



HAL
open science

Caractérisation moléculaire des lymphomes de forme frontière

Clémentine Sarkozy de Nagy-Bocsa

► **To cite this version:**

Clémentine Sarkozy de Nagy-Bocsa. Caractérisation moléculaire des lymphomes de forme frontière. Biologie moléculaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1164 . tel-03385462

HAL Id: tel-03385462

<https://theses.hal.science/tel-03385462>

Submitted on 19 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°d'ordre NNT : 2020LYSE1164



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° accréditation
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Soutenue publiquement le 12/10/2020, par :

Clémentine Sarkozy de Nagy-Bocsa

Sous la direction du Pr Alexandra Traverse-Glehen
Centre de recherche en Cancérologie de Lyon
Département immunité Virus, inflammation
Équipe « Modèles cliniques et expérimentaux de la lymphomagenèse »,
UMR 1052, CNRS 5286

Caractérisation moléculaire des lymphomes de forme frontière.

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Thierry Fest (Président)

Madame la Professeur Marie Hélène Delfeau-Larue (Rapporteur)

Monsieur le Professeur Fabrice Jardin (Rapporteur)

Monsieur le Professeur Serge Lebecque (Examineur)

Madame la Professeur Alexandra Traverse-Glehen, Directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Caractérisation moléculaire des lymphomes de formes frontières

RESUME : le lymphome de forme frontière (LFF) entre lymphome de Hodgkin classique (LHC) et lymphome B à grandes cellules (LBGC), a été introduit dans la classification OMS en 2008. Cependant, les critères diagnostiques restent discutés par les cliniciens et les pathologistes. Nous avons émis l'hypothèse qu'une meilleure caractérisation sur le plan moléculaire de ces cas permettrait de redéfinir une classification reposant sur des bases biologiques communes. Dans le cadre d'une relecture centralisée, nous avons réuni une cohorte rétrospective internationale et revisité les critères diagnostiques au sein d'un spectre entre LHC et LBGC afin de fournir un cadre pour les analyses moléculaires. Grâce à l'étude du profil d'expression génique, nous avons pu déterminer que le statut EBV et la présence d'un envahissement thymique étaient responsables d'une grande part de la variance au sein du spectre. Une caractérisation du microenvironnement tumoral a pu définir que l'infiltrat macrophagique était un élément clé dans les LFF. L'étude des anomalies moléculaires a permis de confirmer la séparation nette entre ces formes de LFF. Au total, ce travail a permis de redéfinir la classification des LFF sur une assise biologique solide, apportant un rationnel pour le développement de thérapies ciblées en fonction des sous-groupes.

Mots clés : lymphome frontière, lymphome de Hodgkin et B primitif du médiastin, EBV

Molecular characterization of grey zone lymphomas

ABSTRACT: Grey zone lymphoma (GZL) with features intermediate between classical Hodgkin lymphoma (cHL) and large B cell lymphoma (LBCL) was introduced into the WHO classification in 2008. However, since diagnostic criteria are imprecise, reliable identification and treatment of GZL cases remains challenging. With the hypothesis that molecular biology could provide a deeper insight into the biology of this entity, we aimed at providing a new framework for the classification of GZL. We first collected an international cohort of centrally reviewed GZL cases and provided refined diagnostic criteria which contribute to a more precise characterization within a broad spectrum from cHL-like to LBCL-like disease. Thanks to RNA sequencing, we discovered that EBV status and thymic involvement were major driver of the variance of the gene expression profiling within the spectrum. A detailed characterization of tumor microenvironment showed that macrophage infiltrate is a key feature of GZL. Then, we further confirmed the split observed at the phenotypic level with fully distinct mutational landscape for thymic and non-thymic GZL, as well as for EBV associated cases. In conclusion, we provided the framework for an evolution in the classification of GZL and project that our findings might have implications for clinical decision making in the future given the increasing role of modern approaches involving tailored therapies.

Key words: grey zone lymphoma, classical Hodgkin lymphoma, primary mediastinal B cell lymphoma, EBV.

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury :

Je remercie chaleureusement les rapporteurs et les examinateurs de mon jury de me faire l'honneur d'examiner ce travail de thèse. Merci pour le temps que vous y aurez consacré, pour votre implication et pour vos conseils. Je souhaite vous exprimer ici ma sincère admiration et reconnaissance.

A ma directrice de thèse :

Chère Alexandra, merci de m'avoir accordé ta confiance pour mener ce projet à bien et de m'avoir soutenue dans les nombreuses étapes tout au long du parcours. Merci d'avoir apporté ton expertise et ta vision sur ce sujet. Je suis ravie à l'idée de poursuivre nos échanges et collaborations dans les années à venir, après Vancouver-Lyon, Paris-Lyon semble très proche.

Aux directeurs et membres de l'unité de recherche :

Cher Gilles, merci de m'avoir motivée à me lancer dans cette voie et introduite auprès de ton équipe de recherche il y a maintenant de nombreuses années. Merci de ton soutien indéfectible et de tes conseils sur mes orientations à des périodes charnières. Ces années passées à Lyon au sein de ton équipe m'ont fourni un solide bagage pour l'avenir.

Chers Laurent, Emmanuel, Pierre, chère Sarah, merci de vos conseils lors de la rédaction des nombreux dossiers de bourse, pour votre patience et pour ces discussions enrichissantes. Un merci particulier à Pierre pour ces petits cours d'initiation à la biologie moléculaire. J'espère avoir la chance de continuer à interagir avec vous dans l'avenir.

Aux LYSA-LYSARC et techniciens du laboratoire d'anatomopathologie de Lyon-Sud :

Merci aux différents centres du LYSA pour leur contribution et aux pathologistes impliqués dans les différentes séances de relecture. Un merci particulier aux équipes du LYSA-P, à Nadine, Véronique, Cassandre et Maryse sans qui la collecte et visualisation des cas n'auraient

pas été possible. Un grand merci aux techniciennes de Lyon Sud, Aurélie, Garance et Pauline pour leur implication dans ce projet malgré l'éloignement.

Au Pr Bertrand Coiffier :

Vous resterez un modèle en tant que médecin, scientifique et leader aux qualités humaines extraordinaires. Je suis heureuse d'avoir eu la chance de travailler et d'apprendre à vos côtés. Ces moments partagés à discuter et écrire ensemble resteront gravés dans ma mémoire. Merci de m'avoir introduite auprès de R.Gascoyne comme une de vos élèves, sans quoi cette expérience Canadienne n'aurait pas été possible.

To the Steild Lab members :

Christian, David, it was an honor to be part of the team, I learned a lot from your scientific rigor. Thanks Stacy, Lauren and Gerben: I loved our discussion and interaction. Tomo and Katsu, without you, laser-microdissection would not have been such a pleasure. Elena, thanks for your friendship from D1.

A ma famille:

A mes parents, frère, sœur, belles-sœurs, à ma belle-famille : merci d'avoir accepté nos choix et de nous avoir aider à les mener à bien. Merci pour ces centaines d'heures passées sur WhatsApp !

A mes deux hommes : je ne pourrai pas être plus fière de vous deux, merci pour votre amour au quotidien, je suis heureuse d'avoir vécu ces mois de rédaction/confinement à vos côtés. Merci Florent d'avoir été un moteur si puissant dans cette expérience Canadienne, sans toi rien de cela n'aurait été possible. Lucien, tu es un rayon de soleil.

A mes deux grands-mères.

Table des matières

INTRODUCTION	13
I. Diagnostic et Anatomopathologie des LH et LBPM.....	17
I.A. Classification OMS et terminologie.....	17
I.B. Diagnostic clinique et anatomopathologique.....	18
II. Origine cellulaire et profil d'expression génique des LHC et LBPM.....	29
II.A. Origine Cellulaire.....	29
II.B. Phénotype moléculaire et programme de transcription dans le lymphome de Hodgkin.....	32
II.C. Phénotype moléculaire du LBPM :.....	36
II.D. Lien entre PEG du LBPM et de la cellule de RS	41
III. Anomalies moléculaires impliquées au sein des voies de lymphomagenèse.....	46
III.A. Voie NF- κ B	46
III.B. Voie JAK/STAT	53
III.C. Voie PI3K/AKT/mTOR :	58
III.D. XPO1.....	60
III.E. Épigenétique.....	61
III.F. Autres voies oncogéniques.....	68
IV. ME et interaction avec la cellule tumorale	70
IV.A. Promotions de la croissance tumorales : une particularité du LHC ?.....	70
IV.B. Les lymphocytes T et mécanismes d'épuisement associés.....	72
IV.C. Perte d'expression des molécules du CMH	76
V. Les lymphomes de forme frontière et lymphomes B à grandes cellules EBV+	79
V.A. Descriptions anatomopathologique, classification OMS et données cliniques des LFF	80
V.B. Données biologiques.....	91
V.C. Lymphomes B diffus à grandes cellules reliés à l'EBV	95
VI. Problématique	102
MATERIELS et METHODES	103
I. Schéma global de l'étude et cohortes.....	104
I.A. Schéma global.....	104

I.B.	Description anatomopathologique de la cohorte	105
I.C.	Deuxième partie : sélection des cas pour l'analyse du PEG (cohortes LYSA/BCCRC)	106
I.D.	Troisième partie : sélection des cas pour l'analyse du profil mutationnel (cohortes LYSA /BCCRC) 107	
II.	Principales techniques :	109
II.A.	Étude du transcriptome par RNAseq :	109
II.B.	Étude du profil mutationnel :	112
RESULTATS	117
I.	Caractérisation anatomopathologique, classification : article 1	118
II.	Caractérisation du profil d'expression génique et du MET : article 2.....	150
III.	Caractérisation du profil mutationnel : article 3.....	193
DISCUSSION	251
I.	Données morphologiques :.....	252
I.A.	Principe de la classification et définition des cas « frontières » parmi les LFF :.....	252
I.B.	LBDGC-EBV+ polymorphes, ou LFF-EBV+ ?	253
II.	Avancées dans la classification des LFF et LBDGC-EBV+ polymorphes grâce au transcriptome	254
II.A.	Analyse en composante principale pour identifier les voies biologiques.....	254
II.B.	Une signature d'expression génique pour les LFF.....	256
II.C.	Groupe 0, à la frontière avec les LHC ?.....	257
II.D.	Groupe 3, à rattacher aux LBDGC/PMBCL ?	257
II.E.	Des arguments pour isoler les cas de LBDGC-EBV+.....	258
III.	Caractérisation du profil mutationnel des LFF et LBDGC-EBV polymorphes :	259
III.A.	LFF : un profil de mutations peu relié à la classification anatomo-pathologique	260
III.B.	L'envahissement du médiastin antérieur comme élément clé dans la lymphomagenèse des LFF 261	
III.C.	LBDG-EBV polymorphes :	263
IV.	Limites, conclusions et perspectives :	266
IV.A.	Limites du travail.....	266
IV.B.	Une classification des LFF à revoir ?.....	267
IV.C.	Quelle cellule d'origine pour les LFF ?.....	267

IV.D. Lymphomes reliés à l'EBV.....	268
Références.....	269

Illustrations et tables

Figure 1: Cellules tumorales de Hodgkin et Reed-Sternberg exprimant le CD30.	22
Figure 2: Lymphome de Hodgkin scléro-nodulaire.	23
Figure 3: Morphologie et IHC d'un cas typique de LBPM.	26
Figure 4: Profil d'expression des cellules B CD30+.	30
Figure 5: Éléments clés dans la reprogrammation de la cellule tumorale dans le LHC.	34
Figure 7: Signature d'expression génique des lymphomes B primitifs du médiastin.	39
Figure 8: Signature des LBPM, LH et LBDGC.	42
Figure 10: PEG du LHC en comparaison aux autres lymphomes B.	44
Figure 9: Voie NFKB.	52
Figure 10: Voie JAK/STAT.	55
Figure 11: Voie PI3K/AKT.	60
Figure 12: Les 3 mécanismes de régulation épigénétique.	63
Figure 13: Anomalies moléculaires et épigénétique dans le LHC et le LBPM.	67
Figure 16: Interaction entre la cellule de RS et les cellules du MET dans le LH.	71
Figure 17: Mécanismes d'échappement de la réponse immune dans le LHC et LBPM.	78
Figure 18: Lymphome de forme frontière (LFF) de morphologie LBPM-like.	81
Figure 19: Lymphome de forme frontière de morphologie LHC-like.	82
Figure 20: Survie des patients atteints de LFF et LBPM	89
Figure 21: Profil de Méthylation et LFF. Adapté, D'après Eberle et al. 2012.	94
Figure 22: Lymphome B diffus grandes cellules EBV positifs, variant polymorphe.	97
Figure 23: Lymphome B diffus grandes cellules EBV positifs, variant monomorphe.	97
Figure 24: Spectre de mutations dans les LBDGC EBV+.	100
Figure 25: Classification morphologique.	105
Figure 26: Flow-chart pour l'inclusion des cas dans l'étude de profil d'expression génique.	106
Figure 27: Flow-chart pour l'inclusion des cas dans l'étude de profil de mutations.	108
Figure 28: Construction des bibliothèques de RNA-sequencing.	110
Figure 29: Schéma expliquant les différentes étapes du RNAseq	111

Figure 30: microdissection au laser des cellules tumorales et des cellules du microenvironnement. 112

Figure 31: Séquençage des exons par capture. 114

Figure 32: Validation des variants issus des exomes par un séquençage ciblé. 115

Tables :

Tableau 1: Présentation clinique, et anatomopathologique des LHC et LBPM 26

Tableau 2: Différents types de chimiothérapie dans le lymphome B primitif du médiastin et lymphome de Hodgkin classique. 28

Tableau 3: Incidences des anomalies moléculaires des gènes impliqués dans la régulation épigénétique, dans le LHC et LBPM. 66

Tableau 4: Série rapportant des cas de lymphomes de formes frontières. 85

Tableau 5: Séries de la littérature sur le traitement des LFF. 87

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
APRIL	proliferating-inducing ligand
ARN	acide ribonucléique
BAFF	BAFF (B-cell activating factor)
BCMA	B cell maturation antigène, BCMA
CG	Centre germinatif
CM	Cellularité mixte
CMF	cytométrie de flux
CP	composante principale
CSH	cellules souches hématopoïétiques
DEG	différentiel d'expression génique
EBNA	EBV nuclear antigens
EBV	Epstein Barr Virus
FFPE	formalin-fixed, paraffin-embedded
FISH	Fluorescence in situ hybridisation
FT	Facteur de transcription
HMS	hyper-mutations somatiques
IG	immunoglobulines
IGF	insulin growth factor
IHC	immuno histo chimie
LBGC	lymphomes B à grandes cellules
LBPM	Lymphome B primitif du médiastin
LFM	lymphome de forme frontière
LHC	lymphome de Hodgkin classique
LLC	leucémie lymphoïde chronique
LMP1	latent membrane protein 1,
LNH	lymphomes non hodgkinien
MDL	microenvironnement
ME	microenvironnement
MEC	matrice extracellulaire
NIK	NF- κ B inducing kinase (NIK)
OMS	l'Organisation Mondiale de la Santé
PAMPs	motifs moléculaires associés aux pathogènes
PCA	Analyse en principale composante
PCR	polymerase chain reaction
PEG	profile d'expression génique
PNE	polynucléaires éosinophiles
PNN	polynucléaires neutrophiles

RS	Reed-Sternberg
SN	scléro-nodulaire
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A
STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B
TACI	transmembranaire activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor, TACI)

INTRODUCTION

Le lymphome représente l'hémopathie maligne la plus fréquente avec une incidence ajustée à l'âge de 24,5 cas pour 100 000 habitants en Europe(Sant et al. 2010), associée à une forte morbi-mortalité. Ce groupe de cancers est hétérogène en termes de fréquence, d'épidémiologie, de biologie, d'anomalies génétiques et de pronostic.

Afin d'optimiser la prise en charge et de l'adapter au mieux à chaque cas, la classification de l'OMS(Swerdlow et al. 2016) (organisation mondiale de la santé) catégorise les lymphomes en plus de 80 entités distinctes à l'aide de caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques, génétiques et cliniques. Elle repose sur le concept de cellule d'origine ou « cell of origin » qui propose d'assigner à chaque cellule lymphomateuse sa contrepartie normale. Le but ultime d'une telle classification est de grouper les lymphomes présentant des anomalies biologiques sous-jacentes communes afin d'apporter au patient le traitement le plus adapté possible et de définir des éléments permettant l'élaboration d'un pronostic. Cette classification est un processus continu qui a évolué en parallèle des connaissances physiopathologiques et des nouveaux traitements. La biologie moléculaire en a permis une refonte avec de grandes avancées, en particulier au sein de l'entité la plus fréquente, les lymphomes B à grandes cellules(Alizadeh et al. 2000). Cependant, il persiste des cas difficiles à classer considérés comme des « zones grises » ou « formes frontières » entre deux entités bien distinctes. Au-delà de la difficulté diagnostique et de la question nosologique, il existe une réelle problématique thérapeutique pour ces patients. Les lymphomes de forme frontière (LFF) présentant des caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques intermédiaires entre le lymphome de Hodgkin (LH) et le lymphome B à grandes cellules (LBGC), plus particulièrement le lymphome B primitif du médiastin (LBPM), font partis de ces cas. Ces patients semblent avoir un pronostic défavorable, pouvant être la conséquence directe de ces difficultés diagnostiques et thérapeutiques, ou bien être le reflet d'une biologie sous-jacente plus agressive. De plus, une morphologie identique est également retrouvée au sein d'une entité récente, le LBDGC-NOS (not otherwise specified) relié à l'EBV, aboutissant à une autre frontière difficile à distinguer.

Les apports récents de la biologie moléculaire ont démontré son intérêt vis à vis de la compréhension de la lymphomagenèse, de l'identification de marqueurs diagnostiques et permettant une meilleure prédiction du pronostic ou encore de la réponse au traitement (Dubois et al. 2016; Sujobert, Salles, and Bachy 2016; Weinstock et al. 2015). En effet, le lymphome est une maladie génétique et les anomalies somatiques touchant le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération, la différenciation ou les interactions avec le microenvironnement tumoral (MET) apportent un avantage sélectif à la cellule en termes de croissance et de survie (Slack and Gascoyne 2013).

Le développement de thérapies ciblées passe par une meilleure caractérisation de ces anomalies génétiques responsable de la lymphomagenèse. La médecine de précision ou « à la carte » est souvent décrite comme le « Graal » en oncologie. Si certaines entités de lymphomes ont déjà été bien décrites, permettant d'aboutir à des progrès thérapeutiques significatifs, d'autres entités plus rares le sont moins, limitant les avancées. L'importance des études biologiques portant sur la caractérisation génétique ou épigénétique est l'un des points avancés par le comité d'organisation de la société américaine d'hématologie dans une feuille de route pour la recherche contre le lymphome (Weinstock et al. 2015). Selon les experts, une caractérisation moléculaire comportant un catalogue précis des anomalies génétiques et transcriptionnelles fournira les bases pour comprendre la pathologie, et l'hétérogénéité tumorale, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans le cadre de formes rares, comme les LFF, la caractérisation d'au moins 50 cas, permettrait d'apporter des réponses aux questions et donc de potentielles avancées. Afin d'aboutir à une classification du cas la plus précise possible ces nouvelles informations et caractérisations génétiques de la tumeur doivent être discutées de concert avec les données anatomopathologiques et cliniques.

L'objectif de ce travail est d'aboutir à une caractérisation du groupe des LFF entre LHC et LBDGC, et des LBDGC-NOS-EBV, en intégrant les données anatomopathologiques, moléculaires et phénotypiques, en corrélation avec les éléments cliniques et de survie. L'hypothèse étant qu'une caractérisation moléculaire permettra une meilleure compréhension de la lymphomagenèse et donc une meilleure prise en charge.

Dans l'introduction, nous étudierons en détail les données de la littérature existante sur les LHC et LBPM, en intégrant les dernières études mettant en exergue leurs anomalies

moléculaires respectives. Nous nous attacherons à mettre en lumière leurs similitudes et différences. Les données existantes sur les LFF et LBDGC-NOS-EBV seront présentées dans une dernière partie.

I. Diagnostic et Anatomopathologie des LH et LBPM

I.A. Classification OMS et terminologie

I.A.1. Lymphomes de Hodgkin

Les LH représentent près de 15% de tous les lymphomes, sa première description remontant à il y a plus de 170 ans avec Thomas Hodgkin qui rapporta les premiers éléments de la maladie qui prendra son nom(Hodgkin 1832). Les cellules tumorales de Hodgkin mononuclées et multinuclées de Reed-Sternberg (RS) ont été décrites en 1898 et 1902 par Dorothy Reed et Carl Sternberg dans deux travaux indépendants(Reed 1902; Sternberg 1898). C'est à la fin des années 1990 que le terme « lymphome de Hodgkin » a pris le pas devant la « maladie de Hodgkin », avec la découverte de l'origine lymphocytaire B centro-germinative et clonale des cellules de RS(Kanzler et al. 1996; Bräuninger et al. 1999; Swerdlow et al. 2016; Theresa Marafioti et al. 2000).

En 1994, sur des données morphologiques, phénotypiques, génotypiques et cliniques, deux différents sous-types de LH ont été individualisés au sein de la classification REAL (revised European-American Lymphoma Classification) : le lymphome de Hodgkin classique (LHC), représentant la grande majorité des cas, et le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire (LHNPL)(Harris et al. 1994), comportant 5 à 10% des cas. Le LHNPL se distingue du LHC à travers différents points :

- le phénotype de la cellule tumoral dans le LHNPL montre, contrairement au LHC, une préservation des marqueurs lymphocytaires B (Brune et al. 2008)) et l'absence d'expression du CD30 ou du CD15(Venkataraman et al. 2011).
- Sur le plan morphologique, le LHNPL se caractérise par la présence de cellules typiques, dites « popcorn » ou à prédominance lymphocytaire (cellules LP), entourées de lymphocytes T se disposant en rosette et exprimant PD1/CD279. Des études récentes ont par ailleurs mis en évidence que les cellules LP n'expriment pas PD-L1 (CD274) ni PD-L2 (PDCD1LG2)(JR, A, and BL 2017), contrairement aux cellules de RS du LHC.

Ainsi, la distinction entre LHC et LHNPL ne fait pas débat et ce dernier ne sera pas abordé d'avantage dans l'introduction. Le LHC peut être divisé en 4 sous-types présentant chacun une architecture et une composition du MET particulière mais des cellules tumorales ayant le même phénotype (à contrario du LHNPL) : le lymphome de hodgkin scléro-nodulaire (SN, 70% des cas), à cellularité mixte (CM, 20-25% des cas), riche en lymphocyte (RL, 5% des cas) et à déplétion lymphocytaire (DL, moins de 1% des cas).

I.A.2. Lymphome B primitifs du médiastin

Les LBPM font partie de la grande branche des lymphomes non-hodgkiniens (LNH) et en représente 2 à 3%(Swerdlow et al. 2016). Longtemps considéré comme un sous-type de LBDGC (6-10% des cas) et classé avec les lymphomes du centre germinatifs (CG) ou avec lymphomes immunoblastiques sous la classification de Kihel(Lennert et al. 1992), en 2001 le LBPM est devenu une entité à part dans la classification OMS. Les différences cliniques, anatomopathologiques et moléculaires avec le LBDGC sont maintenant bien claires(Swerdlow et al. 2016). Une large étude épidémiologique Américaine (base SEER) a permis d'estimer son incidence annuelle à 0,4 par millions d'habitant, l'incidence étant la même en fonction de l'origine ethnique, avec un pic entre 30 et 39 ans. En revanche, le sexe ratio de 3 femmes pour 1 homme ne se retrouvait qu'au sein de la population d'origine caucasienne. L'augmentation de l'incidence observée dans cette étude entre 2001 et 2012 est probablement le reflet d'un meilleur diagnostic de l'entité(Liu et al. 2016).

I.B. Diagnostic clinique et anatomopathologique

I.B.1. Présentation clinique

I.B.1.a. Lymphome de Hodgkin Classique

Un premier pic d'incidence est noté vers 15-35 ans et un second plus tard, vers 50 ans. La répartition des sous-types est distincte en fonction de l'âge de survenue : le LH-CM ayant une distribution bimodale non observée dans le LH-SN. Une prédominance masculine est observée dans les 3 sous-types les moins fréquents, alors que le LH-SN touche

préférentiellement les femmes. L'incidence ajustée à l'âge est de 2,8 cas pour 100 000 habitants, sans augmentation récente.

Les patients se présentent préférentiellement avec une atteinte ganglionnaire, touchant généralement une ou deux aires, souvent cervicales (75%), médiastinales (sous-type SN), axillaires, et para-aortiques. Rarement des aires extra-ganglionnaires sont touchées. Près de 60% des patients ont une maladie localisée au diagnostic. L'atteinte splénique n'est cependant pas rare (20%) et associée avec un risque d'atteintes extra-ganglionnaires. En revanche, l'atteinte médullaire est plutôt rare (5%). Dans près de 40% des cas, des symptômes B (c'est-à-dire sueurs nocturnes, fièvre, et perte de poids) sont présents, tout comme un prurit se majorant à la prise d'alcool.

L'infection par l'EBV (Epstein Barr Virus) joue un rôle physiopathologique dans certains sous-types, notamment les formes à CM (prévalence à 75%) et DL (Swerdlow et al. 2016) ou encore les formes de LHC de l'immunodéprimé (HIV), le sous-type SN n'étant relié à l'EBV que dans 10 à 25% des cas. Dans certaines régions tropicales ou pays en voie de développement, 100% des cas sont rapportés comme reliés à l'EBV (Delsol et al. 1993; Kapatai and Murray 2007; Weinreb, R Day, et al. 1996; Weinreb, Day, et al. 1996). Sur le plan physiopathologique, il est possible que l'infection par l'EBV remplace certaines anomalies génétiques nécessaires au développement du LHC. La perte de l'immuno-surveillance chez les immunodéprimés pourrait favoriser le développement du LHC associé à l'EBV, avec une latence plus volontiers de type I, comme suggéré par le fait que près de 100% des LHC chez les patients VIH sont reliés à l'EBV. Enfin, les cellules infectées par l'EBV expriment LMP1 et EBNA1 sans EBNA2, un patronne caractéristique de la latence de type II retrouvé chez les patients non-immunodéprimés, avec un rôle transformant et anti-apoptotique potentiel fort pour LMP1 (Delsol et al. 1992).

La physiopathologie de l'EBV sera développée dans la troisième partie, en lien avec les autres LNH-B à grandes cellules reliés à EBV.

I.B.1.b. Lymphome B primitif du médiastin

Affectant principalement les femmes jeunes (sexe ratio de 2 à 3 pour 1) entre 30 et 40 ans, la présentation habituelle du LBPM est une volumineuse masse, de plus de 10 cm dans 60 à 70% des cas, située au niveau du médiastin antérieur et de l'aire thymique. Les

adénopathies supra-claviculaires ou cervicales ne sont pas rares. Le LBPM peut aussi survenir chez l'adolescent, avec la même présentation clinique et pathologique(Seidemann et al. 2003). Contrairement aux LBDGC, la moelle est rarement atteinte et l'extension tumorale est généralement locale avec 80% de stade I-II au diagnostic. L'atteinte pulmonaire, pleurale et péricardique et souvent réactionnelle ou parfois tumorale par contiguïté. L'envahissement sous diaphragmatique et les stades III sont rares au diagnostic (K. J. Savage et al. 2006; Hamlin et al. 2005). Lors des rechutes les atteintes extra-ganglionnaires ne sont pas rares, avec des localisations rénales, surrénaliennes, hépatiques et du système nerveux central(T. F. E. Barth et al. 2002b; Lazzarino et al. 1997; Cazals-Hatem et al. 1996).

Les symptômes au moment du diagnostic sont reliés à la masse médiastinale et à la compression qu'elle provoque sur les structures lymphatiques et vasculaires : syndrome cave supérieur, symptômes B et dans un tiers des cas des épanchements pleuraux et/ou péricardiques(Aoki et al. 2014; Zinzani et al. 2002).

L'existence de formes extra-médiastinales pures a été suggérée dans des études de profil d'expression génique (PEG)(Rosenwald et al. 2003; Kerry J. Savage et al. 2003; Yuan et al. 2015). Cependant, ce concept est remis en question au fur et à mesure du démantèlement moléculaire de l'entité(Duns et al. 2019).

I.B.2. Anatomopathologie

I.B.2.a. Les cellules tumorales du lymphome de Hodgkin Classique

Le LHC se caractérise par un infiltrat inflammatoire très riche composé de lymphocytes, monocytes, éosinophiles, mastocytes et histiocytes, les cellules tumorales représentant rarement plus que 1% de l'infiltrat cellulaire. Le phénotype des cellules de RS est singulier par la co-expression de marqueurs de différentes lignées hématopoïétiques (lymphocytaire B, T ou d'origine myéloïdes) avec une expression constante du CD40 (TNFRSF5) et du CD30 (TNFRSF8). Le CD30 est une protéine glycosylée transmembranaire membre de la famille des TNFR (tumor necrosis factor receptor), et physiologiquement exprimée par de rares cellules B et T activées au sein des tissus lymphoïdes(B. Falini et al. 1995) ou lors de l'infection par l'EBV sur les cellules B(Kurth et al. 2000). Son expression aberrante est un élément clé du diagnostic

de LHC. Les cellules de Hodgkin et RS expriment également le facteur de transcription IRF4/MUM1 et le CD15 (75%) de manière variable (potentiellement restreint à certaines cellules tumorales et à leur compartiment golgien), sans exprimer le CD45 (marqueur pan-leucocytaire) ni la chaîne J des immunoglobulines, le CD68 (marqueur macrophagique). Le facteur de transcription B PAX5 est exprimé dans 95% des cas avec un marquage cependant plus faible que celui des lymphocytes B du microenvironnement (ME). Parmi les marqueurs des autres lignées hématopoïétiques, les cellules de RS peuvent exprimer les marqueurs T, avec une préférence pour le CD2 et le CD4, granzyme B et perforine (cytotoxique), fascin (ou C-C chemokine 17 des cellules dendritiques) ou CSF1R et $\alpha 1$ antitrypsine (myéloïde)(Swerdlow et al. 2016).

Le LHC est donc défini par la présence, en faible nombre, de cellules tumorales typiques : les cellules mononucléées de Hodgkin et bi ou multi-nucléées de RS exprimant le CD30+ au sein d'un MET très riche. Des études sur lignées cellulaires ont mis en évidence que les cellules de Hodgkin subissaient souvent une division cytoplasmique (ou cytokinèse) incomplète et que les cellules de RS étaient générées par la fusion entre deux cellules sœurs toujours connectées par des microtubules (Rengstl et al. 2013; Xavier de Carvalho et al. 2015). Ces études ont par ailleurs confirmé le faible pouvoir proliférant des cellules de RS, par rapport aux cellules de Hodgkin(Ikeda et al. 2010) dont une partie semblerait avoir la capacité de renouveler le clone tumorale(Nakashima et al. 2010; Küppers 2010; Shafer et al. 2010).

I.B.2.b.Expression en immuno-histochimie des marqueurs B dans le LHC

Mis à part PAX5, les marqueurs B (CD20, CD79a, OCT-2, BOB1) ne sont en général pas exprimés au niveau membranaire ni nucléaire. Si l'expression du CD20 peut être retrouvée dans 30 à 40% des cas, seulement une minorité de cellules sont positives et l'intensité est faible(Schmid et al. 1991; Tzankov et al. 2003; Benharroch, Nalbandyan, and Lazarev 2015). L'expression de l'antigène associé aux cellules B, CD79a, est plus rare. La valeur pronostique de l'expression du CD20 est toujours débattue : Dans l'étude de Rassidakis et al.(Rassidakis et al. 2002), 22% des cas exprimaient le CD20, avec un seuil de positivité défini à une seule cellule positive. Aucune différence en survie sans progression n'était observée entre les deux groupes, même lorsqu'un seuil de positivité plus élevé (5%) était choisi. Ceci a été confirmé dans une série Japonaise incluant 389 LHC dont 74 était CD20 positifs (ie expression sur plus

de 5% des cellules tumorales) (Ahmed Ali Elsayed et al. 2014). En revanche, Canioni et al (Canioni et al. 2009) ont par la suite rapporté que l'expression du CD20 (i.e. expression sur plus de 10% des cellules tumorales, toujours hétérogène sur les cellules tumorales) était plus importante chez les patients non-répondeurs à la chimiothérapie (34% des cellules de RS versus 15% chez les répondeurs). En analyse multivariée, une expression du CD20 supérieure à 30% des cellules tumorales était indépendamment associée avec une moins bonne survie.

L'expression des facteurs de transcription Oct2 et BOB1 a également été rapportée dans la littérature mais dans peu de série et avec une incidence faible (Torlakovic et al. 2001; Hertel et al. 2002; Stein et al. 2001), allant de 0% (3 séries sur 4) à 9% (une série de 32 cas) des cas pour Oct2 et 0% à 25% pour BOB1.

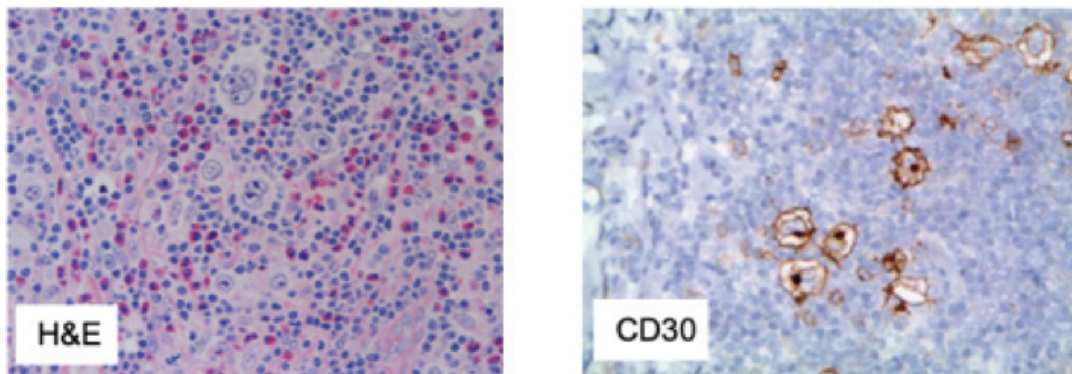


Figure 1: Cellules tumorales de Hodgkin et Reed-Sternberg exprimant le CD30.

