°1 et 2 sont utilisés respectivement avec le FACSCanto et le Navios (tableaux 2 et 3). Concernant le panel n°2, il s'agit d'un mix d'anticorps déjà prêt à l'emploi commercialisé par Beckmann Coulter (ClearLLab Lymphoid Screen®), sous forme lyophilisée, destiné à être vortexé avec la suspension cellulaire. 10 µL de mix Kappa/Lambda (Dako) y sont également ajoutés afin de mieux évaluer le caractère monotypique ou polytypique des lymphocytes. Une incubation de 15 minutes à l'abri de la lumière est nécessaire, avant de laver une fois la suspension au tampon PBS et de récupérer le culot dans 500 µL du même tampon.

Dans de rares cas, un tube complémentaire est réalisé pour analyser l'expression des chaînes légères en intra-cytoplasmique lorsque les lymphocytes n'expriment pas de chaînes en surface. Le même panel de dépistage peut également être répété afin d'acquérir plus d'évènements lorsque les cellules lymphomateuses détectées ne représentent pas plus de 10 évènements. De façon exceptionnelle, un panel orienté vers les lymphomes T est envisagé si lymphocytes suspects s'avèrent être de lignée T.

En effet, les panels utilisés diffèrent entre les deux techniques au niveau des couplages anticorps-fluorochromes, du nombre de fluorochromes utilisés (8 pour le FACSCanto et 10 pour le Navios) et des fournisseurs de réactifs. Néanmoins, les cibles étudiées restent sensiblement identiques, puisque les marqueurs d'intérêt majeurs pour les lymphomes sont conservés.

Le résultat de la CMF est considéré comme positif dès lors qu'une population clonale est détectée (monotypie kappa ou lambda franche, sur un minimum de 10 évènements cellulaires), et que l'hypothèse d'une contamination sanguine est écartée.

Fluorochrome	FTTC	PE	PerCPy5.5	PECFIT	APC	APCPEIT	BV450	PECFIT
Cible	Kappa/CD8	Lambda/CD8	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19/CD4	CD19
Classe	Dako/REA-T3	Dako/NCAM 16.2	LL7PE12	T3-119	HI10a	SK7	LL7-REA-T4	PE30
Fournisseur	BD Biosciences	BD Biosciences	BD Biosciences	Beckman Coulter	BD Biosciences	BD Biosciences	BD Biosciences	BD Biosciences

Tableau 2. Panel d'anticorps n°1 employé avec le cytomètre FACSCanto II.

Fluorochrome	FTTC	PE	KCD	PECFIT	PECFIT	APC	APC-ALEXA 700	APC-ALEXA 700	PE BV450	PECFIT
Cible	Kappa/CD8	Lambda/CD8	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19
Classe	Polyclonal B9.11	Polyclonal 13B8.2	T3-119	N901	ALB1	3H1	BL1a	BL1a	UCHL1	3H1

Tableau 3. Panel d'anticorps n°2 employé avec le cytomètre Navios EX.

F) Biologie moléculaire

Auparavant, la recherche de la mutation de *MYD88* était effectuée par qPCR traditionnelle. Après une étape d'extraction et un programme d'amplification donné, un gel électrophorétique était employé pour séparer les amplicons et détecter ou non une bande correspondant au variant *MYD88* L265P muté grâce à un témoin positif. Avec l'acquisition de la ddPCR, la qPCR démontrée comme étant moins sensible a d'abord été comparée aux résultats de la PCR digitale, puis a finalement été abandonnée par le laboratoire. Les patients de l'étude n'ayant plus bénéficié de cette technique à partir de 2021, les données de cette analyse n'ont pas été exploitées. La procédure opératoire suivante s'applique donc uniquement à la ddPCR.

1) Extraction de l'ADN

L'extraction des ADN cellulaire et circulant représente la première étape indispensable à la recherche de mutations somatiques, permettant de travailler sur du matériel génétique purifié et isolé de tout contaminant cellulaire ou circulant.

Tandis que l'ADNc du LCR nécessitait une extraction manuelle en raison de sa faible concentration, l'existence d'un kit spécialement conçu par Qiagen pour l'ADNcf (QIASymphony DSP Circulating DNA, réf. 937556) offre la possibilité d'une extraction automatisée pour l'ADN du surnageant, à l'aide de l'extracteur QIASymphony®.

L'extraction manuelle de l'ADNc est effectuée à l'aide du kit QIAamp DNA micro kit et de la colonne à élution MiniElute (Qiagen), selon le protocole suivant : décongeler l'échantillon à température ambiante (100µL) ; ajouter 10µL de protéinase, 100µL de tampon AL, 100 µL de tampon ATL et 2µL de *RNA carrier* ; vortexer pendant 15 secondes et spiner ; incuber 10 minutes à 56°C dans le bain marie sec ; ajouter 50µL d'éthanol absolu ; incuber 3 minutes à température ambiante ; vortexer 15 secondes et spiner ; déposer le mix sur la colonne ; centrifuger 1 minute à 6000g, placer la colonne sur un nouveau tube collecteur ; ajouter 500µL de tampon AW1 ; centrifuger 1 minute à 6000g, placer la colonne sur un nouveau tube collecteur ; ajouter 500µL de tampon AW2 ; centrifuger 3 minutes à 20 000g, placer la colonne sur un tube Eppendorf 1.5 mL ; ajouter entre 55 µL de tampon AE ; laisser incubé 5 minutes à température ambiante ; centrifuger 1 minute à 20000g ; redéposer le filtrat sur la colonne, incubé 5 minutes à température ambiante ; centrifuger 1 minute à 20000g.

Concernant le surnageant, celui-ci est centrifugé pendant 5 minutes à 3200g et isolé des éventuels cristaux formés pendant la période de conservation. Un volume total de 2 mL est nécessaire afin d'augmenter la quantité de matériel génétique. Après une étape de lyse cellulaire préalable par la protéinase K, les brins d'ADN circulant peuvent se lier à des billes magnétiques par polarité ionique. Le milieu réactionnel subit alors successivement une étape de lavage des impuretés présentes, puis une étape d'élution des brins d'ADN.

Une fois les extractions terminées, la concentration en ADN extrait (absorbance maximale à 260 nm) ainsi que sa pureté sont déterminées par le spectrophotomètre Nanodrop 2000® (Thermo Scientific). En fonction du niveau d'absorbance à 280 nm et à 230 nm, une courbe d'absorbance ainsi que des ratios d'absorbance A260/A280 et A260/230 sont établis pour évaluer le niveau de contamination de l'ADN respectivement par les protéines, et par d'éventuels composés chimiques ou organiques. Ces ratios doivent idéalement être supérieurs à 1,8 pour témoigner d'un ADN extrait pur.

L'ADNc et l'ADNcf sont conservés respectivement à +4°C et à -20°C jusqu'au lancement de la PCR.

2) Préparations des échantillons et du mix

Etant donné la charge d'ADN plus conséquente dans les prélèvements cellulaires que dans les surnageants, les suspensions d'ADNc sont diluées de moitié dans de l'eau RNase Free (8 µL d'échantillon pour 8 µL d'eau), tandis que les surnageants sont utilisés purs (volume final = 16 µL). Pour chaque série sont également préparés un contrôle positif pour le variant *MYD88 L265P* (2µL de solution pour 14µL d'eau), un témoin normal dépourvu de la mutation (2µL de solution pour 14µL d'eau), ainsi qu'un contrôle négatif constitué exclusivement d'eau (16µL d'eau).

Concernant le mix réactifs, celui-ci est préparé manuellement et en quantité adaptée au nombre d'échantillons, de sorte à pouvoir ajouter 28 µL de mix (BioRad) aux 16 µL des échantillons patients et

des témoins. Ce mix contient de l'eau (3,8 μ L), les deux sondes fluorescentes (2,2 μ L), et un mélange (22 μ L) composé entre autres par les nucléotides, l'ADN polymérase, une paire d'amorce sens et anti-sens encadrant la séquence d'intérêt et du tampon. Les volumes ci-dessus ont été définis pour permettre une analyse en duplicate pour chaque patient et chaque témoin afin d'améliorer la sensibilité analytique. L'usage préliminaire d'enzymes de restriction dans le but de séparer et de digérer les brins d'ADN n'est pas nécessaire pour le traitement des LCR, la concentration en ADN étant relativement faible en comparaison aux prélèvements sanguins.

3) Génération des gouttelettes, préparation de la plaque et amplification

La prochaine étape apparaît propre à la ddPCR. A l'aide du QX 200 Droplet Generator® (BioRad), des milliers de gouttelettes lipidiques individualisées contenant idéalement un unique exemplaire de brin d'ADN sont générées au sein des puits d'une cassette spécialement conçue, à partir de 20 μ L de préparation mix-ADN et de 70 μ L d'huile de génération. Après quelques minutes de temps de formation, 40 μ L de solution de gouttelettes sont transférés en duplicate pour chacun des patients et des témoins dans une plaque 96 puits. Celle-ci est ensuite scellée à 190°C avec un film d'aluminium afin d'éviter les contaminations, à l'aide d'un scelleur PX 1 PCR Plate Sealer® (BioRad).

La plaque est alors prête pour l'étape d'amplification de l'ADN (PCR en point final), effectuée à l'aide d'un thermocycleur C1000 Touch® (BioRad) selon le programme suivant : 1 cycle de 10 minutes à 95°C (activation enzymatique) ; 40 cycles de 30 secondes à 94°C (dénaturation de l'ADN) et successivement 1 minute à 58°C (hybridation et élongation de l'ADN) ; 1 cycle de 10 minutes à 98°C (désactivation enzymatique) ; 1 cycle de durée indéterminée à 4°C (conservation de la plaque).

4) Lecture de fluorescence

Enfin, la plaque est placée dans un lecteur de type QX 200 Droplet Reader® (BioRad) afin d'évaluer l'intensité de fluorescence pour les séquences WT et mutées de chaque gouttelette. Après 30 minutes à 1 heure de lecture, les résultats sont analysés via le logiciel QuantaSoft Plate®, ou sa version plus récente QuantaSoft Analysis Pro® (BioRad).

5) Interprétation des résultats

Les données sont représentées sous la forme de graphiques uni- ou bidimensionnels en fonction de la positivité de chaque gouttelette dans les canaux mutés (*channel 1*) et/ou WT (*channel 2*). En effet, l'utilisation de deux sondes fluorescentes spécifiques des séquences WT (sonde HEX) ou mutées (sonde FAM) rend possible la discrimination du statut mutationnel de chacune des gouttelettes analysées.

Le seuil de positivité de fluorescence, identique pour les deux canaux, est ajusté manuellement en fonction de la dispersion des points des différentes populations obtenues à partir des témoins, selon deux types de représentation graphique (exemples visibles dans le chapitre de la ddPCR) : des nuages de

points unidimensionnels représentant l'intensité de fluorescence pour chaque gouttelette placée en fonction des puits et pour chaque canal ; des nuages de points bidimensionnels avec intensité de fluorescence du canal muté en fonction de celle du canal WT pour chaque gouttelette. Cette dernière représentation permet donc de distinguer les gouttelettes double-négatives (aucune amplification de séquence *MYD88*), les gouttelettes mutées (positives dans le canal 1 pour la mutation *MYD88* L265P), les gouttelettes WT (positives dans le canal 2) et les gouttelettes double-positives (amplification d'un brin WT et d'un brin muté dans la même gouttelette). Bien qu'une gouttelette ne doive en théorie contenir qu'un seul type de séquence, il est possible d'apercevoir des gouttelettes double-positives de façon plus occasionnelle, notamment en cas de d'excès de matériel génétique.

Le seuil de positivité de fluorescence doit être réajusté de manière individuelle en cas d'inhibition ou de saturation de la réaction de PCR (matérialisée par une diminution globale d'intensité de fluorescence dans les deux canaux), afin de ne pas considérer à tort un résultat comme étant négatif.

La technique est validée si un minimum de 10 000 gouttelettes a été analysé par puits, soit un minimum de 20 000 gouttelettes par patient ou par témoin. Le témoin négatif contenant de l'eau et dépourvu d'ADN doit donc présenter uniquement des gouttelettes double-négatives (aucune séquence WT ni mutée). Le témoin normal ne doit présenter que des gouttelettes de type WT, tandis que le témoin positif doit montrer une majorité de gouttelettes mutées.

La limite de détection définie par le fournisseur pour qualifier un variant muté chez un patient est de 3 gouttelettes positives pour la séquence mutée. La limite de détection est recalculée si besoin en multipliant par 3 le nombre de gouttelettes faussement positives potentiellement identifiées dans le témoin négatif ou le témoin normal (équivalent au bruit de fond de la série). En plus de cette limite de détection, l'intensité de fluorescence des gouttelettes mutées doit idéalement se rapprocher de celle du témoin positif pour considérer que les gouttelettes positives sont significatives, hormis en cas d'inhibition ou de saturation avérée de la PCR. Les gouttelettes doublement positives sont considérées comme mutées. Une discordance évidente entre les duplicatas d'un échantillon impose de réitérer l'analyse.

G) Dosage des interleukines IL-10 et IL-6

Cet examen est actuellement sous-traité au laboratoire de biologie médicale des hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière de l'AP-HP. Le dosage des interleukines est effectué par la technique CBA et offre des valeurs quantitatives pour l'IL-10 et l'IL-6, ainsi que le ratio IL-10/IL-6. Le seuil de positivité de l'IL-10 a été défini à 4pg/mL. Pour les valeurs proches de ce seuil (entre 4 et 10 pg/mL), la valeur du ratio permet de compléter l'interprétation des résultats : un ratio < 1 conclut le résultat comme négatif, tandis qu'un ratio ≥ 1 confirme la positivité de l'IL-10.

III. RÉSULTATS

A) Données démographiques, diagnostiques et biologiques

Les 21 cas de PCNSL incluent 20 PCNSL de l'immunocompétent, et 1 PCNSL associé à un contexte d'immunodépression (cas #19, stade SIDA profond). Le cas #21 souffrait d'une forme oculaire isolée sans atteinte cérébrale.

Parmi les 55 patients du groupe contrôle, divers diagnostics ont pu être reliés aux anomalies visibles à l'imagerie : 20 tumeurs non hématopoïétiques du SNC (13 glioblastomes, 7 gliomes), constituant le principal diagnostic différentiel des PCNSL ; 13 origines inflammatoires ou dysimmunitaires (scléroses en plaques, méningites non infectieuses, autres lésions inflammatoires, myélites ou atteintes optiques auto-immunes, maladie à IgG4) ; 8 origines infectieuses (abcès, méningites, encéphalites, leuco-encéphalopathie multifocale progressive, uvéites) ; 3 amyloïdopathies et 2 leucopathies ; 3 accidents vasculaires cérébraux ; 1 étiologie iatrogène ; 1 cause métastatique d'un cancer solide ; 4 autres diagnostics (vascularite cérébrale primitive, syndrome de Miller-Fischer, épilepsie, schizophrénie).