I.B.2.c. Les 4 sous-types de lymphomes de Hodgkin

I.B.2.c.i. LH scléro-nodulaire (SN)

Il s'agit du sous-type le plus fréquent (70 - 80% des cas) touchant principalement les adolescents. Sur le plan clinique, les patients atteints d'un LH-SN se présentent généralement avec un envahissement médiastinal de gros volume. Sur le plan histologique, de larges bandes fibreuses définissent des compartiments nodulaires contenant l'infiltrat typique composé de cellules de RS, de Hodgkin, mais également d'un MET riche (cellules épithéliales, cellules T, polynucléaires neutrophiles (PNN), polynucléaires éosinophiles (PNE), macrophages...). Suite à des artefacts techniques, les cellules de RS et de Hodgkin peuvent apparaître dans des espaces pseudo-lacunaires, responsable de cette dénomination de « cellules lacunaires » par Luke et al en 1966. Sclérose, architecture nodulaire et cellules lacunaires sont les principales

caractéristiques du LH-SN. Certaines cellules tumorales peuvent apparaître momifiées, illustrant un processus d'apoptose en cours. Les nodules peuvent contenir quelques éléments focaux de nécrose. La composition du MET, même si globalement très riche, peut être variable, comportant de nombreux petits lymphocytes B avec un phénotype de cellules du manteau. Par ailleurs, la sécrétion de cytokines par la cellule tumorale attire d'autres éléments inflammatoires comme des lymphocytes T, histiocytes, plasmocytes et PNE formant ainsi un nodule en lieu et place des follicules normaux. Des cellules folliculaires dendritiques peuvent également se trouver dans les nodules (Agostinelli 2011).

Le groupe de recherche britannique BNLI (British National Lymphoma Investigation) (Bennett et al. 1983; Ferry et al. 1993) a proposé une sous-classification des LH-SN, en deux différents grades. Cette classification repose sur le degré de cellularité au sein des nodules, la quantité de sclérose ainsi que le nombre et les atypies des cellules tumorales. Cette classification n'est pas utilisée en routine et tend à disparaître.

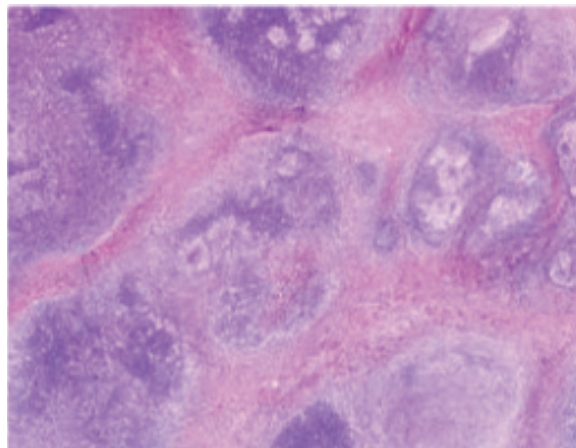


Figure 2: Lymphome de Hodgkin scléro-nodulaire.

I.B.2.c.ii. LH à cellularité mixte (CM)

Ce sous-type représente 15 à 25% des cas. Il est plus fréquemment relié à l'EBV, et touche préférentiellement les enfants et les sujets âgés ou immunosupprimés avec une distribution de l'incidence selon l'âge bimodale. Le ganglion atteint présente un effacement complet de l'architecture avec un infiltrat diffus contenant des histiocytes et des éosinophiles et une localisation souvent para-corticale. La nécrose est généralement absente et la capsule ganglionnaire préservée. Le terme LHC à CM reflète la composition cellulaire réactionnelle du

MET, c'est-à-dire plasmocytes, histiocytes, éosinophiles et cellules lymphocytaires T qui forment des rosettes autour des cellules tumorales. Les cellules tumorales de RS sont nombreuses et facilement identifiées, sans élément lacunaire ni popcorn. Elles peuvent parfois apparaître momifiées comme dans le LH-SN.

I.B.2.c.iii. LH riche en lymphocytes (RL)

Admis dans la classification suite à différents groupes de travail de l'EAHP (European Association of HematoPathologist) en 1994 et 1995, le LH-RL est caractérisé par une richesse en lymphocytes au sein de son MET. Il se divise également en deux sous-groupes : nodulaire et diffus (McBride et al. 1996; Hansmann and Kuppers 1996). Le variant nodulaire est le plus fréquent et se caractérise par la présence de cellules de RS typiques et de petits centres germinatifs en périphérie, d'histiocytes, mais pas de PNN ni PNE. Dans près de 50% des cas, l'EBV est identifié dans les cellules tumorales. L'infiltrat réactionnel est composé d'une abondance de cellules B du manteau (IgD+ et IgM+) et un nombre variable de lymphocytes T CD3+ (généralement CD57+), en rosettes autour des cellules tumorales. Un réseau de cellules folliculaires dendritiques peut être identifié à l'aide du CD21, avec une meilleure définition à proximité des centres germinatifs résiduels. Sur le plan clinique, les patients atteints de LH-RL sont généralement plus âgés (50 ans et plus) avec une atteinte localisée sous diaphragmatique, rarement médiastinale, généralement de faible volume et non associée à des symptômes B.

I.B.2.c.iv. LH à déplétion lymphocytaire (DL)

Ce variant est le plus rare, ne comportant que près de 1% des cas, et est associé à un pronostic plus défavorable avec une maladie souvent disséminée et un envahissement médullaire dans plus de 50% des cas. Il survient généralement chez l'adulte, avec une atteinte principalement ganglionnaire au niveau cervical ou des anneaux de Waldeyer et un stade préférentiellement localisé. L'EBV est retrouvé dans 30 à 50% des cas (Anagnostopoulos et al. 2000; Nam-Cha et al. 2009). Le LH-DL se caractérise par la faible abondance du composant lymphocytaire et la relative abondance des cellules tumorales (Kinney et al. 1986).

I.B.2.d. Le lymphome B primitif du médiastin

Le LBPM se caractérise par des plages de cellules de taille moyennes à grandes contenant un cytoplasme abondant, pâle, encore appelées cellules claires, avec un noyau de forme ovoïde. Une importante hétérogénéité est cependant observée entre les cas. La prolifération diffuse est souvent compartimentée par de la fibrose dite alvéolaire (T. F. E. Barth et al. 2002a; Cazals-Hatem et al. 1996; MENESTRINA et al. 1986; Möller et al. 1986). Dans certains cas, les cellules tumorales ont été rapportées comme relativement pléomorphes et/ou multilobées ressemblant aux cellules de RS. En cas d'expression forte et intense des marqueurs du LHC (i.e. CD30), l'appartenance de ces cas au spectre des LFF peut se discuter.

Sur le plan phénotypique, les LBPM expriment CD45 et les antigènes lymphocytaires B (CD20, CD79a, CD19, CD22, PAX5) mais pas d'immunoglobuline (IG) de surface, en dépit d'un réarrangement fonctionnel au niveau des gènes IG et de l'expression des facteurs de transcriptions OCT2, PAX5, BOB1 et PU1 (Kanavaros et al. 1995; Loddenkemper et al. 2004; Weinberg et al. 2015). Des études de cytométrie de flux (CMF) ont cependant mis en évidence une expression des chaînes légères des IG dans 50% des cas (Weinberg et al. 2015). Le CD30 est présent dans plus de 80% des cas, mais avec un marquage faible et hétérogène par rapport au LHC. Dans une minorité de cas, l'expression du CD15 peut être retrouvée (Swerdlow et al. 2016). Les cellules tumorales sont généralement positives pour IRF4/MUM1 (75% des cas) et BCL6 (45-100%), suggérant une origine post centro-germinative (Klein 2003 PNAS), et ont une expression variable de BCL2 (55-80%), et plus rare de CD10 (8-32%). L'association avec l'EBV est exceptionnelle avec de très rares cas rapportés dans la littérature. Contrairement aux LBDGC et aux LHC, approximativement 70% des LBPM expriment MAL et CD23 (Christiane Copie-Bergman et al. 2002; C Copie-Bergman et al. 1999; Gentry et al. 2017). MAL se situe dans le compartiment membranaire riche en glycolipide impliqué dans le trafficking membranaire médié par les radeaux lipidiques et la transduction du signal. Comme dans le LHC et contrairement au LBDGC, l'expression aberrante des ligands des check-points immunitaires PD-1, PD-L1 et PD-L2, est également fréquente (Calaminici et al. 2004) (cf. chapitre sur échappement au système immunitaire), ou encore celle aberrante du marqueur de cellules dendritiques TNFAIP2 (Kondratiev et al. 2011). La perte d'expression des molécules du CMH de classe I ou II est également fréquemment observée (Möller et al. 1986) (cf. chapitre

sur échappement au système immunitaire). L'expression de MYC peut se voir dans près de 30% des cas, sans lien avec de potentielles anomalies génomiques en FISH(K. D. Li et al. 2015). Les cellules tumorales sont aussi positives pour CD54, FAS (CD95), et co-expriment TRAF1 et REL (expression nucléaire)(Rodig et al. 2007; Zamò et al. 2005). L'expression de FIG-1 (IL4 induced protein 1) retrouvée dans le LBPM est un autre élément discriminant avec le LBGC(Christiane Copie-Bergman et al. 2003) et probablement en lien avec des voies cytokiniques activées.

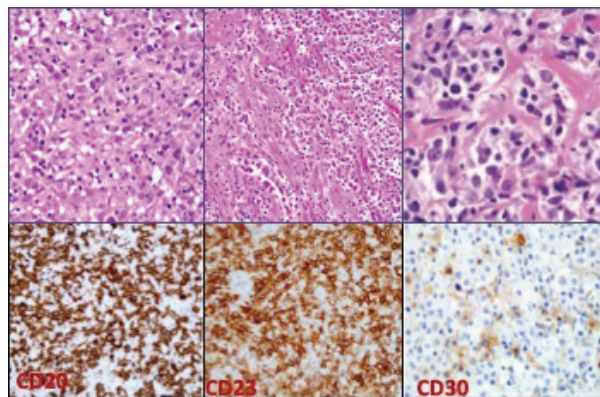


Figure 3: Morphologie et IHC d'un cas typique de LBPM.

A, B et C : H&E ; D : marquage CD20 ; E : marquage CD23 ; F : marquage CD30.

Tableau 1: Présentation clinique, et anatomopathologique des LHC et LBPM

		LBPM	LHC-SN
<i>Clinique</i>	Age	30-40 ans	30 ans
	Sexe	Femme	Femme
	Envahissement	Médiastin antérieur	Médiastin antérieur/ADP supraclaviculaire/axillaire
<i>Anatomopathologie</i>	Sous-diaphragmatique	Rare	Faible
	Moelle	-	+/-
	Stade localisé	80%	60%
	ME	+	+++
	Richesse cellules tum.	+++	+
	CD45	+	-
	Marqueurs B	CD20, CD19, CD22, CD79a	PAX5
	Marqueurs CG (BCL6, IRF4, MUM1)	+	+
	CD30	+/-	+++
	MAL, CD23	+	-

Les LFF, ont été décrit comme ayant une morphologie intermédiaire entre les LHC préférentiellement SN et les LBPM, les formes intermédiaires entre LBDGC et autres types de LHC sont-elles à ce jour moins fréquemment décrites.

I.B.2.e. Prise en charge thérapeutique

Sur le plan thérapeutique, la prise en charge est différente entre LHC et LBPM. Les patients atteints de LBPM seront préférentiellement traités par une poly-chimiothérapie à base d'anthracycline, soit du CHOP (Table 2), soit de l'ACVBP (dose plus importante) toujours en association avec un anticorps ciblant le CD20 : le rituximab (Giulino-Roth 2018). Les patients atteints de LHC recevront eux un traitement adapté au stade de la maladie et aux facteurs de risque (Longo and DeVita 2018). Brièvement, les stades localisés recevront préférentiellement de l'ABVD et les stades disséminés du BEACOPP (Table 2). Dans le LHC, les avancées récentes suggèrent que l'ajout d'un anticorps ciblant le CD30, le brentuximab vedotin (BV), dès la première ligne, permettrait d'alléger la chimiothérapie pour les sujets âgés notamment (Connors et al. 2018). L'utilisation du BV n'est cependant pas encore universelle en première ligne, même si en rechute c'est une des options de choix, avec l'immunothérapie ciblant les immune-checkpoint (cf. infra). Le BV n'a en revanche pas démontré d'efficacité spectaculaire dans le LBPM (Zinzani, Ribrag, et al. 2017).

La table 2 souligne les distinctions de prise en charge entre LHC et LBPM : régime de PCT différents, anticorps différents mais aussi utilisation de la radiothérapie différente, plus fréquente dans les formes localisées de LH, et maintenant délaissée dans le LBPM du fait de sa forte toxicité.

Tableau 2: Différents types de chimiothérapie dans le lymphome B primitif du médiastin et lymphome de Hodgkin classique.

Schéma de traitement	Doses
RCHOP	Dose J1-J21
Rituximab	375mg/m ² J1
Prednisone	60mg/m ² J1-J5
Oncovin	1.4mg/m ² J1
Cyclophosphamide	750mg/m ² J1
Doxorubicin	50mg/m ² J1
RACVBP	Dose J1-J15
Rituximab	375mg/m ²
Prednisone	60mg/m ² J1-J5
Oncovin	2mg/m ² J1, J5
Cyclophosphamide	1200mg/m ² J1
Doxorubicin	75mg/m ² J1
Bleomycin	10mg J1, J5
ABVD	Dose J1-J15
Adriamycin	25mg/m ²
Bleomycin	10mg/m ²
Vinblastine	6mg/m ²
Dacarbazine	370mg/m ²
escBEACOPP	Dose / D21
Bleomycin	10UI/m ² D1-D3
Etoposide	200mg/m ² D1-D3
Doxorubicine	35mg/m ² D1
Cyclo.	1200 mg/m ² D1
Vincristine	1.4mg/m ² D8
Procarbazine	100mg/m ² D1-D7
Prednisone	10mg/m ² D1-D7

RCHOP et RACVBP : LBPM, ABDV et escBEACOPP : LHC

Après avoir décrit les caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des LHC et LBPM, la deuxième partie de l'introduction va aborder l'origine cellulaire de ces lymphomes, ainsi que

les données de profil d'expression génique, permettant d'aborder le phénotype tumoral mais aussi le MET.

II. Origine cellulaire et profil d'expression génique des LHC et LBPM

II.A. Origine Cellulaire

II.A.1. Le lymphome de Hodgkin

II.A.1.a. Une cellule B centro-germinative pré-apoptotique

Dans la grande majorité des cas, les segments variables d'IG des cellules de Hodgkin et de RS sont réarrangés et comportent des hyper-mutations somatiques (HMS)(Kuppers et al. 1994a; Kanzler et al. 1996) aboutissant à une IG non-fonctionnelle (mutations non-sens)(Bräuninger et al. 2003; Kuppers et al. 1994b). Dans le centre germinatif, de telles mutations conduisent normalement à la mort de la cellule par apoptose. Ceci signifie que la cellule de RS peut avoir pour origine une cellule centro-germinative B endommagée, sur la voie de l'apoptose ou pré-apoptotique, suite à l'acquisition de mutations désavantageuses (par exemple responsables d'une perte d'affinité du récepteur B empêchant une sélection antigénique), mais sauvée de l'apoptose grâce à d'autres processus transformant. Autre argument en faveur de l'origine B, les lignées cellulaires de LH, ainsi que les cellules de RS primaires, ont subi un switch au niveau des chaînes lourdes des IG, processus ne survenant qu'au sein de cellules B activées par l'antigène(Irsch et al. 2001; Martín-Subero et al. 2006).

La relation clonale de certains rare cas de lymphomes composites, i.e. présentant une composante LH et une LBPM au diagnostic avec des mutations partagées au niveau des segments variables d'IG et d'autres distinctes, démontre que les deux lymphomes dérivent d'un même précurseur B mature centro-germinatif(Bräuninger et al. 1999; T Marafioti et al. 1999; Traverse-Glehen et al. 2005).

II.A.1.b. Une cellule B CD30+

Dans de récents travaux portant sur une caractérisation approfondie des cellules B CD30+, Weniger et al (Marc A. Weniger et al. 2018) ont mis en évidence que leur profil d'expression génique (PEG) est distinct de celui des cellules B centro-germinatives conventionnelles, mémoires ou des plasmocytes et de manière intéressante, plus proche de celui des cellules de RS. Celui-ci repose largement sur une forte expression de *MYC*. En comparaison à leur probable « contrepartie » normale B-CD30+, les cellules de RS présentent une drastique diminution de l'expression des gènes impliqués dans la stabilité génétique et la division cellulaire.

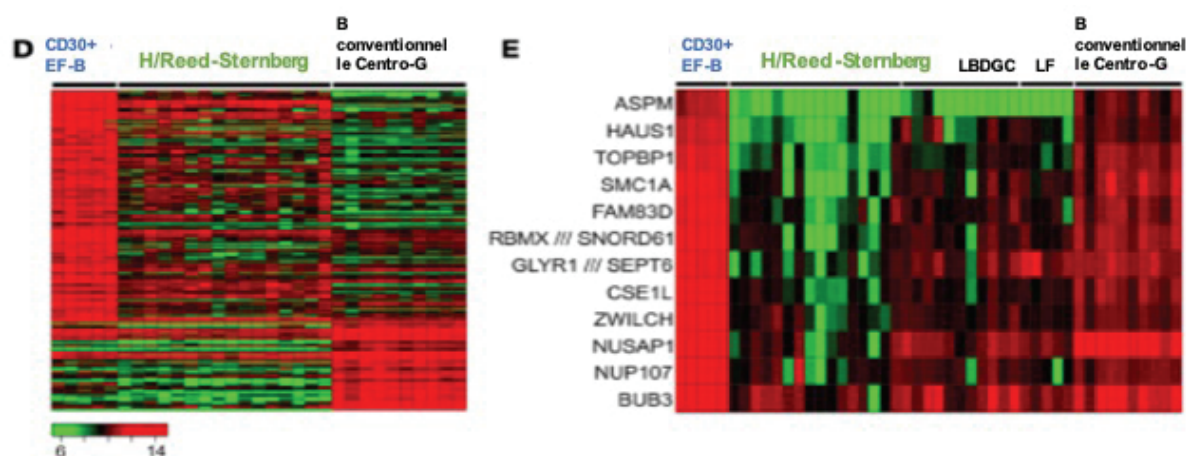


Figure 4: Profil d'expression des cellules B CD30+.

Profil d'expression des cellules B extra-folliculaires (EF) CD30+, en comparaison à celui des cellules de Hodgkin et cellules B conventionnelles du centre germinatif. Le panel de gauche souligne qu'en analyse supervisée reposant sur les gènes différemment exprimés entre cellules CD30+ extra-folliculaires et cellules B centro-germinative, les cellules primitives de RS se positionnent à proximité des cellules EF CD30+, et clairement distinctement des cellules B centro-germinative conventionnelle. Le panel de droite souligne la sous-expression de 12 gènes dans les cellules de RS, impliqués dans la régulation de la ploïdie, cytokinèse et division cellulaire. Adapté, d'après (Marc A. Weniger et al. 2018). LBDGC : lymphome B diffus à grandes cellules ; LF : lymphome folliculaire ; H : Hodgkin.

II.A.2. Le lymphome B primitif du médiastin

Dans le LBPM, la présence d'un réarrangement des chaînes lourdes des IG, d'un fort taux d'HMS, d'un switch (Leithäuser et al. 2001), mais aussi l'expression de *BCL6*, d'*IRF4*, ainsi

que l'existence d'HMS aberrantes au niveau de loci non-IG (*BCL6*, *MYC*, *PAX5*, *PIM1*, *RHOH* et *SOCS1*(Rossi et al. 2005; Tzankov et al. 2003; Pileri et al. 2003)) sont considérés comme des preuves indiquant le passage de la cellule tumorale dans le centre germinatif (CG). Certaines études ont mis en évidence la présence du transcrit d'*AID* dans le LBPM, en faveur d'un mécanisme d'HMS actif(Okazaki et al. 2003; Bödör et al. 2005), mais ceci reste débattu(Leithäuser et al. 2001). De manière intéressante, la répartition spatiale et les motifs cibles des HMS au niveau de la région 5' non codante de *BCL6* sont différentes de celles retrouvées dans le LBDGC ou le lymphome folliculaire, suggérant une évolution singulière propre au LPBM(Malpeli et al. 2004).

La localisation anatomique et la présence de réminiscences thymiques pourraient laisser penser que l'origine cellulaire serait une cellule B thymique, celui-ci étant reconnu pour contenir un set complexe de cellules B transitoires et résidentes exprimant une variété de marqueurs avec une intensité également variable(ADDIS and ISAACSON 1986). De plus, le profil d'expression IHC du LBPM (CD5-, CD19++, CD20++, CD21-, CD22++, CD23+, Ig+/-, MAL+) est en faveur d'une origine B médullaire-thymique(Al-Sharabati et al. 1991). Cependant, certaines données comme la perte d'expression de CD21 et le phénotype CD37++, CD43-, CD45+ élargissent le débat en faveur d'un sous-groupe de cellules B qui aurait migré secondairement dans la médulla thymique(Takaba and Takayanagi 2017; Gies, Guffroy, and Korganow 2017; T. F. E. Barth et al. 2002a; Steidl and Gascoyne 2011; Moldenhauer et al. 2006; Perera et al. 2013; Akashi et al. 2000). L'origine cellulaire des LBPM n'est pas complètement fixée. De plus, de récentes données moléculaires contredisant l'existence de cas extra-médiastinaux favorisent la première hypothèse et une origine cellulaire B thymique bien à part pour ces lymphomes(Duns et al. 2019).

En physiologie, la fonction de la cellule B thymique dans le cadre de l'acquisition d'une tolérance centrale lymphocytaire T est mieux comprise, cependant les connaissances sur son origine exacte restent limitées. En effet, l'existence potentielle d'un progéniteur lymphocytaire commun intra-thymique et la capacité des cellules B thymiques à re-circuler en dehors du thymus restent des points mal compris(Gies, Guffroy, and Korganow 2017; Yamano et al. 2015).

II.B. Phénotype moléculaire et programme de transcription dans le lymphome de Hodgkin

La principale difficulté pour aborder l'étude de la cellule tumorale dans le LH est la faible infiltration tumorale et donc la faible représentativité de la cellule lymphomateuse au sein de la biopsie. Les premières études ont donc utilisé des lignées cellulaires (L1236, L428, KMH2, HDLM2) afin d'améliorer la caractérisation de cette entité puis des techniques d'enrichissement en cellules tumorales, telles que la microdissection au laser (MDL) ou le tri cellulaire en CMF, ont permis d'aborder les caractéristiques moléculaires de la cellule tumorale avec plus de précision.

II.B.1. Perte du programme de différenciation lymphocytaire B

II.B.1.a. Une implication fonctionnelle ?

La perte d'expression (ARNm) des gènes du programme lymphocytaire B (*CD79A/B*, *OBP*, *CD22*, *SWAP-70*, *CD20*, *CD180*, *CD19*, *Igk*, *BLNK*, *A-myb*, *OCT-2*), y compris de molécules importantes dans la signalisation B (*Syk*, *Lyn*, *Blk*), est une marque du LHC (Puce Affy U95A(Schwering et al. 2003)). D'un point de vue fonctionnel, cette perte d'expression pourrait conférer un avantage en survie à la cellule de RS qui verrait la pression de sélection diminuer au sein du CG. Ceci est une particularité fondamentale dans la lymphomagenèse du LHC par rapport aux autres LNH. En plus de l'expression de *PAX5*, seule celle de *B7.1/B7.2*, *CD40*, d'autres marqueurs B permettant une interaction avec le lymphocyte T CD4, a pu être détectée au sein de lignées cellulaires de LH à un taux comparable ou supérieur à celui du contrôle B normal(A. Carbone et al. 1995; Van Den Hove et al. 1997). Ceci suggère qu'une communication avec le lymphocyte T CD4 helper est importante pour la survie de la cellule de RS. L'expression du CMH de classe II peut-être retrouvée, mais sa perte est également mise en évidence dans une partie des cas (cf. chapitre sur l'échappement à la réponse immune).

II.B.1.b. Régulation transcriptionnelle des éléments clés de la différenciation B

Si l'expression d'un groupe de facteurs de transcriptions B (FT) est perdue (*OCT-2*, *PU.1*, *BOB1*, *FOXO1*, *ETS*) de manière quasi homogène, celle d'autres est maintenue, parfois même à un niveau élevé (*PAX5*, *E2A*, *IRF4*) (Swerdlow et al. 2016). Des anomalies génétiques ont été mises en évidence pour certains de ces FT (*ETS1* (Overbeck et al. 2012), *OCT-2* et *BOB1* (Re et al. 2001)) et pourraient expliquer en partie cette perte. Cependant, les origines de la modulation d'expression sont plus complexes comme en atteste la possible expression résiduelle de certains marqueurs (*CD20*, *BCL6*, *BLIMP1*) (Buettner et al. 2005; Brunangelo Falini et al. 1996) ou encore la réactivation in vitro de certains gènes de la lignée B suite à la reconstitution de *FOXO1*, *EBF1* ou *CD99* (Bohle Leukemia 2013, Huang Int J Cancer 2012, Vogel Blood 2014) ou à l'inhibition de *NOTCH1* (Jundt Leukemia 2008). Une hypoxie transitoire à un stade précoce du développement du LHC (Wein Haematologica 2015), ou encore l'épigénétique, et notamment une hyperméthylation inactivatrice sont d'autres sources de modulation (García 2006; Doerr et al. 2005; Ushmorov et al. 2006) aboutissant à cette perte d'expression des marqueurs B, mais aussi à la surexpression d'autres facteurs antagonistes (comme *ABF-1*, *ID2*, *NOTCH1*).

Parmi les FT surexprimés, *ABF-1* (activated B cell factor), *ID2* (inhibitor of differentiation and DNA binding 2) et *NOTCH1* vont agir de concert pour bloquer les éléments du programme B, comme *E2A* (*TCF3*), *EBF1* ou *PAX5* (F. Jundt et al. 2008; Mathas et al. 2006; Renné et al. 2006). *ID2* va se lier aux facteurs de transcription B E12 et E47, codés par *E2A*, et inhiber leur liaison à l'ADN. De même, *ABF-1* va former des complexes hétérodimériques avec E12 et E47 conservant une capacité de liaison à l'ADN, mais sans fonction activatrice. Le récepteur pro-oncogénique *NOTCH1*, lui aussi considéré comme inhibiteur de la différenciation lymphocytaire B, est probablement activé dans les cellules de RS via la stimulation de son ligand Jagged-1 produit par les cellules du ME d'une part (F. Jundt et al. 2008) et via la perte d'expression de son régulateur négatif, Deltex 1 (Mathas et al. 2006) d'autre part. Enfin, en se liant à *PAX5* dans les lignées de LHC, *NOTCH1* peut également altérer sa fonction (F. Jundt et al. 2008).

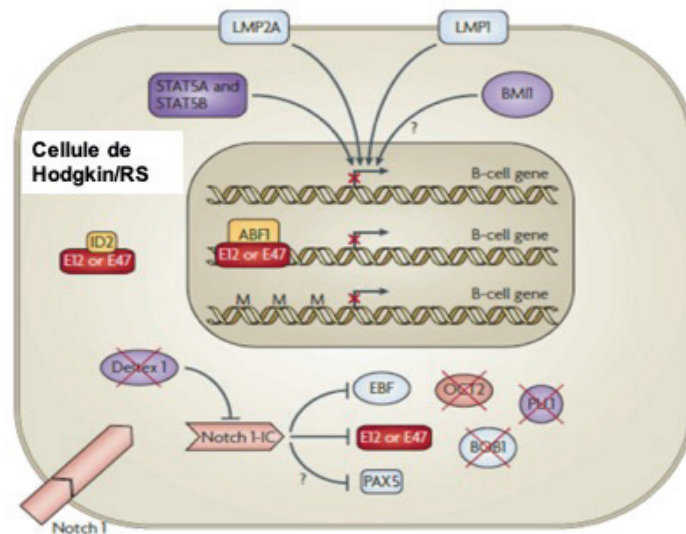


Figure 5: Éléments clés dans la reprogrammation de la cellule tumorale dans le LHC.

Adapté, d'après (Küppers 2009). L'expression anormale d'éléments inhibiteurs des marqueurs lymphocytaires B (ID2 (inhibitor of differentiation and DNA binding 2), ABF-1 (activated B-cell factor) et NOTCH1), la diminution d'expression des facteurs de transcription B (OCT2, BOB1, PU.1), et l'extinction épigénétique des gènes B (CD19, IgH) semblent être impliqués dans ce processus. ID2 se lie aux facteurs de transcription E12 ou E47 (codés par *E2A*) et inhibe leur liaison à l'ADN. Les hétérodimères d'ABF1 et E12 ou E47 peuvent toujours de lier à l'ADN, mais sont incapable d'activer les gènes B. Notch1 inhibe à la fois E12 et E47 et EBF (early B cell factor), exprimé à un faible taux dans les cellules de RS, et sans doute aussi PAX5. L'activité de Notch1 est médiée à travers des ligands exprimés par les cellules du ME tumorale et par la baisse d'expression de son inhibiteur, *deltex1*. EBV est un autre élément impliqué dans la perte des marqueurs B via LMP1 et LMP2A. Enfin, STAT5A et STAT5B, induits par un signaling du récepteur à l'IL21, participent également à cette modification.

II.B.2. Dérégulation des facteurs de transcriptions issues de la cellule souche hématopoïétique (CSH)

Les CSH et précurseurs lymphoïdes communs co-expriment naturellement des gènes de multiples lignées (M. Hu et al. 1997; Miyamoto et al. 2002; Dutton et al. 2007) pouvant se retrouver dans la cellule de RS et de LH. *GATA2* (dont l'expression est induite par *NOTCH1*) est un FT requis pour la prolifération et la survie des CSH, exprimé au sein des cellules de LH (E. M. Schneider et al. 2004) et impliqué dans la reprogrammation des cellules de RS. Les cellules de RS expriment également des éléments clés du complexe protéique PcG (polycomb group), régulateurs des CSH : *BMI1*, *RING1*, *polyhomeotic-like protein (HPH)*, *chromobox protein 8 (HPC3)* et *MEL18* (complexe 1), *EED*, *EZH2*, qui peuvent diminuer l'expression des gènes B.

STAT5A et *STAT5B* (signal transducer and activator of transcription 5A et 5B) ont également été identifiés comme des FT potentiellement impliqués dans la reprogrammation

de la cellule de RS(Scheeren et al. 2008). En effet, in vitro, l'induction de l'expression constitutive de ces deux gènes au sein de cellules B normales provoque un phénotype de cellule de RS, avec une augmentation du CD30 et de GATA3, et une diminution de l'expression du récepteur lymphocytaire B. Dans le LH, l'expression de *STAT5A* et *STAT5B* est probablement induite par une signalétique passant par l'IL21 et son récepteur(Küppers 2009).

Ces premières études sur lignées cellulaires ont donc proposé un modèle avec une origine centro-germinative pré-apoptotique des cellules de RS, intégrant son phénotype bien particulier avec la perte d'expression des marqueurs B et la co-expression de marqueurs d'autres lignées.

Avec l'avènement de technique de MDL ou CMF, les études suivantes ont permis une caractérisation plus précise du PEG de la cellule primaire de RS.

II.B.3. Profil d'expression génique propre aux cellules primaires de RS

Dans une première étude (16 patients, puce microarray HG-U133-Plus2.0 analysant 47.000 transcrits) Tiacci et al(Tiacci et al. 2012) ont mis en évidence que le PEG des cellules primaires de RS microdisséquées était différent de celui des lignées cellulaires.

En effet, celui-ci reflétait l'importance de l'interaction avec le MET avec l'expression de gènes codant pour des chimiokines et leurs récepteurs, des molécules d'adhésion, de la matrice extracellulaire et des facteurs de « remodeling ». Lignées et cellules de patients présentaient toutefois des signatures semblables sur de nombreux traits caractéristiques des LH dont l'expression de gènes de la voie NF- κ B et la perte d'expression des facteurs B. En effet, le programme d'expression défini par les cellules B normales du CG étaient complètement sous-exprimé dans les cellules primaires de LH, sans que celui des plasmocytes ne soit surexprimé pour autant. Ainsi, sur le plan transcriptionnel, les cellules de LH ne sont proches ni des cellules B normales du CG, ni des plasmocytes(Buettner et al. 2005; Antonino Carbone et al. 1998; 1999). Enfin, dans cette étude, une analyse non supervisée a permis de mettre en évidence 2 groupes présentant des signatures d'activation de **MYC**, **IRF4** et **NOTCH1** différentes. De manière surprenante, le statut EBV n'influçait pas le profil d'expression dans cette étude, ni le sous type anatomopathologique(Tiacci et al. 2012).

La même année, l'équipe du Dr Steidl (Steidl et al. 2012) à Vancouver a rapporté des données d'expression obtenues à partir de 29 échantillons microdisséqués. Les analyses d'enrichissement ont été réalisées en prenant pour point de comparaison des cellules B du CG de prélèvements amygdaliens et ont mis en évidence une surexpression de gènes impliqués dans l'apoptose, la signalisation de surface, le chimiotactisme, la prolifération lymphocytaire, la prolifération de tissu conjonctif, la cytotoxicité. Ainsi, les gènes impliqués dans la signalisation NF- κ B, JAK-STAT (*TNFRSF11A*, *PDGFRA*, *STAT1*, *STAT5A*...) et interleukine (*IL9*, *IL5*, *CCL17/TARC*, *CCL22/MDC*, *CX3CL1/fractalkine*...) étaient surexprimés. En revanche, les gènes impliqués dans les voies de l'activation B (*CD19*, *CD20*, *CD79A/B*, *BOB1*), de la réponse anticorps, de la transcription (*FOXO1*, *WT1*, *NFIB* ...), de la signalisation des récepteurs B et T, des intégrines, d'IGF-1 (l'insuline growth factor) avaient une expression diminuée. En analyse non supervisée, les niveaux d'expression de gènes impliqués dans les signatures dites de la réponse immune cytotoxique (*GZMB*, *CXCL10*, *C1Q*), de récepteurs de surface (*TNFRSF11A*, *IL26*, *IL9*, *CCL17*, *PERP*, *CCND2*, *TGFBR3*) et des cellules B (*HLA-C*, *IGJ*, *IGHG3*, *IGL*, *AMIGO2*, *POU2AF1*) permettaient de définir 3 clusters bien distincts, soulignant l'importance de ces voies dans la physiopathologie. Contrairement à Tiacci et al (Tiacci et al. 2012), une signature particulière a été retrouvée en fonction du statut EBV : comportant notamment *CCL8*, *PERP*, *CD44*, *TNFAIP3*, *MAPK1*, *LMO2*, *HOXB7* (plus exprimés chez les EBV+) et *IL9*, *SATB1*, *TGFBR3*, *CXCL1*, *WNT2*, *NTRK3*, *CD69*, *SP1B*, *MAF* (moins exprimés chez les EBV+). Enfin, dans cette étude, une signature d'expression bien particulière était associée à la survie des patients.

II.C. Phénotype moléculaire du LBPM :

II.C.1. *LBPM : profil distinct des lymphomes B diffus à grandes cellules*

II.C.1.a. Premières études : une signature moléculaire à part

En 2003, deux études décrivant le PEG des LBPM ont été publiées, aboutissant à un tournant dans la classification WHO.

La première étude, réalisée par Rosenwald et al (Rosenwald et al. 2003) a utilisé la puce microarray Lymphochip (Alizadeh et al. 2000; Rosenwald et al. 2002) pour comparer le PEG des LBPM et des LBDGC. L'expression de *CD19*, *CD20*, *CD22*, *CD79A*, *CD79B* et *OCT2* au sein des LBPM était comparable à celle obtenue au sein des cas de LBDGC. A partir d'une série d'entraînement de 35 cas correspondant vraisemblablement à des LBPM (i.e. LBDG avec un envahissement du médiastin), et 25 cas de LBDGC sans envahissement médiastinal, ils ont pu identifier les gènes différentiellement exprimés entre les deux entités dont 23 particulièrement surexprimés dans LBPM (parmi lesquels *MAL* et *FIG1* ou encore *TNFAIP6*, *TRAF1*, *PD-L2*, *NKKB2*, *CD30 (TNFRSF8)*, *CD23*, *REL*). Parmi les 35 cas identifiés cliniquement comme des LBPM, 21 formaient un cluster bien précis permettant d'identifier une « signature moléculaire LBPM ». La deuxième étape consistait en l'élaboration d'un modèle permettant d'identifier les LBPM. Les 46 gènes dont l'expression étaient très significativement différentes entre le groupe de 21 LBPM et les LBDGC (ABC ou GC) ont été inclus dans ce modèle. On peut citer *PD-L2*, *SNFT*, *IL13RA1*, *FGFR1*, *CCL17/TARC*, *E2F2*, *MAL*, *OX40 ligand*, *Fig1*, *JAK2* entre autres gènes surexprimés et *CARD11*, *TCL1A*, *PRKAR1B* comme gènes sous-exprimés par les LBPM et inclus dans le prédicteur. En appliquant ce modèle, en plus des 21 cas définis initialement, 6 ayant également un envahissement médiastinal ont été classé comme LBPM sur le plan moléculaire. En revanche, 9 cas ayant un envahissement du médiastin ont été classé comme LBDGC, tout comme les 25 LBDGC sans atteinte médiastinale. Le modèle a ensuite été testé sur une série de 274 cas précédemment analysés (Rosenwald et al. 2002): dans ce set, 11 cas ont été identifiés cliniquement comme de possible LBPM (clinique) et 9 d'entre eux avaient une signature moléculaire bien en faveur de ce diagnostic. Parmi les 263 autres cas (sans atteinte médiastinale), 12 (4.5%) ont été classés comme LBPM, 249 comme LBDGC et 3 étaient inclassables. Les cas classés comme LBPM par le prédicteur moléculaire étaient plus jeunes (médiane d'âge de 33 ans versus 66 ans pour les ABC et 61 pour les GC) et avaient également une meilleure survie (64% à 5 ans versus 46%).

Quelques mois après ce premier travail, l'équipe du Dana-Farber Cancer Institute à Boston (Kerry J. Savage et al. 2003) a rapporté une étude comparable. Les PEG de 34 échantillons de LBPM et 176 de LBDG ont été comparés avec des puces affy U133A et U133B (ARN). Les deux profils étaient bien distincts avec plus de 1000 gènes ayant une expression amoindrie et plus de 1000 une expression plus importante (parmi lesquels *MAL*, *FIG-1* et

CD58/LFA3) au sein du groupe de LBPM. Les 100 gènes les plus différentiellement exprimés entre les deux entités ont été inclus dans un modèle permettant de définir une signature d'expression. Le pouvoir discriminant de la signature d'expression génique a ensuite été évalué : parmi les 176 LBCDG, 6 patients ont été classés comme un LBPM par le prédicteur et avaient bien un envahissement du médiastin et 2 autres, sans atteinte médiastinale, avaient une amplification de *c-REL*, fréquemment retrouvée dans les LHC.

II.C.1.b. 15 ans plus tard, vers une application en routine :

Ce n'est que récemment que ces données ont été transposées pour être applicables sur des prélèvements fixés en formol et inclus en paraffine avec l'élaboration d'une signature d'expression discriminante entre LBPM et LBDGC à l'aide de la plateforme Nanostring (Anja Mottok et al. 2018). Parmi les 58 gènes utilisés dans le modèle, 30 ont été sélectionnés sur leur pouvoir discriminant entre LBPM et LBCG (24 surexprimés dans le LBPM et 6 dans le LBDGC), 15 pour distinguer les LBDGC-GC et ABC (gènes inclus dans le précédent modèle des mêmes auteurs), et 13 comme gènes de ménage. Le modèle a été entraîné sur une cohorte test de 68 cas, incluant 20 LBPM « typiques » sur le plan pathologique et clinique, puis validé sur une cohorte indépendante de 158 cas (88 LBPM et 70 LBDGC). Parmi les 88 LBPM « clinico-pathologique », 75 (85%) ont été classés comme tel par le modèle, 10 comme incertains et 5 (4%) comme LBDGC. Parmi les 70 LBDGC, 58 (83%) ont été classés comme tel, 10 (14%) comme incertains et 2 (3%) comme LBPM. L'existence de formes non-médiastinales de LBPM, ou de LBDGC présentant une signature moléculaire de LBPM est de nouveau soulignée dans ce travail, une des hypothèses étant une signalisation JAK-STAT induite par des gains 9p24 dans ces cas (Yuan et al. 2015). L'origine cellulaire de ces cas reste difficile à préciser. En effet, de récents travaux présentés à l'ASH 2019 (Duns et al. 2019) ont mis en évidence que ces LBDGC avec une signature moléculaire de LBPM étaient plus âgés, plus fréquemment de stades 3-4, et surtout présentaient un profil mutationnel bien distinct de LBPM.

L'utilité clinique d'une telle signature réside dans la possibilité d'une approche thérapeutique distincte entre ces 3 entités (LBPM, LBCG-GC et ABC), notamment lors des rechutes (Svoboda et al. 2018).

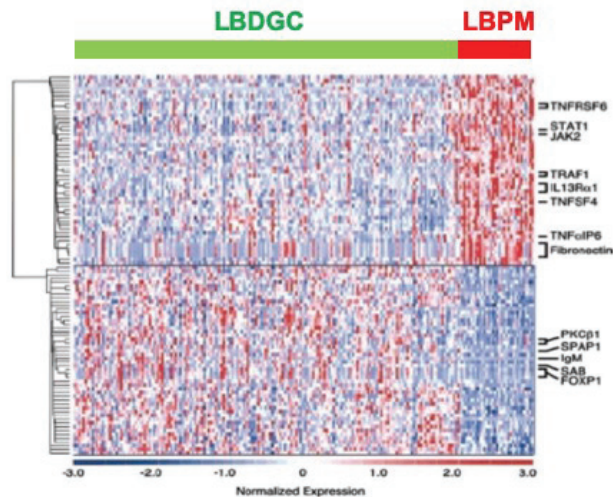


Figure 6: Signature d'expression génique des lymphomes B primitifs du médiastin. Adapté, d'après (Kerry J. Savage et al. 2003) : signature d'expression génique LBPM et LBDGC soulignant les spécificités de chacune des deux entités avec une surexpression de JAK2, STAT1, TNFRSF6, TNFSF4 dans le LBPM et une sous-expression de FOXP1, IgM, PKCB entre autres, par rapport au LBDGC.

II.C.2. Activation des voies JAK-STAT et NF- κ B

La forte incidence des anomalies au sein du locus 9p24 a été mise en évidence dans l'étude de Rosenwald (Rosenwald et al. 2003), corroborant ce qui a été rapporté précédemment avec d'autres techniques dans le LBPM et dans le LHC. Ainsi, *JAK2*, *PD-L1 (CD274)*, *PD-L2 (PDCD1LG2)*, *JMJD2C* (une déméthylase) et *SMARCA2*, tous situés sur ce locus étaient significativement plus exprimés dans le LBPM que dans les LBDGC. *PD-L2* était le gène le plus discriminant au sein du prédicteur, en accord avec des gains/amplifications décrits dans près de 70% des cas de LBPM, sur une région minimale de 3.5 Mb (Green et al. 2010; Twa et al. 2014; S Joos et al. 1996; Stefan Joos et al. 2002) et confirmés en qPCR. *SMARCA2* est un FT jouant un rôle dans la régulation de la structure de la chromatine des gènes avoisinants permettant d'activer leur transcription (Green et al. 2010; Wessendorf et al. 2007). Ainsi, l'expression de *JAK2* est augmentée d'une part suite à l'amplification du locus mais d'autre part suite à une régulation transcriptionnelle induite par *SMARCA2*. Cette plus forte expression (validée en ARNm) se traduit par une activation de la voie JAK-STAT avec une augmentation de p-JAK2 (Green et al. 2010). Au-delà de p-JAK2, une phosphorylation et localisation nucléaire de STAT6 ont été mise en évidence, confirmant l'activation constitutive de la voie dans le LBPM (Guiter et al. 2004).

Dans le travail de Savage et al (Kerry J. Savage et al. 2003), la forte expression de gènes représentant la famille des cytokines (*IL-13R*, *JAK2*, *STAT1*, *IL4*, *RANTES*, *CCR1*, *IL15*...), du TNF (*OX40*, *CD95/FAS ligand receptor*, *TRAF1*, *A20*...), des molécules de costimulation et médiateurs de l'inflammation (*SLAM*, *CD80*, *CD86*, *Prostaglandin receptor*...), des molécules d'adhésion/composants de la matrice extracellulaire (*CD58*, *FGFR1*, *Integrin α M*, *fibronectin*, *collagene type III, IV*...), mais aussi *MAL*, *adenosine deaminase* a été soulignée. Pour 3 de ces gènes, d'anciennes données d'IHC abondent dans le sens de celles d'expression (*MAL*, *FIG1*, *CD58/LFA3*). Le rôle fondamental du signaling via l'IL-13 et de l'activation sous-jacente des voies JAK-STAT et NF- κ B a ensuite été confirmé au niveau protéique. En effet, dans la cellule B normale, IL-13R α 1 s'associe avec la chaîne α du récepteur à l'IL-4 pour former un complexe de forte affinité, IL-13R, aboutissant à la phosphorylation de *JAK2* et *STAT1* puis à la prolifération cellulaire mais aussi au switch des Ig (Skinnider et al. 2002; Ohshima et al. 2001). L'expression de *STAT1* et *P-STAT1*, de *TRAF1* (permettant l'activation de la voie NF- κ B et l'inhibition de l'apoptose), ou encore de *c-REL*, au niveau nucléaire, étaient bien observées dans les LBPM, mais pas dans le LBDGC. L'importance de la voie NF- κ B dans le LBPM a ensuite été confirmée par d'autres. Après avoir révélé la localisation nucléaire de *c-REL*, Feuerhake et al (Feuerhake et al. 2005) ont observé que l'inhibition de la kinase activatrice I κ B α induisait une apoptose des lignées cellulaires de LBPM (Feuerhake et al. 2005; LT et al. 2005).

II.C.3. *Sous-représentation de la cascade du récepteur B*

Par rapport aux LBDGC, une sous-expression des gènes clés de la famille du récepteur B (*IgM*, *PTK*, *BLK*, *SYK*, *BLNK*, *BTK-associated binding protein*, *CD22*) est observée au sein du LBPM, mais aussi d'autres molécules dont l'expression peut être régulée par PLC γ 2, comme des FT influençant la différenciation lymphocytaire (*NFATc*, *Sp1B*, *FOXP1* et *Ikaros*) ou encore *PKC β 1* (Kerry J. Savage et al. 2003). Une plus faible expression d'*AKT* et de sa cible *FOXP1*, tous deux composants de la voie PI3K/AKT et de la cascade du BcR était également retrouvée. Ceci n'est pas sans rappeler le profil d'expression du LHC.

II.D. Lien entre PEG du LBPM et de la cellule de RS

II.D.1. *D'importantes similitudes*

Parmi les gènes différentiellement exprimés entre LBPM et LBDGC figurent certains éléments emblématiques des cellules de RS dans le LHC, comme *CD30* et *TARC*. Suite à cette observation, faisant écho aux ressemblances cliniques, les profils d'expression de lignées de LH (L428, HDLM2 et L540), de LBPM (K1106) et de LBDGC de profil GC ont été comparés.

Parmi les 348 gènes de la signature LBPM de Rosenwald (Rosenwald et al. 2003), 118 (34%) étaient aussi présents dans la signature LH avec une surreprésentation nette par rapport aux LBDGC-GC. De plus, 37% des gènes de la signature LBPM (parmi lesquels *MAL*, *FIG1*, certaines cytokines (*IL-15*, *CSF-1*, *TRAIL*) et chimiokines (*TARC*, *RANTES*, *Fractalkine*)) étaient surexprimés par les lignées de LHC. Les points communs entre LBPM et LHC reflètent des voies d'activation communes comme la voie de réponse à l'IFN (activation des gènes *STAT-1*, *GBP1*, *IFP35*, *AIM2*, *IFIT2*, *IFI-6-16*, *PML*, *IRF-1*) ou *NF-κB* (gènes *A20*, *jun-B*, *IκBα*, *NFκB2*, *TRAF1*, *IL-15*, *CSF-1* et *RANTES*). Les lignées de LHC pouvant avoir un PEG légèrement distinct des cellules tumorales de patients, l'expression en RT-PCR de 4 des gènes clés de la signature LBPM, *CCL17/TARC*, *SNFT*, *MAL* et *TNFRSF6/Fas*, a été évaluée sur prélèvement de cellules de RS microdisséquées, confirmant un taux comparable entre les 2 lymphomes, mais distinct des lignées de LBDGC. Enfin, les anomalies de nombre du locus 9p24 précédemment décrites (S Joos et al. 1996; M et al. 2001) étaient bien retrouvées dans toutes les lignées de LHC et dans plus de 50% des cas de LBPM, mais dans aucun cas de LBDGC.

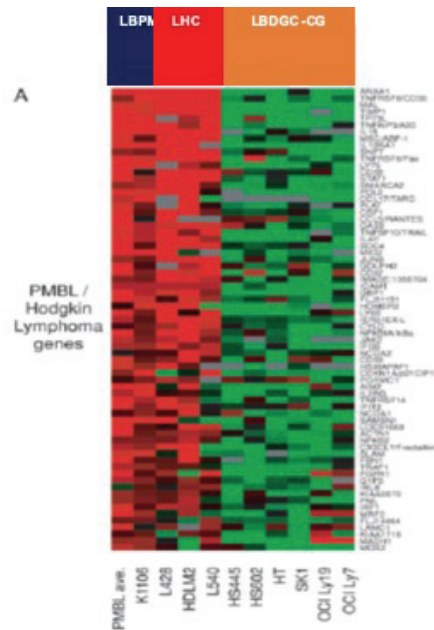


Figure 7: Signature des LBPM, LH et LBDGC.

Heatmap mettant en évidence une signature d'expression génique comparable entre LBPM (prélèvements de patients, moyenne d'expression ; lignée cellulaire) et cellules de RS (3 lignées cellulaires, LHC), et distinctes des autres lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC, lignées cellulaires). Adapté, d'après (Rosenwald et al. 2003).

Avec une approche semblable, Savage et al (Kerry J. Savage et al. 2003) sont arrivés à la même conclusion en comparant leur signature d'expression génique des LBPM avec celle identifiée par Schwering et al pour les LHC (Schwering, Blood 2003). Ils notent ainsi des similitudes flagrantes et significatives, avec une perte/baisse d'expression de certains éléments du signaling B (IgM, Iga/b-associated SRC-family protein tyrosine kinase, BLK, SYK, BLNK, BTK, SAB), de facteurs de transcriptions impliqués dans le développement lymphocytaire (*PLCy2*, *NFATc*, *PKCβ*, *Spi-B*, *Ikaros*), du co-récepteur CD22 et de plusieurs molécules du CMH de classe II. Un autre point commun soulevé est la forte expression des gènes impliqués dans les signaling des cytokines, des interleukines (dont récepteur à IL-4, avec une surexpression du récepteur IL13-1 α , de FIG1 et NF-IL3), de la famille du TNF ou des composants de la matrice extracellulaire. Il est important de noter que les gènes présentant un profil d'expression proche entre LHC et LBPM concernaient principalement ceux ayant un niveau d'expression faible par rapport aux LBDGC (Kerry J. Savage et al. 2003), les similitudes concernant les gènes ayant un niveau d'expression plus fort que le LBDGC étaient moins significatives.

Si les LBPM et LHC présentent des voies d'activation communes, il est possible que les évènements moléculaires sous-jacents soient distincts. En effet, des mutations du gène codant pour le récepteur à l'IL-4 ont bien été rapportées dans des cas de LBPM (Vigano et al. 2018), mais pas dans le LHC. Cet aspect sera abordé dans le chapitre III de l'introduction.

II.D.2. Pointant vers une forte interaction avec le MET

Une des voies communes est celle de l'INF γ avec une forte expression de *CXCR3*, *IP10*, *IFI30/GILT*, *IFI35* (E. Maggio et al. 2002). Renforçant l'importance de l'interaction avec le MET dans ces deux entités où l'expression de la chemokine *RANTES* ainsi que celle des molécules de co-stimulation *B7.1 (CD80)* et *B7.2 (CD86)*, ou encore *SLAM* étaient communément augmentées. Différents éléments de la superfamille du TNF (incluant *FAS/TNFRSF6*, *HVEM/TNFRSF14* et *TRAF1*), pouvant également être le reflet d'une interaction avec le MET, sont également surexprimés dans les deux entités. Par ailleurs, des mutations au niveau du *TNFRSF14* seront décrites plus tard dans le LHC (Tiacci et al. 2018). Dans le lymphocyte B normal, l'activation de la voie du TNF peut aboutir à l'activation de NF- κ B ou bien à l'apoptose, *TRAF1* jouant un rôle fondamental de régulateur en interagissant avec l'inhibiteur d'apoptose (*cIAP*) pour favoriser l'activation de NF- κ B (Bradley and Pober 2001), en accord avec l'observation d'une résistance à l'apoptose au sein de lignées de LHC avec un taux basal de *TRAF1* élevé (Dürkop et al. 2003). L'expression de *TRAF1* a été validée au niveau protéique en IHC dans les LBPM, et dans les LHC (Dürkop et al. 2003; Izban et al. 2000), mais pas dans les LBDGC. L'importante fibrose est un des points communs entre LHC et LBPM. Ceci peut être relié à un taux d'expression important de *TNFAIP6* (TNF- α induced hyaluronan-binding protein), ou encore d'autres molécules d'adhésion comme *CD58/LFA3*. Cependant, *CD58* est aussi impliqué dans la reconnaissance immune des cellules tumorales via sa liaison au récepteur CD2 exprimé à la surface des lymphocytes T cytotoxiques (Fazlyn Reeny Abdul Razak et al. 2015; F. R. Abdul Razak et al. 2016; M. Schneider et al. 2015) et des mutations de *CD58* ont été retrouvées dans le LHC et le LBPM (A. Mottok et al. 2019). Celles-ci étaient associées à une perte d'expression induisant un défaut de stimulation des lymphocytes T.

II.D.3. Mais deux entités qui restent distinctes

En dépit des grandes ressemblances, le LH et LBPM restent deux entités distinctes avec notamment un set de gènes préférentiellement exprimés dans la signature LBPM : TNFSF4/OX40 ligand, *CYBB*, *TNFRSF17*, *ADA*, *LMO2*...et une signature de type cellules B matures (comportant *CD19*, *CD20*, *CD79A/B*, *OCT-2*) retrouvée dans le LBPM mais pas dans les lignées de LH. Par ailleurs, la perte d'expression de *TACI*, retrouvée dans le LBPM, n'était pas une caractéristique commune avec le LHC (Rosenwald et al. 2003). De plus, l'environnement cytokinique du LHC, comportant IL5, IL6, IL10(Skinnider et al. 2002) n'était pas complètement retrouvé dans la signature d'expression des LBPM(Kerry J. Savage et al. 2003). Enfin, en sélectionnant un set de 235 gènes différentiellement exprimés entre des cellules de LHC microdisséquées et d'autres LNH-B, Tiacci et al(Tiacci et al. 2012) ont bien démontré que le LHC restait une entité à part, même des LBPM, avec une sous-expression de gènes impliqués dans l'apoptose (*BIK*, *HRK*...), certaines voies oncogéniques (*RASAL1*, *BTG2*, *AIM2*...), et une expression plus importante de gènes impliqués dans l'interaction avec la MEC.

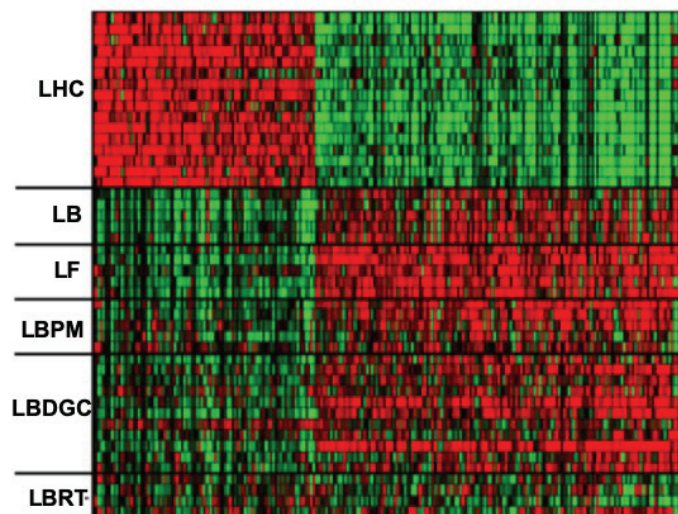


Figure 8: PEG du LHC en comparaison aux autres lymphomes B.

Heatmap issue d'une analyse supervisée mettant en évidence le PEG bien à part des cellules de RS micro-disséquées (16 cas) en comparaison aux prélèvements de lymphomes B : lymphomes folliculaires (LF, N=5), lymphomes B primitifs du médiastin (LBPM, N=5), lymphomes de Burkitt (LB, N=5), lymphomes B riches en T (LBRT, N=4), lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC : 1 GCB, 8 non-GCB, 2 NA). Dans cette analyse, 235 cibles (probe-set) ont été identifiées comme RS spécifiques (fold-change > 4) en comparaison autres LNH-B : 85 sur-exprimées (dont *CCL22/TARC*) et 150 sous-exprimées (incluant *MS4A1*, *POU2AF1*). D'après (Tiacci et al. 2012).

Enfin, dans l'étude de Tiacci et al (Tiacci et al. 2012), une analyse supervisée plus fine à l'aide du profil de 168 gènes exprimés différemment entre LBPM et DLBCL a permis de confirmer que les cellules de LH-SN sont bien plus proches des LBPM que des LBDGC mais également que les LH-non-SN sont eux distincts des LBPM. En effet, les cellules de RS des LH-CM et RL avaient un profil proche de celui des cellules tumorales des LH-NPL alors que celles des LH-SN et DL étaient proches des LBPM. Ceci va dans le même sens que les données morphologiques et cliniques soulignant des similitudes surtout entre LH-SN et LBPM.

Ces données d'expression génique pourraient conduire à penser, qu'au-delà de voies d'activation commune, il puisse exister une cellule tumorale commune entre LBPM et LH-SN (ADDIS and ISAACSON 1986; Isaacson, Norton, and Addis 1987). L'acquisition d'anomalies génétiques secondaires distinctes, un profil de méthylation, ou encore un contexte biochimique particulier comme une hypoxie transitoire permettraient alors à la cellule de revêtir le phénotype de LBPM ou de LH-SN. Ainsi, les convergences phénotypiques peuvent être l'aboutissement d'anomalies moléculaires semblables, étudiées dans le chapitre III, mais aussi de deux chemins différents : l'un reflétant un MET très riche et l'autre des anomalies moléculaires mimant ce ME et rendant la cellule tumorale indépendante de ces interactions. L'existence de formes intermédiaires entre LH-SN et LBPM s'intègre bien dans ce contexte, en revanche, l'existence de certains cas de LFF (cf. chapitre IV) ne présentant pas d'envahissement du médiastin ou de la loge thymique laisse suggérer une autre origine pour ceux-ci.

III. Anomalies moléculaires impliquées au sein des voies de lymphomagénèse

Ce chapitre abordera plus en détail les différentes voies de lymphomagénèse au sein des LH et LBPM. Les anomalies génétiques ne sont pas les seules responsables de l'activation constitutive de multiples voies de signalisation. En effet, à côté de ces mécanismes intrinsèques, les cytokines et chimiokines, protéines de faible poids moléculaire fonctionnant de manière paracrine, peuvent moduler de manière extrinsèque l'activité des cellules environnantes ou même de façon autocrine pour directement influencer la cellule qui les fabrique. Ainsi, plus particulièrement dans le LHC, les cytokines et chimiokines produites par les cellules de RS ainsi que celles produites par les cellules du MET stimulent l'activation des voies dérégulées et contribuent à la prolifération et au phénotype anti-apoptotique des cellules tumorales(Steidl, Connors, and Gascoyne 2011), dépendantes de l'interaction avec le MET.

III.A. Voie NF- κ B

III.A.1. Activation Physiologique de la voie NF- κ B

La voie NF- κ B est composée d'une famille de 5 facteurs de transcriptions homo ou hétérodimériques, p50 (NF- κ B1), p52 (NF- κ B2), p65 (RelA), RelB et c-Rel, jouant un rôle particulièrement important dans la survie et la prolifération des cellules du système immunitaire(Bonizzi and Karin 2004). Ces protéines forment des complexes conservés inactifs par une liaison à des protéines inhibitrices dans le cytoplasme, les I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ ou p105 et p 100, les précurseurs de p50 et p52). L'activation physiologique de la voie est toujours secondaire à la phosphorylation des protéines I κ B par le complexe IKK (I κ B-Kinase), contenant lui-même deux unités catalytiques : IKK α (IKK1) et IKK β (IKK2) et une régulatrice IKK γ (NEMO, NF- κ B essential modifier). Il existe deux types de voies, classique et alterne, différant par les molécules activatrices et de signalisation intracellulaire (figure 11).

- La voie classique, ubiquitaire, est activée suite à divers stimuli (cytokines pro-inflammatoires, PAMPS (motifs moléculaires associés aux pathogènes) se liant aux récepteurs du système immunitaire inné, signaux via les récepteurs antigéniques TcR ou BcR, ou encore via les corécepteurs lymphocytaires (Hayden and Ghosh 2004)). IKK actif va phosphoryler les protéines I κ B induisant leur poly-ubiquitination et dégradation par le protéasome. Les dimères NF- κ B peuvent alors transloquer librement dans le noyau pour exercer leur fonction de FT. Le complexe CBM (contenant CARMA1, BCL10 et MALT1) est un autre élément permettant une activation de la voie classique lors de la réponse inflammatoire, notamment suite à l'activation des récepteurs antigéniques des cellules B et T (Lucas et al. 2001; Ruland et al. 2001; Zhou et al. 2004). En effet, CARMA1, BCL10 et MALT1 sont capables de former un hétéro-dimère pour initier un signal de transduction aboutissant à l'activation IKK avec l'ubiquitination de NEMO (IKK γ).
- La voie alterne représente une voie supplémentaire spécifique et particulièrement importante au sein des cellules B matures. Cette voie est activée par un nombre restreint de récepteurs de surface appartenant à la famille du TNF, comportant CD40, le récepteur de la lymphotoxine β (LTB) et le récepteur BAFF. Suite à son activation, IKK α va directement phosphoryler p100 (NF- κ B2) induisant sa protéolyse partielle et la formation de p52 qui se liera préférentiellement à RelB pour être ensuite transloqué dans le noyau.

Des études de modèles murins présentant des mutations de l'un des membres de la voie ont mis en exergue son rôle dans le développement, l'activation, la prolifération, et la survie lymphocytaire (Q. Li and Verma 2002). Une fois dans le noyau, les complexes NF- κ B régulent la transcription de nombreuses cibles. Bien que chaque sous-unité ait des fonctions régulatrices distinctes, de nombreuses cibles géniques sont communes aux différents dimères. Ces différentes cibles peuvent être regroupées en fonction de leur activité en : régulateurs positifs du cycle cellulaire (cyclin D1, cyclin D2, c-myc et c-myb), facteurs anti-apoptotiques (cIAP, membres de la famille BCL2 (A1, BCL-X_L et c-FLIP), gènes inflammatoires/immuno-régulateurs, et régulateurs négatifs de la voie NF- κ B. L'induction de cytokines immuno-régulatrices comme IL-2, IL-6 ou CD40L va ainsi activer la prolifération lymphocytaire à travers un effet auto/paracrine. Enfin, il a été mis en évidence que l'activation

forcée de la voie par une activation constitutive d'IKK β induisait une prolifération et survie de lymphocytes, au dépend de leur différenciation(Sasaki et al. 2006).

III.A.2. NF- κ B et lymphome de Hodgkin.

Le LH fut une des premières tumeurs pour lequel un rôle oncogénique de NF- κ B a été mis en évidence, représentant une de ses marques de fabrique.

III.A.2.a. Activation extrinsèque :

Un des principaux mécanismes de dérégulation « extrinsèque » de la voie NF- κ B dans le LHC est une activation constitutive d'IKK par des mécanismes dépendants des récepteurs du TNF et des molécules TRAF (TNF- α receptor-associated factor).

Ainsi, les molécules de surface CD30 (TNFR8) vont spontanément former des homo-dimères, pouvant recruter des molécules TRAF ((TNF- α receptor-associated factor), TRAF2 et TRAF5, et ainsi activer IKK, via les voies alternes et classiques contribuant fortement à la survie des cellules de H/RS. Renforçant l'activation, le CD30L (TNFSF8) est également sécrété par les mastocytes et éosinophiles(Molin et al. 2002; Von Wasielewski et al. 2000). Un autre récepteur de la famille du TNF exprimé à la surface des cellules de H/RS est RANK (TNFRSF11A, récepteur activateur de NF- κ B) dont le ligand, RANK-L est également exprimé. Leur association résulte en une transduction constitutive du signal activant la voie NF- κ B via TRAF2, TRAF5 et TRAF6(Fiumara et al. 2001). CD40 (TNFRSF5) est le troisième TNF-R avec une expression augmentée dans le LHC. Son ligand, (CD40L, CD154) est exprimé par les cellules T activées entourant les cellules de H/RS, permettant de délivrer un signal permanent aboutissant à la dimérisation de CD40 et au recrutement de TRAF2 et TRAF5. L'activation de la voie alterne peut se faire à travers l'activation de deux autres récepteurs, TNFRSF13B (receptor transmembranaire activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor, TACI) et TNFRSF17 (B cell maturation antigène, BCMA), par leur ligands TNFSF13 (APRIL, proliferating-inducing ligand) et TNFSF13B (BAFF, B-cell activating factor)(Chiu et al. 2007; Fiumara et al. 2001), exprimés par les cellules de RS mais aussi par de nombreuses cellules du MET comme les macrophages, les PNN, les mastocytes, suggérant encore un « network » paracrine. Une

boucle de régulation positive est générée par la sécrétion de BAFF et APRIL par la cellule de RS suite à l'activation de la voie NF- κ B (Chiu et al. 2007).

L'EBV, rencontré dans 30 à 40 % des cas de LHC, usurpe l'identité et la machinerie du CD40. L'oncoprotéine membranaire de latence virale LMP1 exprimée à la surface des cellules infectées, possède un domaine intracellulaire ayant une forte homologie avec le CD40. A défaut de posséder un domaine de liaison extracellulaire, LMP1 contient 6 domaines transmembranaires hydrophobes qui s'auto-agrègent induisant une oligomérisation et activation constitutive de TRAF2 et TRAF5 et ainsi un engagement de la voie classique et alterne (Vockerodt et al. 2015a; Antonino Carbone et al. 2017).

III.A.2.b. Activation intrinsèque

La sous-unité RELA (p65) (Bargou et al. 1997) a été la première incriminée comme responsable de la lymphomagenèse au sein de la voie classique de NF- κ B avec une localisation nucléaire constitutive dans les lignées cellulaires. Mais très rapidement des anomalies touchant d'autres éléments, comme *c-REL*, *RELB* et *p52* et impliquant également la voie alterne, ont été mis en évidence dans le LHC. Ainsi des gains ou amplifications de *c-REL* (locus 2p14-16, codant pour REL), responsable d'une surexpression protéique ont été décrits dans 70% des cas de LHC sur cellules microdisséquées (Stefan Joos et al. 2002; Steidl, Telenius, et al. 2010; Steidl et al. 2012). Des anomalies de nombre (gain) et réarrangement des loci contenant les gènes *BCL3* et *MAP3K14* aboutissant à une activité augmentée de la voie NF- κ B ont également été rapportées (Steidl, Telenius, et al. 2010; Martin-Subero et al. 2006).

Un deuxième mécanisme d'activation est la présence de mutations inactivatrices au niveau des régulateurs négatifs comme *NFKBIA* (16-20% des cas, dont certaines dans le domaine ankyrin aboutissant à une inactivation), codant pour I κ B α (Cabannes et al. 1999; Jungnickel et al. 2000; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019). Ces mutations étaient surtout retrouvées dans les cas non associés à l'EBV (Jungnickel et al. 2000). Des délétions décalant le cadre de lecture (générant un codon STOP) de *NFKBIE* (codant pour I κ B ϵ), sont retrouvées dans près de 30% des cas (Mansouri et al. 2016; Tiacci et al. 2018; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019). Des mutations faux-sens affectant le domaine 5' d'épissage de l'intron 1 ont été retrouvées dans une lignée cellulaire (Emmerich et al. 2003). *TNFAIP3* (A20) fonctionne

comme un régulateur négatif post-transcriptionnel de la voie, à travers des modification d'ubiquitination, après son engagement via les récepteurs du TNF (RIP1, TRAF1 et TRAF2). En ubiquitinillant RIP1, A20 induit sa dégradation dans le protéasome, provoquant ainsi une régulation négative de la voie. Des délétions et mutations somatiques de ce gène suppresseur de tumeurs ont été rapportées (33% dans le LHC) avec, comme pour les autres éléments de la voie NF-κB, une fréquence plus élevée dans les cas non reliés à l'EBV(Schmitz et al. 2009; Nomoto et al. 2012; M. Kato et al. 2009). Ces données sont étayées par la présence d'une mutation de *TNFAIP3* dans 4 des 10 cas analysés en exome à partir de cellules de RS triées par Reichel et al.(Reichel et al. 2015) ou encore dans 24% des cas de l'étude de Wienand et al.(Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019), qui ont également mis en évidence une perte du locus 6q23.2 dans 56% des cas, avec 12% d'anomalies touchant donc les 2 allèles de *TNFAIP3*. Des mutations de *TNFAIP3* ont été mise en évidence dans l'ADN tumoral circulant chez 35% des cas (28/80)(Spina et al. 2018). Sur le plan fonctionnel, il a été démontré que la perte de *TNFAIP3* induisait une activation de la voie NF-κB avec une expression de ses cibles (*BCL2*, *MYC*), mais aussi de la voie JAK/STAT via l'expression de l'IL-6 et CXCL10(Wenzl et al. 2018). Dans une autre étude portant sur 34 cas d'exomes, 44% des patients (15/34) présentaient une lésion génétique au niveau d'un régulateur négatif de la voie NF-κB(Tiacci et al. 2018). Dans l'ensemble, les anomalies touchant la voie NF-κB sont plus fréquemment retrouvés dans les formes non reliées à l'EBV(Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019; Tiacci et al. 2018; Spina et al. 2018; Reichel et al. 2015), confirmant un rôle oncogénique intrinsèque pour le virus.