Le tableau 4 rassemble les principales données démographiques et biologiques concernant les patients étudiés. Le groupe de PCNSL était composé de 52,4% de femmes (11/21) et 47,6% d'hommes (10/21). 49,1% d'hommes (27/55) et 50,9% de femmes (28/55) composaient le groupe contrôle. L'âge médian au diagnostic des PCNSL était de 72 ans, contre 63 ans pour le groupe contrôle.

		PCNSL	Groupe contrôle	Cohorte
Effectifs (n)	<i>Patients</i>	21	55	76
	<i>LCR</i>	37	67	109
Sexe (n)	<i>Hommes</i>	10 (47,6%)	27 (49,1%)	37 (48,7%)
	<i>Femmes</i>	11 (52,4%)	28 (50,9%)	39 (51,3%)
Âge au moment de la PL (années)	<i>Minimal</i>	38	19	19
	<i>Maximal</i>	86	85	86
	<i>Médian</i>	72	63	65,5
Délai d'acheminement (heures)	<i>Minimal</i>	0h10	0h34	0h10
	<i>Maximal</i>	3h28	2h40	3h28
	<i>Médian</i>	1h58	1h54	1h55
Volume d'échantillon (mL)	<i>Minimal</i>	1,5	2	1,5
	<i>Maximal</i>	20	17	20
	<i>Médian</i>	10	7,5	8,75

Tableau 4. Données démographiques et biologiques des 76 patients.

Les échantillons de LCR ont été pris en charge par le laboratoire avec un délai médian de 1h56 à partir de l'heure de prélèvement (défini à partir de 98 échantillons parmi les 104 totaux), avec un laps de temps plus allongé pour près de la moitié d'entre eux (43 LCR acheminés en plus de 2 heures, dont 1 LCR en

plus de 3 heures). A noter que les conditions pré-analytiques ont été bien respectées pour les patients prélevés directement sur site. Notre expérience a cependant montré que cet intervalle de temps ne semblait pas être un obstacle à l'obtention de résultats exploitables en routine, mais qu'un délai rallongé devait toutefois être pris en considération, notamment en cas de bilan diagnostique négatif.

La majorité des échantillons de ce travail a répondu aux exigences en termes de volume, avec un volume médian global de LCR de 8,75mL (calculé à partir de seulement 78 prélèvements parmi les 104 LCR faute de renseignements), bien que certains n'aient pas systématiquement bénéficié de la recherche de la mutation *MYD88* L265P sur ADNc et sur ADNcf dans le groupe des PCNSL. La quantité de matériel biologique constitue donc le principal facteur limitant dans la réalisation du panel d'exams envisageables (volume observé le plus faible = 1.5mL).

B) Taux d'envahissement méningé et performances diagnostiques

Le tableau 5 présente l'ensemble des résultats biologiques obtenus pour les 21 cas de PCNSL à partir de 37 LCR : 13 patients ont bénéficié d'une seconde PL, et 3 patients d'une troisième PL, la CC et la CMF ayant été réalisées systématiquement sur tous les LCR. Le taux de positivité final (valeur encadrée et en gras) traduit la proportion de patients positifs pour chaque paramètre en tenant compte des résultats parfois multiples des LCR (un patient est considéré comme positif pour un paramètre dès lors qu'au moins un de ses LCR est positif) : 71,4% pour la CC (15/21), 61,9% pour la CMF (13/21), 100% pour le dosage de l'IL-10 (21/21), 47,6% pour la mutation *MYD88* L265P sur ADN cellulaire (10/21), et 71,4% pour la mutation sur ADN circulant (15/21). Un envahissement cellulaire leptoméningé, défini par l'association de résultats positifs pour la CC et la CMF sur un même prélèvement, est détecté chez 61,9% des cas (13/21).

Ainsi, le diagnostic de PCNSL a pu être posé dans le LCR sur l'argument biologique d'un EM chez 13 patients de la cohorte. Pour les 8 patients restants (38,1%), ce sont les résultats anatomopathologiques de la biopsie cérébrale (n=7), ou les résultats biologiques de la vitrectomie dans le cas d'un lymphome oculaire (n=1, cas #21) qui ont permis de déterminer le diagnostic. A noter que le cas #2 qui présentait un EM a également bénéficié d'une biopsie cérébrale. Le statut mutationnel de *MYD88* a également été étudié pour 7 biopsies et le liquide vitré, révélant la mutation L265P pour la majorité des prélèvements.

La sensibilité de détection de la mutation L265P dans le surnageant du LCR a été évaluée en se basant sur les patients présentant une preuve cellulaire de la mutation. Il s'agit donc des patients pour lesquels le gène muté *MYD88* a été détecté sur des cellules lymphomateuses : uniquement sur LCR (n=7) ; uniquement sur biopsie cérébrale (n=3) ; sur LCR et biopsie cérébrale (n=3) ; sur vitrectomie (n=1).

Patients	Cytologie						CMF			IL-10			MTD88 cellulaire			MTD88 circulant			Envassement leptoméningé			Biopsies cérébrales					
	PL n°1		PL n°2		PL n°3		PL n°1		PL n°2		PL n°3		PL n°1		PL n°2		PL n°3		PL n°1		PL n°2		PL n°3		Cytop. MYD88		
	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL	PL
#1	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	
#2	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	1
#3	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0
#4	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
#5	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
#6	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-
#7	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0
#8	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0
#9	0	1	0	-	-	-	0	1	1	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	1	0	-	-	-	0	0	0
#10	1	1	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	0	0	0
#11	1	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0
#12	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1
#13	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	1	1	1
#14	0	1	0	-	-	-	0	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	0	0	0
#15	1	1	-	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1	1	1
#16	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1
#17	0	1	-	-	-	-	0	1	-	-	-	0	1	-	-	-	-	-	0	1	-	-	-	-	0	0	0
#18	0	0	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	-	-	1	0	-	-	-	-	0	0	0
#19	0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	0	0	0
#20	1	1	1	-	-	-	0	0	1	-	-	0	0	-	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0
#21	0	0	0	-	-	-	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
*Liquide vitré																											
Nouveaux cas positifs (n)		12	3	0	0	9	3	1	20	1	0	8	2	0	11	4	0	9	3	1							
Taux de positivité cumulé (%)		57,1	71,4	71,4	71,4	42,9	57,1	61,9	100,0	100,0	100,0	40,0	47,6	47,6	57,9	71,4	71,4	42,9	57,1	57,1	61,9						

Tableau 5. Données biologiques des 21 PCNSL et taux de positivité. Les résultats négatifs et positifs sont codifiés respectivement par 0 et 1. *Cytop.* : cytopathologie (par examen anatomopathologique ou biologique).

Finalement, la mutation a donc été retrouvée sur la fraction cellulaire tumorale de 14 patients, ayant bénéficié au total de 23 LCR avec recherche de la mutation sur ADNcf. Celle-ci a été retrouvée sur 18 prélèvements, démontrant une sensibilité de la technique de 78,3% (18/23).

Le tableau 6 résume les données de spécificité pour diagnostiquer un PCNSL qui ont pu être obtenues à partir du groupe contrôle, pour chacun des paramètres : 89,6% pour la CC (60/67), 100% pour la CMF (67/67), 97,1% pour le dosage de l'IL-10 (33/34), 100% pour la recherche de MYD88 L265P sur ADNc et ADNcf (67/67). Ainsi, 7 faux-positifs ont été relevés pour la CC, et un seul pour l'IL-10.

	CC	CMF	IL-10	MYD88c	MYD88cf
<i>Patients (n)</i>	55	55	33	55	55
<i>LCR (n)</i>	67	67	34	67	67
<i>Faux positifs (n)</i>	7	0	1	0	0
<i>Spécificité (%)</i>	89,6	100	97,1	100	100

Tableau 6. Résultats du groupe contrôle et spécificités diagnostiques.

C) Intérêt de la réitération des PL

Parmi les 13 patients ayant bénéficié de PL multiples (13 PL doubles, 3 PL triples), la majorité ont été effectuées avec environ un jour d'intervalle (n=9). Certaines PL ont été réitérées au bout de quelques jours : 2 jours (n=1), 3 jours (n=2) ou 5 jours (n=1). D'autres ont été répétées dans un laps de temps plus long : 11 jours (n=1), 27 jours (n=1) ou 34 jours (n=1). Aucun nouveau traitement n'aura été instauré pendant les intervalles de temps séparant les PL multiples. Une corticothérapie aura néanmoins été stoppée entre les 2 PL pratiquées chez le cas #17. Autrement, seuls les cas #10, #12, #15 et #16 étaient traités par glucocorticoïdes au moment de leurs PL.

Pour chaque patient, les paramètres qui ne se seraient pas positivés sur toutes les PL réitérées sont matérialisés en rouge. Les taux de positivité cumulés désignent alors le taux de positivité à chaque PL en tenant compte des nouveaux cas positifs. Par analogie, la preuve biologique d'un EM (CC et CMF positives) apportée grâce au 2^{ème} ou 3^{ème} LCR est matérialisée en rouge. Ainsi, nous pouvons constater qu'un EM a été diagnostiqué à la 1^{ère} PL chez seulement 42,9% des patients (9/21). La réalisation d'une 2^{ème} PL chez 13 patients (dont 11 pour lesquels aucun EM n'avait été prouvé au préalable) a permis de prouver un envahissement cellulaire chez 3 patients supplémentaires. La réalisation d'une 3^{ème} PL chez 3 patients (dont 2 pour lesquels aucun EM n'avait été prouvé au préalable) a apporté 1 cas d'EM supplémentaire. Le patient #19 est le seul à ne pas avoir bénéficié d'au moins deux LCR alors que son unique bilan ne montrait pas d'EM. Parmi les 8 patients sans preuve d'EM au 2^{ème} LCR, seuls 2 ont bénéficié d'une 3^{ème} PL. Au total, la réitération des PL dans cette cohorte aura permis de détecter un

EM, et donc de diagnostiquer formellement un PCNSL par biologie médicale, chez 61,9% des patients (13/21).

Indépendamment du bénéfice concernant la détection d'un EM, les résultats révèlent que d'autres patients ayant bénéficié de LCR multiples présentent des résultats discordants pour certains paramètres. Le cas #11 présente une CC positive uniquement sur le 1^{er} LCR et non sur le 2^{ème}. Concernant l'étude du gène *MYD88*, l'analyse d'un second LCR était nécessaire pour les patients #10 et #17 afin de détecter la mutation L265P. Pour les cas #10 et #21, la mutation a également pu être détectée sur ADN circulant à partir du 2^{ème} LCR, tandis qu'elle a été mise en évidence sur le premier et non le 2^{ème} LCR pour le patient #18. La répétition des PL n'a pas impacté les résultats du dosage des interleukines, qui étaient en faveur d'un PCNSL sur l'ensemble des LCR étudiés.

IV. DISCUSSION

A) Performances diagnostiques : CC, CMF et IL-10

Dans ce travail, un « taux de positivité » pour chacun des paramètres étudiés a été déterminé. La sensibilité diagnostique est inappropriée pour la CC et la CMF puisque leur combinaison a été décrétée comme une méthode diagnostique de référence. En effet, les résultats de CC et de CMF ont eux-mêmes fait office de gold standard biologique alternatif à la biopsie tissulaire pour diagnostiquer un PCNSL. De plus, la présence d'un EM n'est pas systématique et est soumise à une variabilité inter- et intra-individuelle. Les résultats de CC et de CMF peuvent donc naturellement se révéler non concluants, pour des raisons physiopathologiques et non de performance intrinsèque du test biologique. De la même façon, la mutation L265P du gène *MYD88*, bien que souvent impliquée dans les PCNSL, n'est pas toujours présente et ne peut donc pas toujours être détectée. Seule l'IL-10 peut donc se voir attribuer un taux de positivité correspondant à une véritable sensibilité diagnostique de PCNSL.

1) CC, CMF et taux d'EM

Dans ce travail, la CC et la CMF arborent respectivement un taux de positivité de 71,4% et 61,9%. La performance de ces deux méthodes pour exclure un PCNSL apparaît peu satisfaisante, mais peut s'expliquer au moins en partie par le fait que tous les patients ne présentent pas nécessairement d'EM au moment du prélèvement céphalo-rachidien. Une dissémination méningée concernerait 7 à 42% des PCNSL selon la littérature, la majorité des études retrouvant des chiffres compris entre 15 et 20%.^{9,22,80,81} Des chiffres plus ou moins similaires ont été obtenus pour les SCNSL.^{94,95,97-100} Ces données sont toutefois soumises à de potentielles discordances entre les études en raison des techniques utilisées pour définir un EM, ainsi que des critères de positivité choisis. Ici, la CC était qualifiée de positive dès lors qu'une cellule douteuse était observée sur la cytopspin : taille moyenne à grande, cytoplasme basophile,

chromatine décondensée ou nucléolée, noyau irrégulier, avec un aspect différent d'un monocyte ou d'un lymphocyte classique. Un résultat positif était conclu par la CMF dès lors qu'une population de 10 cellules au minimum (clusterisée sur l'expression de différents marqueurs) était caractérisée de clonale (expression exclusive d'un seul isotype de chaîne légère de surface).

La CC affiche un meilleur taux de positivité que la CMF. Cet élément contraste avec les résultats de la majorité des études ayant comparé ces deux techniques dans la détection d'un EM (PCNSL et SCNSL confondus).⁹⁴⁻¹⁰⁰ Ceci pourrait être la conséquence d'un critère de positivité moins restrictif pour la CC que pour la CMF, puisque l'identification d'une seule cellule suspecte suffisait pour conclure à un résultat positif. De plus, bien que l'aspect cytologique soit apprécié par plusieurs lecteurs expérimentés, la lecture microscopique souffre naturellement d'un manque de reproductibilité et d'un certain degré de subjectivité. Cette problématique est d'autant plus marquée par la confusion possible entre des cellules lymphomateuses de DLBCL et des lymphocytes réactionnels qui peuvent présenter un aspect semblable, et par l'altération potentielle des cellules liée à la procédure opératoire de la cytopspin. Il devient donc inévitable de considérer à tort certains échantillons comme positifs (notamment les prélèvements paucicellulaires ou présentant de rares cellules suspectes), se traduisant par une spécificité de seulement 89,6%. En comparaison, la spécificité de la CMF est excellente (100%), mais au détriment d'une détectabilité moins optimale que la CC. Ceci reflète bien la complémentarité des deux techniques, et justifie l'importance de systématiquement les associer. C'est pourquoi il a été décidé de diagnostiquer un EM uniquement lorsque les deux techniques sont positives.

Il est intéressant de constater que le taux d'EM correspond en fait au taux de positivité de la CMF, soit 61,9% (13/21). En effet, il n'a pas été observé de résultats où la CMF était isolément positive, à l'exception du 3^{ème} LCR du cas #9 où la CC était négative sans raison évidente exceptée une paucicellularité relative de la cytopspin. Heureusement, le 2^{ème} LCR de ce patient avait déjà démontré l'existence d'un EM (CC et CMF positives). Etant donné l'excellente spécificité de la CMF, il serait naturel de considérer qu'un résultat positif en CMF se suffise à lui seul pour diagnostiquer un EM, et d'abandonner le résultat de la CC. Néanmoins, il serait indispensable de vérifier ces données sur une cohorte plus importante. De plus, le meilleur taux de positivité de la CC permet pour certains patients d'orienter plus fortement l'hypothèse diagnostique vers un lymphome du SNC et de poursuivre les investigations, bien que la CMF demeure négative. L'association de la CC permet également de conforter le diagnostic lorsqu'elle est cohérente avec les résultats de CMF.