Concernant la voie proximale du BCR, une étude récente a mis en évidence de rares mutations au niveau de *CARD11* (7%) ou encore de la kinase *BTK* (10%)(Mata et al. 2017). Dans l'étude de Tiacci et al.(Tiacci et al. 2018), seul 1 cas / 34, et dans celle de Spina et al.(Spina et al. 2018), seul 2/80 présentaient une mutation affectant un élément de la voie proximale du BCR comme *CD79B* et aucun cas ne présentait d'anomalie au niveau de *CARD11*, *CD79A*, ou *MYD88*. Ceci suggère bien un mécanisme physiopathologique distinct de celui aboutissant à l'activation de la voie NF-κB dans les LBDGC.

III.A.2.c. Études fonctionnelles :

L'importance de la voie NF- κ B dans le LHC a été mise en évidence à l'aide de modèles *in vitro* puis murins portant une mutation d'I κ B α ayant un effet dominant négatif. Dans ce modèle, la protéine mutée se lie à NF- κ B mais ne relâche pas le complexe suite à l'activation de la voie, empêchant ainsi toute transduction du signal. L'introduction de ces molécules I κ B α mutées dans des lignées de LHC entraînent l'apoptose et une suppression de la progression du cycle (phase G1). Les modèles de xénogreffes réalisés à partir de lignées de LHC transduites avec I κ B α mutés formaient moins de tumeurs que les lignées avec I κ B α sauvage (Bargou et al. 1997). De plus, l'inhibition de la voie à l'aide de l'arsenic, qui cible IKK β , induit un blocage de l'activation constitutive d'IKK dans les lignées de RS, conduisant à une diminution de la transcription des gènes cibles (TRAF-1, c-IAP2, CCR7 et IL-13). Une réduction du volume tumoral a été observé chez les souris traités par l'Arsenic(Mathas et al. 2003).

III.A.3. NF- κ B et lymphome B primitif du médiastin

Les différentes études de PEG ont également mis en évidence l'importance de la voie NF- κ B dans le LBPM. Les évènements oncogéniques responsables de cette activation sont maintenant mieux compris, nombreux d'entre eux étant identiques à ceux retrouvés dans le LHC (figure 11).

En effet, tout comme dans le LHC, des gains chromosomiques du locus contenant *c-REL* (2p16.1), ont été décrits dans 50% à 75% des cas (en FISH et CGH array) (Marc A. Weniger et al. 2007; Wessendorf et al. 2007; Bea et al. 2005), associés à une localisation nucléaire de *c-REL*. D'autres anomalies de nombres activant NF- κ B, comme une amplification de *BCL10* (1p22), de *MALT1* (18q21), membres du complexe d'activation CBM (*CARMA1*, *BCL10*, *MALT1*), et de *BCL11A* (2p16)(Wessendorf et al. 2007) sont également récurrentes dans le LBPM.

Dans la suite du LHC, le rôle du gène suppresseur de tumeur *TNFAIP3* (A20), ou plutôt sa perte de fonction, dans le LBPM a été mis en évidence. Des mutations non-sens ont été retrouvées dans 36% à 61% des cas, menant à une activation constitutive de la voie (Schmitz et al. 2009; Chapuy et al. 2019b; Dubois et al. 2016). Au-delà des mutations, des pertes du locus de

TNFAIP3 peuvent se voir de manière récurrentes également (25% dans une série récente, mettant en évidence 41% de mutations 6% d'anomalies bi-alléliques(Chapuy et al. 2019b)). Tout comme dans le LHC et contrairement au lymphome folliculaire, à la leucémie lymphoïde chronique (LLC), au lymphome du manteau ou au LBDGC, des mutations touchant *NFKBIE* ont également été retrouvées au sein des cas de LBPM avec une incidence significative (23%) et comparable à celle observée dans le LHC, avec une association à une moins bonne réponse au traitement et une moins bonne survie (59% vs 78% à 5 ans avec et sans mutation respectivement)(Mansouri et al. 2016).

Enfin, contrairement au LBDGC mais en lien avec le LHC, les mutations de *CD79B*, *MYD88* ou *CARD11* sont très rares voir absentes(Dubois et al. 2016; A. Mottok et al. 2019; Chapuy et al. 2019b), confirmant bien que l'activation de la voie NF-κB se fait par des mécanismes distincts, et similaires à ceux décrits dans le LHC.

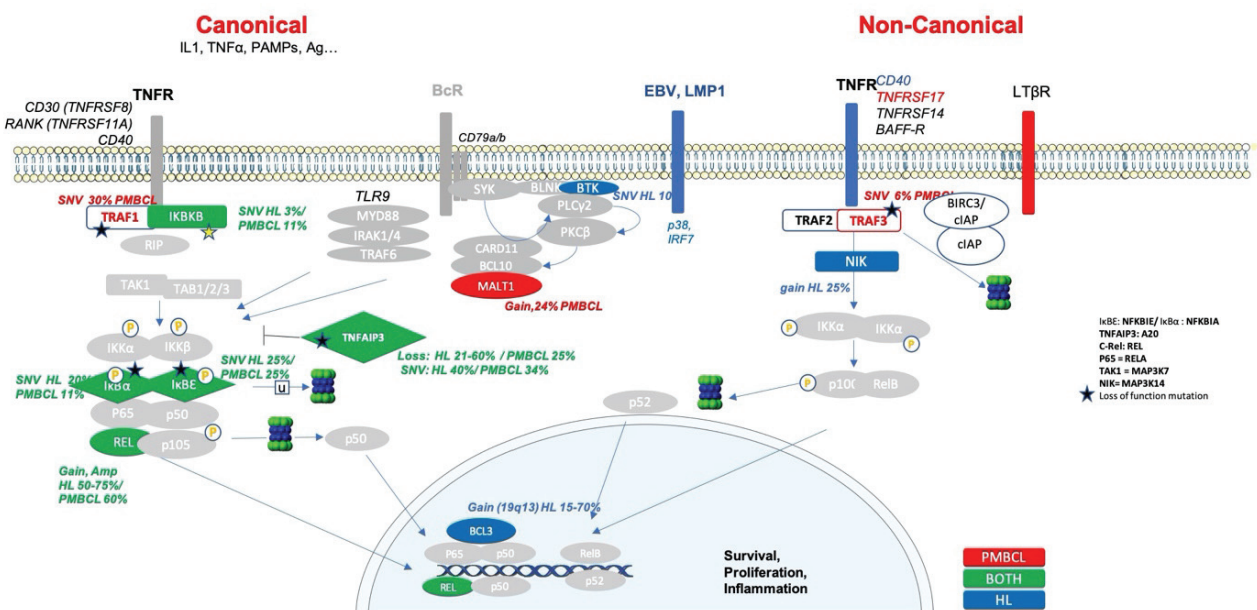


Figure 9: Voie NFκB.

Anomalies moléculaires aboutissant à l'activation de la voie NF-κB dans le LHC et LBPM. Les anomalies plus spécifiques aux lymphomes B primitifs du médiastin sont colorées en rouge, celles au LHC en bleu et celles retrouvées dans les deux entités en vert. L'EBV représente un des mécanismes d'activation de la voie différentiel entre LHC et LBPM.

III.B. Voie JAK/STAT

Dans le lymphocyte B normal, cette voie est activée par la stimulation extrinsèque des récepteurs cytokiniques à l'IL ou l'IFN, aboutissant à l'autophosphorylation des tyrosines kinases JAK, phosphorylant à leur tour les facteurs de transcriptions STAT pour les activer (figure 12). Les phospho-STAT, sous forme de dimères, sont ensuite transloquées dans le noyau(O'Shea, Holland, and Staudt 2013) (principalement STAT5A/B et STAT6)(M. A. Weniger et al. 2006; Skinnider et al. 2002) conduisant à une majoration de l'expression de leur gènes cibles(Lollies et al. 2018).

III.B.1. *JAK/STAT dans le lymphome de Hodgkin*

La forte expression des différentes STAT (transcrits et protéiques)) (STAT3, STAT5 et STAT6) dans le LHC est un témoin de l'importance de cette voie dans la lymphomagenèse(Skinnider et al. 2002; Hinz et al. 2002). En effet, 87% des cas présentent une anomalie moléculaire au sein d'un des membres de la voie(Tiacci et al. 2018), aboutissant à cette activation constitutive mise en évidence notamment par l'expression de phospho-STAT6, observée dans près de 80% des cas(Skinnider et al. 2002; Guiter et al. 2004; Natkunam et al. 2007).

III.B.1.a. Anomalies Intrinsèques

III.B.1.a.i. Anomalies activatrices

Des anomalies de nombre (gain/amplification) du locus 9p24.1, contenant *JAK2*, sont décrites dans environ 50 à 74% des cas de LHC(Green et al. 2010; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019). Ces anomalies de nombre sont associées à une plus forte expression protéique de *JAK2*, mais aussi à l'activation de la voie comme en atteste une majoration de P-JAK2 (Green Blood 2010). Ce locus contient des gènes régulant la structure de la chromatine avoisinante et donc modulant la transcription, comme la déméthylase *JMJD2C* ou le facteur de transcription *SMARCA2*(Stefan Joos et al. 2000; Green et al. 2010). Il contient également des éléments clés de la réponse immunitaire (*PD-L1* (CD274), *PD-L2* (PDCD1LG2), cf. infra).

Favorisant l'activation de la voie, des mutations faux-sens de *STAT6* au niveau de son site de liaison à l'ADN ont été retrouvées dans 32-38% des cas, avec un hotspot au niveau du résidu N417 (50% des mutations, 9/18) et deux autres au niveau des résidus D419 et N421 (même région)(Tiacci et al. 2018; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019; Spina et al. 2018). De manière intéressante, dans l'étude de Tiacci et al(Tiacci et al. 2018), les gains de *JAK2* (33%) n'étaient pas associés aux mutations de *STAT6*. Dans celle de Spina et al, les mutations de *STAT6* étaient plus fréquemment retrouvées au sein des formes SN non-associées à l'EBV et donc chez les sujets de moins de 60 ans, ce qui reflète l'enrichissement des formes à CM et reliées à l'EBV chez les sujets de plus de 60 ans.

D'autres anomalies au sein de cette voie ont été mise en évidence avec une incidence inférieure à 5% et sans réelle caractérisation fonctionnelle pour l'ensemble des anomalies à ce jour (mutations de *JAK1*, *JAK2*, *STAT3* et *STAT5B*).

Enfin, des mutations au niveau du gène *CSF2RB* codant pour la chaîne β commune du récepteur à l'IL13 (CD131), dont l'activation aboutit à la phosphorylation de *STAT6*, ont été retrouvées dans des lignées de LHC(Fazlyn Reeny Abdul Razak et al. 2015) et rapportés par Mata et al(Mata et al. 2017) puis Wienand et al(Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019) chez 12% et 17% des patients respectivement, dont un possible hotspot (V212I).

III.B.1.a.ii. Perte de fonction des éléments régulateurs

Des mutations inactivatrices de régulateurs négatifs de la voie comme *SOCS1* et *PTPN1*(M. A. Weniger et al. 2006; Gunawardana et al. 2014; Tiacci et al. 2018; Reichel et al. 2015; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019) sont également récurrentes. Des mutations de *PTPN1* ont été identifiées dans 20% des cas de LHC et dans 6/9 lignées (Gunawardana et al. 2014). Sur le plan fonctionnel, ces mutations sont associées à une majoration de la phosphorylation des différents éléments de la voie JAK-STAT, reproduite à l'aide de siRNA ciblant *PTPN1* dans des lignées de LHC. Récemment, de nouveaux variants d'épissage de *PTPN1* ont été mis en évidence et caractérisés comme étant fonctionnellement inactifs(Zahn et al. 2017). Dans une cellule normale, *SOCS1*, dont l'expression est induite par les STATs, est un effecteur clé d'une boucle d'autorégulation négative, inhibant ensuite la phosphorylation des JAK et ciblant les JAK-P pour une

dégradation dans le protéasome(Davey, Heath, and Starr 2006). L'incidence est variable en fonction des séries, mais reste très importante, entre 59 et 70% des cas, faisant de *SOCS1* le gène le plus fréquemment muté (59% des cas)(Tiacci et al. 2018; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019). Ces mutations (préférentiellement décalage du cadre de lecture et non-sens) étaient significativement plus nombreuses dans la population présentant une mutation de *STAT6*, suggérant une interaction entre ces deux évènements dans le LHC(Tiacci et al. 2018).

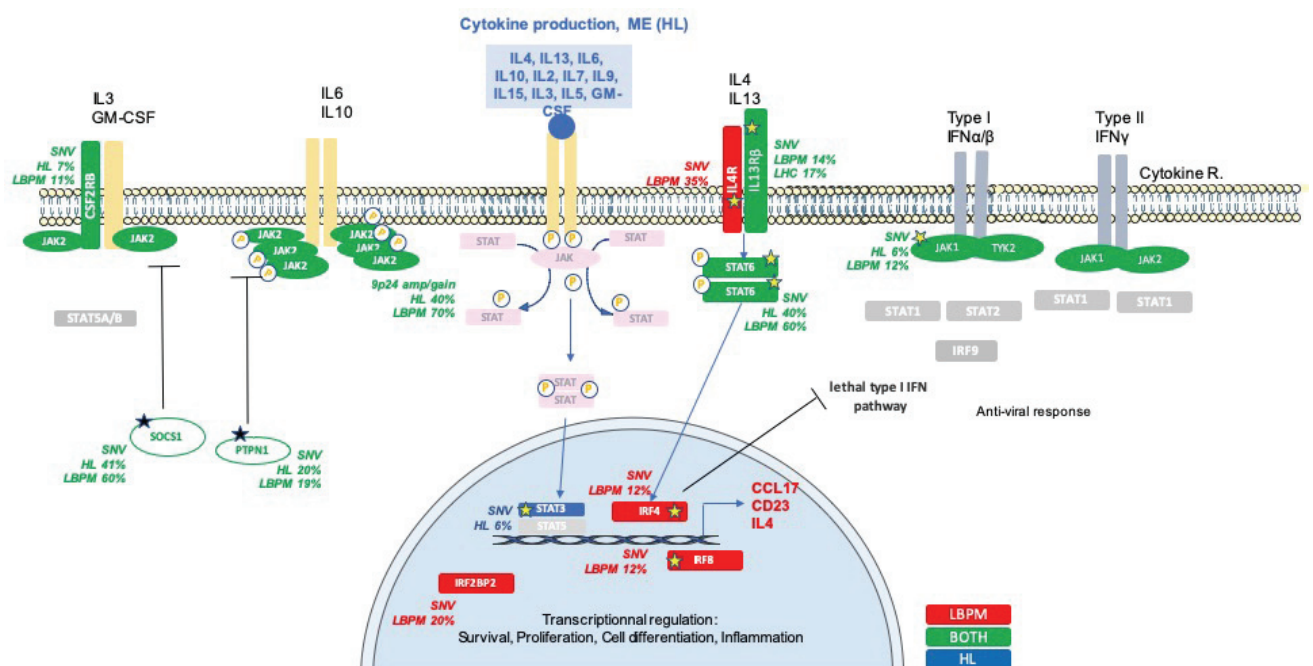


Figure 10: Voie JAK/STAT.

Anomalies moléculaires aboutissant à l'activation de la voie JAK-STAT dans le LHC et LBPM. Les anomalies plus spécifiques aux lymphomes B primitifs du médiastin sont colorées en rouge, celles au LHC en bleu et celles retrouvées dans les deux entités en vert.

III.B.1.a.iii. Coordination entre anomalies gain et perte de fonction au sein de la voie JAK-STAT

A l'aide de shRNA visant à diminuer l'expression de *STAT6* et de phospho-*STAT6*, il a été mis en évidence que les mutations de *STAT6* pouvaient contribuer au maintien de la survie cellulaire. En effet, une majoration de l'apoptose suite au ciblage par shRNA n'était observée que dans les lignées *STAT6* mutées, suggérant une dépendance à la voie associée à ces

mutations(Tiacci et al. 2018). Par ailleurs, dans cette même étude, la transduction d'un allèle sauvage de *SOCS1* induisait une baisse significative de la phosphorylation de *STAT6* associée à une plus forte apoptose seulement dans les deux lignées présentant des mutations concomitantes de *SOCS1* et d'un membre de la famille STAT (L1236 et HDLM2). En accord avec ces données, un traitement par un inhibiteur sélectif de JAK2 (fedratinib) était toxique pour les deux lignées portant ces doubles anomalies. Au total, ceci suggère une coopération entre les mutations activatrices des STAT et inhibitrices de *SOCS1* pour le maintien de la croissance tumorale dans le LHC.

III.B.1.a.iv. PIM kinase

Les sérines/thréonine kinases de type *PIM* interviennent en aval des voies JAK/STAT et NF- κ B et leur surexpression a été mise en évidence dans des lignées de LH mais aussi dans des cellules primaires. Un traitement par inhibiteur de PIM kinase a induit l'apoptose, une baisse de la signalisation JAK/STAT et NF- κ B, mais aussi l'expression des molécules immuno-régulatrices galectin-1 et PD-L1/2 (programmed death receptor ligands 1 and 2)(Szydłowski et al. 2017). Des mutations de PIM2 ont été identifiées dans 2 cas sur 10 dans l'étude d'exome de Reichel et al(Reichel et al. 2015), sans avoir été validées dans d'autres études à ce jour. Dans le LBPM, aucune mutation de PIM1 n'a été mis en évidence dans l'étude de Dubois et al(Dubois et al. 2016), contrairement au LBDGC où 33% des sous-types ABC et 8% des sous types GC présentaient une anomalie.

III.B.1.b. Activation Extrinsèque

L'activation constitutive de la voie JAK/STAT est également amplifiée par des signaux autocrines et paracrines via l'IL13 qui se lie à son récepteur au niveau de la cellule de RS et conduit à la prolifération cellulaire via la phosphorylation de *STAT6* (Kapp et al. 1999; Skinnider et al. 2002). L'activation de *STAT3*, via la fixation de l'IL-21, et celle de *STAT5* ont également été rapportées(Scheeren et al. 2008; Lamprecht et al. 2008; Kube et al. 2001). La fixation spécifique d'autres ILs (IL3, IL6, IL7) à leurs récepteurs présents à la surface des cellules de RS (récepteurs IL2, récepteurs IL3, IL6 ou IL7) a également été incriminée dans la lymphomagenèse, du fait d'une forte expression retrouvée en PEG(Steidl, Connors, and Gascoyne 2011).

III.B.2. *JAK-STAT et lymphome B primitif du médiastin*

Dans le LBPM, l'activation de la voie JAK-STAT, décrite dans les études de PEG, est également le produit de différentes anomalies moléculaires aboutissant, entre autres, à une surexpression de *JAK2* et des différentes *STAT* (figure 12). Ainsi, dans une série récente 73% des malades présentaient une anomalie de la voie JAK-STAT (Chapuy et al. 2019b).

III.B.2.a.i. De nombreuses anomalies communes avec le LHC

Des gains et amplifications du locus 9p24.1 (sur une région minimale de 3.5 Mb) sont rapportées dans près de deux cas sur trois de LBPM (68%) (Green et al. 2010; Wessendorf et al. 2007). L'activation constitutive de *STAT6* a été démontrée dans le LBPM (Guiter et al. 2004) avec une localisation nucléaire de p-STAT6. Cette activation est une des conséquences de l'amplification de *JAK2*, ou encore de mutations de *STAT6* elles-mêmes observées dans 36% à 72% des cas dans le domaine de liaison à l'ADN (Ritz et al. 2009; Chapuy et al. 2019b; Dubois et al. 2016). Tout comme dans le LHC, des mutations perte de fonction (ou petites délétions) d'éléments régulateurs, tels *SOCS1* et *PTPN1* sont décrites dans le LBPM. En effet, une délétion (petite taille) de *SOCS1* a été identifiée dans 45% des cas dans une série de 20 cas, sans que celle-ci ne soit exclusive de l'amplification de *JAK2*, suggérant un effet synergique entre les deux anomalies (Anja Mottok et al. 2009). Différentes études rapportent une incidence variant entre 35% et 68% faisant de la perte de fonction de *SOCS1*, avec les mutations de *STAT6*, une des anomalies les plus fréquentes (Dubois et al. 2016; A. Mottok et al. 2019; Chapuy et al. 2019a) avec dans un tiers des cas des mutations inactivatrices. Au sein de lignées de LBPM (MedB-1), des mutations bi-alléliques de *SOCS1* ont été retrouvées, abrogeant la fonction SOC box de la protéine et aboutissant à une phosphorylation constitutive de *JAK2* et *STAT5* (T. F. Barth et al. 2005). Cette activation de la voie était abolie grâce à la surexpression ectopique de *SOCS1* sauvage. Des délétions ont aussi été retrouvées dans une autre lignée (KARPAS1106P), avec les mêmes conséquences fonctionnelles (Melzner et al. 2006). Des mutations de *PTPN1* ont été identifiées dans 22% des cas de LBPM et 1/3 lignées testées (Gunawardana et al. 2014). Ces mutations conduisaient à une réduction de l'activité phosphatase et donc à une augmentation de la phosphorylation des membres de la voie JAK-STAT.

III.B.2.a.ii. Mais des spécificités

Récemment des mutations du gène codant pour le récepteur à l'IL4 (*IL4R*) ont été rapportées dans 24% à 30% des cas de LBPM, avec un hotspot identifié au sein de l'exon 8 aboutissant à une modification d'acides aminés au niveau membranaire (11 mutants sur 21)(Vigano et al. 2018; Duns et al. 2019; Chapuy et al. 2019b). In vitro mais aussi in vivo dans un modèle murin, la présence de ce hotspot est associée à un gain de fonction avec une voie JAK-STAT activée et une prolifération tumorale augmentée. De manière intéressante, ces mutations étaient toujours associées avec un autre « hit » sur la voie JAK-STAT suggérant un effet synergique dans la lymphomagenèse. Enfin, ces mutations étaient associées avec une diminution de l'expression du récepteur, corroborant bien le fait que l'activation de la voie n'est pas due à une sécrétion autocrine d'IL4 ou d'IL13(Steidl and Gascoyne 2011). Cette mutation n'est pas décrite comme faisant partie des anomalies oncogéniques au sein des séries de LHC, soulignant ici l'une des différences entre les deux entités (figure 12).

III.C. Voie PI3K/AKT/mTOR :

III.C.1. *PI3K/AKT/mTOR dans le lymphome de Hodgkin*

Parmi les nombreuses voies de signalisation de la cellule lymphomateuse, la voie PI3K-AKT-mTOR joue un rôle majeur dans la croissance, la prolifération et la survie cellulaire et semble également être altérée dans le LHC comme suggéré par des données de PEG de cellules de RS primaires montrant une surexpression des gènes impliqués dans cette voie(Vrzalikova et al. 2018) ou encore par des données in vitro où l'inhibition de la voie conduit à l'apoptose, suggérant un rôle important pour la survie des cellules de RS(Dutton et al. 2005; Georgakis et al. 2005) (figure 13).

ITPKB est un régulateur clé et des mutations perte de fonction de ce gène ont été rapportées par plusieurs équipes dans le LHC, avec une incidence variant entre 16 et 40%(Reichel et al. 2015; Tiacci et al. 2018; Spina et al. 2018). *ITPKB* code pour une kinase qui convertit le second messenger inositol triphosphate (IP3) en IP4, permettant de bloquer la voie en empêchant IP3

d'activer AKT(Westernberg et al. 2016). *GNA13*, codant pour la sous unité G α 13 de protéines G hétérodimériques, est également muté dans 19 à 30% des cas (Reichel et al. 2015; Tiacci et al. 2018; Spina et al. 2018; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019). G α 13 assure une prolifération des cellules centro-germinatives au sein des organes lymphoïdes secondaires en transmettant le signal des récepteurs couplés aux protéines G, *S1PR2* et *P2RY8*, résultant en l'inhibition de la phosphorylation d'AKT, restreignant ainsi l'expansion des CG en facilitant l'apoptose dans les niches potentiellement dangereuse(Healy et al. 2016; Muppidi et al. 2014; Muppidi, Lu, and Cyster 2015). Dans l'étude de Tiacci et al(Tiacci et al. 2018), les mutations de *GNA13* étaient fortement associées à celles de *STAT6* (64% de mutations de *GNA13* chez les patients *STAT6* mutés, versus 4% chez les patients *STAT6* non-mutés) suggérant une interdépendance de ces voies.

Au sein de cette même voie, Spina et al ont pu mettre en évidence des variants de *P2RY8* (7.5%), *PIK3CA* (6%), *S1PR2* (2.5%) et *ID3* (2.5%)(Spina et al. 2018) à des taux plus faibles (figure 13).

Récemment, une boucle de rétrocontrôle positif initiée par la liaison de la sphingosine-1 phosphate (S1P) à son récepteur membranaire (S1PR) et favorisant une activation de la voie PI3K et un PEG particulier dans la cellule de RS a été mise en évidence. Un des éléments clés de cette boucle, BATF3 (basic leucine zipper transcription factor), dont l'expression peut aussi être induite par l'activation de la voie JAK/STAT, a pour cible préférentielle *MYC*(Brune et al. 2008; Vrzalikova et al. 2018; Lollies et al. 2018), démontrant l'intrication étroite de toutes les voies de survie dans la cellule de RS. L'extinction de BATF3, par ailleurs toxique pour les cellules de LHC(Lollies et al. 2018), induit une baisse d'expression de S1PR1, validant ainsi un mécanisme de rétrocontrôle positif pouvant faire l'objet de cible thérapeutique(Vrzalikova et al. 2018).

III.C.2. *PI3K/AKT/mTOR et lymphome B primitif du médiastin*

Dans l'étude de Dubois et al, et confirmée par d'autres(Chapuy et al. 2019b; A. Mottok et al. 2019), des mutations de *GNA13* étaient retrouvées dans 50% des cas de LBPM versus seulement 12% pour les LBDGC-GC ou 0% pour les ABC. Des mutations d'*ITPKB* sont également

retrouvées plus de 40% des cas, une incidence plus importante que dans le LBDGC (9 et 16% des LBDGC ABC et GC respectivement)(Dubois et al. 2016; A. Mottok et al. 2019).

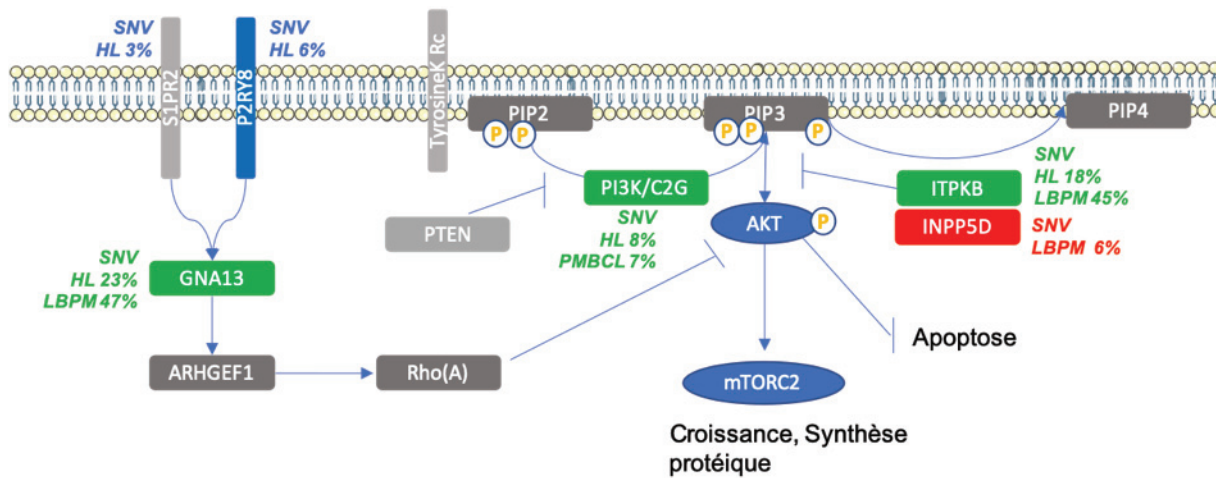


Figure 11: Voie PI3K/AKT.

Anomalies moléculaires aboutissant à l'activation de la Voie PI3K/AKT dans le LHC et LBPM. Les anomalies plus spécifiques aux lymphomes B primitifs du médiastin sont colorées en rouge, celles au LHC en bleu et celles retrouvées dans les deux entités en vert.

III.D. XPO1

XPO1 (exportin 1, alias CRM1 chromosome région maintenance 1) est un membre de la superfamille des récepteurs d'export nucléaire importin- β . Le canal hydrophobe d'*XPO1*, en se liant au domaine riche en leucine de protéines cargo (SEN), est ainsi responsable de l'export nucléaire de nombreux ARN et protéines de régulation cellulaires, y compris des protéines suppresseurs de tumeur comme p53, BRCA1, Survivin, NPM, APC et FOXO(Lapalombella et al. 2012; Sun et al. 2013).

L'équipe de F.Jardin (Jardin et al. 2016) a été la première à mettre en évidence des mutations d'*XPO1* au niveau du hotspot E571. Ces mutations étaient retrouvées avec une incidence similaire dans le LBPM et dans le LHC (24 et 25% respectivement), et nettement plus faible dans le LBDGC (1%). Ceci a été confirmé par d'autres équipes, dans le LBPM (16-25% mutations, et 72% un gain du locus 2p15, contenant *XPO1*(Chapuy et al. 2019b; A. Mottok et al. 2019)) et dans le LHC (10 à 26%, (Reichel et al. 2015; Tiacci et al. 2018; Spina et al. 2018; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Ducar, et al. 2019)).

Camus et al.(Camus et al. 2016) ont mis en évidence que la présence de ce hotpost dans l'ADN tumoral circulant de patients atteints de LHC (24%, par PCR digitale) était associée avec une survie sans progression à deux ans plus courte (57% versus 90% p=0.06).

Plus récemment, Miloudi et al.(Miloudi et al. 2018) ont démontré que STAT6 était une protéine cargo d'XPO1, aussi bien dans des conditions normales que dans des lignées de LBPM *XPO1* mutées ou sauvages. Ceci ouvre la voie à de potentielles combinaisons thérapeutiques entre Selinexor (inhibiteur sélectif d'export nucléaire) et les inhibiteurs de la voie JAK/STAT.

XPO1 est également surexprimés dans de nombreux cancer, et l'inhibition de son activité semble plus toxique pour la cellule tumorale que pour les cellules normales(Senapedis, Baloglu, and Landesman 2014; D. S. P. Tan et al. 2014; Etchin et al. 2016). Selinexor est un inhibiteur sélectif d'export nucléaire agissant par une liaison covalente au résidu C528 situé dans le canal hydrophobe d'XPO1. Testé sur des lignées de LHC, il était responsable d'une baisse de la croissance tumorale et de l'apoptose dans les deux lignées portant la mutation mais non dans les 4 ayant un phénotype sauvage ou avec une faible variance allélique(Tiacci et al. 2018).

III.E. Épigénétique

Tout comme dans de nombreux cancers, les mécanismes régulant la structure de la chromatine et la méthylation de l'ADN sont fortement impliqués dans la lymphomagenèse du LHC et du LBPM.

III.E.1. *Épigénétique et physiologie*

Au sein de la chromatine, il existe un lien direct entre le degré de condensation de l'ADN autour des nucléosomes d'histones et son accessibilité à la machinerie des ARN polymérases et donc à la transcription : l'euchromatine est faiblement condensée et ouverte, et l'hétérochromatine condensée et fermée, ceci étant régi au sein d'un équilibre dynamique. Le degré de condensation est régulé par des modifications des extrémités N-terminales des

histones, comme la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination ou la sumoylation, chacune étant opérée par des enzymes spécifiques. Ces modifications covalentes des histones agiraient soit directement en modifiant la compaction et l'accessibilité de l'enroulement de la chromatine autour du nucléosome soit indirectement en constituant des marques permettant le recrutement d'enzymes, au niveau des régions promotrices et enhanceurs, capables de modifier la structure de la chromatine (figure 14).

- L'acétylation, qui s'effectue par les histones acétyl-transférase (HAT) sur des résidus lysines, entraîne en général le relâchement de la structure et est associée avec une activation de la transcription.
- Les histones déacétylases (HDAC) ont en charge la déacétylation.
- La méthylation, soit sur des lysines, soit sur des arginines, est associée à une activation ou répression en fonction du nombre de groupement ajouté et du résidu. Ces mécanismes sont effectués par les histones méthyl-transférase (HMT) et histones déméthylase (HDM).

Ce « code » des histones établit un lien direct entre des empreintes spécifiques et l'état transcriptionnel de la chromatine (Strahl and Allis 2000):

- Parmi les principales marques d'activation de la transcription, on note la méthylation des histones H3 au niveau des lysines 4 (H3K4me), ou l'acétylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27 (H3K27ac).
- A l'inverse, la triméthylation de l'histone 3 au niveau de la lysine 27 ou 9 (H3K27me3 ou H3K9me3) est associée à une répression de la transcription.

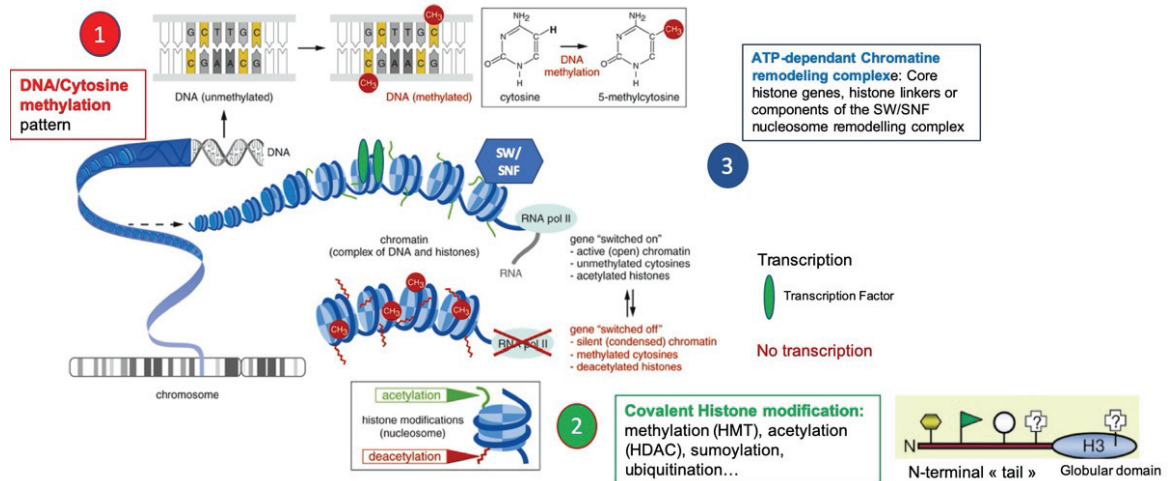


Figure 12: Les 3 mécanismes de régulation épigénétique.

Méthylation de l'ADN au niveau des locus préférentiels, modifications covalentes des histones et remodelage de la chromatine via des mécanismes ATP-dépendant.

La régulation de ces marques, suite à des signaux environnementaux ou internes, va aboutir à des modifications transcriptionnelles de gènes ayant un rôle dans la différenciation lymphocytaire B, dans la régulation de la formation du centre germinatif, ou des voies de survie comme NF- κ B et JAK-STAT, entre autres, permettant une promotion de la lymphomagenèse.

On observe dans le cancer une relation bidirectionnelle entre génétique et épigénétique. En effet, les anomalies moléculaires peuvent engendrer des modifications au niveau de l'épigénome et réciproquement, les modifications de méthylation, au niveau des îlots CpG notamment, peuvent favoriser l'accès à la chromatine et la survenue de mutations.

III.E.2. Mécanismes moléculaires perturbant la machinerie épigénétique dans le lymphome

Différentes anomalies moléculaires peuvent perturber ces mécanismes (figure 14&15).

III.E.2.a. Mutations au niveau des histones et associés

Parmi celles-ci, des mutations au niveau des histones, des histones dit linker ou des composants du complexe de remodeling du nucléosome SWI/SNF (switch/sucrose non-fermentable nucleosome remodelling complex), perturbent l'enroulement de la structure

primaire de la chromatine et l'accessibilité de l'ADN. Ainsi les mécanismes permettant de modifier les histones ou nécessaire aux processus cellulaires tels que la transcription, la réplication ou les réparations de lésions de l'ADN sont affectés, à travers un accès perturbé à la chromatine.

III.E.2.b. Mutations au niveau des gènes impactant la structure de la chromatine

Des mutations ont également été rapportées au niveau des gènes codant pour des éléments (enzymes) modifiant la structure de la chromatine ou ses marques transcriptionnelles (figure 14). Le lymphome folliculaire est un bon exemple (Huet, Sujobert, and Salles 2018; Morin et al. 2011). Parmi les anomalies rapportées dans des processus de lymphomagenèse, des mutations inactivatrices de l'histone lysine-N-méthyltransférase *KMT2D*, ou encore *KMT2C* peuvent aboutir à une baisse de la méthylation au niveau de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4) et à un état de répression transcriptionnelle. Des mutations pertes de fonction dans le domaine HAT de gènes codant pour *CREBBP* et *EP300* vont jouer sur l'acétylation de la lysine 27 (H3K27) au niveau d'enhancer de certains gènes. De manière indirecte, des mutations activatrices de *BCL6*, dont le rôle est de s'opposer aux effets « pro-expression » de *CREBBP* et *EP300* en recrutant des corépresseurs *SMRT* (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) et *HDAC*, sont fréquemment rencontrées dans le lymphome. La méthylation est elle aussi impactée avec des mutations des HMT comme *EZH2* aboutissant à l'accumulation d'H3K27 triméthylée au niveau de régions promotrices.

Dans l'ensemble, ces mutations au niveau des gènes modifiant la structure de la chromatine aboutissent à une répression aberrante de la transcription de ces gènes cibles.

III.E.2.c. Méthylation de l'ADN

Au-delà des mutations au niveau des histones ou des enzymes gérant la régulation des marques transcriptionnelles de la chromatine, la méthylation de l'ADN au sein des motifs CpG peut être dérégulée dans les LHC et LBPM (Eberle, Rodriguez-Canales, et al. 2011). Ainsi, en comparaison à des ganglions réactionnels le lymphome se caractérise par un profil de déméthylation globale impactant préférentiellement l'hétérochromatine (habituellement condensée et fermée), et une hyperméthylation focale de régions promotrices de certains gènes suppresseurs de tumeur. D'après Eberle et al (Eberle, Rodriguez-Canales, et al. 2011),

ces processus dans le LHC ou LBPM sont souvent médiés par le complexe polycomb PRC2 et aboutissent à un profil global de méthylation avec des distinctions claires entre les deux entités. En effet, les LHC sont caractérisés par une absence d'hypométhylation dite de novo (i.e. en comparaison au profil du ganglion réactionnel), contrairement aux LBPM pour lesquels 32% des zones hypométhylées étaient situées au niveau des régions riches en îlots CpG. L'hyperméthylation de novo était exclusivement retrouvée au niveau des îlots CpG dans le LBPM, alors que dans 14% des cas de LHC elle touchait aussi des zones en dehors. Ainsi, le développement des cellules de RS pourrait être d'avantage gouverné par des mécanismes induisant la perte d'expression de gènes suite à leur méthylation que l'inverse, ce qui le distingue des LBPM. En effet, la méthylation aberrante de l'ADN fait figure d'étape importante dans la reprogrammation des marqueurs lymphocytaires B dans le LHC (Doerr et al. 2005; Ushmorov et al. 2006). Dans cette même étude (Eberle, Rodriguez-Canales, et al. 2011), l'hyperméthylation de *MMP9* était spécifique aux LHC (possiblement en lien avec la morphologie SN et une faible expression de métalloprotéase), et celle de *EPHA7* et *DAPK1* aux LBPM, confirmant d'autres données sur la perte d'expression de ces gènes dans les lymphomes B (D. W. Dawson et al. 2007; Amara et al. 2008).

III.E.3. Anomalies moléculaires touchant les acteurs de l'épigénétique dans le lymphome de Hodgkin et B primitif du médiastin

Dans le LHC et LBPM, le réarrangement du locus 9p24.1 inclue des gènes impliqués dans cette régulation épigénétique comme la déméthylase *JMJD2C* ou le facteur de transcription *SMARCA2*. *JMJD2C* fonctionne comme une déméthylase au niveau des lysines 9 des histones 3 triméthylées (H3K9) et entrave le recrutement d'HP1 α et la formation d'hétérochromatine (i.e. fermée) (Cloos et al. 2006) aboutissant ainsi à une augmentation de la transcription des gènes avoisinants. De plus, P-JAK2 coopère dans ce processus en phosphorylant la tyrosine 41 de l'histone 3 d'HP1 α , qui devient alors inactif, ce qui contribue à la formation de chromatine ouverte (M. A. Dawson et al. 2009). De manière intéressante, des études d'interférence d'ARN avec *JAK2* et *JMJD2C* ont mis en évidence *MYC* comme étant un des gènes les plus impactés par ces modifications de la structure chromatinienne (Rui et al. 2010).

Tableau 3: Incidences des anomalies moléculaires des gènes impliqués dans la régulation épigénétique, dans le LHC et LBPM.

FONCTION	GENE	LHC	LBPM
HMT (H3K4)	KMT2D	3-11%	17%
HMT (H3K9)	SETDB1	20%	0%
HMT (H3K27)	EZH2	3%	6%
HAT (H3K27, H3K18)	CREBBP	5%	11%
HAT (H3K27, H3K18)	EP300	1%-12%	17%
HISTONES	HIST1H1E	10%	22%
	HIST1H3B	2.5- 20%	0%
	HIST1H1C	-	17%
	HIST1H3D	-	14%
	HIST1H2BC	-	6%
	HIST1H4E	-	6%
	HIST1H4J	-	3%
SWI/SNF COMPLEX ; NUCLESOME	ARID1A	10-24%	21%
BCL6 CO-REPRESSOR	BCOR	2.5%	-
	NCOR1	7%	13%
	NCOR2	0%	10%
METHYLCYTOSINE DIOXYGENASE, DNA DEMETHYLATION	TET2	2.5%	11%
FACTEUR DE TRANSCRIPTION	MEF2B		11%

LHC : Lymphome de Hodgkin classique ; LBPM : lymphomes B primitifs du médiastin ; HMT : histone méthyl-transférase, HAT : histone acétyl-transférase, SWI/SNF : switch/sucrose non-fermentable nucleosome remodelling complex, HDAC : histones déacétylases.

Ainsi, parmi les mutations impactant les gènes modifiant la structure de la chromatine dans le LHC, des mutations (perte de fonctions ?) des HMT *KMT2D* (*MLL2*, 1-11%), *SETDB1* (20%) et de nombreux gènes codant pour les histones (*HIST1H1E* (10%-50%), *HIST1H3B* (2.5%-20%), *HIST1H4C* (20%)), mais aussi du membre du complexe SWI/SNF *ARID1A* (10%- 24%), du corépresseur de BCL6 *BCOR* (2.5%), de la méthylecytosine dioxygénase *TET2* (2.5%), des HMT *EZH2* (1-2.5%), *WHSC1* (2.5%), des HAT *EP300* (1%-12%) ou *CREBBP* (5%, hotspot R1446H affectant le domaine acétyl-transférase), ont été rapportées (Spina et al. 2018; Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Matthew, et al. 2019; Reichel et al. 2015; Mata et al. 2017).

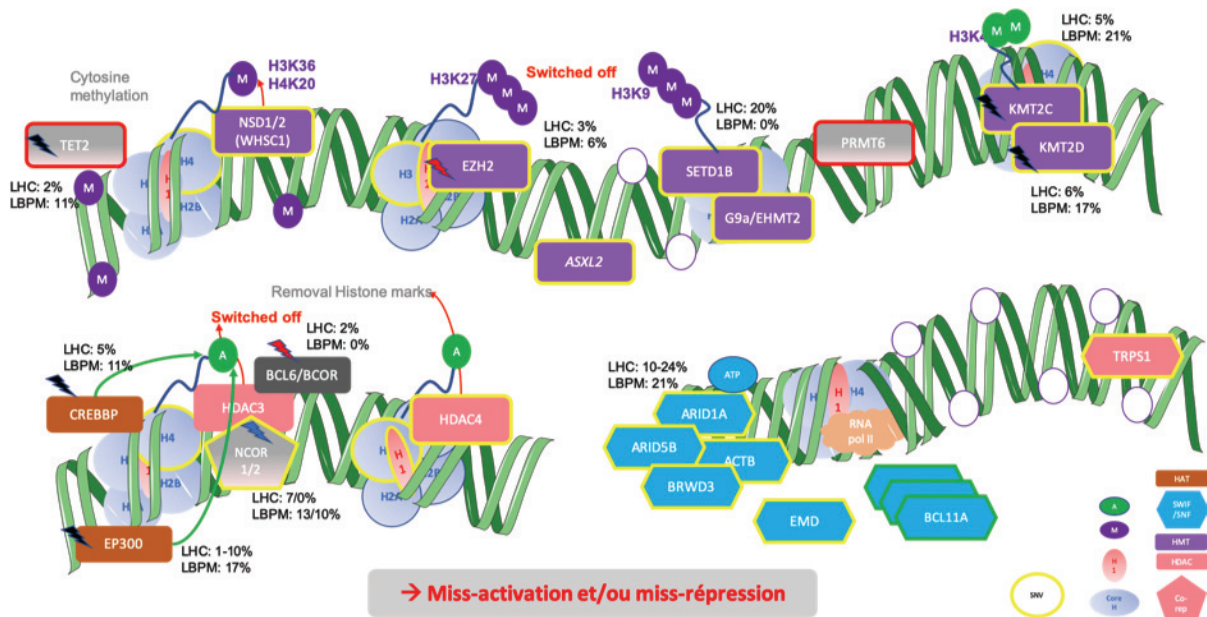


Figure 13: Anomalies moléculaires et épigénétique dans le LHC et le LBPM.

Abréviations : HMT (violet) : histone méthyl-transférase, HDAC (rose) : histone dé-acétylase, HAT : histone acetyl-transférase (marron), SWI/SNF (bleu) : Switch/Sucrose Non-Fermentable.

Dans le LBPM, Dubois et al ont également rapporté des mutations touchant des gènes impliqués dans la régulation de la structure de la chromatine, comme *EP300* (17%), *EZH2* (6%), *CREBBP* (11%), *KMT2D* (17%), *MEF2B* (11%). Dans cette même étude, *EP300*, *EZH2*, *CREBBP*, *KMT2D* et *MEF2B* étaient mutés dans 14%, 18%, 31%, 46%, 23% des LBDGC GC et 15%, 0%, 6%, 41%, 12% des lymphomes ABC, renforçant encore la différence entre ces sous-types et le LBPM (Dubois et al. 2016). D'autres ont rapporté des mutations au niveau de différents histones 1 comme étant potentiellement oncogéniques (MutSIG) (A. Mottok et al. 2019). Parmi celles-ci, l'incidence des mutations au niveau d'*HIST1H1E* est comparable à celle du LHC (20%), alors que celle au niveau de *HIST1H1C* était bien supérieure (17%) et qu'aucune anomalie n'était décrite au sein d'*HIST1H3B*.

III.F. Autres voies oncogéniques

III.F.1. *Apoptose et survie de la cellule*

De manière moins récurrente que pour les anomalies des voies JAK-STAT ou NF-κB, des anomalies affectant des éléments régulateurs de l'apoptose, du cycle cellulaire ou la survie de la cellule en réponse à des agressions ont également été décrits. En effet, comme dans de nombreux autres cancers, la voie de réparation des lésions de l'ADN peut être touchée, même si l'incidence est bien plus faible que dans d'autres hémopathie comme la LLC.

La fréquente observation d'une accumulation de p53 dans les cellules de RS (IHC) suppose un rôle pathogénique pour cette voie dans le LHC. Afin d'expliquer cette accumulation, Kuppers et al ont mis en évidence des gains au niveau du locus 12q14 contenant le gène *MDM2*, régulateur négatif de *TP53*(Küppers 2009). Ces gains de *MDM2* ont également été identifiés dans le LBPM(Wessendorf et al. 2007) (30%). Des mutations de *TP53* sont retrouvées avec une incidence assez faible, dans 5-12% des cas de LH étudiés, tout comme dans le LBPM(Dubois et al. 2016; A. Mottok et al. 2019).

Des mutations de l'oncogène *MYC* sont retrouvées dans ces deux pathologies, mais avec une incidence assez faible (6% dans les LBPM (Dubois et al. 2016), 4% dans les LHC(Spina et al. 2018)). Des pertes d'*ATM* ou *RB1*, régulateurs du cycles cellulaires, ont été décrites dans près de 50% des cas par Reichel et al(Reichel et al. 2015), mais dans une série de seulement 10 cas. Des mutations au sein du répresseur transcriptionnel *ZNF217* ont aussi été rapportées dans les deux entités (31% des LBPM, et incidence assez variable dans le LHC, allant de 2 à plus de 20%).

III.F.2. *Réparation de l'ADN et signature mutationnelle*

Des anomalies au niveau du gène *UBE2A* codant pour une enzyme de la famille des E2-ubiquitine conjuguantes et nécessaire pour la réparation des lésions de l'ADN induites par la réplication, ont également été retrouvées dans 5 à 15% des cas de LHC et 4% des LBPM (A. Mottok et al. 2019).

Récemment Mottok et al ont rapporté des données d'exomes chez 94 cas de LBPM permettant d'étudier les signatures mutationnelles, au-delà des anomalies spécifiques. Les trois signatures les plus fréquentes étaient reliées à l'âge, au défaut de réparation de l'ADN et à l'activité AID/APOBEC(A. Mottok et al. 2019). Un peu plus tard, Chapuy et al(Chapuy et al. 2019c) ont rapporté des données chez 37 cas de LBPM. Trois cas dans cette série ont été identifiés comme « hyper-mutator », deux d'entre eux avaient une anomalie décalant le cadre de lecture du gène *MLH1* (impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN), et l'autre une mutation non-sens du gène *PMS2* également impliqué dans les réparations des lésions de l'ADN. De manière intéressante, en dépit du jeune âge des patients, la majorité des autres mutations étaient causées par une déamination spontanée au niveau de sites CpGs, correspondant à une signature généralement associée à l'âge, comme dans l'étude de Mottok et al. En dehors de la signature reliée à l'âge, celles reliées aux activités cytidine déaminase (APOBEC et AID) étaient les plus fréquentes.

III.F.3. Facteurs de différenciation B

Enfin, des mutations au sein des facteurs de transcription en charge de la différenciation B ont été décrites dans certaines études, mais avec une incidence assez variable dans le LHC en fonction des études, nécessitant donc validation : *IKZF3* (IKAROS, 2-20% dans le LHC, 10% dans le LBPM) et *PAX5* (20% dans le LHC(Wienand et al. 2019)).

IV. ME et interaction avec la cellule tumorale

Approximativement 95-99% du tissu du LHC est composé de cellules réactionnelles non tumorales: cellules T CD4+, CD8+, macrophages, mais aussi mastocytes, PNE, PNN, cellules B et plasmocytes, cellules endothéliales, fibroblastes(Swerdlow et al. 2016). Ainsi le MET, et les interactions cytokines/chimiokines permettant un soutien à la croissance de la cellule de RS, représentent une des différences majeures entre les LHC et LBPM. Ces cellules inflammatoires échouent dans leur fonction anti-tumorale en ne reconnaissant et en n'éliminant pas de manière efficace les cellules cancéreuses. Les mécanismes d'échappement à la surveillance immune anti-tumorale sont multiples et impliquent dans le LHC une promotion de cellules régulatrices TH2 et T-régulateurs. Un autre mécanisme commun au LHC et LBPM réside dans la prévention de la cytotoxicité cellulaire via une expression accrue par la cellule tumorale de molécules entraînant un épuisement des cellules T ou encore la perte de molécule du CMH empêchant leur reconnaissance par le système immunitaire adaptatif. Si certains mécanismes pro-tumoraux en lien avec le MET sont spécifiques du LHC, ceux en lien avec l'échappement à la réponse anti-tumorale sont largement partagés par les deux entités.

Dans ce chapitre, nous aborderons en premier le ME pro-tumoral dans le LHC en décrivant les différents constituants (macrophage, PNE...), puis les éléments associés à l'échappement à la réponse immune dans les deux entités (exhaustion, perte d'expression du CMH).

IV.A. Promotions de la croissance tumorales : une particularité du LHC ?

Un des rôles du ME dans le LHC est de promouvoir la croissance tumorale et la survie des cellules de RS et de Hodgkin.

Attirés sur le site tumoral via RANTES, IL-5, IL-9, CCL28, GM-CSF et CCL11(Glimelius et al. 2006; Hanamoto et al. 2004), les PNE stimulent l'interaction CD30/CD30L avec la cellule de RS, en association avec les mastocytes attirés par RANTES et IL-9(Fischer et al. 2003). La production d'IL-8 par les cellules de RS recrutent des PNN, sécrétant le NGF (nerve growth factor), ligand de DDR2, dont l'activation induit la survie de la cellule de RS(Renné et al. 2008). Étant donné

que les PNN sont rarement à proximité des cellules de RS, une étude suggère le rôle des exosomes pour délivrer la molécule CD30 aux cellules exprimant son ligand et stimuler la production d'IL8(Hansen et al. 2014). Les fibroblastes sont un autre composant majeur du MET. Les cytokines comme IL-13, TNF- α , TGF- β et FGF (fibroblastes growth factor) prennent part à l'attraction des fibroblastes au sein du tissu tumoral alors source d'une variété de cytokines/chimiokines dont eotaxin et RANTES, contribuant ainsi à l'attraction d'autres éléments du MET comme les PNE, les cellules T régulatrices et aussi à la prolifération tumorale(Franziska Jundt et al. 1999; Aldinucci et al. 2004). Enfin, l'interaction entre le MET et les cellules de RS via un signal CCR5-CCL5 a récemment été étudiée dans un modèle in vitro démontrant que le CCL5, sécrété par les cellules de RS, recrutait des cellules stromales, mésenchymateuse et des monocytes, participant ensuite à une boucle de régulation positive aboutissant à la croissance tumorale. Dans cette étude, les monocytes, au contact des cellules tumorales, subissaient une reprogrammation vers un phénotype de macrophages associés aux tumeurs, exprimant IDO, PD-L1 et sécrétant de l'IL-10, CCL17 et TGF- β . Sur le plan thérapeutique, ces interactions pouvaient être bloquées par maraviroc, un agent antagoniste de CCR5(Casagrande et al. 2019).

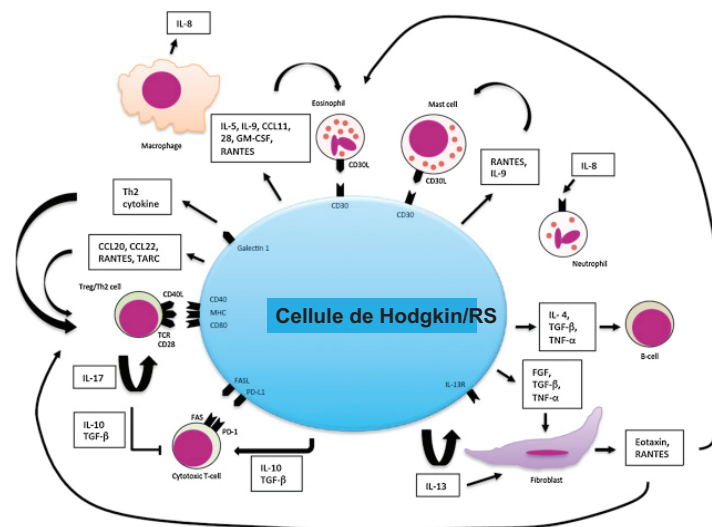


Figure 14: Interaction entre la cellule de RS et les cellules du MET dans le LH.

Une interaction complexe entre la cellule de RS et les autres cellules du MET, aussi bien directe et à travers des cytokines/chimiokines est impliquée dans la survie et la prolifération des cellules tumorales. Les composants du MET incluent : des cellules TH (helper), cytotoxique et régulatrice (T reg), des cellules B, neutrophiles, éosinophiles, mastocytes, macrophages et fibroblastes. RANTES: regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted; TARC: thymus and activation regulated chemokine; TGF- β : transforming growth factor beta; FGF: fibroblast growth factor; TNF- β : tumor necrosis factor beta. Adapté, d'après (Matsuki and Younes 2015).

IV.B. Les lymphocytes T et mécanismes d'épuisement associés

IV.B.1. Les lymphocytes T dans le LHC

Les cellules T correspondent au principal composant du MET dans LHC, attirée au sein de la tumeur grâce à l'expression de différentes chimiokines, comme RANTES, TARC, CCL20 et CCL22 par les cellules de Hodgkin et de RS (Van Den Berg, Visser, and Poppema 1999). L'interaction entre ces lymphocytes T et les cellules tumorales se fait via CD80 et CD40/CD40L, offrant à la cellule tumorale à la fois des signaux de survie et une protection contre la surveillance immune (Marshall et al. 2004).

La majorité des lymphocytes T du MET sont CD4+, certaines ayant un phénotype T régulateur (reg). Ces cellules T reg (CD4+CD25+FOXP3+) exercent une activité immunosuppressive vis-à-vis des cellules T-CD8 cytotoxiques (Marshall et al. 2004; Tanijiri et al. 2007) en sécrétant, tous comme les cellules de RS, de l'IL10 et du TGF β (Skinnider et al. 2002; Herbst et al. 1996; Kadin et al. 1990). De plus, la différenciation des cellules CD4 naïves en T reg est favorisée par la sécrétion d'IL7 par les cellules de RS qui sur-expriment galectin-1 induisant une sécrétion de cytokines de type TH2, IL-4 et IL-10, et donc une expansion des cellules régulatrices (Juszczynski et al. 2007; Cattaruzza et al. 2009).

L'infiltrat T CD4+ au sein de suspension cellulaire de LHC a été mieux caractérisé par Greaves et al (Greaves et al. 2013), en combinant CMF et analyse fonctionnelle du profil de sécrétion cytokinique. Contrairement aux données plus anciennes (Poppema Sem Cancer Biol 2000 ; Marshall, Blood 2004), cette étude a mis en évidence que les cellules T CD4+ helper exprimaient plus de marqueur de type TH1 (CXCR3/CXCR5, TNF α /IFN γ /Interleukine-2 (IL-2)) et moins de marqueur TH2 (CCR3/CCR4, sans IL-4/IL-13)). Dans cette étude, l'expression de PD-1 (marqueur d'épuisement) n'était pas retrouvée sur ces cellules TH1 qui avaient un profil de cellules mémoires centrales, avec des marqueurs d'activation. En étendant leur étude à une cohorte sur TMA, l'expression de T-BET (marqueur TH1) était abondante au sein des prélèvements de LHC, alors que celle de CMAF/GATA3 (marqueur TH2) et PD-1 étaient moins

importantes. Récemment, l'équipe de M. Shipp a réalisé une étude permettant de caractériser en détail les cellules CD4+ à l'aide de la spectrométrie de masse (Cader et al. 2018). Cette étude a pu confirmer la richesse du MET en cellules T CD4+, avec en parallèle, une perte fréquente du CMH de classe I sur les cellules de RS. De plus, une expansion concomitante de cellules TH1 effectrices et régulatrices a été mise en évidence. Les cellules T-reg n'exprimaient pas ou peu de PD-1, à contrario des cellules TH1 effectrices, allant un peu à l'encontre des données précédentes ne mettant pas en évidence de marqueur d'épuisement sur les cellules TH1 dans le LHC (Greaves et al. 2013). Ce différentiel d'expression de PD-1 et donc de fonctionnalité entre les T reg et les T effecteurs représente possiblement un mécanisme complémentaire d'immunosuppression (Cader et al. 2018).

Enfin, les avancées techniques avec le séquençage à l'échelle de la cellule unique ont permis de mettre en évidence une sous-population de cellules T régulatrices particulières dans le MET du LHC, les T-reg1, pouvant faire l'objet de cible thérapeutique à travers leur expression du récepteur inhibiteur LAG-3 (Aoki et al. 2020). Des analyses fonctionnelles ont permis d'établir cette population LAG-3+ comme immunosuppressive et en contact direct avec les cellules tumorales n'exprimant pas le CMH-II.

Une équipe française s'est concentrée sur la caractérisation des cellules T exprimant ICOS, marqueur indispensable à l'activation des cellules TFH et à leur interaction avec les cellules B du centre germinatif (Le et al. 2018) dans le LHC. Les cellules TFH sont spécialisées dans le support de la réponse immune en étant capable de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires pour interagir avec les cellules B, grâce à l'expression de marqueur comme CXCR5, ICOS, OX40, BTLA, ou encore PD-1. Dans cette étude, comme attendu, les CD4 représentait la majeure partie de l'infiltrat exprimant ICOS et CXCR5. Mais de manière intéressante, les auteurs ont mis en évidence une population CD8+, ICOS+/CXCR5+, représentant 3.6 à 25% de l'infiltrat dans 6 des 45 cas analysés. Ces cellules n'étaient pas retrouvées dans les prélèvements sains non tumoraux ou dans d'autres LNH. L'étude de ces cellules a pu montrer des caractéristiques phénotypiques et de PEG communes avec les TFH (y compris PD-1, BCL6, OX40, CD200). Sur le plan fonctionnel, elles se caractérisent par un déficit en cytotoxicité, une faible sécrétion d'IFN γ et une production d'IL-4, IL-21, CXCL13 comparable à celle des TFH, permettant d'attirer les cellules B. Le rôle de ces cellules CD8 au profil TFH reste encore à

élucider mais renforce l'idée d'un immuno-editing particulier au sein du LHC, et une reprogrammation touchant à la fois la cellule tumorale mais aussi le ME.

IV.B.2. Exhaustion : La voie PD-1 / PD-L1 dans le LHC et LBPM

L'épuisement des lymphocytes T à travers la voie PD-1 / PD-L1 est une des principales sources d'échappement à la réponse immune dans le LHC(Yamamoto et al. 2008), mais aussi dans le LBPM, pouvant faire l'objet de cible thérapeutique. En effet, cette expression de PD-L1 par les cellules tumorales est en grande partie due à des anomalies récurrentes (réarrangements, gains, amplifications) impliquant le locus 9p24.1, contenant les gènes *CD274 (PD-L1)* et *PDCD1LG2 (PD-L2)*(Green et al. 2010; Roemer, Advani, Ligon, et al. 2016). De manière intéressante, ces gains/amplifications comportent aussi les gènes *JMJD2C* (Lysine Demethylase 4C qui convertit les histones triméthylés vers la forme diméthylés) et *JAK2*(Green et al. 2010). Par screen d'ARN d'interférence, *JAK2*, *JMJD2C* et *RANBP6* ont été identifiés comme étant des gènes essentiels à la survie du LBPM(Rui et al. 2010). Les gains ou amplifications du locus 9p24.1, associés à une élévation des transcrits et de l'expression protéique de PD-L1/2, étaient absents dans toutes les lignées de LBDGC analysées(Green et al. 2010; Twa et al. 2014). L'incidence a été évaluée à 38% dans une série de LHC microdisséqués (préférentiellement LHC-SN) et 68% des LBPM (Green et al. 2010; Twa et al. 2014). De manière intéressante, les cassures ou translocations semblaient restreintes aux LBPM (20% versus 0% pour les LHC)(Twa et al. 2014), et être associées à un niveau d'expression de PD-L2 à la surface plus importante. Deux types de fusions ont été rapportés : une impliquant la région 3', avec *CIITA*, l'autre la région 5', avec le gène des immunoglobulines *IGHV7-81*. Récemment, Roemer et al(Roemer, Advani, Ligon, et al. 2016) ont étudié ces réarrangements par FISH dans une vaste cohorte de LHC (N= 108 cas) et ont mis en évidence une anomalie au sein de la vaste majorité des cas (97%) : principalement des gains/amplifications du locus (polysomie 5%, gain 56%, amplification 36%, translocation 2%) toujours en lien avec le niveau d'expression protéique. La survie sans maladie était plus courte pour les patients ayant une amplification.

Sur le plan thérapeutique, l'efficacité des anticorps anti-PD-1 a été démontrée à travers différentes études(Ansell et al. 2015; Armand et al. 2018; Roemer, Advani, Ligon, et al. 2016),

l'expression des molécules du CMH de classe I ou II (Roemer, Advani, Ligon, et al. 2016) semblant être prédictive de la réponse.

IV.B.3. Autres anomalies ciblant la réponse immunitaire anti-tumorale

Au-delà de l'interaction PD-1 / PD-L1, des anomalies moléculaires ayant pour cible des voies d'activation de la réponse anti-tumorale ont été mise en évidence dans le LHC et dans le LBPM, comme des mutations de *CD58*, *Fas* (*TNFRSF6*, *CD95*) ou *MSH4A1*.

CD58 est impliqué dans la reconnaissance immune des cellules tumorales via sa liaison au récepteur CD2 exprimé à la surface des lymphocytes T cytotoxiques. Des mutations de *CD58* associées à une perte d'expression protéique ont été identifiées dans des lignées cellulaires de LHC. Sur des biopsies de patients, l'expression de *CD58* était retrouvée dans tous les cas n'ayant pas rechuté (N=36), alors que 6 des 45 cas ayant rechuté avaient une expression diminuée ou absente du *CD58* (11% de rechutes) (F. R. Abdul Razak et al. 2016). De même, dans l'étude de Dubois et al, des mutations de *CD58*, pour la plupart tronquantes étaient plus fréquemment retrouvées dans le LBPM (39%) quand dans les deux sous-types de LBDGC (6 et 10% dans les LBDGC-ABC et LBDGC-GC respectivement).

Des mutations/pertes d'hétérozygotie de *Fas* (*CD95*) ont été rapportées dans le LHC (3 mutations sur 10 cas étudiés, et 2 pertes d'hétérozygotie sur 6 cas, dont un comportant une mutation sur l'autre allèle) (Müschen et al. 2000; E. M. Maggio et al. 2003). Ce récepteur de surface est connu pour son habilité à médier l'apoptose avec son ligand *CD95L*, exprimé à la surface des cellules NK et T. Ces mutations pourraient donc altérer sa fonction pro-apoptotique.

MFHAS1 est un potentiel oncogène comportant des régions répétées conservées riche en leucine et ayant un potentiel rôle dans l'immunité innée comme régulateur des voies TLR2 et TLR4, permettant l'activation du FT AP-1. Des mutations, distribuées de manière homogène sur la séquence protéique, sont retrouvées dans 28% des LBPM, 10% des LBDGC-GC et seulement 1% des ABC. Aucune mutation décrite dans le LHC à ce jour.

IV.B.4. Les macrophages : un autre rempart entre le lymphocyte T et cellule de RS

L'importance des macrophages dans le MET a d'abord été étudiée sous l'angle des biomarqueurs, leur abondance étant prédictive d'une moins bonne réponse au traitement.

Plus récemment, Carey et al (Carey et al. 2017) ont rapporté d'intéressantes données à l'aide d'analyseurs systématiques d'images d'IHC. Ils ont mis en évidence que les macrophages étaient les cellules ayant la plus forte expression de PD-L1 dans le MET. Ils ont ensuite visualisé la relation spatiale entre les différentes composantes du ME : les macrophages PD-L1+ se localisaient non seulement plus proche des cellules de RS que les macrophages PD-L1- mais avaient, comme les cellules de RS, un contact avec les cellules T CD4+ PD-1+, permettant ainsi de « protéger » la cellule tumorale. Par ailleurs, ces lymphocytes CD4+ PD-1+ étaient plus proche des cellules de RS PD-L1+ que les lymphocytes CD8+ PD-1+, ce qui est cohérent avec une perte plus importante de l'expression du CMH-I par rapport à celle du CMH-II sur les cellules tumorales (Roemer, Advani, Redd, et al. 2016; Carey et al. 2017; A. Diepstra et al. 2005; Roemer, Advani, Ligon, et al. 2016).

IV.C. Perte d'expression des molécules du CMH

Les pertes du segment chromosomique 6p21.3, contenant le locus HLA classe I et II, ne sont pas très fréquentes (11% des cas de LBPM), en revanche d'autres mécanismes permettent d'aboutir à la perte d'expression (Wessendorf et al. 2007).

IV.C.1. CMH de classe- II : Réarrangement 16p13.13 et CIITA

Dans le LBPM, *CIITA* (16p13.13), codant pour un élément régulateur/transactivateur du CMH de classe II, est la cible de réarrangements touchant 38% des patients (Steidl et al. 2011) et ayant un impact sur la survie (survie sans maladie 63% vs 85%), indépendamment de l'index pronostic international (IPI). Ces translocations touchent deux voies d'échappement à la réponse immune entraînant la perte d'expression des molécules du CMH-II tout d'abord, mais

aussi, la surexpression de *PD-L1* et *PD-L2*, ceux-ci étant des partenaires possibles. Dans un modèle de co-culture cellulaire avec des lignées de LBPM et lymphocytes T, Steidl et al (Steidl et al. 2011) ont démontré que la surexpression de *PD-L1* et *PD-L2* secondaire à la translocation, induisait une inhibition de l'activation des lymphocytes T (mesurée par l'expression de *CD69* et *IL-2*), réversible après traitement par anti-*PD-1*, -*PD-L1* ou -*PD-L2*, mais pas par des inhibiteurs de *CTLA4*. De telles cassures chromosomiques étaient observées dans 15% des LHC, mais dans seulement 3% des LBDGC. Les réarrangements au niveau du locus 16p13.13 sont parfois déséquilibrés et impliquent la perte de matériel génétique au niveau du point de cassure. *SOCS1*, élément fondamental dans la régulation de la voie JAK-STAT, se situe à proximité du locus de *CIITA*. Il est raisonnable de suggérer que cet évènement puisse avoir 3 conséquences menant à la prolifération et survie de la cellule tumorale : une perte de l'expression de *CIITA*, une perte de celle de *SOCS1* et le gain d'expression d'oncogène comme *PD-L1/PD-L2* (Melzner et al. 2006; Steidl, Connors, and Gascoyne 2011; Steidl and Gascoyne 2011).