Ainsi, la CC se révèle plus fréquemment positive de façon isolée. Pour le cas #10, la CMF a montré à 2 reprises une population lymphocytaire B composée de peu d'évènements, et n'exprimant pas de chaînes légères en surface, ne permettant donc pas de prouver avec certitude sa clonalité et son caractère malin.

Le patient #11 présente une population minoritaire lymphoïde B mais n'exprimant aucune chaîne légère de surface sur le 1^{er} LCR, et une population sans restriction isotypique sur le 2^{ème} LCR. La grande taille de ces cellules (FSC très élevée) ne suffit pas à caractériser la population de lymphomateuse. Enfin, le patient #20 a présenté un LCR avec une population lymphocytaire minoritaire de grande taille mais montrant seulement une inversion du rapport kappa/lambda, un LCR sans aucune anomalie, avant d'afficher une population monoclonale kappa sur un dernier LCR. Une solution pour pallier le défaut d'expression de chaînes légères kappa ou lambda en surface serait de rechercher leur présence en intracytoplasmique à l'aide d'anticorps et d'un mode opératoire adaptés. Cette technique en cours d'essai au laboratoire ne s'est néanmoins pas révélé suffisamment optimale.

Le cas #2 a présenté un EM à deux reprises au sein d'un prélèvement hémorragique. L'absence de clones malins en périphérie et de maladie systémique permettait d'exclure une éventuelle origine sanguine et d'affirmer la véritable localisation méningée. Théoriquement, ce patient n'aurait pas nécessité le recours à une biopsie cérébrale, puisque le diagnostic de PCNSL était fait sur la base de l'EM. Néanmoins, le profil atypique du clone détecté dans le LCR a motivé la poursuite des investigations. Il s'agissait d'un clone de petite taille, au noyau parfois irrégulier et nucléolé, dont le phénotype révélait une clonalité lambda ainsi qu'un score de Matutes à 3, incompatible au premier abord avec un DLBCL. Finalement, la biopsie cérébrale a révélé une tumeur de type DLBCL de même restriction isotypique. Une étude des réarrangements VDJ a prouvé l'existence de remaniements identiques entre le clone cérébral et le clone méningé, témoignant donc de leur lien de parenté. Ainsi, la raison de la présence de deux profils vraisemblablement distincts reste obscure. Un développement malin de deux clones distincts malgré tout apparentés et exclusivement au niveau du SNC pourrait traduire la détection d'un stade évolutif dans la tumeur cérébrale et une dissémination méningée de l'autre stade évolutif.

2) Dosages de l'IL-10 et IL-6

Le dosage de l'IL-10, marqueur soluble innovant, révèle dans cette étude une excellente sensibilité diagnostique (100%) et est retrouvée à concentration élevée dans l'intégralité des LCR des PCNSL (n=24), ainsi qu'une spécificité très satisfaisante (97,1%). Ces résultats avoisinent les performances les plus hautes démontrées dans la littérature (sensibilité de 59 à 96%, spécificité de 83 à 100%),⁸⁹ et se montrent supérieures à celles obtenues par Nguyen *et al.* (sensibilité de 88,6% et de 88,9%), malgré le même choix de seuil de positivité (4 pg/mL).¹²⁴ Ceci peut en partie s'expliquer par la prise en compte supplémentaire du ratio IL-10/IL-6 pour conclure quant aux valeurs basses d'IL-10 comprises entre 4 et 10 pg/mL, qui imposent un ratio ≥ 1 pour qualifier le résultat de positif. Ainsi, ce paramètre diagnostique dosé dans le surnageant du LCR apparaît comme un excellent marqueur d'exclusion d'un lymphome du SNC. Cette molécule est potentiellement sécrétée par les cellules lymphomateuses, mais tout particulièrement par les différents acteurs physiologiques du système immunitaire.⁸⁹ Ainsi, l'instauration

de traitements anticancéreux impacteraient à court terme principalement les cellules malignes, ce qui préserverait ainsi la synthèse anormale d'IL-10 par les éléments cellulaires sains et ne perturberait pas le dosage biologique en début de traitement, bien qu'un rétro-contrôle négatif finisse par se mettre en place sur la sécrétion d'IL-10.¹²⁴ De plus, la localisation cérébrale de la tumeur et de son microenvironnement immunitaire, et la distribution ubiquitaire des différents acteurs physiologiques pourraient expliquer que l'IL-10 transite vers la tumeur via le LCR et soit malgré tout retrouvée à des concentrations élevées même en l'absence de dissémination méningée. La proximité anatomique entre l'œil et le LCR peut justifier une concentration élevée d'IL-10 dans le LCR même en cas de lymphome strictement oculaire,¹²⁴ comme c'est le cas pour le patient #21.

Néanmoins, les résultats de ce travail reflètent l'interprétation délicate dont fait l'objet le dosage des interleukines, et la difficulté consécutive à établir de manière consensuelle un seuil diagnostique dans le cadre des lymphomes cérébraux. Parmi les 24 LCR analysés chez les PCNSL, 4 présentaient un ratio IL-10/IL-6 < 1, mais qualifiés de positifs car le taux d'IL-10 était supérieur à 10 pg/mL. A l'inverse, 8 d'entre eux ont présenté un ratio > 1, mais associé à une valeur d'IL-10 relativement basse (entre 5 et 30 pg/mL). Dans le groupe contrôle, un résultat faussement positif a été relevé, avec des concentrations en IL-10 et en IL-6 à 5 pg/mL, aboutissant à un ratio égal à 1. Deux autres patients ont affiché un taux d'IL-10 entre 4 et 10 pg/mL, mais ont été rendus négatifs à partir d'un ratio < 1. Premièrement, ces données prouvent que les valeurs proches du seuil décisionnel ne doivent pas donner lieu à une conclusion formelle, et que la prise en compte des concentrations et celle du ratio sont nécessaires. Deuxièmement, notre expérience a montré qu'il était possible d'observer une concentration élevée d'IL-10 (> 10 pg/mL), mais accompagnée d'un ratio < 1 en raison d'un taux d'IL-6 majoré. Malgré l'interprétation conjointe des deux critères, il demeure parfois difficile de conclure entre un véritable lymphome du SNC associé à une composante inflammatoire indépendante ou non, et un contexte purement inflammatoire à l'origine d'un relargage cytokinique massif, toutes cytokines confondues. En conclusion, le dosage des interleukines requière une grande prudence d'interprétation. Bien qu'un bilan associant un ratio nettement supérieur à 1 et une concentration élevée en IL-10 dans le LCR soit très en faveur, voire pathognomonique d'un lymphome du SNC, des situations plus complexes peuvent se rencontrer en routine.

B) Intérêt de la réitération des PL

Le taux d'EM calculé dans cette étude (61,9%) est supérieur aux données de la littérature indiquées précédemment. Cependant, ce résultat reste encore potentiellement sous-estimé puisqu'une étude a rapporté que des examens post-mortem permettaient en réalité de détecter un EM chez près de 80% des patients décédés des suites d'un PCNSL.⁸⁸ La réitération des PL constitue un des éléments ayant incontestablement contribué à l'amélioration de l'identification d'un EM. Initialement, le taux d'EM

aurait été de 42,9% (9/21) en se contentant d'une PL unique. Ce sont les tentatives ultérieures de PL qui ont permis de déceler un EM chez 4 patients supplémentaires dont le premier bilan était négatif, ramenant le taux d'EM final à 61,9% (13/21). La répétition des LCR a d'ailleurs déjà été recommandée à plusieurs reprises dans la littérature.^{85,89} S'il est primordial d'optimiser au maximum la recherche de cellules lymphomateuses dans le LCR par CC et CMF, c'est parce que la preuve biologique d'un EM tient lieu de preuve diagnostique d'un lymphome du SNC. Elle autorise de s'affranchir d'un examen anatomopathologique moyennant une biopsie tissulaire invasive, offrant ainsi un bénéfice considérable pour le clinicien et le patient. La biopsie cérébrale a donc été évitée chez 12 patients parmi les 13 concernés, tandis que les 8 patients restants ainsi que le cas #2 ont subi un geste invasif (8 biopsies cérébrales, 1 vitrectomie).

Concernant les 4 patients chez lesquels un EM n'a pas été démontré à la 1^{ère} PL (cas #9, #14, #17 et #20), le délai d'acheminement des prélèvements ne semble pas perturber les résultats. Pour les cas #14 et #17, les seconds LCR qui ont permis de prouver l'EM ont même été acheminés au laboratoire au bout de 2h34 et 2h53 respectivement. Les volumes d'échantillon étaient globalement satisfaisants (pas de renseignements pour le cas #20) car au moins supérieurs à 6,5mL. Seule la 1^{ère} PL du cas #17 a recueilli un volume faible (1,5mL), pouvant être mis en cause dans la négativité du bilan. En revanche, un traitement par corticoïdes était en cours lors du recueil du 1^{er} LCR chez ce patient, et a été stoppé pour réitérer ultérieurement le bilan méningé avec un 2^{ème} LCR, revenu positif pour la CC, la CMF ainsi que l'analyse de *MYD88* sur la fraction cellulaire. Ce prélèvement a été recueilli 27 jours plus tard afin de réduire au maximum l'impact des glucocorticoïdes. Au vu de ce délai rallongé, il est légitime de se demander si la découverte d'un EM sur le 2^{ème} prélèvement est plutôt liée à l'arrêt des corticoïdes, ou plutôt à l'évolution de la pathologie qui aurait entamé une dissémination méningée pendant ce laps de temps. Le patient #20 a obtenu un 3^{ème} LCR qui s'est révélé concluant 11 jours après le 2^{ème} bilan, soit 14 jours après le 1^{er} bilan. La distinction entre un réel bénéfice de la réitération des PL et l'évolution naturelle du cancer reste délicate, bien que la positivité de la CC sur les 3 échantillons laisse à penser que le stade évolutif est resté globalement le même sur ces 14 jours. Par ailleurs, le dosage d'IL-10 était positif dès le 1^{er} LCR pour ces 4 patients.

Outre les patients présentant une dissémination leptoméningée, l'importance de répéter les prélèvements est aussi mise en évidence par le cas #11 pour lequel la CC a conclu à des cellules lymphomateuses sur un seul LCR, et par les cas #10, 18 et 21 chez lesquels la mutation L265P du gène *MYD88* n'est pas détectée sur l'intégralité des prélèvements. Le cas #21 n'a cependant bénéficié de sa 2^{ème} PL (et d'un résultat positif pour *MYD88*) qu'après un délai de 34 jours. La part d'évolutivité de la pathologie peut à nouveau se discuter dans ce cas de figure.

A l'exception du cas #17, le retentissement de la corticothérapie sur les résultats obtenus reste difficile à évaluer, parfois faute de renseignements. A notre connaissance, les cas #10, #12, #15 et #16 étaient également traités par glucocorticoïdes au moment de leurs PL. Le patient #10 a vu apparaître la mutation L265P sur la fraction cellulaire et le surnageant du 2^{ème} LCR, mais une origine iatrogène à cette discordance reste discutable étant donné que la CC était positive sur les 2 prélèvements. Enfin, les bilans des 3 autres patients ont montré des résultats positifs pour l'ensemble des paramètres analysés malgré le traitement en cours.

A travers l'exploitation de ces résultats et de l'ensemble des données, de multiples facteurs apparaissent comme potentiellement responsables de résultats biologiques non concluants. Bien que l'impact des glucocorticoïdes ait déjà été prouvé,^{4,9,19,22} pouvant engendrer une méconnaissance d'un PCNSL dans près de 50% des cas,⁷³ celui-ci n'est pas significativement mis en évidence dans notre cohorte. L'intervalle de temps appliqué entre deux PL successives ne fait pas l'objet de recommandations consensuelles. Ainsi, plus le délai est rallongé, et plus il devient délicat de savoir si la positivité du bilan réitéré ne serait pas uniquement liée à l'évolution du lymphome. Quelle qu'en soit l'explication, il reste néanmoins légitime de répéter les prélèvements dès lors qu'un lymphome du SNC est suspecté étant donné la progression rapide de cette pathologie, et peu importe le délai pratiqué. Même si ce travail n'a pas permis de le démontrer, des facteurs pré-analytiques (délais d'acheminement du LCR, volumes d'échantillon) peuvent contribuer à la négativité des paramètres biologiques. La répartition du prélèvement de LCR entre les différents secteurs du laboratoire peut aussi être source d'une mauvaise distribution des éléments lymphomateux au sein des échantillons, à l'origine de discordances entre les différentes techniques. Enfin, le comportement physiopathologique de la tumeur lymphomateuse peut constituer une autre composante de la variabilité des résultats du LCR. D'abord, l'envahissement cellulaire leptoméningé pourrait ne jamais survenir si la masse reste par exemple confinée dans le parenchyme encéphalique ou oculaire profond, ou bien survenir plus tard dans le temps lors de la progression du PCNSL. Ensuite, l'excrétion tumorale est potentiellement soumise à une variabilité à court terme dans le temps chez un même individu. La libération de composants malins cellulaires ou circulants dans le LCR pourrait donc être aléatoire et expliquer en partie des résultats discordants lorsque l'intervalle de temps entre deux PL reste court.

En conclusion, la réitération des PL apparaît comme essentielle afin de surmonter au mieux l'ensemble de ces obstacles. Cette pratique a pour but d'optimiser les performances des techniques biologiques et ainsi d'éviter les biopsies tissulaires et leurs complications éventuelles, en multipliant certes les recueils de LCR, mais à travers des gestes d'invasivité relative. En cas de bilan méningé négatif, il est donc fortement recommandé de réitérer la PL une voire deux fois à des temps rapprochés. Dans la mesure du possible et en fonction de l'état clinique du patient, aucun traitement ne doit être instauré pendant

l'exploration diagnostique par risque de masquer un véritable lymphome du SNC. En cas de forte suspicion de tumeur lymphomateuse, une nouvelle tentative peut être effectuée à plus long terme et à distance de tout traitement, notamment si le patient a été prétraité par glucocorticoïdes.