Par ailleurs, des mutations de *CIITA* ont été mise en évidence dans 25 à 56% des cas de LBPM (Dubois CCR 2016, Hung Blood 2019, versus 12 et 10% dans les LBDGC-ABC et GC) et dans le LHC à une fréquence moindre (6%) (Spina et al. 2018).

IV.C.2. CMH de classe I : *B2M*

Des mutations affectant le gène *B2M*, codant pour la Béta-2 microglobuline associée aux protéines de surface du CMH-I, sont fréquemment retrouvées dans le LBPM, affectant 32 à 50% des patients (Dubois et al. 2016; Chapuy et al. 2019b), versus 9 et 18% dans les LBDGC-ABC et GC respectivement. La majorité de ces mutations sont tronquantes, ou impliquent le codon start. Des pertes du locus sont aussi retrouvées dans 27% des cas, aboutissant à des lésions bi-alléliques dans peu de situation toutefois (6%, (Chapuy et al. 2019a)). Des mutations récurrentes sont également retrouvées dans le LHC (16 à 70% (Reichel et al. 2015; Spina et al. 2018; Tiacci et al. 2018)). Les auteurs ont montré que ces mutations inactivatrices conduisaient à la perte d'expression du CMH-I, qui a pu être rétablie grâce à la transduction du gène *B2M* sauvage (Reichel et al. 2015). Dans une cohorte d'extension comportant 145 cas, l'absence d'expression de la protéine *B2M* au sein des cellules de RS était associée avec un

stade précoce, un âge jeune au diagnostic et une survie sans progression et globale plus longue(Reichel et al. 2015). La perte de la B2M était associée avec le sous type SN et l'absence d'EBV, suggérant que cette perte influence la structure du MET dans le LHC.

Au total, dans l'étude récente de Chapuy et al(Chapuy et al. 2019a) 59% des cas de LBPM avaient une anomalie impliquant une altération des mécanismes de présentation antigénique : que ce soit une perte ou une mutation de *B2M*, une perte du locus 6q21.33 ou une anomalie de structure de *CIITA*.

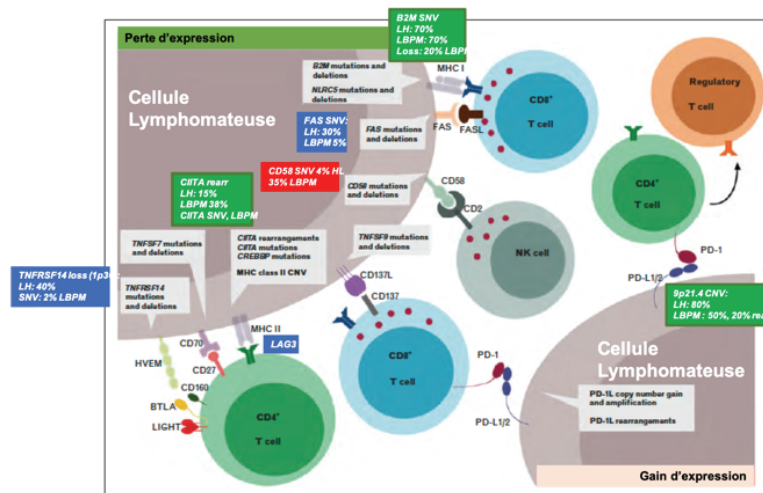


Figure 15: Mécanismes d'échappement de la réponse immunitaire dans le LHC et LBPM.

Adapté, d'après Mottok et al, 2015(Anja Mottok and Steidl 2015). Les anomalies rencontrées dans la LHC sont dans les encadrés bleus, LBPM verts, et dans les deux rouges.

V. Les lymphomes de forme frontière et lymphomes B à grandes cellules EBV+

Étant donné les similitudes cliniques et moléculaires entre le LHC et LBPM il n'est pas surprenant que certains lymphomes, dénommés lymphome de formes frontières (LFF), puissent présenter des caractéristiques intermédiaires sur le plan morphologique et immunophénotypique. Au-delà d'une problématique de nosologie et de classification, l'existence de ces lymphomes pose une réelle problématique thérapeutique. En effet, les LHC et LBPM étant eux même traités de manières distinctes, comment doit-on prendre en charge les patients atteints de LFF ? ce d'autant que ceux-ci semblent avoir une moins bonne réponse au traitement que les LHC ou LBPM, dont l'origine n'est pas comprise à ce jour.

De plus, si l'existence d'un continuum entre LBPM et LHC peut facilement se concevoir, l'existence de nombreux cas de LFF n'ayant pas d'envahissement médiastinal questionne sur l'origine cellulaire de ces lymphomes et donc sur leur classification. Enfin, la place de l'EBV au sein de cette entité est débattue : certains étant en faveur d'une classification plus strict regroupant les cas EBV positifs au sein des LBDGC-NOS reliés à l'EBV(Nicolae et al. 2015), dans ce cas de morphologie polymorphe, décrits dans le chapitre suivant. D'autre considérant que tout comme pour le LHC, la présence de l'EBV n'empêche pas la classification de ces cas ayant une morphologie intermédiaire au sein du groupe des formes frontières(Ahmed A. Elsayed et al. 2017).

L'objectif de ce chapitre est de résumer les données disponibles sur les LFF et sur les LBDGC-EBV de morphologie polymorphe, étant donné l'intrication de ces deux entités sur le plan morphologique, et ainsi de définir la problématique du travail.

V.A. Descriptions anatomopathologique, classification OMS et données cliniques des LFF

V.A.1. Description initiale des LFF entre lymphomes de Hodgkin et lymphome B à grandes cellules.

Les premiers cas de LFF entre LBPM et LHC ont été décrit en 1998, lors d'un workshop sur le lymphome de Hodgkin regroupant 12 experts en hématopathologie, d'Europe et d'Amérique du Nord où 5 cas présentant des caractéristiques intermédiaires entre LHC et LBPM ont été présentés, suggérant une possible entité distincte pour ces cas à présentation médiastinale (Rudiger et al. 1998). Quelques années plus tard, Traverse-Glehen et al (Traverse-Glehen et al. 2005) ont confirmé ces observations initiales et rapporté 34 cas, dont 21 avec une morphologie intermédiaire et 13 présentant un lymphome dit composite ou séquentiel où chacune des deux composantes est bien identifiée chez le même malade, soit au diagnostic (composite) soit de manière séquentielle (diagnostic/rechute). Les auteurs ont défini les LFF comme présentant à la fois des caractéristiques histologiques et immuno-phénotypiques de LHC et de LBPM, rendant le diagnostic de l'une ou l'autre des catégories non relevant. Dix cas présentaient une morphologie plus caractéristique des LHC (encore appelés LHC-like) et 11 des LBPM (LBPM-like). A première vue, l'aspect histologiques des cas LBPM-like est en faveur du diagnostic de LBPM avec un infiltrat monomorphe de grandes cellules avec un fond inflammatoire éparse. Des zones de nécrose entouraient parfois des grappes de cellules tumorales, donnant un aspect de compartimentalisation. Par endroit, des nodules et des plages de grandes cellules, dont certaines avaient l'aspect de cellules lacunaires et de RS, étaient observés. Ces cas avaient un immunophénotype évoquant un LHC avec une expression du CD30 pour tous, du CD15 dans 8/10, alors que l'expression du CD20 était variable, parfois hétérogène et même négative dans 3 cas.

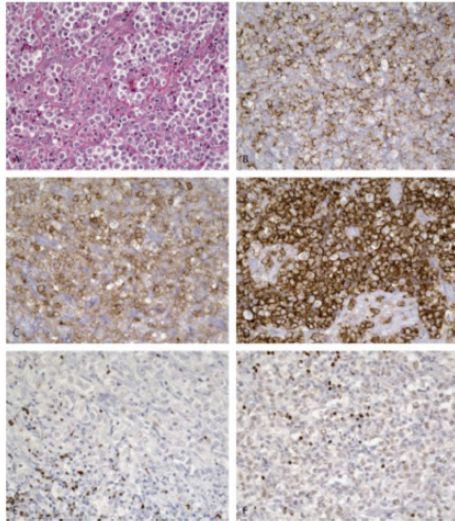


Figure 16: Lymphome de forme frontière (LFF) de morphologie LBPM-like. D'après Traverse et al (Traverse-Glehen et al. 2005). De haut en bas et de gauche à droite : H&E, CD20, CD30, CD15 (fort), BOB-1 (neg) et OCT-2 (neg). La tumeur est composée de plage de grandes cellules avec un cytoplasme clair. Quelques cellules occasionnelles ressemblent à des cellules lacunaires, sans claire cellule de RS. La plupart des cellules sont CD20, avec un marquage faible cependant. Elles sont positives pour CD30 et CD15, et négatives pour BOB-1 et OCT-2, alors que les petites cellules B du ME sont bien positives.

A contrario, la morphologie des 11 autres cas évoquaient plus un LHC, avec des caractéristiques de LH-SN de grade 2 et de nombreuses cellules tumorales (de RS ou lacunaires) pouvant parfois former des plages. Un fond inflammatoire de PNE et PNN était présent, bien que moins important dans le LHC typique, tout comme la nécrose, assez peu présente dans ces cas, contrairement au LH-SN. En dépit de l'apparence histologique de LHC, les cellules tumorales exprimaient toutes fortement et uniformément le CD20 dans 11 cas sur 11 et CD79a dans 7 cas sur 11. Le CD30 et le CD15 étaient également positifs dans 10/11 et 8/11 cas respectivement. L'expression des facteurs de transcription Oct-2, Pax-5 et BOB1 était retrouvée de manière variable, nécessitant une exploration plus approfondie. L'expression de MAL, habituellement caractéristique des LBPM, étaient retrouvée dans les deux sous-groupes. Dans cette série, 7 cas sur 34 ne présentaient pas d'envahissement médiastinal et 2/7 était EBER positif.

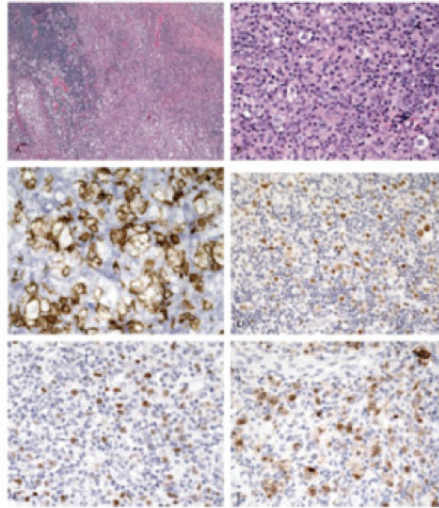


Figure 17: Lymphome de forme frontière de morphologie LHC-like.

D'après Traverse et al 2005(Traverse-Glehen et al. 2005). De haut en bas et de gauche à droite : H&E (bandes fibreuses), H&E (cellules tumorales de H et RS), CD20 (fort), PAX5 (positif), OCT-2 (positif), BOB-1 (positif). Des bandes fibreuses sont bien présentes, ainsi que des cellules de RS, lacunaires sous forme de plage parfois confluentes. Un fond inflammatoire de PNE et PNN est présent. Les cellules tumorales sont CD20 positives, PAX5 (marquage nucléaire), OCT-2 et BOB-1.

De manière concomitante, Garcia et al ont rapporté 9 autres cas, dont 6 avaient une atteinte médiastinale(Garcia et al. 2005). Tous les cas avaient une présentation histologique semblable avec une morphologie intermédiaire comportant des plages de grandes cellules cohésives et pléomorphes, dont certaines d'aspect Hodgkin, au sein d'un fond inflammatoire polymorphe. L'aspect des cellules tumorales allaient de la cellule B de taille moyenne avec une apparence centroblastique/immunoblastique à la cellule typique de RS avec un cytoplasme éosinophile abondant et de nombreux nucléoles. Les cellules tumorales avaient un immunophénotype mixte, exprimant à la fois le CD30 et des marqueurs B (CD20 dans 9/9 cas, et OCT2, dans 8/9 cas) mais aussi le CD45 (9/9 dont 6 avec une intense expression). Dans 2 des 9 cas, la recherche de l'EBV (sonde EBER) était positive.

V.A.2. Classification OMS 2008 et suite :

Suite à ces observations, une nouvelle entité provisoire a été introduite dans la classification OMS des lymphomes en 2008, sous le terme de « B cell lymphoma unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and cHL » (Campo et al. 2011).

En 2009, lors d'un workshop à Bordeaux sur les LFF autour des LBDGC, 7 cas LFF et 4 formes composites ont été rapportés par Quintanilla et al (Quintanilla-Martinez et al. 2009). La description anatomopathologique faite par les auteurs est concordante avec les données précédentes. Ils soulignent dans cette étude les difficultés des biopsies à l'aiguille dans le contexte et également des localisations extra-médiastinales pures possibles. La conclusion de ce workshop fût que malgré les progrès faits pour identifier ces cas, il restait encore du travail pour mieux définir les limites entre les LFF à proprement parler et certains cas de LHC avec une simple déviation phénotypique, au travers de l'expression du CD20. En effet, au-delà des cas présentant une morphologie intermédiaire, certains présentent comme principale caractéristique une forte discordance phénotypique avec une morphologie typique de LHC ou LBPM. Ainsi, dans une série de 10 cas, Gualco et al (Gualco, Natkunam, and Bacchi 2012) rapportent un cas de LH avec une expression intense et diffuse du CD20, 2 cas de LBPM avec une expression intense et diffuse du CD30, et 6 cas avec une morphologie « mixte ».

Dans cette première version, le statut EBV des LFF n'était pas spécifiquement précisé, aboutissant à des controverses quelques années plus tard lors de la révision de la classification où les LBDGC associés à l'EBV et ayant une morphologie de FF (i.e. polymorphes) ont été décrit dans un groupe à part (cf. infra) (Nicolae et al. 2015; Swerdlow et al. 2016).

V.A.3. Malgré la classification, des difficultés diagnostics persistent

Malgré la création de cette entité dans la classification OMS, il est clair que des difficultés diagnostiques persistent. Chacune des séries présentées dans la table 4 (cf. infra) ont été publiées suite à une revue minutieuse des cas, sauf celle d'Evens et al (Evens et al. 2015) rapportant initialement 112 cas de forme frontière. En 2018, Pilichowska et al (Pilichowska et al. 2017) ont rapporté la revue pathologique centralisée de 68 de ces 112 cas. Au final, le diagnostic de LFF n'a été retenu que pour 26 cas, soit 38%. L'expression d'un marqueur B au moins était retrouvée dans tous les cas (CD20, CD79a et/ou PAX5). Les prélèvements étaient en général riches en cellules tumorales. Au-delà d'un pléomorphisme certain, celles-ci étaient souvent de grande taille avec un aspect centroblastique ou immunoblastique et disposées en plaque. La plupart des cas exprimait fortement le CD20 (81%), MUM-1 (96%), et CD30 (92%). Quatre cas étaient CD20 négatifs mais avec une absence de fond inflammatoire et une

morphologie évoquant un LBPM avec un marquage PAX5 fort. Seulement un cas était EBV+, en faisant quasiment un critère diagnostique d'exclusion pour ces auteurs, sans plus de précision sur la morphologie de ce cas permettant de justifier son inclusion comme LFF versus LBDGC-EBV-polymorphe.

La majorité des cas exclus ont été classés comme des LHC SN (27/42, 64%), parmi lesquels 10/27 avaient des caractéristiques de LH-SN de grade 2 ou anciennement dénommé à déplétion lymphocytaire (Kant et al. 1986). Ces cas avaient pour la plupart une forte expression du CD20 et plus faible du CD30. Quatre cas ont été reclassés comme LHNPL. Quatre cas ont été reclassés comme LBDGC et 2 LBPM. Enfin, 3 cas ont été reclassés comme des LBDGC-EBV positifs. De manière intéressante, les cas reclassés comme LH-SN de grade 2 avaient une SSP moins bonne que les LBDGC ou LHC, et proche de celle des 26 cas de LFF confirmés.

Suite à ce travail, l'équipe d'E. Jaffe a émis des recommandations pour le diagnostic de LFF. D'après leur travail, les LFF ne peuvent avoir une morphologie typique de LHC (architecture nodulaire, fibrose en bande) et l'infiltration tumorale doit être importante. Le spectre cytologique de la cellule tumorale est large, le pléomorphisme étant une caractéristique importante. L'expression, même forte, du CD20 dans un contexte de morphologie typique de LHC ne doit pas faire retenir le diagnostic de LFF. Ce dernier point, correspondant à la « limite » d'inclusion des cas de LFF versus les LHC avec variant phénotypique, reste discuté comme évoqué précédemment (Gualco, Natkunam, and Bacchi 2012; Traverse-Glehen et al. 2005). En effet, d'après la classification WHO, si l'expression du CD20 est admise dans le diagnostic LHC, celle-ci est toujours faible et non présente sur la totalité des cellules (Swerdlow et al. 2016; Benharroch, Nalbandyan, and Lazarev 2015; Canioni et al. 2009). A l'inverse, le chapitre des LFF dans la classification WHO mentionne des cas ayant une morphologie de LHC mais une expression diffuse, intense et homogène du CD20 et CD79a sur les cellules tumorales. Une expression intense et diffuse du CD20 doit par ailleurs faire discuter une modification thérapeutique et l'administration du rituximab, argument en faveur d'une forme frontière.

Enfin, autre point débattu, l'association avec l'EBV qui doit faire évoquer un diagnostic de LBDGC-EBV+ NOS, dont la morphologie « grey-zone » like a été rapportée par les mêmes auteurs (Nicolae et al. 2015). Ce point est certes tranché dans la nouvelle classification 2016

où les LFF sont considérés comme EBV négatifs (dans 96% des cas, sans trop de précision sur les 4% restant(Swerdlow et al. 2016)), mais pas dans la littérature où des cas de LFF EBV continuent d’être rapportés (Ahmed A. Elsayed et al. 2017). **Si le regroupement des cas de LBDGC-EBV+ NOS au sein d’une seule et unique catégorie semble faire sens, il n’y a à ce jour pas de données moléculaires pour asseoir cette stratégie et décision.**

Ces points soulignent la difficulté du diagnostic final de LFF et l’absence de consensus international. Ce manque de reproductibilité confirme la difficulté du diagnostic et la nécessité de poursuivre les études afin d’aboutir à une meilleure caractérisation de l’entité.

V.A.4. Données cliniques et de survie des LFF

V.A.4.a. Présentation clinique initiale

Comme les LHC et LBPM, dans plus de la moitié des cas les patients sont jeunes, avec un âge médian autour de 30 ans. Une présentation extra-médiastinale n’est pas rare, 30 à 50% en fonction des séries, souvent retrouvée chez des patients plus âgés.

Tableau 4: Série rapportant des cas de lymphomes de formes frontières.

Référence	N	Age	Sexe (M/F)	LBPM-like	CHL-like	EBV	LFF médiastinal non-
(Rudiger et al. 1998)	7	NA	NA	1	4	29%	0
(Traverse-Glehen et al. 2005)	34	31 (13-62)	23/13	10	11	29%	20%
(Garcia et al. 2005)	9	45 (22-68)	6/3	NA	NA	22%	33%
(Quintanilla-Martinez et al. 2009)	11	25-85	6/5	2	NA	45%	9%
(Minami et al. 2010)	2	22-30	1/1	0	1	50%	0
(Oschlies et al. 2011)	4	10-18	1/3	2	0	66%	0
(Eberle, Salaverria, et al. 2011)	33	32 (16-91)	20/13	15	12	0°	27%
(Gualco, Natkunam, and Bacchi 2012)	10	37 (15-85)	9/1	NA	NA	11%	20%
(Wilson et al. 2014)	24	33 (14-59)	15/9	8	15	NA	0
(Pilichowska et al. 2017)	26	37 (19-72)	17/9	NA	NA	4%	31%
(Ahmed A. Elsayed et al. 2017)	14	62 (32-83)	11/4	0	14	100%	6 (42%)

Dans l'étude de Traverse-Glehen et al (Traverse-Glehen et al. 2005), la médiane d'âge était 31,5 ans (13-62) avec 23 hommes et 13 femmes dans la population global (10/11 parmi les LFF stricto sensu). Dans 7 cas sur 21, la biopsie analysée n'était pas d'origine médiastinale (2 sus-claviculaire, 5 cervicales). La présence d'atteinte extra-ganglionnaire est précisée pour les formes séquentielles, avec une localisation intestinale et splénique pour 2 cas parmi les 5 LHC au diagnostic. Dans l'étude de Garcia et al, 6/9 des cas étaient des hommes, avec une médiane d'âge de 45 ans. De manière intéressante, 3 cas n'avaient pas d'envahissement médiastinal (atteinte pulmonaire, abdominale et ganglionnaire/hépatique). Tous avaient une maladie disséminée. La prédominance masculine a bien été observée par Eberle et al (Eberle, Salaverria, et al. 2011) avec une médiane d'âge de 32 ans, mais on peut noter que la fourchette d'âge s'étend jusqu'à 91 ans et 27% des cas n'avaient pas d'envahissement médiastinal, ces cas étant plus vieux que ceux avec un envahissement médiastinal (29 *versus* 55 ans).

En 2017, notre équipe a rapporté les données cliniques d'une série rétrospective (C. Sarkozy et al. 2017). Cette série a été élaborée au sein du LYSA, avec un processus rigoureux de relecture détaillé dans l'article anatomopathologique de la thèse. Brièvement, les cas ont été recherchés à partir des données du fichier LYMPHOPATH, LYSA-P, et des fichiers personnels des hématopathologistes du LYSA. Après avoir définis un consensus pour inclure les cas, le panel d'hématopathologistes a revu chaque biopsie pour valider son inclusion dans l'étude et classer initialement en forme CHL-like ou LBPM-like. Dans ce premier travail, seuls les LFF avec un envahissement médiastinal ont été rapportés. Une majorité de femme a été observée (55%), avec un âge médian de 32 ans (13 à 83 ans). La présentation clinique initiale reflète une maladie agressive avec un stade III/IV dans 56%, une masse de plus de 7 cm dans 55% et un syndrome cave supérieur dans 16%. Les LDH étaient élevés dans 60% des cas et une anémie à moins de 10.5g présente dans 21%. Dans 16% de cas, une association avec l'EBV a été mise en évidence. Le score IPI ajusté à l'âge était élevé (2-3) dans 41% des cas.

Les données des patients de la série du LYSA présentant une atteinte extra-médiastinale ont ensuite été présentées au congrès de l'ICML en 2017 (Sarkozy, abstract 023). Onze avaient une morphologie CHL-like et 7 plus proche des formes à grandes cellules (i.e. LBDGC ou LBPM), en accord avec les données rapportées par Pilichowska et al (Pilichowska et al. 2017) et Eberle et al (Eberle, Salaverria, et al. 2011). Tous avaient une atteinte ganglionnaire, 9 avec une

maladie disséminée (sus et sous-diaphragmatique) et 8 une atteinte extra-ganglionnaire (os, rate, foie, poumon, tissu mou). Comme rapporté par Pilichowska (Pilichowska et al. 2017) ou Eberle (Eberle, Salaverria, et al. 2011), ces patients étaient plus âgés que ceux ayant une présentation médiastinale et l'infection par EBV tendait à être plus fréquente.

V.A.4.b. Traitement

Les principales données de réponse au traitement des différentes séries de la littérature ont été résumées table 5.

Tableau 5: Séries de la littérature sur le traitement des LFF.

Études	N	Age	Traitement	RG/RC	PFS/SG	Commentaires
(Wilson et al. 2014)	24	33 (14-59)	DA-EPOCH-R	100% / 79%	5y SSE: 53%, 5y SG: 74%	Prospective
(C. Sarkozy et al. 2017)	99	32 (13-84)	RCHOP / R- ACVBP/ ABVD/ escBEACOPP	80% / 73%	3y SSE: 63%, 3y SG: 80%	Intensive treatment better ABVD worse
(Pilichowska et al. 2017)	25	37 (19-72)	RCHOP / ABVD/ DA-EPOCH-R	60% / 56%	3y SSP: 39% 3y SG: 95%	RCHOP better ABVD worse
(Chihara et al. 2017)	16	39 (19-64)	RCHOP / ABVD/ DA-EPOCH-R	69% / 69%	2y SSP: 42% 2y SG: 93%	DA-EPOCH do better

V.A.4.b.i. Série rétrospective

Dès les premières études, le mauvais pronostic de ces patients est souligné avec dans la série de Garcia et al 6 patients réfractaires sur 8 et 4 décès en lien avec le lymphome (8-28 mois). Gualco et al (Gualco, Natkunam, and Bacchi 2012), ont rapporté 2 décès précoce mais 7 patients en RC après un suivi cependant court (10-28 mois). Cinq sur les 7 en RC ont reçu de la radiothérapie, sans que les modalités ne soit rapportée (en intensification de traitement ou sur une masse résiduelle post chimiothérapie ?). L'hétérogénéité des traitements rend toute conclusion assez compliquée.

La série rétrospective du LYSA (C. Sarkozy et al. 2017) souligne également le caractère agressif avec 28% des cas présentant une maladie primo-réfractaire, une SSE et SG à 3 ans de 63% et 80%. Dans cette étude, il a été observé que les patients traités avec un schéma plus intensif (type R-ACVBP ou escBEACOPP) avaient une meilleure SSE et SG que ceux traités avec un

schéma de type R-CHOP ou ABVD. La radiothérapie, lorsque réalisée en consolidation chez des patients en RC, n'avait pas d'impact sur la SSE ou SG. Mais ceci doit être discuté en prenant en compte les nombreux biais d'une étude rétrospective. Aucune différence de survie n'a été observée entre les cas LHC-like et LBPM-like. En analyse univariée, le performans-status et l'anémie étaient les deux éléments ayant le plus fort impact sur la survie.

L'utilité d'un schéma intensif a également été rapporté dans une autre série rétrospective ayant inclus 16 patients (Chihara et al. 2017) où un traitement par DA-EPOCH-R permettait d'obtenir de meilleurs résultats que l'ABVD.

V.A.4.b.ii. Une étude prospective

En 2014, Wilson et al (Wilson et al. 2014) ont publié la seule série prospective sur les LFF, incluant 24 patients avec une atteinte médiastinale tous traités uniformément par le schéma intensif DA-EPOCH-R. Ce schéma comporte un premier pallier de dose avec du rituximab (375mg/m² J1), de la doxorubicine (10mg/m²/j), de l'étoposide (50mg/m²/j), et de la vincristine (0.4mg/m²/j), en infusion continue de J1 à J4, du cyclophosphamide (750mg/m², à J5) et de la prednisone, puis s'adapte à la toxicité rencontrée. La médiane d'âge était de 33 ans avec une prédominance masculine (15 hommes). La moitié (46%) des patients avait une masse de plus de 10 cm, 3 (13%) un stade IV, et 12 (50%) des LDH augmentés. Deux tiers avaient une morphologie LHC-like (63%) et 33% LBPM-like. Dix-neuf patients ont atteint une réponse complète et 5 une réponse partielle. Cependant, à 3 mois de la fin du traitement une maladie active a été documentée dans 9 cas (7 biopsies, 2 scanners). Ces 9 patients ont reçu de la radiothérapie permettant d'obtenir une rémission dans près de la moitié des cas (N=4 cas, 3-128 mois). Après un suivi de 59 mois, la SSE était de 62% et survie globale de 74%. En dépit du petit effectif, différentes analyses à la recherche de marqueurs prédictifs de la survie ont été faites. Aucune association entre l'IPI, le score IPS ou la taille de la masse et la survie n'a été retrouvée. Les patients ayant une morphologie type LBPM avaient une tendance vers une SSE et SG plus courte, mais sans que cela ne soit significatif. Par ailleurs, l'intensité du marquage CD20 n'avait pas d'impact sur la survie, à contrario du marquage CD15 : un marquage plus intense étant ici associé avec une moins bonne survie (SG 38% vs 98%, p=0.016). Un taux de lymphocyte bas (<880/μl, la médiane) était associé avec une moins bonne SSE et SG (83% vs 42%, p=0.038 et 100% vs 52%, p=0.028). Les auteurs ont comparé la

survie des LFF à celle des LBPM traités par le même protocole et observé une nette différence. En effet, la SPP était de 62% pour les LFF versus 93% pour les LBPM à 5 ans et la SG 74% versus 97%, confirmant une maladie plus agressive.

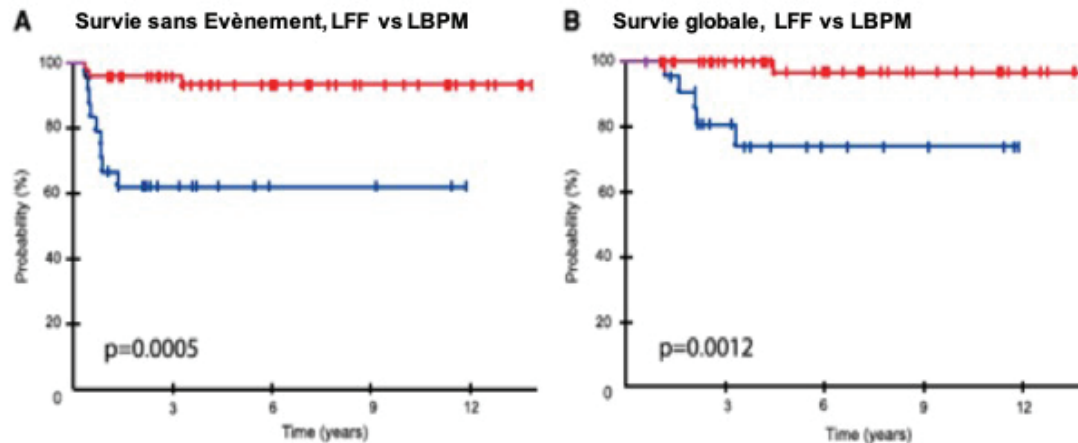


Figure 18: Survie des patients atteints de LFF et LBPM
Survie sans progression et survie globale des lymphomes de formes frontière du médiastin (LFF, courbe bleue) versus lymphomes B primitifs du médiastin (LBPM, courbe rouge) traités par DA-EPOCH-R(Wilson et al. 2014).

V.A.4.b.iii. Données sur les nouveaux agents

Devant l'efficacité des anti-PD1 dans le LHC et dans le LBPM, et la présence de réarrangements 9p24 dans certains cas de LFF (cf. infra), certaines équipes ont appliqué un traitement par anti-PD1 à de rare cas de LFF et (Melani et al. 2017) les données sont encourageantes. Un essai avec du pembrolizumab pour les patients en rechute/réfractaire est en cours. Les données avec le brentuximab vedotin ou anti-CD30 sont moins spectaculaires, avec quelques réponses décrites, mais une rechute très rapide en l'absence de consolidation(Cihara et al. 2017; J. Li et al. 2018; Svoboda et al. 2020).

En conclusion, les LFF ont une moins bonne réponse au traitement que les LHC ou LBPM et à ce jour aucune stratégie n'est clairement recommandée, même si selon certaines études, une prise en charge par un traitement plus intensif semble être plus appropriée. Des études moléculaires pourraient permettre de mieux définir le spectre de ces lymphomes et donc de mieux cerner la prise en charge thérapeutique en intégrant des thérapies ciblées.

V.A.5. Lymphomes séquentiels et composites : une problématique reliée ?

L'entité « LFF » dans la classification OMS n'inclue pas formellement les lymphomes séquentiels et composites. Cependant, la problématique de ces cas présentant un LHC et un LBPM/LBDGC de manière concomitante au diagnostic ou bien séquentielle lors de deux occurrences, peut s'apparenter à celle des LFF.

Avant le début de ce travail, une des plus grosses séries de forme composite ou séquentielle était celle rapportée dans la publication de Traverse-Glehen et al (Traverse-Glehen et al. 2005) sur les LFF, avec 6 cas composites et 9 formes séquentielles. Dans les 6 cas composites, les 2 histologies pouvaient être identifiées, soit sur la même biopsie (N=5), soit sur deux biopsies différentes faites au même moment (N=1). Si la présence des deux composantes était bien claire, avec un phénotype comme attendu, des zones de transitions de forme frontière étaient observées. Un cas sur 4 étudiés était EBV positif, dans les deux composantes. Les 9 formes séquentielles présentaient des caractéristiques typiques de LHC et de LBPM mais à deux moments différents de l'histoire de la maladie. Dans deux de ces cas, un clone IGH identique pour les deux composantes a pu être mis en évidence par PCR. Parmi eux, 5 ont eu une présentation initiale de LHC puis de LBPM et 4 de LBPM puis de LHC. Suite au workshop sur les lymphomes frontières, Quintanilla et al (Quintanilla-Martinez et al. 2009) ont rapporté 4 cas composites, tous ayant la particularité d'être EBV positifs.

Dans le cas de formes séquentielles, l'association à l'EBV lors de la seconde occurrence uniquement doit faire suspecter un lymphome non relié sur le plan clonal et survenant dans le contexte d'une immunosuppression post-chimiothérapie. Cependant, l'existence de formes séquentielles EBV+ dans les deux occurrences ainsi que les formes composites EBV + suggèrent que l'entité forme frontière ou le concept de morphologie intermédiaire se retrouve aussi dans les formes associées à l'EBV.

Ce travail de thèse n'a pas inclus les formes composites ou séquentielles, même si celles-ci constituent probablement l'extrémité du spectre des LFF. L'étude clinique de 30 cas de

lymphomes séquentiels ou composites a fait l'objet d'un autre travail en 2020(Aussedat et al. 2020). L'étude moléculaire de ces cas n'a pas été incluse dans ce travail de thèse.

V.B. Données biologiques

V.B.1. *Anomalies moléculaires*

Les données de la littérature sont résumées table 6. Garcia et al(Garcia et al. 2005) ont initialement étudié les anomalies récurrentes observées dans les LBDGC, i.e. touchant *BCL2*, *BCL6* ou *TP53*. Sur les 8 cas analysés, aucun ne présentait de réarrangement de *BCL2*, 2 cas un réarrangement de *BCL6* et 1 cas une mutation de *TP53* (non-sens). Afin de mettre en évidence une activation de la voie NF- κ B, les auteurs ont étudiés la localisation de c-REL/p65 en IHC, qui s'est avérée être nucléaire dans 7 cas sur 9 (2 non contributifs). La majorité des cas exprimaient également I κ B α (6/8) et deux cibles de NF- κ B : Bcl-XL (7/9) et c-FLIP (8/9). Corroborant ces données, Gualco et al(Gualco, Natkunam, and Bacchi 2012) n'ont pas mis en évidence de réarrangement de *MYC*, *BCL2* ou *BCL6* en FISH (10 cas).

Les anomalies récurrentes des LHC et LBPM ont été étudiés dans les LFF par Eberle et al(Eberle, Salaverria, et al. 2011), dans la plus grosse série rapportant des données de FISH : un gain / amplification du locus 2p16 (*BCL11*, *REL*) était observé dans 10 cas sur 30, et plus fréquemment dans les cas de morphologie CHL-like. Les gains ou amplifications de *JAK2/PDL2* (9p24.1) étaient observés dans 17 cas sur 31 et plus fréquemment dans les formes de morphologie grandes cellules. Une cassure du locus *CIITA* était notée dans 8 cas sur 30, une amplification dans 2 cas (7%). Les cas avec un envahissement médiastinal présentaient plus d'anomalies au niveau des locus 2p16.1, 8q24 et 9p24.1, alors que les anomalies au niveau du locus 16p13.13 étaient plus fréquentes dans les formes non médiastinales, mais ces corrélations n'étaient pas significatives au vu des petits effectifs. Par ailleurs, les données cliniques rapportées étaient assez minces, se résumant à l'âge et au sexe, et la localisation précise de l'envahissement au niveau du médiastin non détaillée. Dans cette étude, aucune corrélation entre les cassures observées au niveau du locus *CIITA* et la perte d'expression de l'HLA de classe II (HLA-DR) n'a été observée. Enfin, aucune cassure de *MYC* n'a été observée,

mais un gain dans 7 cas sur 26. Au total, ces données suggèrent que les LFF présentent plus d'anomalies moléculaires identifiées de manière récurrentes dans les LHC ou LBPM que LBDGC.

Tableau 6: Anomalies cytogénétiques dans les lymphomes de formes frontières.

	8q24 (MYC)	BCL2	BCL6	2p16.1 (REL)	(BCL11, 9p24.1 (JAK2/PDL1-2)	16p13.13 (CIITA)
(Garcia et al. 2005)	NA	0/8	2/8	NA	NA	NA
(Gualco, Natkunam, and Bacchi 2012)	0/10	0/10	0/10	NA	NA	NA
(Oschlies et al. 2011)	0/1	NA	NA	0/1	0/1	NA
(Eberle, Salaverria, et al. 2011)	Gain 7/26 (27%)	NA	NA	10/30 (33%) (gain 6, amp 4)	17/31 (55%)	8/30 cassure 3/30 (gain, amp)

V.B.2. Profil de méthylation

Comme discuté précédemment, la baisse d'expression des facteurs de transcription et des gènes du programme B pourrait s'expliquer par une régulation épigénétique et les LFF pourraient être un exemple de reprogrammation phénotypique de la cellule tumorale, tout comme les lymphomes de type composites ou séquentiels.

En étudiant le profil de méthylation de l'ADN par BeadArrays (micrray sous forme de billes, chaque bille contenant une sonde spécifique) des LFF (N=9, N=1 composite) et en la comparant à celui de LHC (N=10, microdisséqués), LBPM (N=10), et de LBDGC (N=10) Eberle et al (Eberle, Haematologica 2011) ont mis en évidence que les LFF présentaient un profil à part, bien que très proche des LHC et des LBPM. La méthylation de 1505 sites CpG sélectionnés sur plus de 800 gènes a été analysée (en utilisant le GoldenGate Methylation cancer Panel I, Illumina). Ce panel inclut des gènes suppresseurs de tumeur, oncogènes, gènes impliqués dans

la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Des échantillons de ganglions réactionnels ont été analysés afin de définir le caractère hypo ou hyperméthylé « de novo » des différentes cibles. Les résultats montrent que les LFF ont un profil intermédiaire entre celui des LHC et LBPM en analyse en composante principale. De plus, si chacune des entités avait un taux de cibles hypométhylées comparables, le nombre de cibles hyperméthylées était clairement moins important au sein des LFF (moins 40% environs). En comparant les cibles hypométhylées communes, les similitudes entre LFF et LBPM étaient plus importantes qu'entre LFF et LHC. Aucune cible exclusivement hyperméthylée dans les LFF n'a été mise en évidence, alors que 7 cibles étaient exclusivement hypométhylées : *ACVR1C*, *ERN1*, *HOXA5*, *ISL1*, *PTGS2*, *TMEFF2* et *ZNF215*, toutes situées au niveau d'îlots CpG. Les auteurs ont ensuite comparé la distribution de la méthylation au niveau des régions promotrices et leur relation avec les îlots CpG. Dans les LFF, tout comme dans les LBPM, 60% des zones hypométhylées de novo était en dehors des îlots CpG et 40% au sein de ces îlots. A contrario, les LHC ne présentaient pas d'hypométhylation de novo, les distinguant clairement des LFF et autres lymphomes B à grandes cellules. Les LFF et LHC présentaient 20 gènes différentiellement méthylés, les LFF et LBPM 35 et LHC et LBPM 180. En utilisant ces 235 gènes sur une série test, les auteurs ont construit un modèle identifiant 22 sites présentant un profil bien distinct entre les différentes paires. Au sein de ces 22 sites étaient présents des gènes codant pour la prolifération cellulaire, la différenciation, la catabolisme enzymatique, des récepteurs de tyrosine kinases, et des protéines de types zinc finger. Un clustering hiérarchique du taux de méthylation de ces 22 gènes permettait de séparer les échantillons en 3 groupes avec cependant 3 cas mal classés : 1 LBPM classé au sein des LHC, et 2 LFF classés au sein des LHC. Dans ce modèle, l'hypométhylation d'*HOXA5* était caractéristique des LFF, l'hyperméthylation de *MMP9* des LHC (possiblement en lien avec la morphologie SN et une faible expression de métalloprotease), et celle de *EPHA7* et *DAPK1* des LBPM. De manière intéressante, une surexpression d'*HOXA5* dans le contexte de certaines translocations a été associée à un rôle de transformation leucémique (Okada, Nat Cell Biol 2006). En conclusion, cette étude révèle un profil de méthylation particulier entre ces 3 entités avec plus particulièrement l'absence d'hypométhylation de novo dans le LHC, et une hyperméthylation de nombreuses cibles du complexe PRC2. Cependant, l'absence de microdissection des cas de LFF peut engendrer un biais ici tant l'hétérogénéité de l'infiltrat tumoral peut être importante

et expliquer ici la distinction de profil entre les lymphomes B diffus, LHC microdisséqués et LFF non microdisséqués.

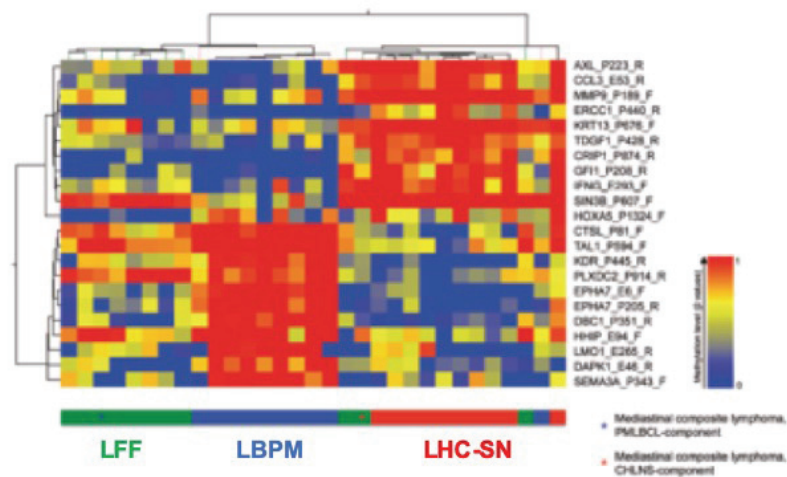


Figure 19: Profil de Méthylation et LFF. Adapté, D’après Eberle et al. 2012. Clustering hiérarchique comportant 22 cibles différemment méthylées dans les LFF, LHC-SN et LBPM. Chaque colonne représente un échantillon de tumeur microdisséquée. Les lignes représentent les sites CpG indiqués. Les couleurs représentent le niveau de méthylation (0%, bleu à 100%, rouge).

V.B.3. Signature d’expression génique

En 2020, les données d’expression génique de 20 cas ont été rapportées par l’équipe d’E.Jaffe(Pittaluga et al. 2020). Les auteurs ont comparé le PEG des LF avec une localisation médiastinale (N=20), avec celui des LHC et LBPM. Ils concluent que les LFF ont un PEG plus proche des LHC avec une signature « macrophage » et à une signature NFkB plus forte dans les LFF ou LHC par rapport aux LBPM. Cependant, des problèmes méthodologiques empêchent de tirer des conclusions de ces données. Premièrement, le statut EBV des LFF n’est connu que pour 11 des 20 cas (négatifs) et pour aucun des cas de LHC. Étant donné que des formes médiastinales de LBDGC reliés à l’EBV avec une morphologie intermédiaire entre LHC et LBDGC ont été rapportées (par les mêmes auteurs), ceci soulève un point fondamental ne permettant pas de conclure à l’implication éventuelle de l’EBV dans les signatures retrouvées. Deuxièmement, les auteurs ont analysé les PEG sans microdissection préalable, ce qui est tout à fait possible mais doit être pris en compte dans l’interprétation des résultats. En effet, toute l’analyse repose sur une analyse de différentiel d’expression entre les LHC et LBPM, mettant

en évidence 130 gènes. Étant donné la prédominance du MET du côté des LHC et des cellules tumorales du côté des LBPM, les gènes surexprimés dans le LHC seront probablement issus du MET et inversement ceux surexprimés dans le LBPM issus des cellules tumorales. Ainsi, comparer sur le même plan une signature d'expression de type NF κ B dans le LHC et dans le LBPM n'a pas de sens biologique.

Une signature d'expression spécifique aux LFF n'a pas été recherchée dans ce travail, et une étude détaillée du MET n'a pas été réalisée non plus.

V.C. Lymphomes B diffus à grandes cellules reliés à l'EBV

V.C.1. L'Epstein-Barr virus :

L'Epstein-Barr virus (EBV, Human Herpès virus 4) est un virus à ADN double brin qui infecte préférentiellement les lymphocytes B. La prévalence dans la population est très importante, avec une immunisation avoisinant les 90% à l'âge adulte et une primo-infection par la salive généralement dans l'enfance(Thorley-Lawson, Duca, and Shapiro 2008).

L'infection se fait via une liaison de la protéine d'enveloppe virale gp350 au CD21. La glycoprotéine virale gp42 est un cofacteur de l'infection qui se lie au HLA de classe II. Dans les cellules humaines, le génome de l'EBV forme un épisode circulaire comportant approximativement 85 gènes. Le cycle de vie de l'EBV comporte deux phases : réplication lytique et latence. Dans les cellules B mémoires, la latence progresse généralement du type III, II puis I, avec extinction progressive de l'expression des protéines virales permettant d'échapper à la reconnaissance du système immunitaire(Thorley-Lawson, Duca, and Shapiro 2008; Long, Taylor, and Rickinson 2011).

Ainsi en infectant une cellule B naïve, l'EBV en latence de type III génère de nombreuses protéines virales immunogéniques et donc une réponse T cytotoxique. De plus, l'expression du génome de l'EBV entraîne une prolifération et une transformation des lymphocytes B infectés, ceux-ci étant, en condition « normale », détruits par les lymphocytes réactifs vis-à-vis de l'EBV(Long, Taylor, and Rickinson 2011). Plus tard, en passant en latence de type II, l'EBV

réduit l'expression de ses protéines virales à LMP1, LMP2 et EBNA-1 au sein de la cellule B devenue mémoire, après son passage dans les follicules lymphoïdes. A la sortie du centre germinatif, lorsque le lymphocyte B regagne la circulation sanguine, l'EBV éteint l'expression de toutes ses protéines de surface, c'est la latence de type 0. Il devient alors indétectable par le système immunitaire de l'hôte, permettant une longue survie de ces cellules. Enfin, la latence de type I correspond à une phase de réplication de ces lymphocytes B infectés circulants, seuls EBNA-1 et les EBER (EBV-encoded small RNA) sont exprimés. EBNA-1 est donc exprimé sur toutes les cellules infectées en prolifération et est responsable de la maintenance et réplication du génome EBV (Marques-Piubelli et al. 2020). L'EBV est classé comme un carcinogène humain du groupe I selon l'OMS, devant ses capacités de transformation tumorale et l'existence de lien de causalité avec certains cancers.

EBNA-2 et LMP-1 sont les principales protéines transformantes de l'EBV, en favorisant d'une part une instabilité génomique (Gruhne, Sompallae, and Masucci 2009) mais aussi des mécanismes aboutissant à la prolifération anormale du lymphocyte B hôte. LMP-1 induit une augmentation de BCL2 et de A20, bloquant ainsi l'apoptose et dérégulant la voie NF-kB (Young and Rickinson 2004; Vockerodt et al. 2015b). De plus, en mimant une signalisation CD40 via TRADD et TRAF, LMP1 active la voie NF-kB (Farrell 2019). Les EBER sont aussi impliqués dans le blocage de l'apoptose des cellules infectées. De son côté, EBNA-2 joue un rôle dans l'immortalisation en favorisant l'expression des gènes de la voie NOTCH.

V.C.2. Description anatomopathologique :

Sur le plan morphologique, il est observé des points de concordance avec les autres lymphoproliférations EBV+, y compris dans certains cas avec le LHC EBV+. Ainsi, il n'est pas rare de retrouver des cellules de grande taille avec un aspect Hodgkin-like et un fond inflammatoire évoquant un lymphome B riche en T. Ces formes dites polymorphes sont tour à tour dénommées « Grey-Zone like » (Nicolae et al. 2015), LBDGC avec une morphologie de cHL (Montes-Moreno et al. 2012; Ahmed Ali Elsayed et al. 2014), ou T cell rich-like (Nicolae et al. 2015). Le diagnostic différentiel avec un LFF devient alors compliqué. Certains cas, plus fréquemment retrouvés chez les sujets âgés, sont de morphologie plus monomorphe avec un aspect plus typique de LBDGC, ne rentrant donc pas dans le spectre morphologique des LFF.

Sur le plan phénotypique, les cellules tumorales expriment habituellement l'ensemble des marqueurs B avec un phénotype activé (IRF4/MUM1 positif, CD10/BCL6 négatif). Le CD30 est habituellement positif, sans que le pattern d'expression ne soit précisé dans la classification OMS. LMP1 est positif dans plus de 90% des cas, indiquant plutôt une latence de type II comme dans le LHC(Nicolae et al. 2015). Plus rarement une latence de type III est retrouvée (7% des cas), comme chez l'immunodéprimé, mais quasi jamais une latence de type I comme dans le lymphome de Burkitt.

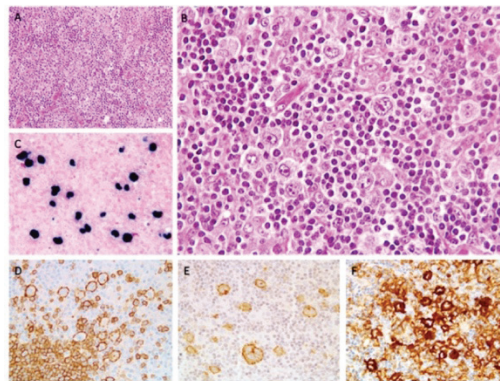


Figure 20: Lymphome B diffus grandes cellules EBV positifs, variant polymorphe. Prolifération de cellules de type RS-like avec un fond inflammatoire composé principalement de cellules T et d'histiocytes, effaçant l'architecture ganglionnaire. (A and B) EBER-ISH (C) CD20 (D), CD30 (E) and PDL1 (F). Grossissement: x 100 (A) and x 400 (B-F).

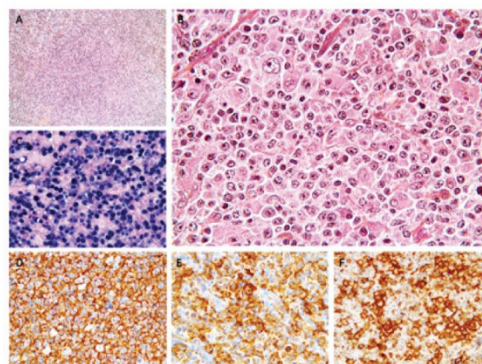


Figure 21: Lymphome B diffus grandes cellules EBV positifs, variant monomorphe. Prolifération diffuse Diffuse de cellules de taille moyenne à grande, avec un aspect centroblastique. (A and B). EBER (C) CD20 (D), CD30 (E), PDL1 (F). Grossissement: x 100 (A) et x 400 (B-F).

V.C.3. Épidémiologie des LBDGC-EBV positifs NOS :

Les LBDGC-EBV positifs NOS (sans autre spécificité), correspondent à une lymphoprolifération clonale B à grandes cellules, EBV positive, chez un sujet sans immunosuppression connue (d'où le terme NOS). Le critère diagnostic comporte une hybridation in situ pour EBER positive dans plus de 80% des cellules tumorales.

Initialement décrit en 2003 chez des patients âgés Japonais(Oyama et al. 2003) et désigné comme une pathologie reliée à l'âge, des cas rapportés chez des patients jeunes ont fait évoluer la classification OMS (Nicolae et al. 2015; Ok et al. 2013; Lu et al. 2015). L'incidence reste plus importante chez les sujets de plus de 50 ans, 10% seulement ayant moins de 50 ans dans une large série récente (Witte et al. 2020), faisant suspecter tout de même un rôle de l'immuno-senescence. Cette incidence varie avec l'origine géographique, plus fréquente en Asie où ces cas représentent 5 à 15% des LBDGC que dans les pays occidentaux où il s'agit de moins de 5% des cas(Oyama et al. 2003; Nicolae et al. 2015; Ok et al. 2014; Lu et al. 2015; Ok et al. 2013; Hong et al. 2015). Tout comme les autres pathologies reliées à l'EBV, les LBDGC-EBV+ sont plus fréquents chez les hommes avec un sexe ratio de 1.2 à 3.6/1.

La présentation clinique est légèrement différente en fonction de l'âge, avec plus de formes extra-ganglionnaires chez les sujets âgés (poumon et tube digestif)(Nicolae et al. 2015) et 60% de formes disséminées au diagnostic(Witte et al. 2020). L'envahissement neuro-méningé est rare. La survie des patients varie en fonction des études (17 à 36 mois en médiane), l'âge étant un facteur pronostic pas nécessairement consensuel(Ok et al. 2014; Lu et al. 2015). Enfin, différentes études récentes n'ont pas mis en évidence de différence pronostique avec les LBDGC EBV-(Witte et al. 2020; Ok et al. 2014), en stratifiant sur l'âge.

V.C.4. Données moléculaires

La majorité des données de la littérature décrivant les anomalies moléculaires des LBDGC-EBV sont issues de cohortes de LBDGC où la présence de l'EBV a été recherchée dans un deuxième temps, induisant potentiellement un biais en favorisant la présence de cas de formes monomorphes. Les cellules tumorales expriment fréquemment PD-L1 et PD-L2, comme dans le LHC, source d'échappement au système immunitaire, l'EBV (notamment EBNA-2) pouvant

être à l'origine de cette expression (Anastasiadou et al. 2019). Des gains et/ou réarrangements au niveau du locus 9p24.1 ont aussi été mis en évidence dans 38.5 et 19% des cas respectivement (Yoon et al. 2015; Kataoka et al. 2019) (réarrangements révélés dans 19% des cas et impliquant préférentiellement la région 3'UTR) ce qui est plus important que dans les cas de LBDGC EBV négatifs. Malgré un profil global comportant peu d'anomalies de nombre par rapport aux cas EBV négatifs, des gains de 1q23.3 (31%), contenant les gènes de la famille SLAM (signaling lymphocyte activation molecule, CD48, CD244, CD84 entre autres), 1q32 (38%) (comportant famille de l'IL10) suggèrent un rôle important de la régulation de la réponse immune. Des réarrangements de *CIITA*, habituellement absent des LBDGC, ont été mis en évidence dans 23% des cas engendrant une baisse d'expression de CMH-II en IHC (Jiang et al. 2020). Contrairement aux LBDGC EBV négatifs, les réarrangements de *MYC*, ou encore *BCL2/BCL6* sont rares.

En analyse de profil d'expression génique et d'enrichissement génique, ces lymphomes se distinguent par un MET riche (Yoon et al. 2015), une activation des voies JAK-STAT et NF-KB (H. Kato et al. 2014; Ok et al. 2014), se traduisant par une expression de p50 et p-STAT3 plus importante que dans les formes non-EBV. Yoon et al (Yoon et al. 2015) ont mis en évidence que *TNFRSF8/CD30*, *CCL3*, *INDO*, ou encore *CD163*, étaient parmi les gènes les plus up-régulés par rapport aux LBDGC non-EBV. En annotant le profil d'expression génique avec des données de la base DAVID, les auteurs ont mis en évidence l'importance de la réponse immunitaire de l'hôte (ou signature « host response » mise en évidence par Monti et al (Monti et al. 2005)), avec notamment le complément, le chimiotactisme, la voie IFN de type I (réponse antivirale). L'importance des macrophages de type M2 ou CD163 positifs a également été souligné par d'autres (Keane et al. 2019c) révélant aussi un MET tolérogène avec une plus forte expression de TIM-3, LAG3 (Nanostring), et confirmant la surexpression de PD-L1 et PD-L2 (Keane et al. 2019c). Les gènes sous-exprimés se regroupaient au sein des voies de l'activation lymphocytaires B et de la signalisation par le récepteur B (*LTB*, *CD79A*, *CD79B*, *CXCR5*, *SYK*, *FOXP1...*) (Kataoka et al. 2019; Jiang et al. 2020).

Enfin, le peu de données disponible sur les mutations des LBDGC-EBV sont en faveur d'un profil distinct de celui de LBDGC non-EBV. De manière globale il semble que les patients EBV+ présentent moins de mutations que les patients atteints d'un LBDGCL (Ok et al. 2014), comme

c'est le cas aussi dans le LHC(Tiacci et al. 2018) ou dans le lymphome de Burkitt(Grande et al. 2019), mais cette observation reste controversée(Kataoka et al. 2019). Les mutations fréquemment retrouvées dans les formes de LBDGC-ABC, notamment celles affectant la voie NFkB et le complexe MyTBcR(Phelan et al. 2018), comme *MYD88*, *CD79B* et *CARD11*, sont absentes ou très rare dans les formes EBV+ (Ok et al. 2014; Kataoka et al. 2019; Gebauer et al. 2015). Une incidence plus importante de mutation de *TET2* ou *DDX3X* a été rapportée par rapport aux cas de LBDGC non-EBV (Kataoka et al. 2019). Les cas EBV+ présentait significativement moins de mutations de *FAS* par rapport aux cas non-EBV, plaidant pour des mécanismes d'échappement à la réponse anti-tumorale distincts des formes non-EBV (mutations retrouvées dans 25% des cas), étant donné le rôle de l'interaction *FAS-fas* ligand au sein des cellules B/T dans la réponse(Afshar-Sterle et al. 2014).

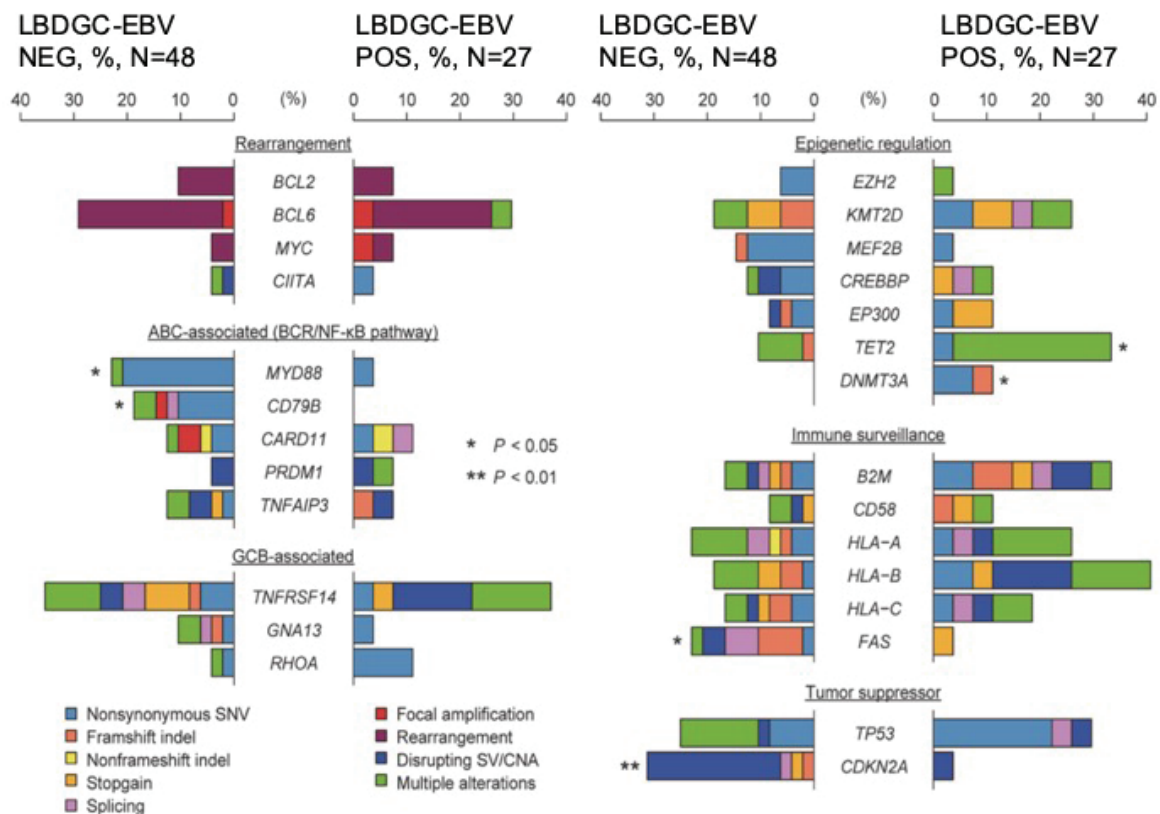


Figure 22: Spectre de mutations dans les LBDGC EBV+. Adapté, D'après Kataoka et al(Kataoka et al. 2019)

Une limite concernant l'ensemble de ces données est que ces séries de LBDGC-EBV+ incluent préférentiellement des formes monomorphes en comparant les données moléculaires à des LBDGC non-EBV. Ainsi, le profil moléculaire et mutationnel des formes polymorphes ou ayant

une morphologie frontière entre LHC et LBDGC/LBPM n'est pas bien décrit à ce jour. De plus, la question de la COO dans les rares formes médiastinales n'a pas encore été abordée dans la littérature.

VI. Problématique

Décrite comme « intermédiaire » entre LHC et LBDGC dans la classification OMS actuelle, l'entité des LFF, bien que de mieux en mieux démembrée, soulève toujours des questions. Au travers de l'étude de la littérature, il ressort que certains points sont non-consensuels :

- Une expression intense et diffuse des marqueurs B (notamment du CD20) sur toutes les cellules tumorales au sein d'une morphologie typique de LHC est-elle suffisante pour dénommer ce cas LFF ? Ou en d'autres termes, où se situe la limite entre variant phénotypique et formes frontières.
- L'association avec l'EBV doit-elle faire revoir le diagnostic en LBDG-EBV de morphologie polymorphe ?
- Quelle est le lien entre les LFF avec et sans atteinte du médiastin antérieur (loge thymique) ?

Par ailleurs, la caractérisation biologique de l'entité est incomplète et à ce jour et aucune étude moléculaire n'a corrélé les données d'expression ou de mutations de LFF avec celles des LHC, LBPM ou LBDGC. Une telle étude permettrait d'améliorer la caractérisation et de répondre à certaines questions cliniques et biologiques fondamentales :

- Peut-on définir une signature moléculaire pour les LFF, notamment ceux du médiastin-antérieur, reposant sur un profil d'expression génique distinct de celui des LHC et LBPM ? Comment s'articulent les formes extra-médiastinale par rapport aux formes médiastinales ? L'étude du profil d'expression génique permet-elle de définir où s'arrête le spectre des LFF, du côté des LHC et des LBDG/LBPM ?
- Existe-t-il des anomalies moléculaires ou mutations propres aux LFF et non retrouvées dans le LHC et LBPM ? Les formes médiastinales et non-médiastinales présentent-elles les mêmes caractéristiques mutationnelles ?
- Les données d'expression génique et l'analyse des profils de mutations permettent-elles d'apporter des arguments en faveur d'une classification distincte entre LFF et LBDG-EBV de morphologie polymorphe ?

MATERIELS et METHODES

I. Schéma global de l'étude et cohortes

I.A. Schéma global

Le travail de thèse a consisté en la caractérisation moléculaire de l'entité des LFF. Afin d'analyser ces données dans un contexte plus large, des cas de LBDGC-EBV polymorphes, LHC et LBPM ont aussi été inclus dans l'étude.

Les cohortes de LFF et LBDGC-EBV polymorphes utilisées ont été construites grâce au réseau LYMPHOPATH (Laurent et al. 2017) (labélisé INCA) et au groupe anatomopathologie du LYSA. Puis dans un deuxième temps une collaboration avec la British Columbia Cancer Agency (BCCA) et BCCancer Research Center (BCCRC) a permis d'étendre la cohorte suite à l'organisation d'une séance de relecture à laquelle des pathologistes et hématologues du LYSA et du BCCRC ont participé.

Le travail de thèse s'est articulé en trois parties rapportées dans 3 publications différentes

I- Caractérisation anatomo-pathologique : définition du spectre des LFF (dans ce travail, les formes EBV sont incluses dans les LFF (Sarkozy et al. Am J Surg Pathol 2019)

II- Caractérisation du profil d'expression génique (RNAsequencing) des LFF et LBDGC-EBV polymorphes, en comparaison avec une cohorte de LHC et LBPM (Sarkozy et al. Blood Advances 2020)

III- Caractérisation du profil mutationnel des LFF et LBDGC-EBV polymorphes: A l'aide d'une cohorte découverte (exomes appariés) suivi d'une cohorte d'extension (séquençage ciblé). Comparaison avec les données de la littérature (LHC, LBPM, LBDGC). Sarkozy et al (Submitted)

I.B. Description anatomopathologique de la cohorte

Une **première partie** a fait l'objet de la description anatomopathologique et cytogénétique des cas et a été rapportée dans American Journal of Surgical Pathology en 2019 (C. Sarkozy et al. 2019). Cette étude avait pour objectif de mieux définir le spectre morphologique, préalablement aux études moléculaires. La méthodologie utilisée pour la relecture des cas et la construction de la cohorte du LYSA est décrite dans l'article. Au-delà d'apporter des éléments descriptifs sur la morphologie et le phénotype de ces cas, cette première étude a permis d'élaborer une classification afin de faciliter le diagnostic au sein du spectre des formes frontières. De plus, cette classification (groupe 0 à 3) servira de socle permettant une analyse intégrée des données d'expression et de mutations dans une deuxième temps. Au sein de cette classification, les cas de groupe 0 sont situés à la frontière avec les LHC, les cas de groupe 3 avec les LBPM/LBDG, les cas de groupe 1 et 2 sont ceux avec la morphologie et le phénotype la plus intermédiaire.

Dans cette étude, les cas EBV+ ont été intégrés au LFF, et ont fait l'objet d'une analyse de sous-groupe. Ils seront, dans les deux études suivantes, considérés à part, comme LBDGC-EBV polymorphes.

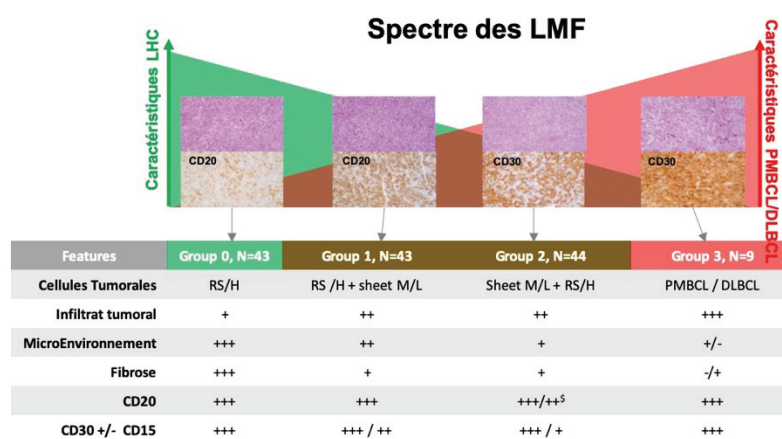


Figure 23: Classification morphologique.

139 cas inclus dans l'étude des LFF, pour une caractérisation anatomopathologique. Au sein de ces 139 cas, 32 étaient EBV+ et donc potentiellement considérés comme lymphomes B de morphologie polymorphe (groupe 0= 17, groupe 1= 4, groupe 2= 11).

I.C. Deuxième partie : sélection des cas pour l'analyse du PEG (cohortes LYSA/BCCRC)

Une **deuxième partie** a consisté en la caractérisation du profil d'expression génique (PEG) associée à une étude du MET. Cette deuxième partie a fait l'objet d'une publication acceptée dans Blood Advances en 2020. Dans cette partie, ainsi que dans la troisième, la cohorte a été étendue aux cas de la BCCA. La méthodologie de relecture des cas est expliquée dans l'article, dans la section données supplémentaires. La figure 27 résume l'inclusion des cas et les motifs d'exclusion pour l'analyse du profil d'expression génique. Dans cette étude, **les cas EBV positifs ayant une morphologie de forme frontière et inclus comme tels dans l'article 1 ont été appelés LBDGC-EBV polymorphes, afin de répondre strictement à la définition de la classification internationale.** Ainsi, parmi les 139 cas de LFF rapportés dans l'article 1, les cas EBV+ (N=32) correspondent aux LBDGC-EBV polymorphes dans la suite des études.