C) Apport de l'étude du statut mutationnel du gène *MYD88*

1) *MYD88* L265P, un marqueur onco-moléculaire de confirmation

Ce travail démontre une spécificité diagnostique de 100% pour la recherche de la mutation L265P du gène *MYD88*, aussi bien sur la fraction cellulaire (ADN cellulaire) que sur le surnageant (ADN circulant). Des performances semblables sont notifiées dans la littérature, puisque cette mutation semble être incriminée uniquement dans des pathologies lymphomateuses, aussi bien cérébrales qu'extra-cérébrales, présentant tout particulièrement un réel intérêt dans le bilan diagnostique d'une tumeur cérébrale.^{24,42,101-103,134-139} En revanche, la détection isolée de cette mutation n'offre pas la possibilité de caractériser le sous-type histologique du lymphome, puisqu'elle rencontrée dans les maladies de Waldenström et les autres lymphomes lymphoplasmocytaires, les MGUS et les DLBCL extra-cérébraux.^{1,89,101,104} De ce fait, la présence de ce marqueur moléculaire ne permet pas non plus de distinguer une origine primitive d'une origine secondaire, mais traduit néanmoins un processus lymphomateux de manière formelle. En cas d'absence de preuve de LNH systémique, ce marqueur signe une origine primitive du lymphome au niveau du SNC, à condition que le LCR ne soit pas hémorragique (auquel cas, une confirmation est nécessaire sur un autre prélèvement).

2) Taux de positivité de la mutation *MYD88* L265P

La mutation hotspot de *MYD88* n'est pas retrouvée chez l'ensemble des PCNSL de la cohorte étudiée. En tenant compte des patients révélant la mutation sur culot cellulaire du LCR (n=10), sur surnageant du LCR (n=15) et sur cellules tumorales biopsiées (n=3), le taux de positivité global de la mutation dans la cohorte est de 76,2% (16/21). Ainsi, un bilan moléculaire négatif ne permettrait pas d'exclure une étiologie lymphomateuse.

Premièrement, la littérature rapporte la détection de la mutation chez 28 à 94% des PCNSL selon les études, dont une majorité la retrouvent chez plus de 60% des individus.^{8,13,24,103} Cela signifie que tous les PCNSL n'arborent pas nécessairement cette mutation, bien qu'il s'agisse d'une des plus fréquemment rencontrées dans cette population.

Deuxièmement, cette analyse est soumise aux mêmes facteurs limitants que ceux précédemment évoqués pour la caractérisation d'un EM. Le délai d'acheminement, le volume et la répartition des échantillons constituent des sources d'erreur pré-analytiques, notamment en raison de la charge tumorale potentiellement faible, de la fragilité cellulaire pour la recherche sur le culot, et de la dégradation rapide de l'ADN circulant pour la recherche sur le surnageant. La variabilité de l'excrétion tumorale et du relargage d'éléments lymphomateux dans le LCR peut également aboutir à des résultats faussement

négatifs. De plus, la technique de ddPCR requiert une quantité suffisante de matériel génétique, raison pour laquelle l'étude moléculaire peut souvent être mise en défaut. Ces éléments, ainsi que les résultats des patients #10, #17, #18 et #21 justifient donc la répétition des PL pour les analyses moléculaires.

3) Interprétation du couple *MYD88* cellulaire / *MYD88* circulant

En théorie, l'analyse de l'ADN du culot cellulaire ne permet, par définition, de ne détecter la mutation que si des cellules lymphomateuses ont envahi les leptoméninges, et donc le LCR. La détection de la mutation sur ADN circulant du surnageant peut témoigner d'un relargage cellulaire d'ADN directement dans le LCR (envahissement leptoméningé), mais également au niveau cérébral avec diffusion de l'ADN libre dans le LCR, sans nécessairement d'atteinte méningée. Ainsi, en cas de présence de la mutation dans le culot cellulaire, celle-ci doit logiquement être retrouvée également dans le surnageant. C'est d'ailleurs ce qui est observé dans cette cohorte, puisque l'intégralité des patients positifs sur le culot sont effectivement positifs dans le surnageant. Ce raisonnement s'applique à condition que la quantité de matériel génétique soit suffisante. En effet, l'étude de l'ADN cellulaire impliquant une lyse de l'ensemble des cellules localisées dans le prélèvement (cellules lymphomateuses et cellules saines) au moment de l'examen, le matériel génétique extrait correspond souvent à de plus grandes quantités que pour l'ADN circulant déjà présent sous forme libre dans l'échantillon, et dont la dégradation demeure rapide (demi-vie : 114 minutes).¹¹³ De plus, en l'absence d'EM, la mutation ne peut donc logiquement pas être retrouvée dans le culot, mais potentiellement dans le surnageant. C'est probablement une des raisons pour laquelle la mutation est ici plus souvent détectée sur l'ADNcf (71,4%, n=15/21) que sur l'ADNc (47,6%, n=10/21). Les meilleures performances de l'ADNcf par rapport à l'ADNc pour la recherche de cette mutation ont d'ailleurs déjà été rapportées dans la littérature.^{134,135}

a) *MYD88* sur culot cellulaire et envahissement leptoméningé

Curieusement, *MYD88* est retrouvé muté sur la fraction cellulaire de certains LCR n'ayant pas démontré d'EM. Le cas #8 présente à deux reprises la mutation sur culot (et sur surnageant), alors qu'aucune cellule lymphomateuse n'est détectée ni en CC ni en CMF. La mutation est aussi retrouvée sur le culot du 1^{er} LCR du cas #14 alors que la CC et la CMF sont négatives. Un 2^{ème} LCR viendra mettre en évidence la mutation cette fois-ci accompagnée d'un EM. Pour le patient #10 sans preuve formelle d'EM, la mutation est également détectée sur le culot, mais des cellules douteuses semblent être retrouvées par CC et par CMF, bien que la clonalité n'ait pas pu être confirmée par absence de chaînes légères de surface.

A l'inverse, certains patients n'affichent pas la mutation sur l'ADNc mais uniquement sur l'ADNcf, alors qu'un EM a été prouvé, comme les cas #5 et #9. Pour le patient #5, la technique de ddPCR effectuée sur culot cellulaire n'a malheureusement permis d'analyser aucune séquence génétique (ni WT ni

mutée). Ainsi, ce résultat probablement faussement négatif résulterait plutôt d'un problème analytique qui aurait mérité de répéter l'analyse si le volume restant avait été suffisant. Pour le patient #9 (2^{ème} LCR), une quantité relativement satisfaisante de matériel génétique a été analysée, mais peut-être insuffisante au regard de la faible fréquence allélique du variant *MYD88* calculée sur l'ADNcf (3,1%).

b) Statut *MYD88* sur LCR et sur biopsie cérébrale

Concernant le cas #11, la mutation est retrouvée sur la biopsie cérébrale, sur l'ADNcf et non sur le culot, alors que la CC est rendue positive, et que la CMF, bien que rendue négative, révèle une population lymphocytaire anormale mais dont la clonalité n'a pu être affirmée par absence d'expression membranaire de chaînes légères. La quantité de matériel génétique extrait du culot cellulaire pourrait potentiellement expliquer ce résultat.

Le bilan du patient #7 a été rendu entièrement négatif à deux reprises, à l'exception de l'IL-10 qui restait alors le seul argument biologique en faveur d'un lymphome. L'absence d'EM chez ce patient pourrait expliquer les résultats négatifs pour la CC, la CMF et la biologie moléculaire sur culot. En revanche, la mutation L265P confirmée sur la biopsie cérébrale n'est retrouvée dans le surnageant d'aucun des deux LCR, alors que les conditions pré-analytiques et la quantité de matériel génétique analysée sont optimales. Il se pourrait que la tumeur n'ait eu aucune interface avec un réservoir anatomique de LCR en raison d'une localisation trop profonde, d'où l'absence d'ADNct dans le LCR, analogiquement à ce qui a déjà pu être conclu pour des tumeurs du SNC non hématopoïétiques.¹³³

Pour le patient #10, les résultats moléculaires sur LCR (culot et surnageant) sont en accord avec les résultats de la biopsie sur une seule des deux PL pratiquées. Etant donné la faible VAF calculée (5%) et la quantité de matériel génétique supérieure pour la 2^{ème} PL, c'est très probablement une charge en ADN insuffisante pour le 1^{er} LCR qui explique cette discordance.

c) Intérêt de *MYD88* sur l'ADN circulant

Les résultats des cas #18 et #21 sont particulièrement intéressants à exploiter. Ces patients ne présentent pas d'EM : aucune cellule lymphomateuse n'a été suspectée ni par CC ni par CMF. L'analyse moléculaire de la fraction cellulaire est sans anomalie, tandis que l'ADNcf révèle la mutation *MYD88* L265P. Le résultat de l'IL-10, le second marqueur soluble, accompagne le bilan moléculaire en faveur d'une pathologie lymphomateuse. Cette hypothèse a ensuite été confirmée par l'examen anatomopathologique de la biopsie cérébrale et par l'examen biologique de la vitrectomie respectivement pour les patients #18 et #21. Il est à noter que l'analyse du surnageant du 2^{ème} LCR du patient #18 n'a étrangement pas révélé la mutation, alors que la quantité de matériel génétique était identique au 1^{er} LCR, prélevé à 24h d'intervalle.

Ainsi, l'intégration de l'étude de *MYD88* sur culot et surnageant au bilan diagnostique offre des éléments d'interprétation supplémentaires : le cas #18 présente une tumeur lymphomateuse du SNC (biopsie à

l'appui), localisée exclusivement au niveau cérébral (pas d'EM : CC, CMF et *MYD88* négatifs sur culot cellulaire), et en contact avec une région contenant du LCR, à l'origine de la diffusion d'ADN tumoral sous forme libre et à travers le LCR (*MYD88* muté sur ADNcf). Le cas #21 présente un lymphome du SNC exclusivement localisé au niveau oculaire (vitrectomie à l'appui, pas d'EM), à l'origine d'une sécrétion d'ADNct dans le LCR (*MYD88* muté sur ADNcf). Une atteinte cérébrale additionnelle pourrait également expliquer que la mutation soit détectée dans le LCR chez ce patient, mais aucun argument n'a été retenu pour une telle localisation. Ces deux cas de figure illustrent non seulement la supériorité de l'ADNcf sur l'ADNc dans le diagnostic moléculaire des PCNSL, mais également la plus-value de la recherche de *MYD88* sur le surnageant du LCR. Ce biomarqueur moléculaire circulant peut constituer (avec l'IL-10) un premier argument évocateur d'une pathologie lymphomateuse, et ce même en l'absence d'envahissement cellulaire leptoméningé, aussi bien pour des localisations cérébrales qu'oculaires étant donné la proximité anatomique entre le LCR et les yeux. Conformément aux résultats d'autres travaux, cette analyse biologique offrirait donc un gain en matière de sensibilité diagnostique d'un LOC.^{138,139}

Parmi les 8 patients pour lesquels un EM n'a pu être entièrement prouvé et dont le diagnostic a nécessité une biopsie cérébrale (n=7) ou vitrectomie (n=1), la mutation L265P du gène *MYD88* a été détectée dans le LCR de 5 individus (2 sur culot et surnageant, 3 sur surnageant uniquement), soit 62,5% des cas (5/8). D'une part, la recherche de cette mutation sur l'ADNcf apparaît plus performante que sur l'ADNc. D'autre part, les résultats de cette étude ont démontré que ce biomarqueur moléculaire était spécifique à 100% d'un processus néoplasique lymphomateux. Bien qu'un examen histologique demeure actuellement le gold standard diagnostique lorsqu'aucun EM n'est prouvé ni en CC ni en CMF, la preuve du gène *MYD88* muté au niveau méningé sur l'ADNcf pourrait devenir une alternative lorsque la biopsie présente un risque de lésions cérébrales trop important. D'autant plus que certains patients ne développeront probablement jamais de forme méningée, et n'auront donc pas l'opportunité d'échapper à une biopsie, dont la praticabilité reste à discuter au cas par cas en raison des complications éventuelles.^{8,16}

La mutation L265P de *MYD88* sur ADNcf représenterait alors un réel biomarqueur de confirmation d'une pathologie lymphomateuse. Celui-ci ne pourrait cependant pas être utilisé en tant que marqueur d'exclusion, puisque la mutation ne concerne pas l'intégralité des lymphomes du SNC. Elle n'est parfois pas détectée dans le LCR alors qu'elle est identifiée sur les cellules tumorales (sensibilité du test = 78,3%, n=18/23), probablement pour des motifs pré-analytiques ou d'excrétion tumorale. La répétition des PL a toutefois contribué à sa détection chez 92,9% (13/14) des PCNSL avec une preuve cellulaire de la mutation (sur LCR, biopsie ou liquide vitré). Cette donnée se rapproche des résultats d'autres

études qui ont pu mettre en évidence la mutation sur l'ADNcf chez 67 à 100% des PCNSL mutés sur les cellules tumorales.¹³⁴⁻¹³⁷

Finalement, pour cette cohorte de PCNSL, la réitération des PL aura permis d'éviter un geste invasif à 61,9% des patients (13/21) si l'on considère que le patient #2 n'avait pas besoin de subir une biopsie cérébrale. La prise en considération du gène *MYD88* sur ADN circulant aurait permis de s'affranchir d'un prélèvement à haut risque chez 5 patients supplémentaires : au total, le diagnostic biologique aurait été posé chez 85,7% des patients (18/21).

D) PCNSL et SCNSL

La découverte d'une tumeur lymphomateuse au niveau du SNC doit impérativement motiver une exploration périphérique approfondie à la recherche d'un lymphome systémique, nodulaire ou extra-nodulaire. Il s'agit entre autres de la recherche de signes cliniques généraux (adénopathies, altération de l'état général, fièvre, sueurs), d'anomalies hypermétaboliques au PET-Scan, ou directement d'une population lymphomateuse par des examens anatomopathologiques (prélèvements tissulaires) ou biologiques (prélèvements sanguins et médullaires, autres fluides corporels). Il est en effet primordial de déterminer l'origine primitive ou secondaire du lymphome, d'autant plus que le SNC semble constituer un environnement de choix pour les rechutes de lymphomes périphériques. Cette localisation concernerait globalement 2 à 27% des LNH périphériques,¹⁷ favorisée en cas de lymphomes agressifs et en l'absence de prophylaxie neuro-méningée.^{12,18-20} Le pronostic plus sombre des SCNSL, ainsi que la nécessité d'une chimiothérapie systémique justifient également de distinguer les origines primitives et secondaires.¹²

Les cas #1 et #4 possèdent des résultats très intéressants à exploiter. Le cas #1 a présenté dans son LCR deux populations lymphomateuses positives pour le CD19 et le CD45, mais de profils phénotypiques très différents : une population monoclonale lambda de grande taille, n'exprimant pas le CD5 et co-exprimant le CD10, le CD44 et le Ki-67, ainsi qu'une population monoclonale kappa de petite taille, ne co-exprimant aucun de ces quatre marqueurs. Le clone kappa est également retrouvé en périphérie dans le sang et la moelle osseuse lors du bilan d'extension. Les mêmes réarrangements clonaux sont visibles à l'étude du locus IgH sur le sang, la moelle osseuse et le LCR, de même que la mutation *MYD88* L265P. Le clone lambda de grande taille semble donc exclusif au SNC. Aucun argument ni radiologique ni clinique n'était en faveur d'un lymphome systémique. Au regard de ces éléments et de la présence de manifestations neurologiques, le diagnostic de PCNSL a finalement été retenu, et un protocole thérapeutique dédié a été engagé pour traiter exclusivement l'atteinte du SNC, et non une éventuelle atteinte systémique.

Le cas #4 a présenté un clone kappa sanguin ainsi qu'un clone kappa méningé, mais pour lesquels l'expression du CD10 différait. A noter que le LCR ne présentait pas de contamination sanguine. La

mutation *MYD88* L265P était détectée dans les deux compartiments, mais l'étude de la clonalité s'est révélé positive dans le sang et négative dans le LCR, suggérant un profil moléculaire au moins en partie différent entre ces deux clones, sous réserve d'un défaut de matériel cellulaire pour l'analyse du LCR. Aucun argument clinique ou radiologique n'était en faveur d'une maladie lymphomateuse systémique.

Ces deux cas illustrent la difficulté à discriminer une origine centrale primitive d'une origine secondaire. Il serait d'ailleurs légitime de considérer qu'il s'agisse plutôt de SCNSL que de PCNSL dans le cas présent, consécutifs à un lymphome périphérique vraisemblablement indolent mais existant, puisque la preuve biologique d'un clone périphérique est apportée. Néanmoins, il apparaîtrait plus approprié d'évoquer la présence de clones pré-lymphomateux périphériques (se référer à la partie dédiée plus loin), plutôt que d'une véritable composante lymphomateuse périphérique, qui dans le cas présent serait même silencieuse d'un point de vue clinique.

De plus, il a déjà été montré dans la littérature que certains patients pouvaient développer successivement des lymphomes issus de clones bien distincts et indépendants, sans forcément qu'il s'agisse d'une transformation maligne du clone initial. C'est notamment sur la base d'un profil moléculaire similaire comportant au moins un certain nombre de réarrangements VDJ clonaux identiques qu'un lien clonal entre deux populations lymphomateuses peut être confirmé. Ainsi, l'étude des remaniements au sein du locus IgH a permis entre autres à Pachmann *et al.* de conclure à l'absence de lien entre un lymphome initial de type MALT et un lymphoplasmocytome survenu cinq ans plus tard chez un patient de 59 ans, alors que ses antécédents laissaient plutôt penser qu'il s'agissait d'une rechute lymphomateuse au premier abord.¹⁴⁰ De la même façon, il a été prouvé que les syndromes de Richter (SR), traduits par la transformation d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC) en lymphome agressif à grandes cellules, n'étaient pas tous apparentés avec le clone de LLC initial d'un point de vue clonal. Une distinction pourrait donc être faite entre les SR clonalement liés à la LLC, et ceux non apparentés, dont les caractéristiques diagnostiques et pronostiques se rapprocheraient plus d'un cas classique de DLBCL survenu *de novo*.^{141,142} La co-existence successive ou même simultanée de deux néoplasies lymphoïdes indépendantes semble donc bel et bien possible.

A l'inverse, il est également possible d'observer chez un même individu deux clones lymphomateux en apparence différents, sur la base des résultats cytologiques et immunophénotypiques, dont les remaniements moléculaires au sein de la séquence VDJ témoignent pourtant d'une origine clonale commune. Ainsi, Kobayashi *et al.* ont mis en évidence un lien clonal entre une maladie de Waldenström (MW) connue depuis plusieurs années, et un DLBCL systémique hépatique survenu plus tard, alors que les clones MW et DLBCL présentaient respectivement une monotypie kappa et une monotypie lambda.¹⁴³ De la même façon, des cas de SR dont la restriction isotypique présentée par le clone était

différente de celle du clone de LLC initial ont également été relevés.^{144,145} Des hypothèses ont alors été avancées quant à la chronologie des différents événements oncogéniques pour expliquer ces cas atypiques, et ont été investiguées par Fabbri *et al.* en particulier pour les SR.¹⁴⁶

Dans une série de 15 patients présentant un SR, le clone de LLC ainsi que le ou les clones SR ont été caractérisés pour chaque patient sur le plan moléculaire. A partir des données cytogénétiques, de l'étude des réarrangements VDJ, et de l'identification de mutations oncogéniques au sein de divers gènes d'intérêt, les auteurs ont pu établir pour chaque patient la chronologie ainsi que l'évolution clonale hypothétique du SR (figure 25). Alors qu'une transformation maligne « linéaire » entre la LLC et le SR est survenue chez 80% des patients (12/15), les 20% restants (3/15) ont plutôt affiché des évolutions clonales « ramifiées » entre les deux entités. Chez ces cas minoritaires, le clone SR proviendrait de la transformation non pas du clone LLC directement, mais plutôt d'une souche ancestrale commune à ces deux clones. Ce précurseur correspondrait alors au stade lymphocytaire au cours duquel serait survenu le premier événement oncogénique. Si l'on considère que ce stade se situe chronologiquement entre la première étape physiologique des réarrangements géniques de la chaîne lourde, et la seconde responsable des réarrangements de la chaîne légère, il semble donc théoriquement possible qu'une même souche oncogène puisse aboutir à des clones de restriction isotypique kappa et lambda.^{144,145}

Ainsi, concernant les cas #1 et #4 de notre série, l'origine primitive a notamment été retenue en raison de l'absence d'argument pour un lymphome périphérique. En termes d'évolution clonale, un mode de transformation « ramifié » pourrait éventuellement expliquer la biclonalité observée pour le cas #1.

E) Statut *MYD88* plasmatique et clones pré-lymphomateux sanguins

En raison de leur taille réduite, les fragments d'ADNcf possèdent une grande capacité de diffusion à travers les structures tissulaires et potentiellement les barrières anatomiques. C'est pourquoi la biopsie liquide offre l'opportunité d'identifier des processus néoplasiques sans pour autant que des échantillons tumoraux tissulaires ou cellulaires ne soient disponibles. Les tumeurs du SNC peuvent ainsi se traduire par la présence de quantités importantes d'ADNcf dans le LCR, dont fait partie l'ADN circulant tumoral. Bien qu'une fraction des tumeurs du SNC non hématopoïétiques puissent présenter de l'ADNct dans le plasma,^{128,131} la biopsie liquide dans le LCR s'est révélé plus performante que dans le sang.^{80,127,133} Des conclusions similaires ont été tirées dans le cadre des PCNSL *MYD88* mutés, pour lesquels la VAF obtenue dans le surnageant du LCR est majorée par rapport au plasma,^{134,136} les PCNSL étant donc considérés par certaines études comme étant pourvoyeurs d'ADNct dans la circulation périphérique.^{24,132,138} A l'inverse, les patients souffrant d'un lymphome systémique et sans atteinte du SNC ne semblent pas présenter d'ADNct dans le LCR, témoignant donc du caractère protecteur de la BHE qui limite significativement l'effraction du SNC.¹³⁸

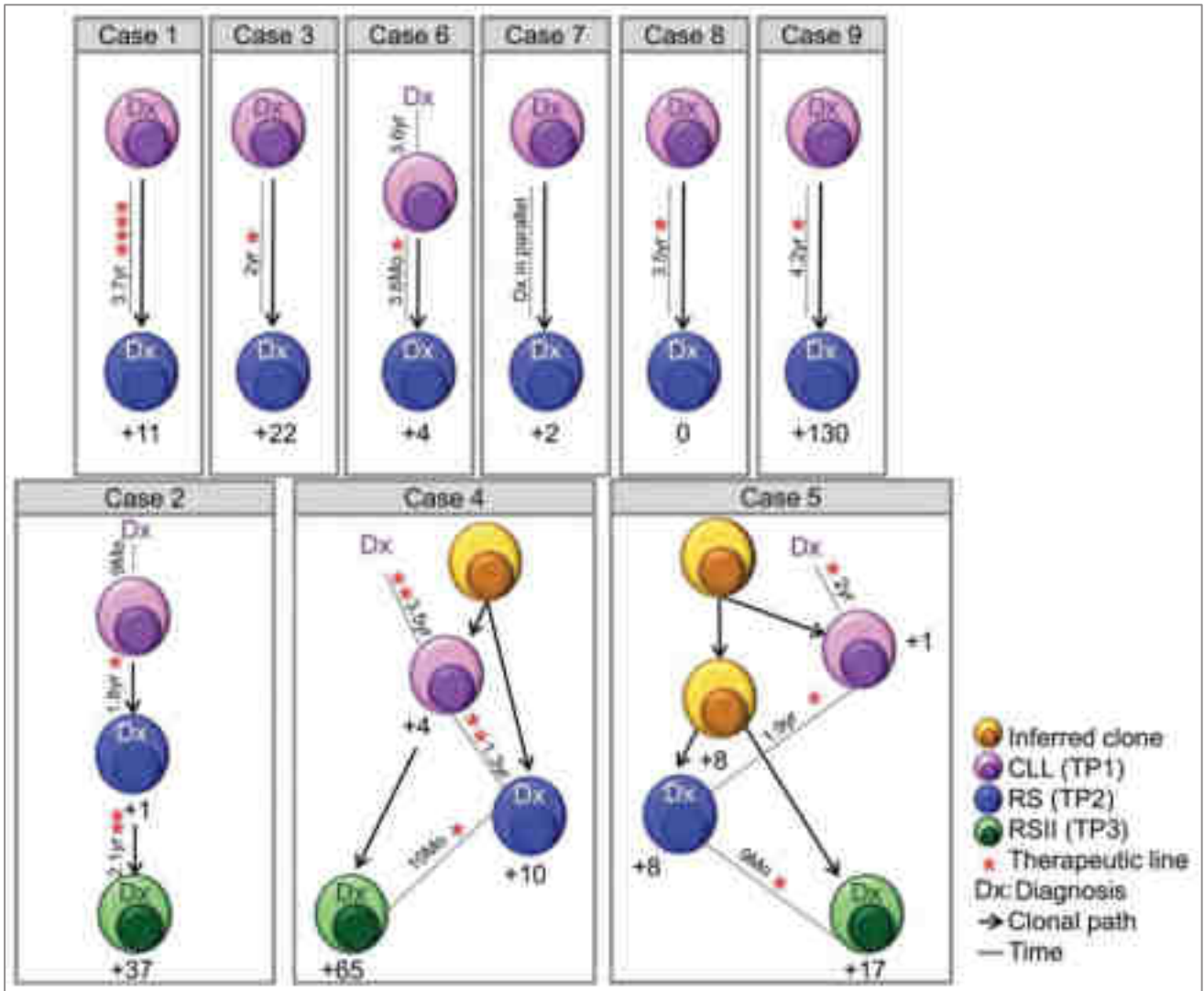


Figure 25. Modèles d'évolution clonale individuelle pour 9 patients de la littérature.¹⁴⁶

Les précurseurs lymphoïdes oncogènes hypothétiques sont matérialisés en orange, les clones RSII désignent un second clone RS en phase leucémique. Les clones RS issus d'une transformation linéaire (cas 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9) présentent la quasi-totalité des anomalies génétiques du clone LLC, auxquelles s'ajoutent des mutations acquises additionnelles lors du processus (nombre indiqué sous le clone RS). Les clones RS issus d'une transformation d'un précurseur commun (cas 4 et 5) partagent une partie des anomalies du clone LLC. Cependant, leurs voies de transformation distinctes sont à l'origine de mutations acquises propres à chacune des deux entités.

CLL : chronic lymphocytic leukemia ; *TP* : time-point ; *RS* : Richter syndrome ; *yr* : year ; *Mo* : month.

L'altération de cette barrière, favorisée par le potentiel infiltratif et agressif des lymphomes du SNC, serait donc plus susceptible d'engendrer une libération d'ADNct ou de cellules lymphomateuses dans le sang, plutôt qu'un simple phénomène de diffusion de fragments d'ADNct à travers une BHE intègre.

Ces observations restent soumises à controverse, puisque d'autres résultats avancent qu'il semble peu probable que la mutation *MYD88* rencontrée dans le sang soit issue d'un clone cérébral. En réunissant les profils moléculaires obtenus directement sur la tumeur en parallèle de ceux obtenus dans le sang périphérique correspondant, Fukumura *et al.* ont en effet constaté qu'une partie des PCNSL *MYD88*

mutés affichaient également la mutation dans le sang. Or, des mutations impliquées sur des gènes différents, détectées sur les biopsies tumorales chez ces mêmes patients, n'ont pas été retrouvées dans le sang, alors que les charges mutationnelles étaient systématiquement plus élevées que pour *MYD88*. La détection isolée de *MYD88* L265P en périphérie ne semble donc être justifiée ni par la simple dissémination de clones cérébraux vers la périphérie, ni par la diffusion d'ADNct.¹³

Dans la cohorte étudiée ici, une observation semblable est faite pour les cas #7, #10, #14 et #15, chez lesquels la mutation *MYD88* L265P est identifiée sur l'ADNcf du sang. L'absence totale d'arguments cliniques (absence d'adénopathies ou d'altération de l'état général), radiologiques (absence d'hypermétabolisme), cytologiques (aucune cellule sanguine suspecte) et cytométriques (absence de population lymphomateuse sanguine) compatibles avec un lymphome périphérique écarte l'hypothèse que la mutation sanguine puisse être liée à un lymphome systémique. Ces patients affichent également la mutation sur l'ADNct du LCR, à l'exception du cas #7 chez qui le statut *MYD88* muté a été prouvé uniquement sur la biopsie cérébrale. Pour ce patient, il serait donc étonnant que l'ADNct ait circulé jusque dans le sang, alors que son absence dans le surnageant du LCR (vraisemblablement non imputable à des facteurs pré-analytiques) laissait penser que la tumeur était trop dissimulée dans les structures nerveuses pour que l'ADN circulant puisse diffuser jusque dans le LCR.

Sous réserve qu'un lymphome périphérique indolent n'ait pas été méconnu, une autre hypothèse pourrait expliquer que la mutation *MYD88* soit détectée dans le SNC et dans le sang de certains PCNSL. Le développement physiopathologique de ces lymphomes implique le plus probablement une première étape oncogénique au sein de la moelle osseuse ou des organes lymphoïdes secondaires, et une deuxième étape à l'intérieur du SNC (figure 3). Au cours de sa maturation, le futur clone lymphomateux est indéniablement sujet à des remaniements moléculaires aberrants, promoteurs de sa différenciation maligne. C'est pourquoi la notion de clones pré-lymphomateux, potentiellement identifiables en périphérie, est apparue dans la littérature.^{13,33,41,43} A partir de ce raisonnement-là, il est possible de considérer que la mutation L265P du gène *MYD88* pourrait représenter un des événements pro-tumorigènes initiaux au moment du développement médullaire ou ganglionnaire,³⁷ et de ce fait être détectée dans l'ADNct du plasma (issu du clone pré-lymphomateux périphérique) et l'ADNct du LCR (issu du clone lymphomateux du SNC). Le clone pré-lymphomateux, dont la survie centrale pourrait être favorisée par la mutation de *MYD88*, amorcerait alors sa transformation maligne finale au sein du SNC par acquisition d'altérations génomiques additionnelles.¹³ Cette théorie pourrait s'appliquer aux trois patients concernés et expliquer le cas de figure du patient n°7, chez qui le clone pré-lymphomateux aurait pu se confiner dans le SNC pour y donner un PCNSL *MYD88* muté à distance des réservoirs de LCR, d'où l'absence de la mutation dans le LCR. Outre la simple détection d'ADNct dans le sang, les clones

périphériques mis en évidence pour les cas #1 et #4 précédemment évoqués pourraient également correspondre à des clones pré-lymphomateux silencieux d'un point de vue clinique.

Afin de valider cette hypothèse, le lien de parenté entre un clone cérébral et un clone périphérique peut être analysé en comparant les réarrangements moléculaires au sein de leur séquence *VDJ* respective (locus IgH) par PCR ou par séquençage. Divers articles ont déjà démontré la présence de clones périphériques (sanguins et médullaires) identiques à celui de la tumeur lymphomateuse pour certains cas de PCNSL.^{43,147} La question d'une dissémination systémique depuis le SNC se pose alors, d'autant plus que des rechutes périphériques de PCNSL à un stade évolutif tardif ont déjà été observées dans la littérature pour 5 à 10% des cas.^{43,137,147} En pratique, il reste néanmoins complexe de déterminer la chronologie des événements, et de définir lequel du clone périphérique ou central a été le premier à se développer pour progressivement émigrer de sa localisation originelle. En cas de profils moléculaires différents, les deux clones pourraient aussi être issus de deux voies de différenciation distinctes mais malgré tout originaires d'une souche lymphocytaire oncogénique commune, plutôt que d'une transformation directe de l'un vers l'autre. La pertinence des rechutes systémiques observées chez les PCNSL peut donc être remise en cause. La coexistence de remaniements génétiques ou de clones lymphomateux identiques dans le SNC et dans les fluides périphériques témoignerait plutôt d'une composante lymphomateuse systémique occulte déjà présente lors du diagnostic de PCNSL, mais non détectable par les techniques traditionnelles de CC et de CMF.¹⁴⁷ Dans ce cas de figure précis, il devient problématique de savoir si le clone pré-lymphomateux sanguin, suspecté sur la mise en évidence d'ADNct ou bien de clones cellulaires monotypiques, doit faire évoquer un véritable lymphome périphérique, ou encore s'il aboutira nécessairement à une maladie systémique. Même si cela n'est pas observé chez l'ensemble des PCNSL, il se pourrait que l'intégralité des patients possèdent en fait des clones pré-lymphomateux périphériques et indolents, mais qui ne seraient pas toujours détectables faute de sensibilité analytique.

F) Problématique de la contamination sanguine du LCR

Bien que les compartiments cérébro-spinaux et sanguins soient anatomiquement distincts et séparés par la BHE, leur proximité peut malgré tout être à l'origine d'un passage anormal de sang dans le LCR. Il n'est donc pas rare de recueillir du LCR contaminé par du sang, se traduisant souvent par un aspect macroscopique caractéristique rosé voire rouge, et non pas limpide comme de « l'eau de roche ». Ce sang peut provenir soit de processus pathologiques ayant eu lieu au niveau du SNC avant le prélèvement et aboutissant à une hémorragie méningée, soit d'une PL traumatique. Lors de l'examen cytologique du LCR, une prédominance majeure d'hématies par rapport aux leucocytes témoigne d'une contamination sanguine, puisque le LCR est naturellement stérile, dépourvu d'hématies et ne contient que de très rares leucocytes (< 5 cellules/ μ L).

S'il est fondamental d'évaluer systématiquement le degré de contamination du LCR, c'est parce que ce phénomène peut être source d'une mauvaise interprétation biologique. D'une part, l'invasion par des cellules sanguines peut potentiellement masquer des éléments cellulaires malins minoritaires qui auraient pu se développer au niveau méningé. Dans le cas d'un lymphome du SNC, des cellules lymphomateuses présentes en faible quantité dans le LCR risqueraient d'être méconnues par l'ensemble des techniques biologiques employées, en raison de la pollution du milieu réactionnel par les différents composants sanguins. D'autre part, cela peut conduire à tort à la conclusion d'un LCR infiltré par des cellules malignes qui proviendraient en fait de la circulation périphérique, situation à laquelle nous avons déjà été confrontés en pratique. A titre d'illustration, un patient connu pour une LLC active avait bénéficié d'un LCR pour exploration d'une masse cérébrale non documentée. Le prélèvement s'est révélé être hémorragique et a montré une population clonale lymphocytaire B, dont le profil phénotypique était identique à celle du sang. Le diagnostic anatomopathologique de la tumeur a finalement conclu à un glioblastome. La présence de lymphocytes malins dans le LCR était donc bien liée à la contamination sanguine et non à une infiltration lymphomateuse neuroméningée. Il est donc recommandé de répéter les PL dans la mesure du possible afin d'obtenir le LCR le plus pur possible, ce qui reste parfois peu contributif notamment si la contamination provient d'un contexte pathologique et non d'un prélèvement traumatique ponctuel.

En cas de cellules lymphomateuses détectées sur un LCR hématique ou hémorragique, le diagnostic de lymphome du SNC ne pourra ainsi être posé qu'en l'absence formelle d'évidence de maladie systémique. Par définition, le caractère primitif du lymphome est alors prouvé, comme c'est le cas pour le patient #2. Si en revanche un lymphome périphérique est connu ou découvert fortuitement à cette occasion, il est impossible de conclure définitivement quant à l'origine des lymphocytes malins retrouvés dans le LCR, d'autant plus si leurs profils cytologiques et phénotypiques sont identiques. Il peut alors aussi bien s'agir de clones périphériques que d'une véritable infiltration méningée, que la contamination n'aurait pas masqué en totalité. En cas de profils différents, il pourrait très bien s'agir d'une transformation du lymphome initial, mais dont la localisation centrale serait également délicate à affirmer sans exploration approfondie. Malgré tout, l'impact de la contamination sanguine du LCR n'est pas toujours le même et dépend très certainement du degré de contamination et de la charge tumorale. Le cas #15 a bénéficié de deux LCR dont l'un a été sujet à une contamination sanguine. Pourtant, l'intégralité des paramètres biologiques étaient positifs sur les deux échantillons. Pour le cas #20 ayant subi trois PL, le second LCR s'est avéré hémorragique. Bien que la CMF n'ait pas été contributive sur cet échantillon, elle ne l'a pas été non plus sur le 1^{er} LCR qui était satisfaisant, et la CC a été concluante sur les 3 prélèvements.

Ces éléments exposent donc la difficulté d'interprétation des LCR hémorragiques. Il apparaît nécessaire de développer des outils afin de réduire l'impact de ce phénomène sur l'interprétation du bilan

biologique méningé et la confirmation ou non d'une infiltration méningée. Un travail mené par l'équipe du laboratoire d'Hématologie de Mulhouse a été présenté sous forme de poster au 40^{ème} congrès de la Société Française d'Hématologie et propose une solution destinée non pas à réduire le niveau de contamination sanguine dans le prélèvement, mais plutôt à pallier cet obstacle grâce à une méthode d'interprétation plus exacte.¹⁴⁸ Lors de l'analyse immunophénotypique du LCR, un anticorps marqué et dirigé contre la glycophorine A (CD235a), un constituant membranaire des hématies, est ajouté afin de pouvoir dénombrer précisément le nombre total d'hématies contaminantes présentes dans le prélèvement. Cette valeur, rapportée au ratio leucocytes/hématies du sang (une numération sanguine est donc nécessaire), permet de déduire le nombre théorique maximal de leucocytes contaminants périphériques, qui est ensuite comparé au nombre d'évènements lymphomateux. Si la quantité de cellules tumorales excède la quantité théorique maximale de leucocytes contaminants, cela signifie que les cellules tumorales excédentaires ne peuvent pas provenir du sang. L'infiltration méningée peut donc être confirmée, même en présence de cellules lymphomateuses dans la circulation périphérique. Si en revanche le nombre de cellules tumorales dans le LCR est plus faible que le nombre théorique de leucocytes contaminants, l'origine méningée ne peut être affirmée. Cette méthode a l'avantage de s'intégrer directement dans l'examen de CMF qui sera pratiqué dans tous les cas, et de ne pas entraîner de surcoût majeur à l'exception de l'ajout d'un anticorps supplémentaire.

G) Perspectives

Si l'intérêt diagnostique de la mutation *MYD88* L265P dans le surnageant du LCR a bien été validée dans cette étude, sa place dans le monitoring des PCNSL et dans la détection des rechutes, ainsi que les données quantitatives de concentrations en ADN circulant total ou tumoral, ou de fréquence allélique n'ont pas été analysées. Des résultats encourageants ont cependant déjà été publiés à ce propos, et indiquent que la sensibilité de la ddPCR offre une évaluation plus exacte et fiable de la maladie résiduelle, en comparaison aux techniques cytologiques, cytométriques et neuroradiologiques. De plus, cette nouvelle méthode permettrait de dépister des rechutes au niveau du SNC bien plus précocement en suivant l'évolution des concentrations d'ADNcf ou d'ADNct, en ciblant par exemple *MYD88*.^{136,138}

Néanmoins, ce nouveau biomarqueur soluble n'est pas infallible, notamment au niveau de sa sensibilité. D'un point de vue purement analytique, la technique de PCR digitale requiert une quantité suffisante de matériel génétique pour espérer obtenir des résultats exploitables, fortement dépendante des conditions pré-analytiques et de l'activité de la tumeur. D'un point de vue hématologique, il existe malheureusement des PCNSL qui ne sont pas concernés par la mutation *MYD88* L265P. De plus, par un phénomène de pression de sélection tumorale, il reste théoriquement possible d'observer une perte du statut mutationnel pour *MYD88* entre le lymphome initial et les éventuelles récidives. L'interprétation

de cette analyse demande donc une certaine prudence, puisqu'un résultat négatif ne permet en aucun cas d'exclure une origine lymphomateuse au moment du diagnostic ou d'une suspicion de rechute.

D'une part, il a été constaté que la mutation hotspot L265P concernerait près de 95% des mutations du gène *MYD88*, la fraction restante correspondant à des anomalies nucléotidiques diverses et survenant à des positions variées.^{8,42,136} Il subsiste ainsi de rares cas de PCNSL mutés pour *MYD88* mais non détectables avec la technique de ddPCR traditionnelle qui ne cible que la position hotspot de ce gène. D'autre part, des mutations de prévalences variées et impliquant d'autres gènes ont également été identifiés dans les profils moléculaires des PCNSL, dont la mutation hotspot *CD79B* Y196 qui représente globalement la deuxième anomalie la plus fréquemment rencontrée.^{8,13,42} En raison de leur prévalence globale dans la population et d'une position mutationnelle quasi exclusive, les gènes *MYD88* et *CD79B* constituent de réels candidats à la biopsie liquide conventionnelle, qui ne permet de cibler qu'une courte séquence génétique et sur une quantité d'ADN trop restreinte pour pouvoir rechercher d'autres mutations sur le même gène au cours d'une même analyse. Une étude moléculaire plus exhaustive incluant les autres gènes potentiellement incriminés, ainsi qu'un séquençage complet de chacun des gènes (en particulier *MYD88* et *CD79B*) peut parfois être nécessaire et pourrait compléter le bilan onco-hématologique. Néanmoins, cela implique le recours à des méthodes de séquençage génétique dont le bénéfice médical reste discutable étant donné le faible nombre de patients concernés et l'existence des techniques diagnostiques de routine (radiologiques, anatomopathologique et biologiques). Il pourrait ainsi être envisagé en première intention d'employer la PCR digitale pour rechercher la présence d'ADNct en ciblant la mutations hotspot du gène *MYD88* (plus ou moins du gène *CD79B* avec une deuxième technique), et de recourir à un séquençage plus approfondi dans un second temps si la biopsie liquide classique s'avérait non concluante.

Enfin, d'autres paramètres biologiques inédits peuvent venir compléter l'exploration du LCR, mais dont l'utilisation en pratique courante demande toutefois d'être validée à travers des investigations supplémentaires. Les micro-ARN, dont le niveau d'expression peut traduire des processus néoplasiques, ont été évalués. Il s'agit de brins d'ARN présentant une courte séquence nucléotidique, ne codant aucune protéine et ayant un rôle fondamental dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.⁸⁹ Grâce à leur activité de répresseurs transcriptionnels, les micro-ARN sont capables d'induire la perte d'expression de certains gènes et sont impliqués dans de multiples phénomènes cellulaires physiologiques. Chacun des micro-ARN existants sont répertoriés numériquement et possèdent une cible bien spécifique. Une dérégulation de l'expression de ces entités moléculaires peut donc aboutir à des modifications épigénétiques à l'origine d'évènements tumorigènes : il peut s'agir d'une répression totale des gènes suppresseurs de tumeurs (surexpression des micro-ARN spécifiques) ou d'une transcription anormalement accrue de proto-oncogènes (défaut d'expression des micro-ARN spécifiques).¹⁴⁹ Ainsi, l'hyperexpression de certains micro-ARN précis a été identifiée chez des patients atteints de PCNSL.⁸⁹

De façon intéressante, un autre micro-ARN a démontré son intérêt potentiel dans la distinction entre un PCNSL (expression normale) et un SCNSL (surexpression).¹⁵⁰ Néanmoins, la spécificité diagnostique de cet éventuel marqueur futur nécessite des études supplémentaires puisque diverses étiologies, physiologiques ou malignes et notamment des tumeurs cérébrales non hématopoïétiques, peuvent conduire à la dérégulation des mêmes micro-ARN.⁸⁹

L'étude du méthylome de l'ADN circulant pourrait également représenter une alternative innovante aux prélèvements biopsiques hautement invasifs. Celle-ci consiste à analyser le profil de méthylation des îlots CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) présents dans l'ADN, responsables de la modulation d'expression de nombreux gènes et par conséquent impliqués dans les mécanismes onco-moléculaires. Alors que cet outil épigénétique a déjà montré un réel intérêt dans la discrimination histologique des tumeurs malignes aussi bien sur le tissu tumoral en lui-même que dans l'ADNcf plasmatique, il semblerait que l'étude du méthylome sur l'ADNcf du LCR offre aussi d'excellentes performances dans le diagnostic des tumeurs malignes du SNC. Plus précisément, cette analyse permettrait de distinguer les métastases cérébrales consécutives à un cancer périphérique, les glioblastomes et les atteintes lymphomateuses du SNC. A l'inverse des mutations oncogéniques récurrentes qui ne sont pas toujours rencontrées d'un patient à un autre, chaque entité tumorale est soumise à des processus de méthylation dont il est possible d'extraire un profil bien particulier, qui semblerait même propre aux cellules dont la tumeur est issue. De plus, les îlots CpG étant répartis sur l'ensemble du génome, les performances de cet examen ne sont pas strictement dépendantes de l'abondance de l'ADNct, à l'inverse des performances des examens moléculaires plus traditionnels. L'étude du méthylome sur l'ADNcf semble donc très prometteuse pour l'avenir mais doit encore faire l'objet d'études à plus grande échelle.¹⁵¹

La chimiokine CXCL13, une cytokine chimio-attractrice des LB reconnue grâce au récepteur CXCR5, a montré des concentrations élevées dans le LCR des PCNSL. Malgré des performances diagnostiques satisfaisantes, des résultats similaires peuvent cependant être observés dans d'autres pathologies malignes ou neuro-inflammatoires, justifiant son association avec d'autres biomarqueurs tels que l'IL-10. Une augmentation des taux de néoptérine dans le LCR, un marqueur d'activation de l'immunité à médiation cellulaire, a également été prouvée chez les PCNSL. Cette molécule est principalement sécrétée par les monocytes et les macrophages, et probablement par les cellules microgliales. L'infiltration lymphomateuse du tissu cérébral expliquerait alors le relargage local de néoptérine. A l'instar de la chimiokine CXCL13, un manque de spécificité a été relevé : l'élévation de sa concentration dans des contextes de maladies neuro-inflammatoires ou d'autres tumeurs cérébrales limite sa capacité à discriminer les PCNSL des autres pathologies neurologiques.^{89,152}

CONCLUSION

De l'évaluation clinique neuro-hématologique à l'examen biologique complet, en passant par un bilan neuroradiologique approfondi et un examen anatomopathologique de la tumeur, le diagnostic intégratif des PCNSL relève de multiples disciplines. La complexité médicale ainsi que l'agressivité de cette pathologie imposent de développer des outils innovants et performants dans le but de faciliter et d'accélérer la confirmation du diagnostic. Les techniques biologiques traditionnelles telles que la CC et la CMF ont d'ores et déjà été validées pour identifier un envahissement leptoméningé lymphomateux, pouvant ainsi faire office de preuve diagnostique d'un lymphome du SNC et limiter le recours aux prélèvements biopsiques grâce au LCR. La fragilité cellulaire, les conditions pré-analytiques et le comportement physiopathologique de la tumeur peuvent fortement perturber l'interprétation des bilans céphalo-rachidiens. La réitération des PL semble être un bon moyen de pallier au moins en partie ces obstacles. Le dosage en routine de l'IL-10 dans le LCR, un marqueur soluble moderne, offre un outil supplémentaire et performant pour les cliniciens dans l'établissement du diagnostic différentiel. Bien qu'apparaissant comme un puissant marqueur d'exclusion d'un PCNSL dans cette étude, l'interprétation de ce paramètre possède également ses limites.

C'est pourquoi l'intérêt de la recherche de la mutation *MYD88* L265P dans le LCR a été évalué dans ce travail. Dans le cadre des PCNSL, ce biomarqueur onco-moléculaire possède une réelle valeur diagnostique. Son excellente spécificité à témoigner d'un processus lymphomateux, ainsi que sa forte prévalence au sein des PCNSL justifient sa recherche systématique sur un bilan méningé d'exploration d'une tumeur cérébrale. Ce paramètre a de surcroît démontré une dimension pronostique et thérapeutique, bien qu'il n'existe à ce jour aucune thérapie ciblée directement contre la protéine MYD88. Bien que sa mise en évidence dans l'ADN cellulaire reste tout à fait justifiée, l'étude de l'ADN circulant du LCR par des techniques hautement sensibles de PCR digitale a révélé de meilleures performances. Véritable marqueur de confirmation d'un lymphome, la prise en considération de cette mutation dans les arguments diagnostiques permettrait de s'affranchir d'une biopsie chez des patients pour lesquels un EM n'aurait pas été identifié par CC et CMF. L'association de la recherche de la mutation *MYD88* L265P sur l'ADN circulant du LCR et du dosage de l'IL-6 et de l'IL-10 dont les performances sont complémentaires offre un moyen efficace d'affiner l'orientation diagnostique face à une tumeur du SNC non documentée.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Swerdlow, S. H. *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised Fourth Edition.* (2017).
2. Louis, D. N. *et al.* *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Fifth Edition.* (2021).
3. Bathla, G. & Hegde, A. Lymphomatous involvement of the central nervous system. *Clin. Radiol.* **71**, 602–609 (2016).
4. Korfel, A. & Schlegel, U. Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 317–327 (2013).
5. Houillier, C. *et al.* Management and outcome of primary CNS lymphoma in the modern era: An LOC network study. *Neurology* **94**, e1027–e1039 (2020).
6. Preusser, M. *et al.* Primary central nervous system lymphoma: a clinicopathological study of 75 cases. *Pathology (Phila.)* **42**, 547–552 (2010).
7. Scott, D. W. *et al.* Prognostic Significance of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Cell of Origin Determined by Digital Gene Expression in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue Biopsies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 2848–2856 (2015).
8. Hiemcke-Jiwa, L. S. *et al.* Molecular analysis in liquid biopsies for diagnostics of primary central nervous system lymphoma: Review of literature and future opportunities. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **127**, 56–65 (2018).
9. Franceschi, E. *et al.* Rare Primary Central Nervous System Tumors in Adults: An Overview. *Front. Oncol.* **10**, 996 (2020).
10. Hattab, E. M. *et al.* Most primary central nervous system diffuse large B-cell lymphomas occurring in immunocompetent individuals belong to the nongerminal center subtype: a retrospective analysis of 31 cases. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **23**, 235–243 (2010).
11. Camilleri-Broët, S. *et al.* A uniform activated B-cell-like immunophenotype might explain the poor prognosis of primary central nervous system lymphomas: analysis of 83 cases. *Blood* **107**, 190–196 (2006).
12. Correia, C. E., Schaff, L. R. & Grommes, C. Central Nervous System Lymphoma: Approach to Diagnosis and Treatment. *Cancer J. Sudbury Mass* **26**, 241–252 (2020).
13. Fukumura, K. *et al.* Genomic characterization of primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **131**, 865–875 (2016).
14. Fu, H. *et al.* Primary central nervous system Hodgkin’s lymphoma: a case report. *J. Int. Med. Res.* **49**, 300060521999533 (2021).
15. Bilgrami, M. & O’Keefe, P. Neurologic diseases in HIV-infected patients. *Handb. Clin. Neurol.* **121**, 1321–1344 (2014).
16. Brandsma, D. & Bromberg, J. E. C. Primary CNS lymphoma in HIV infection. *Handb. Clin. Neurol.* **152**, 177–186 (2018).
17. Montoto, S. & Lister, T. A. Secondary central nervous system lymphoma: risk factors and prophylaxis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **19**, 751–763, viii (2005).
18. Haldorsen, I. S., Espeland, A. & Larsson, E.-M. Central nervous system lymphoma: characteristic findings on traditional and advanced imaging. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **32**, 984–992 (2011).
19. Deckert, M. *et al.* Modern concepts in the biology, diagnosis, differential diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma. *Leukemia* **25**, 1797–1807 (2011).
20. Malikova, H. *et al.* Secondary central nervous system lymphoma: spectrum of morphological MRI appearances. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **14**, 733–740 (2018).
21. Ney, D. E. *et al.* Characteristics and outcomes of elderly patients with primary central nervous system lymphoma. *Cancer* **116**, 4605–4612 (2010).

22. Deckert, M., Brunn, A., Montesinos-Rongen, M., Terreni, M. R. & Ponzoni, M. Primary lymphoma of the central nervous system--a diagnostic challenge. *Hematol. Oncol.* **32**, 57–67 (2014).
23. Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Waite, K., Kruchko, C. & Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro-Oncol.* **23**, iii1–iii105 (2021).
24. Fontanilles, M. *et al.* Non-invasive detection of somatic mutations using next-generation sequencing in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* **8**, 48157–48168 (2017).
25. Villano, J. L., Koshy, M., Shaikh, H., Dolecek, T. A. & McCarthy, B. J. Age, gender, and racial differences in incidence and survival in primary CNS lymphoma. *Br. J. Cancer* **105**, 1414–1418 (2011).
26. Kadan-Lottick, N. S., Skluzacek, M. C. & Gurney, J. G. Decreasing incidence rates of primary central nervous system lymphoma. *Cancer* **95**, 193–202 (2002).
27. Gensous, N., Turpin, D., Duluc, D., Contin-Bordes, C. & Blanco, P. SA.1 - Genèse des anticorps. *Rev. Rhum.* **83**, A27–A32 (2016).
28. Lenz, G. & Staudt, L. M. Aggressive lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1417–1429 (2010).
29. Seifert, M., Scholtysik, R. & Küppers, R. Origin and Pathogenesis of B Cell Lymphomas. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1956**, 1–33 (2019).
30. Colomo, L. *et al.* Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **101**, 78–84 (2003).
31. Chang, C.-C. *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.* **28**, 464–470 (2004).
32. Hans, C. P. *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**, 275–282 (2004).
33. Montesinos-Rongen, M., Siebert, R. & Deckert, M. Primary lymphoma of the central nervous system: just DLBCL or not? *Blood* **113**, 7–10 (2009).
34. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511 (2000).
35. Wright, G. *et al.* A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9991–9996 (2003).
36. Montesinos-Rongen, M. *et al.* Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. *Leukemia* **22**, 400–405 (2008).
37. Chapuy, B. *et al.* Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* **24**, 679–690 (2018).
38. Lacy, S. E. *et al.* Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. *Blood* **135**, 1759–1771 (2020).
39. Wright, G. W. *et al.* A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications. *Cancer Cell* **37**, 551–568.e14 (2020).
40. Morin, R. D., Arthur, S. E. & Hodson, D. J. Molecular profiling in diffuse large B-cell lymphoma: why so many types of subtypes? *Br. J. Haematol.* **196**, 814–829 (2022).
41. Montesinos-Rongen, M. *et al.* Primary Central Nervous System (CNS) Lymphoma B Cell Receptors Recognize CNS Proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 1312–1319 (2015).
42. Nakamura, T. *et al.* Recurrent mutations of CD79B and MYD88 are the hallmark of primary central nervous system lymphomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **42**, 279–290 (2016).
43. McCann, K. J., Ashton-Key, M., Smith, K., Stevenson, F. K. & Ottensmeier, C. H. Primary central nervous system lymphoma: tumor-related clones exist in the blood and bone marrow with evidence for separate development. *Blood* **113**, 4677–4680 (2009).
44. Healy, J. A. & Dave, S. S. The Role of EBV in the Pathogenesis of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **390**, 315–337 (2015).

45. Montesinos-Rongen, M., Van Roost, D., Schaller, C., Wiestler, O. D. & Deckert, M. Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood* **103**, 1869–1875 (2004).
46. Lim, K.-H., Yang, Y. & Staudt, L. M. Pathogenetic importance and therapeutic implications of NF- κ B in lymphoid malignancies. *Immunol. Rev.* **246**, 359–378 (2012).
47. Wang, J. Q., Jeelall, Y. S., Ferguson, L. L. & Horikawa, K. Toll-Like Receptors and Cancer: MYD88 Mutation and Inflammation. *Front. Immunol.* **5**, 367 (2014).
48. Deguine, J. & Barton, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000prime Rep.* **6**, 97 (2014).
49. Lord, K. A., Hoffman-Liebermann, B. & Liebermann, D. A. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* **5**, 1095–1097 (1990).
50. Hardiman, G. *et al.* Genetic structure and chromosomal mapping of MyD88. *Genomics* **45**, 332–339 (1997).
51. Hunter, Z. R. *et al.* Insights into the genomic landscape of MYD88 wild-type Waldenström macroglobulinemia. *Blood Adv.* **2**, 2937–2946 (2018).
52. Shiratori, E., Itoh, M. & Tohda, S. MYD88 Inhibitor ST2825 Suppresses the Growth of Lymphoma and Leukaemia Cells. *Anticancer Res.* **37**, 6203–6209 (2017).
53. de Groen, R. A. L., Schrader, A. M. R., Kersten, M. J., Pals, S. T. & Vermaat, J. S. P. MYD88 in the driver's seat of B-cell lymphomagenesis: from molecular mechanisms to clinical implications. *Haematologica* **104**, 2337–2348 (2019).
54. Chen, R., Zhou, D., Wang, L., Zhu, L. & Ye, X. MYD88L265P and CD79B double mutations type (MCD type) of diffuse large B-cell lymphoma: mechanism, clinical characteristics, and targeted therapy. *Ther. Adv. Hematol.* **13**, 20406207211072840 (2022).
55. Song, Y. *et al.* Cerebrospinal Fluid IL-10 and IL-10/IL-6 as Accurate Diagnostic Biomarkers for Primary Central Nervous System Large B-cell Lymphoma. *Sci. Rep.* **6**, 38671 (2016).
56. Sasayama, T. *et al.* Cerebrospinal fluid interleukin-10 is a potentially useful biomarker in immunocompetent primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *Neuro-Oncol.* **14**, 368–380 (2012).
57. Hernández-Verdin, I. *et al.* Molecular and clinical diversity in primary central nervous system lymphoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **34**, 186–199 (2023).
58. Montesinos-Rongen, M. *et al.* Interphase cytogenetic analysis of lymphoma-associated chromosomal breakpoints in primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **61**, 926–933 (2002).
59. Schwindt, H. *et al.* Chromosomal imbalances and partial uniparental disomies in primary central nervous system lymphoma. *Leukemia* **23**, 1875–1884 (2009).
60. Montesinos-Rongen, M. *et al.* Primary central nervous system lymphomas are derived from germinal-center B cells and show a preferential usage of the V4-34 gene segment. *Am. J. Pathol.* **155**, 2077–2086 (1999).
61. Thompsett, A. R., Ellison, D. W., Stevenson, F. K. & Zhu, D. V(H) gene sequences from primary central nervous system lymphomas indicate derivation from highly mutated germinal center B cells with ongoing mutational activity. *Blood* **94**, 1738–1746 (1999).
62. Montesinos-Rongen, M. *et al.* Absence of immunoglobulin class switch in primary lymphomas of the central nervous system. *Am. J. Pathol.* **166**, 1773–1779 (2005).
63. Riemersma, S. A. *et al.* High numbers of tumour-infiltrating activated cytotoxic T lymphocytes, and frequent loss of HLA class I and II expression, are features of aggressive B cell lymphomas of the brain and testis. *J. Pathol.* **206**, 328–336 (2005).
64. Norden, A. D., Drappatz, J., Wen, P. Y. & Claus, E. B. Survival among patients with primary central nervous system lymphoma, 1973-2004. *J. Neurooncol.* **101**, 487–493 (2011).
65. Jelicic, J., Stauffer Larsen, T., Bukumiric, Z., Juul-Jensen, K. & Andjelic, B. Prognostic models in primary central nervous system lymphoma patients: A systematic review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **161**, 103341 (2021).

66. Grommes, C. & DeAngelis, L. M. Primary CNS Lymphoma. *J. Clin. Oncol.* **35**, 2410–2418 (2017).
67. Lukas, R. V., Stupp, R., Gondi, V. & Raizer, J. J. Primary Central Nervous System Lymphoma-PART 1: Epidemiology, Diagnosis, Staging, and Prognosis. *Oncol. Williston Park N* **32**, 17–22 (2018).
68. Ferreri, A. J. M. *et al.* Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **21**, 266–272 (2003).
69. Batchelor, T. & Loeffler, J. S. Primary CNS lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 1281–1288 (2006).
70. Abrey, L. E. *et al.* Primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 5711–5715 (2006).
71. Recommandations nationales de bonnes pratiques - Réseau LOC. ANOCEF - Association des Neuro-Oncologues d'Expression Française. <https://www.anocef.org/>. Consulté le 20/11/2022 (2014).
72. Omuro, A. M. P. *et al.* Delayed neurotoxicity in primary central nervous system lymphoma. *Arch. Neurol.* **62**, 1595–1600 (2005).
73. Önder, E. *et al.* Corticosteroid pre-treated primary CNS lymphoma: a detailed analysis of stereotactic biopsy findings and consideration of interobserver variability. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 7798–7808 (2015).
74. Hattori, K. *et al.* MYD88 (L265P) mutation is associated with an unfavourable outcome of primary central nervous system lymphoma. *Br. J. Haematol.* **177**, 492–494 (2017).
75. Takano, S. *et al.* MyD88 Mutation in Elderly Predicts Poor Prognosis in Primary Central Nervous System Lymphoma: Multi-Institutional Analysis. *World Neurosurg.* **112**, e69–e73 (2018).
76. Zhou, Y. *et al.* Analysis of Genomic Alteration in Primary Central Nervous System Lymphoma and the Expression of Some Related Genes. *Neoplasia N. Y. N* **20**, 1059–1069 (2018).
77. Miyao, K., Yokota, H. & Sakemura, R. L. Is CD19-directed chimeric antigen receptor T cell therapy a smart strategy to combat central nervous system lymphoma? *Front. Oncol.* **12**, 1082235 (2022).
78. Simakurthy, S., Jena, S. & Tripathy, K. Primary Intraocular Lymphoma. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
79. Bower, M. *et al.* British HIV Association guidelines for HIV-associated malignancies 2014. *HIV Med.* **15 Suppl 2**, 1–92 (2014).
80. De Mattos-Arruda, L. *et al.* Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat. Commun.* **6**, 8839 (2015).
81. Kiewe, P., Fischer, L., Martus, P., Thiel, E. & Korfel, A. Meningeal dissemination in primary CNS lymphoma: diagnosis, treatment, and survival in a large monocenter cohort. *Neuro-Oncol.* **12**, 409–417 (2010).
82. Küker, W. *et al.* Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients. *J. Neurooncol.* **72**, 169–177 (2005).
83. Tang, Y. Z., Booth, T. C., Bhogal, P., Malhotra, A. & Wilhelm, T. Imaging of primary central nervous system lymphoma. *Clin. Radiol.* **66**, 768–777 (2011).
84. Procédure opératoire de la Biopsie cérébrale stéréotaxique. *Neurochirurgie Pitié Salpêtrière AP-HP*. <https://neurochirurgie-pitie-salpetriere.fr/offre-de-soins/biopsie-cerebrale-stereotaxique/>. Consulté le 23/11/2022. (2021).
85. Baraniskin, A. & Schroers, R. Modern cerebrospinal fluid analyses for the diagnosis of diffuse large B-cell lymphoma of the CNS. *CNS Oncol.* **3**, 77–85 (2014).
86. Zaiem, F. *et al.* High Ki67 proliferation index but not cell-of-origin subtypes is associated with shorter overall survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Avicenna J. Med.* **10**, 241–248 (2020).
87. Debliquis, A. *et al.* Cytomorphology and flow cytometry of brain biopsy rinse fluid enables faster and multidisciplinary diagnosis of large B-cell lymphoma of the central nervous system. *Cytometry B Clin. Cytom.* **94**, 182–188 (2018).
88. Onda, K., Wakabayashi, K., Tanaka, R. & Takahashi, H. Intracranial malignant lymphomas: clinicopathological study of 26 autopsy cases. *Brain Tumor Pathol.* **16**, 29–35 (1999).

89. Nguyen-Them, L. *et al.* CSF biomarkers in primary CNS lymphoma. *Rev. Neurol. (Paris)* S0035-3787(22)00784–6 (2022) doi:10.1016/j.neurol.2022.06.014.
90. Engelborghs, S. *et al.* Consensus guidelines for lumbar puncture in patients with neurological diseases. *Alzheimers Dement. Amst. Neth.* **8**, 111–126 (2017).
91. Schillinger, F. Lymphomes B à grandes cellules. (2018).
92. Cytométrie en Flux - BICEL de l'Université de Lille. *BioImaging Center Lille - Plateforme d'imagerie cellulaire et tissulaire* <https://bicel.univ-lille.fr/cytometrie-en-flux>. Consulté le 28/11/2022. (2022).
93. Debliquis, A. Hémopathies malignes et SNC - Diagnostic biologique. (2022).
94. Schroers, R. *et al.* Diagnosis of leptomeningeal disease in diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system by flow cytometry and cytopathology. *Eur. J. Haematol.* **85**, 520–528 (2010).
95. Finn, W. G., Peterson, L. C., James, C. & Goolsby, C. L. Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* **110**, 341–346 (1998).
96. French, C. A., Dorfman, D. M., Shaheen, G. & Cibas, E. S. Diagnosing lymphoproliferative disorders involving the cerebrospinal fluid: increased sensitivity using flow cytometric analysis. *Diagn. Cytopathol.* **23**, 369–374 (2000).
97. Hegde, U. *et al.* High incidence of occult leptomeningeal disease detected by flow cytometry in newly diagnosed aggressive B-cell lymphomas at risk for central nervous system involvement: the role of flow cytometry versus cytology. *Blood* **105**, 496–502 (2005).
98. Quijano, S. *et al.* Identification of leptomeningeal disease in aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma: improved sensitivity of flow cytometry. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **27**, 1462–1469 (2009).
99. Stacchini, A., Aliberti, S., Demurtas, A., Benevolo, G. & Godio, L. Ten antibodies, six colors, twelve parameters: a multiparameter flow cytometric approach to evaluate leptomeningeal disease in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Cytometry B Clin. Cytom.* **82**, 139–144 (2012).
100. Benevolo, G. *et al.* Final results of a multicenter trial addressing role of CSF flow cytometric analysis in NHL patients at high risk for CNS dissemination. *Blood* **120**, 3222–3228 (2012).
101. Hiemcke-Jiwa, L. S. *et al.* The use of droplet digital PCR in liquid biopsies: A highly sensitive technique for MYD88 p.(L265P) detection in cerebrospinal fluid. *Hematol. Oncol.* **36**, 429–435 (2018).
102. Brennan, C. W. *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, 462–477 (2013).
103. Ferreri, A. J. M. *et al.* MYD88 L265P mutation and interleukin-10 detection in cerebrospinal fluid are highly specific discriminating markers in patients with primary central nervous system lymphoma: results from a prospective study. *Br. J. Haematol.* **193**, 497–505 (2021).
104. Moreno, D. F. *et al.* Prognostic impact of MYD88 and CXCR4 mutations assessed by droplet digital polymerase chain reaction in IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering Waldenström macroglobulinaemia. *Br. J. Haematol.* (2022) doi:10.1111/bjh.18502.
105. Fernández-Rodríguez, C. *et al.* MYD88 (L265P) mutation is an independent prognostic factor for outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* **28**, 2104–2106 (2014).
106. Nishimura, N. *et al.* MYD88 L265P mutation detected by digital PCR as a prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphoma in rituximab era. *Leuk. Res.* **97**, 106426 (2020).
107. Niu, J. *et al.* Prognostic value of MYD88 L265P mutation in diffuse large B cell lymphoma via droplet digital PCR. *Mol. Med. Rep.* **22**, 1243–1256 (2020).
108. Weissinger, S. E. *et al.* Targetable alterations in primary extranodal diffuse large B-cell lymphoma. *EJHaem* **3**, 688–697 (2022).
109. Galimberti, S., Balducci, S., Guerrini, F., Del Re, M. & Cacciola, R. Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagn. Basel Switz.* **12**, 1305 (2022).
110. Perkins, G., Lu, H., Garlan, F. & Taly, V. Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. *Adv. Clin. Chem.* **79**, 43–91 (2017).
111. Quan, P.-L., Sauzade, M. & Brouzes, E. dPCR: A Technology Review. *Sensors* **18**, 1271 (2018).

112. Perez-Toralla, K. *et al.* [Digital PCR compartmentalization I. Single-molecule detection of rare mutations]. *Med. Sci. MS* **31**, 84–92 (2015).
113. Postel, M., Roosen, A., Laurent-Puig, P., Taly, V. & Wang-Renault, S.-F. Droplet-based digital PCR and next generation sequencing for monitoring circulating tumor DNA: a cancer diagnostic perspective. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **18**, 7–17 (2018).
114. Langerak, A. W. *et al.* EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia* **26**, 2159–2171 (2012).
115. Mode d'emploi du kit IdentiClone : IGH + IGK B-cell clonality assay. Consulté le 29/11/2022. (2022).
116. Ghorbian, S. Molecular pathology diagnosis of diffuse large B cell lymphoma using BIOMED-2 clonal gene rearrangements. *Ann. Diagn. Pathol.* **29**, 28–31 (2017).
117. Ribera, J. *et al.* Usefulness of IGH/TCR PCR studies in lymphoproliferative disorders with inconclusive clonality by flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* **86**, 25–31 (2014).
118. Liu, L. *et al.* Detection of malignant B lymphocytes by PCR clonality assay using direct lysis of cerebrospinal fluid and low volume specimens. *Int. J. Lab. Hematol.* **37**, 165–173 (2015).
119. van den Brand, M. *et al.* Next-Generation Sequencing-Based Clonality Assessment of Ig Gene Rearrangements: A Multicenter Validation Study by EuroClonality-NGS. *J. Mol. Diagn. JMD* **23**, 1105–1115 (2021).
120. Ekstein, D. *et al.* CSF analysis of IgH gene rearrangement in CNS lymphoma: relationship to the disease course. *J. Neurol. Sci.* **247**, 39–46 (2006).
121. Cassoux, N. *et al.* IL-10 measurement in aqueous humor for screening patients with suspicion of primary intraocular lymphoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 3253–3259 (2007).
122. Fisson, S. *et al.* Cytokine profile in human eyes: contribution of a new cytokine combination for differential diagnosis between intraocular lymphoma or uveitis. *PLoS One* **8**, e52385 (2013).
123. Costopoulos, M. *et al.* ISOLD: A New Highly Sensitive Interleukin Score for Intraocular Lymphoma Diagnosis. *Ophthalmology* **123**, 1626–1628 (2016).
124. Nguyen-Them, L. *et al.* The CSF IL-10 concentration is an effective diagnostic marker in immunocompetent primary CNS lymphoma and a potential prognostic biomarker in treatment-responsive patients. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **61**, 69–76 (2016).
125. Diaz, L. A. & Bardelli, A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 579–586 (2014).
126. Poulet, G., Massias, J. & Taly, V. Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytol.* **63**, 449–455 (2019).
127. Pan, W., Gu, W., Nagpal, S., Gephart, M. H. & Quake, S. R. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin. Chem.* **61**, 514–522 (2015).
128. Bettegowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24 (2014).
129. Schneegans, S. *et al.* Pre-analytical factors affecting the establishment of a single tube assay for multiparameter liquid biopsy detection in melanoma patients. *Mol. Oncol.* **14**, 1001–1015 (2020).
130. Nikolaev, S., Lemmens, L., Koessler, T., Blouin, J.-L. & Nospikel, T. Circulating tumoral DNA: Preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory. *Anal. Biochem.* **542**, 34–39 (2018).
131. Schwaederle, M. *et al.* Detection rate of actionable mutations in diverse cancers using a biopsy-free (blood) circulating tumor cell DNA assay. *Oncotarget* **7**, 9707–9717 (2016).
132. Hattori, K. *et al.* Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Sci.* **109**, 225–230 (2018).
133. Wang, Y. *et al.* Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid of patients with primary tumors of the brain and spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 9704–9709 (2015).
134. Hiemcke-Jiwa, L. S. *et al.* MYD88 p.(L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma. *Br. J. Haematol.* **185**, 974–977 (2019).

135. Rimelen, V. *et al.* Tumor cell-free DNA detection in CSF for primary CNS lymphoma diagnosis. *Acta Neuropathol. Commun.* **7**, 43 (2019).
136. Watanabe, J. *et al.* High Detection Rate of MYD88 Mutations in Cerebrospinal Fluid From Patients With CNS Lymphomas. *JCO Precis. Oncol.* **3**, 1–13 (2019).
137. Watanabe, J. *et al.* Comparison of circulating tumor DNA between body fluids in patients with primary central nervous system lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **60**, 3587–3589 (2019).
138. Bobillo, S. *et al.* Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas. *Haematologica* **106**, 513–521 (2021).
139. Zhuang, Z. *et al.* Circulating cell-free DNA and IL-10 from cerebrospinal fluids aid primary vitreoretinal lymphoma diagnosis. *Front. Oncol.* **12**, 955080 (2022).
140. Pachmann, S. *et al.* Monoclonal gammopathy after low-grade MALT lymphoma: evidence for a second neoplasm. *Am. J. Hematol.* **70**, 167–173 (2002).
141. Vitale, C. & Ferrajoli, A. Richter Syndrome in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr. Hematol. Malign. Rep.* **11**, 43–51 (2016).
142. Rossi, D. *et al.* The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* **117**, 3391–3401 (2011).
143. Kobayashi, H. *et al.* Transformation to diffuse large B-cell lymphoma with germinal center B-cell like subtype and discordant light chain expression in a patient with Waldenström macroglobulinemia/lymphoplasmacytic lymphoma. *Int. J. Hematol.* **114**, 401–407 (2021).
144. Nakamine, H. *et al.* Richter's syndrome with different immunoglobulin light chain types. Molecular and cytogenetic features indicate a common clonal origin. *Am. J. Clin. Pathol.* **97**, 656–663 (1992).
145. Miyamura, K. *et al.* Single clonal origin of neoplastic B-cells with different immunoglobulin light chains in a patient with Richter's syndrome. *Cancer* **66**, 140–144 (1990).
146. Fabbri, G. *et al.* Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome. *J. Exp. Med.* **210**, 2273–2288 (2013).
147. Jahnke, K. *et al.* Detection of subclinical systemic disease in primary CNS lymphoma by polymerase chain reaction of the rearranged immunoglobulin heavy-chain genes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 4754–4757 (2006).
148. Debliquis, A. *et al.* L'évaluation de la contamination sanguine par cytométrie en flux avec l'anticorps anti-glycophorine A permet de confirmer la localisation méningée de l'infiltration lymphomateuse. *40ème Congrès SFH - Paris 9 Au 11 Sept.* (2020).
149. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 704–714 (2009).
150. Baraniskin, A. *et al.* MicroRNA-30c as a novel diagnostic biomarker for primary and secondary B-cell lymphoma of the CNS. *J. Neurooncol.* **137**, 463–468 (2018).
151. Zuccato, J. A. *et al.* Cerebrospinal fluid methylome-based liquid biopsies for accurate malignant brain neoplasm classification. *Neuro-Oncol.* noac264 (2022) doi:10.1093/neuonc/noac264.
152. Geng, M. *et al.* The diagnostic role and dynamic changes in cerebrospinal fluid neopterin during treatment of patients with primary central nervous system lymphoma. *Cancer Med.* **7**, 3889–3898 (2018).