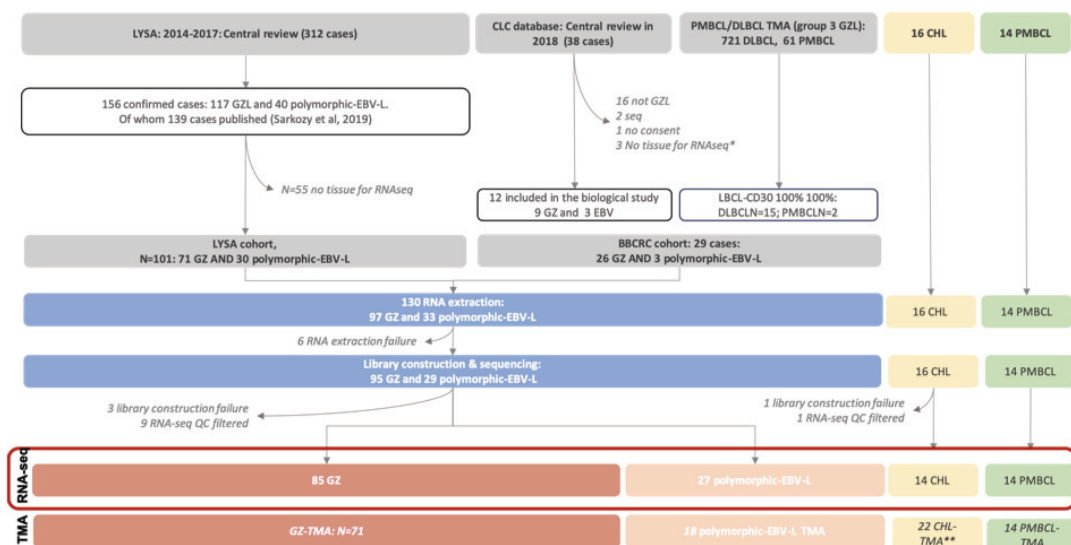


Figure 24: Flow-chart pour l'inclusion des cas dans l'étude de profil d'expression génique. Supplementary figure 1 dans le manuscrit #2.

Parmi les 139 rapportés précédemment (C. Sarkozy et al. 2019), des échantillons en FFPE étaient disponibles pour 84 cas inclus dans l'étude de PEG (62 LFF et 22 LBDGC-EBV polymorphes). En 2017, 17 nouveaux cas ont été inclus, soit au total 101 cas venant du LYSA: 71 LFF (13 Groupe 0, 54 groupes 1 ou 2, 4 Groupes 3) and 30 LBDGC-EBV polymorphes.

En aout 2018, une séance de relecture, sur une semaine complète, a été organisée à Vancouver au sein de la BCCRC afin de pouvoir inclure les cas locaux sur les mêmes critères. Ont participé : Alexandra Traverse-Glehen (pathologiste, LYSA), Clémentine Sarkozy (Hématologue, LYSA), Graham Slack (pathologiste, BCCRC), Katsuyoshi Takata (pathologiste, BCCRC), Tomoko Takata (pathologiste, BCCRC). Parmi les cas revus au sein de la BCCRC, 26 LFF (1 groupe 0, 8 groupes 1 ou 2, 17 groupes 3) et 3 LBDGC-EBV polymorphes ont été inclus selon les mêmes critères que la relecture du LYSA.

Au total, l'extraction d'ARN a été faite pour 130 cas (124 succès, 6 échecs), puis la construction de librairies pour 124 cas (librairies insuffisantes : 3). 121 cas ont été séquencés et 9 cas ne répondant pas aux critères de qualité ont dû être exclus (nombre de reads séquençage insuffisants, 9).

Au total le PEG de 85 LFF, 27 LBDGC-EBV polymorphes ont été analysés. En parallèle, une cohorte de 14 cas de LHC et 14 cas de LBPM, ont été séquencées selon les mêmes techniques et avec les mêmes critères de qualité, afin de pouvoir comparer le PEG de chacune des entités.

De manière importante, l'envahissement médiastinal a été détaillé et la présence d'un envahissement du médiastin antérieur a été intitulé comme envahissement thymique dans les manuscrits 2 et 3, à la différence du premier manuscrit ou l'envahissement médiastinal n'était pas d'avantage détaillé.

I.D. Troisième partie : sélection des cas pour l'analyse du profil mutationnel (cohortes LYSA /BCCRC)

Une **troisième partie** a consisté en la caractérisation du profil mutationnel des LFF et lymphomes B EBV-polymorphes.

En se basant sur les données du PEG, les cas de groupes 3 (N=4 cas du LYSA, N=17 cas de la BCCRC, total N=21 sur les 130 initialement incluables) ont été exclus de cette étude, et les LBDGC-EBV polymorphes ont été analysés comme tel.

Ainsi, 76 LFF et 33 LBDGC-EBV polymorphes (N=109) ont été inclus. Nous avons ensuite divisé la cohorte en « découverte » pour laquelle un exome apparié a été réalisé, permettant de découvrir de potentiels variants spécifiques des LFF, et « extension » pour laquelle un séquençage ciblé a été réalisé afin d'étendre les données obtenues avec les exomes. La distinction s'est faite sur la disponibilité d'une biopsie congelée pour de la microdissection permettant d'enrichir en cellules tumorales et de disposer de l'ADN non-tumoral pour faire un séquençage d'exomes appariés (N=29 cas). Pour la cohorte d'extension, le panel de séquençage ciblé comporte 217 gènes (1Mb), définis à partir des résultats d'exomes et de la littérature (cf. infra). La cohorte d'extension était donc constituée de prélèvements en paraffine, avec de l'ADN de qualité ayant pu être extrait pour 53 cas. La figure 28 résume le processus. Onze cas ont ensuite été exclus devant des données de séquençage de qualité insuffisante (< 100X de profondeur). L'ADN issue de cellules mononuclées du sang était disponible pour 14 cas, permettant de réaliser un « pool » d'ADN normal et d'apparier les échantillons lors de l'analyse de variants. Les données cliniques initiales entre les patients pour lesquels nous avons des données de séquençage et ceux exclus au long du processus d'inclusion étaient comparables. De même, les données cliniques initiales entre les patients inclus dans la cohorte découverte et ceux de la cohorte extension étaient comparables.

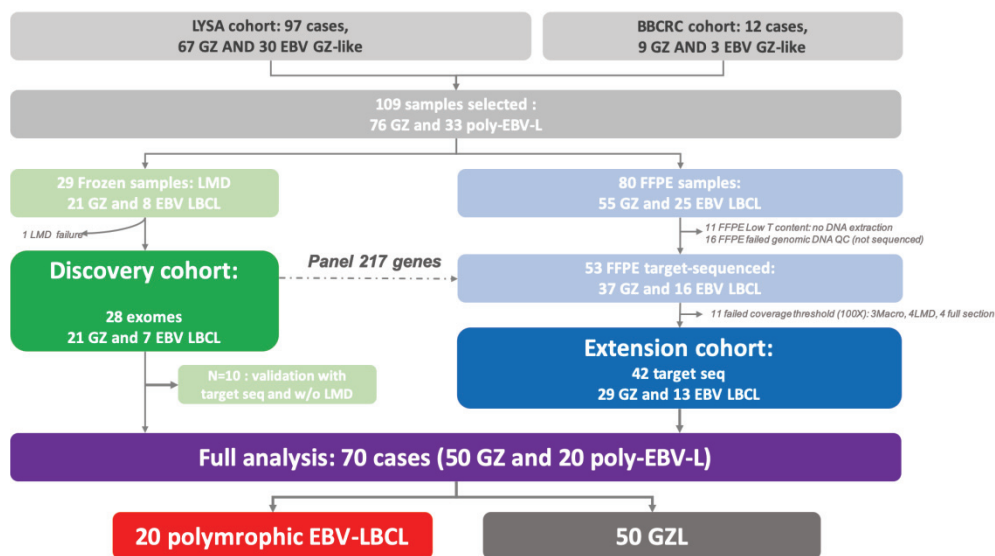


Figure 25: Flow-chart pour l'inclusion des cas dans l'étude de profil de mutations. Figure 1 dans le manuscrit #3.

II. Principales techniques :

Les techniques de préparations des échantillons (i.e. extraction des acides nucléiques) sont détaillées dans les manuscrits, tout comme l'ensemble des techniques utilisées. L'objectif de ce chapitre est de revoir le principe des différentes techniques de séquençages utilisées lors de l'étude.

II.A. Étude du transcriptome par RNAseq :

Afin d'étudier le profil d'expression génique (PEG) des LFF, LBDGC-EBV-polymorphes en lien avec ceux des LHC et LBPM, nous avons analysé les données de transcriptomes obtenues par séquençage de nouvelle génération (ou à haut débit) permettant un séquençage en parallèle de l'ensemble des gènes à partir de l'ARN extrait sur paraffine. Par rapport aux techniques d'hybridation sur puce ou à la technologie Nanostring, ceci permet :

- Une étude plus large du transcriptome, permettant d'avoir une vision non biaisée par une pré-sélection de gènes,
- Des techniques de mesures plus sensibles et donc plus précises.

Le principe du RNAseq repose sur la fabrication d'une librairie ou banque d'ADNc (NEBNext Ultra II Directional RNA library Pep kit for Illumina).

Pour éviter tous biais, tous les échantillons (ARN) inclus dans cette étude ont été extraits sur des coupes de prélèvements FFPE (y compris les cas de LHC et LBPM, N14 chaque).

- Déplétion en ARN-ribosomal : Les ARN ayant été extraits à partir de prélèvement en FFPE, une étape de déplétion enzymatique en ARN ribosomal (représentant jusqu'à 80% du pool d'ARN extrait) a été affectée au préalable (Human NEBNext rRNA depletion kit : RNase H), étant donné qu'un enrichissement poly-A n'est pas possible avec ce type de prélèvement.

- Fragmentation : Les ARNm sont ensuite élués et fragmentés (fragmentation enzymatique randomisée par un cocktail d'enzymes non spécifiques) durant 7 minutes.

- Synthèse de ADNc : L'étape suivante consiste en une reverse transcription pour synthèse de l'ADNc, la matrice d'ARN est ensuite éliminée par une RNase H.

- **Réparation des extrémités 3'** : Un résidu adénine est ajouté aux extrémités 3' des fragments d'ADNc, afin d'assurer une ligation spécifique aux adaptateurs porteurs d'une thymine en 3', évitant à deux molécules d'ADNc différentes de se lier (créant des transcrits chimériques artificiels).

- **Liaison des adaptateurs aux extrémités 3' et 5'** : Ceux-ci contiennent une séquence permettant une étape d'amplification par PCR et une autre l'hybridation sur la cellule de séquençage. Une étape de purification permet ensuite de sélectionner les brins de taille adéquate (purification sur bille).

- **Puis un enrichissement du pool par PCR** : est effectué, avant une autre étape de purification.

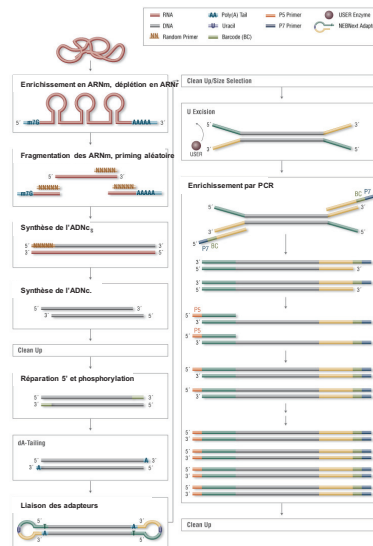


Figure 26:Construction des librairies de RNA-sequencing.

- **séquençage** : 16 librairies indépendantes ont ensuite été regroupées pour être séquencées sur une ligne (flow-cell) du séquenceur Illumina NextSeq 550. Le séquençage repose sur la génération de clusters grâce à une PCR en « pont » à partir des molécules d'ADNc. Les adaptateurs permettent aux molécules d'ADNc de s'hybrider et d'être amplifiées. Les amplicons restent ainsi regroupés en cluster distincts les uns des autres. Plusieurs millions de clusters peuvent être générés à des positions distinctes sur la ligne de séquençage. Les amplicons sont ensuite linéarisés afin de permettre la fixation des amorces de séquençage : à chaque cycle, 4 types de désoxynucléotides avec des labels fluorescents distincts vont être ajoutés au milieu. L'acquisition d'images permettra ensuite l'identification du nucléotide

intégré. La lecture se fait de manière appariée par l'extrémité 5' et 3' (paired-end), sur 75 bases (75 cycles).

- Pipeline bio-informatique : L'outil FastQC permet un premier control de qualité. Les reads sont ensuite alignés sur le génome de référence GRCh38 et un compte par gène a été généré par START aligner. Environ 75 millions de reads de 75 paires de base ont été générés pour chaque échantillon. Picard (v2.18.1) a été utilisé pour calculer la proportion de bases utilisables (exons + UTR) dans chaque échantillon. La proportion de base utilisable (i.e. pourcentage de bases s'alignant sur ARNm divisé par le nombre total de base passant le seuil de qualité, en d'autres termes, exclusions des bases non-codantes, introniques, intergéniques, mitochondriales) a ensuite été utilisée pour identifier les échantillons de mauvaise qualité, définis comme ayant une valeur inférieure à 2 déviations absolues de la médiane.

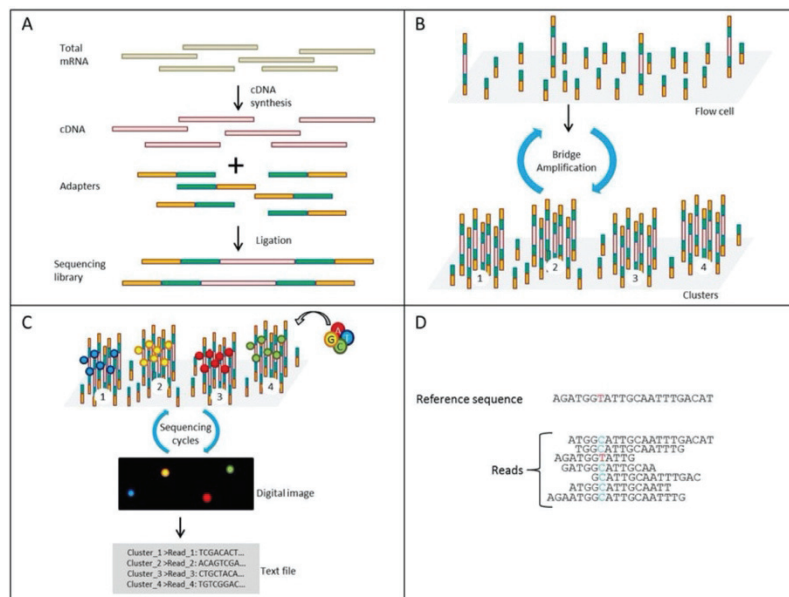


Figure 27: Schéma expliquant les différentes étapes du RNAseq
A-Construction des bibliothèques de RNA-sequencing. B- amplification par « pont ». C- Séquençage. D- Alignement.

II.B. Étude du profil mutationnel :

II.B.1. *Exomes*

L'exome correspond au séquençage des régions codantes du génome (i.e. 1%), l'objectif étant d'identifier les variants (mutations ou insertion/délétion de petites taille) potentiellement oncogéniques. Afin de s'affranchir des variants constitutionnels (ou polymorphisme, SNP), il est indispensable de disposer de l'ADN non tumoral pour chaque patient, permettant de réaliser une analyse appariée. L'ADN constitutionnel peut être obtenue soit à partir des cellules sanguines nucléées, soit en disséquant les régions non-tumorales des ganglions.

II.B.1.a. Pré-analytique : microdissection

Afin d'enrichir en cellules tumorales et d'obtenir de l'ADN non tumorale, les prélèvements congelés (N=29) ont été microdisséqués au laser (cf. données supplémentaires de l'article 3). Un minimum de 1200 cellules tumorales ont été disséquées dans une première étape, suivi de 3000 cellules du MET, sur des coupes bien distinctes afin d'éviter toute contamination. La microdissection s'est faite avec un support visuel (marquage en IHC CD20/CD30/H&E, lames scannées).

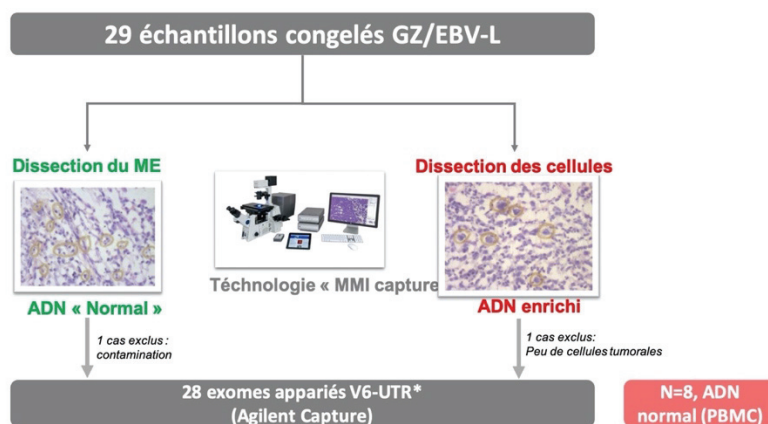


Figure 28: microdissection au laser des cellules tumorales et des cellules du microenvironnement.

II.B.1.b. Exomes, capture

Une première étape consiste en la réalisation de bibliothèques dites génomiques à partir de l'ADN extrait, puis une deuxième étape consiste en la capture des régions d'intérêt, i.e. exons, afin de les amplifier puis séquencer.

Il est important de souligner qu'aucune amplification pan-génomique n'a été réalisée avant de fragmenter l'ADN dans le processus de fabrication des bibliothèques génomiques, afin d'éviter les biais et les faux positifs induits par de telles techniques. La fragmentation randomisée (par sonication) permet de générer des segments d'ADN unique de petites tailles qui seront ensuite reliés à des adaptateurs et amplifiés. Lors de l'analyse bio-informatique, les duplicas issus de l'amplification par PCR pourront être retirés (en identifiant les fragments ayant la même extrémités 5' et 3').

En retirant les duplicas, la technique de capture permet d'avoir une approche la plus spécifique possible en évitant des faux positifs par rapport aux techniques d'amplicons où les reads issus de l'amplification par PCR peuvent être comptabilisés dans les variants (une approche cependant étant d'utiliser la technique des UMI ou identifiant moléculaire unique, non utilisée ici étant donné que nous avons travaillé avec des prélèvements issus de microdissection).

- bibliothèques génomiques : La totalité de l'ADN extrait suite à la microdissection a été utilisé pour la construction des bibliothèques avec un kit adapté aux très faibles quantités : Ovation Ultralow System V2 library kit (Nugen Technologies Inc). Après fragmentation randomisée (sonication) et liaison aux adaptateurs, les bibliothèques ont été amplifiées par 16 cycles de PCR et la quantité/qualité ont été évaluées à l'aide du 2100 Bioanalyzer et DNA 1000 assay. Chaque bibliothèque indexée a ensuite été hybridé pour capture.

- enrichissement ciblé des régions exoniques et UTR : La technique utilisée est celle d'un enrichissement post capture en solution des régions d'intérêt. Un pool d'appât oligonucléotidiques (labélisés) spécifiques des régions cibles est utilisé afin d'obtenir une hybridation avec la bibliothèque d'ADN génomique des échantillons analysés. Une étape d'éluion avec des billes permet de ne conserver que les régions capturées et de laver la solution pour éliminer l'excès d'appâts. Nous avons utilisé le kit SureSelect Human All Exon V6+UTR avec le module Ovation Target Capture pour bloquer les adaptateurs et l'amplification post capture.

- séquençage : Les bibliothèques de 4 prélèvements tumoraux ou 8 microenvironnements ont été regroupées pour être séquencées en batch sur le séquenceur Illumina NextSeq550 en utilisant 150-bp paired-end reads.

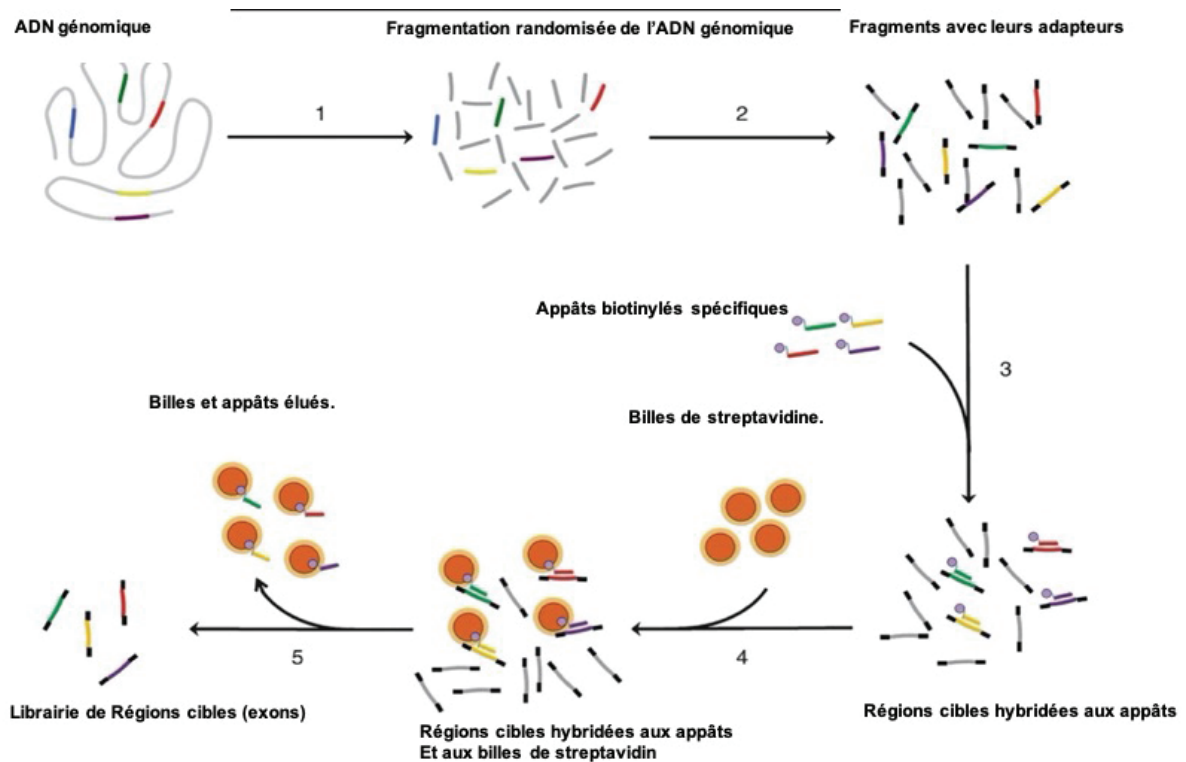


Figure 29: Séquençage des exons par capture.
D'après Chakravorty et al. Genomic Applications in Pathology pp 203-217.

- Validation des résultats avec re-séquençage ciblé :

Afin de valider la qualité des exomes tumoraux et constitutionnels issus de la microdissection, deux analyses ont été utilisées :

1- Prélèvements non-tumoraux : les exomes constitutionnels issus des prélèvements de MET ont été comparés aux exomes constitutionnels issus de l'ADN extrait des cellules nucléées du sang pour le mêmes patients (N=8). Ceci afin d'évaluer la présence de variants récurrents au sein des ADN issus du MET, reliés à une possible contamination du MET par des cellules tumorales lors du processus de dissection, ou à des variants induits lors de la construction des librairies. Afin de d'affranchir de ce biais, des seuils spécifiques ont été appliqués lors de l'analyse bio-informatique. Les résultats sont présentés dans le manuscrit 3 et mettent en évidence un taux de contamination très faible et pas de variants spécifiques à la technique de microdissection.

2- Prélèvements tumoraux : les exomes issus des prélèvements de cellules tumorales disséquées ont été comparés aux données issues de séquençages ciblés réalisés à partir d'ADN extrait de coupes de tissus congelés (même tissu), sans aucune dissection préalable. Cette

expérience a été faite pour 10 cas pour lesquels nous avons assez de tissus congelés pour réaliser la microdissection puis l'extraction sur copeaux (figure 33). Une analyse détaillée avec le logiciel IGV (integrative genomic viewer) a permis de confirmer la présence de tous les variants détectés au sein des exomes (série découverte) au sein de l'analyse par séquençage ciblé (série validation). De plus, pour 90%, le seuil de confiance était suffisant pour être annoté par au moins 2 des logiciels VarScan, Mutect et Strelka. Dans les 10% discordants, le variant identifié dans l'exome était bien présent en séquençage ciblé, mais sous le seuil de détection des logiciels (résultats présentés en détail dans le manuscrit 3).

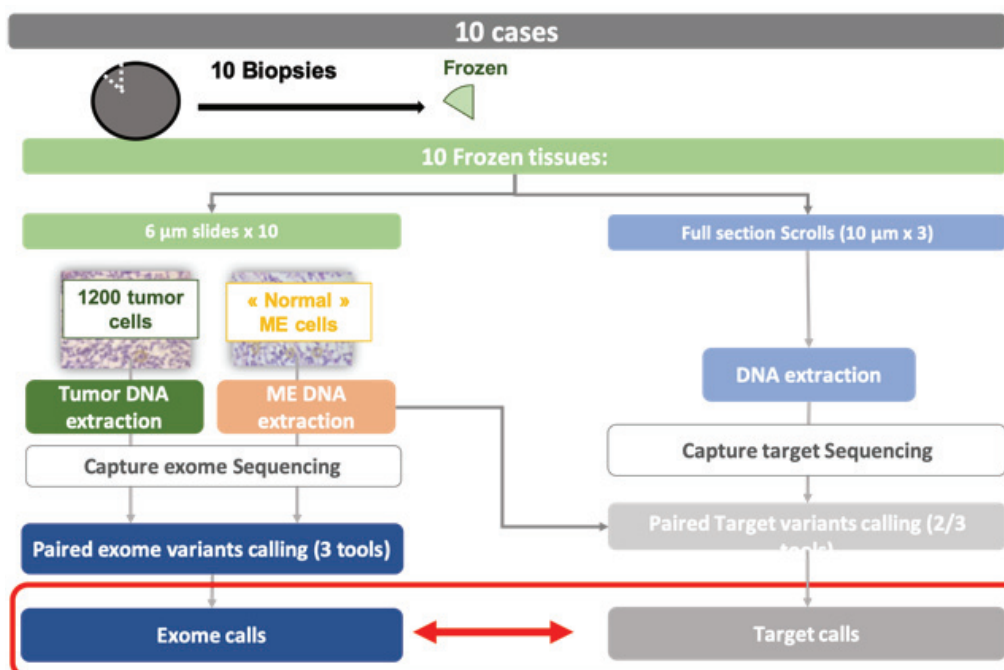


Figure 30: Validation des variants issus des exomes par un séquençage ciblé. Pour 10 cas, d'une source d'ADN issus de prélèvements non-microdisséqués.

II.B.2. Séquençage ciblé

Pour le séquençage ciblé la même technique a été utilisé (i.e. capture en solution).

Suite aux résultats d'exome (cohort « découverte »), et avec les données de la littérature, nous avons sélectionné un panel de gènes d'intérêt à inclure pour le séquençage ciblé. La sélection des gènes est détaillée dans l'article 3 et repose sur :

- Analyse des exomes avec MutSig

- Analyse de l'incidence dans les exomes (gène présentant un variant présents chez 3 patients ou plus conservés).
- Littérature : nous avons inclus les gènes rapportés comme mutés dans les travaux de la littérature rapportant des données d'exomes sur le LHC(Tiacci et al. 2018; Reichel et al. 2015); LBPM (A. Mottok et al. 2019); LBDGC(Chapuy et al. 2018; Schmitz et al. 2018); ou de séquençage ciblé(Spina et al. 2018; Dubois et al. 2016).
- La sélection finale s'est faite lors de 5 réunions où au moins 7 membres du laboratoire ont pris part.

Le panel de 217 gènes a ensuite été construit à l'aide du logiciel Agilent SureDesign (Agilent, Santa Clara, CA) avec un total de 15679 régions correspondant à une taille de capture globale de 1,037 MB. Les bibliothèques génomiques ont été construites selon le protocole du kit 100ng SureSelect XT2 Target Enrichment System for Illumina Multiplexed Sequencing, version E1 de juin 2015 (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca). Les bibliothèques indexées de 12 prélèvements tumoraux ont été regroupées et séquencées en batchs sur un séquenceur illumina NextSeq 550 System® (150-bp, paired-end).

RESULTATS

I. Caractérisation anatomopathologique, classification : article 1

Gray-zone Lymphoma Between cHL and Large B-Cell Lymphoma: A Histopathologic Series From the LYSA.

Sarkozy, Clémentine; Copie-Bergman, Christiane; Damotte, Diane; Ben-Neriah, Susana; Burroni, Barbara; Cornillon, Jérôme; Lemal, Richard; Golfier, Camille; Fabiani, Bettina; Chassagne-Clément, Catherine; Parrens, Marie; Herbaux, Charles; Xerri, Luc; Bossard, Celine; Laurent, Camille; Cheminant, Morgane; Cartron, Guillaume; Cabecadas, Jose; Molina, Thierry; Salles, Gilles; Steidl, Christian; Ghesquières, Hervé; Mottok, Anja; Traverse-Glehen, Alexandra. The American Journal of Surgical Pathology. 43(3):341-351, March 2019.

Grey zone lymphoma between CHL and diffuse large B cell lymphoma: a histopathological series from the LYSA

Clémentine Sarkozy, MD,^{1,2,5}, Christiane Copie-Bergman, MD-PHD³, Diane Damotte, MD⁴, Susana Ben-Neriah PHD⁵, Barbara Burroni, MD-PHD⁴, Jérôme Cornillon, MD⁶, Richard Lemal, MD PHD⁷, Camille Golfier, MD⁸, Bettina Fabiani, MD⁹, Catherine Chassagne-Clément, MD^{1,0}, Marie Parrens, MD¹¹, Charles Herbaux, MD¹², Luc Xerri, MD-PHD¹³, Celine Bossard, MD PHD¹⁴, Camille Laurent, MD-PHD¹⁵, Morgane Cheminant, MD-PHD¹⁶, Guillaume Cartron, MD-PHD¹⁷, Jose Cabecadas, MD¹⁸, Thierry Molina, MD PHD¹⁹, Gilles Salles, MD PHD^{1,2}, Christian Steidl, MD-PHD⁵, Hervé Ghesquières, MD-PHD^{1,2}, Anja Mottok*, MD-PHD^{5,20}, Alexandra Traverse-Glehen*, MD-PHD^{2,21}.

* both authors contributed equally to this work

1. Hospices Civils Lyon, Lyon-Sud, Hospital, Hematology Department, 69495 Pierre Bénite Cedex, France.
2. INSERM1052, CNRS 5286, Claude Bernard University, Lyon-Sud Charles Mérieux Lyon-1 Faculty, 69495 Pierre Bénite Cedex, France.
3. Pathology Department , Henri Mondor-Albert Chennevier Hospital, APHP, Créteil, F-94010, France. Paris Est-Créteil (UPEC) University, Faculty, Créteil, F-94010, France. UMR-S 955, INSERM, Créteil, F-94010, France.
4. Pathology Department, Groupe Hospitalier Cochin, APHP, Paris, France. Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, Paris, France
5. Department for Lymphoid Cancer Research, Centre for Lymphoid Cancer, BC Cancer, Vancouver, Canada.
6. Hematology Department, Lucien Neuwirth Cancer Institut, 42271 St Priest en Jarez, France.
7. Hematology Department, CHU Clermont-ferrand, France
8. Hematology Department, CHU Dijon, France
9. Pathology Department, Hôpital Saint Antoine, APHP, Paris, France
10. Pathology Department, Centre Léon Bérard, Lyon, France
11. Pathology Department, CHU de Bordeaux, France
12. Hematology Department, CHRU de Lille, France
13. Cancer Research Center of Marseille, Inserm U1068/CNRS U7258, Aix Marseille Université, Institut Paoli - Calmettes, 13009 Marseille, France.
14. Pathology Department, CHU de Nantes, France
15. Pathology Department, Institut Universitaire du Cancer-Oncopole, CHU Toulouse, France; INSERM, U.1037, Centre de recherche en cancérologie de Toulouse-Purpan, Toulouse, France.
16. Clinical Hematology, Necker-Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France; Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, Paris, France;
17. Hematology Department, CHU Montpellier, France
18. Instituto Português de Oncologia de Lisboa – IPO- Departamento de Diagnóstico Laboratorial. Lisbon
19. Université Paris Descartes, EA 7324, Necker Enfants Malades Hospital, APHP, Paris, France.
20. Institute of Human Genetics, Ulm University and Ulm University Medical Center, Ulm, Germany
21. Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pathology Department, 69495 Pierre Bénite Cedex, France.

Tables: 5; Figures: 5; References: 41; Word count: 4545

Corresponding author: Clémentine Sarkozy, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite, France; clementine.sarkozy@chu-lyon.fr

Financial support:

CSarkozy received research grant from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la vie et de la santé, National Alliance for Life Sciences and Health) within the framework of the Cancer Plan; Nuovo Soldati Foundation; Servier Foundation. We thank Takeda and Roche for their research financial support.

Abstract 235 words (<250)

Grey zone lymphoma (GZL) with features intermediate between classical Hodgkin lymphoma (cHL) and large B cell lymphoma (LBCL) was introduced as a provisional entity into the WHO classification in 2008. However, since diagnostic criteria are imprecise, reliable identification of GZL cases remains challenging. Here, we describe the histopathological features of 139 GZL cases from a retrospective Lymphoma Study association (LYSA) study with the goal to improve classification accuracy. Inclusion criteria were based on literature review and an expert consensus opinion of the LYSA hematopathologist panel. We observed 86 cases with a morphology more closely related to cHL, but with a LBCL immunophenotype based on strong and homogenous B cell marker expression (CD20 and/or CD79a, OCT2, BOB1, PAX5) on all tumor cells (cHL-like GZL). Fifty-three cases were morphologically more closely related to LBCL but harbored a cHL immunophenotype (LBCL-like GZL). Importantly, we observed a continuous morphologic and immunophenotypic spectrum within these two GZL categories. The majority of cases presented genetic immune escape features with *CD274/PDCD1LG2* and/or *CIITA* structural variants by FISH. Patients without mediastinal involvement at diagnosis (17%) were older than those with mediastinal tumors (median 56y versus 39y). Cases associated with EBV (24%) presented with similar patient characteristics and outcome as EBV-negative cases. In summary, we provide refined diagnostic criteria which contribute to a more precise pathological and clinical characterization of GZL within a broad spectrum from cHL-like to LBCL-like disease.

INTRODUCTION

The current World Health Organization (WHO) classification categorizes lymphomas into nearly 90 distinct entities, based on morphology, immunophenotype, genetic alterations and clinical features^{1, 2}, providing an international framework, and in some instances biological rationales, for therapeutic decision making and patient management. Next generation sequencing (NGS) and gene expression profiling (GEP) studies had profound impact on the improved definition and classification of different lymphoma entities resulting in shifts of treatment paradigms and discovery of new drugs³⁻⁵. However, despite these recent advances, a number of lymphoma cases cannot be accurately classified into any of the well-established entities based on current morphological criteria and routinely available immunohistological and molecular assays. Such cases have subsequently been termed 'grey zone' lymphomas and, not surprisingly, poorly defined diagnostic criteria led to poor inter-observer reproducibility and misclassification. One form of these lymphomas, mediastinal grey zone lymphoma (GZL), that shares features of both classical Hodgkin lymphoma (cHL) and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) or primary mediastinal large B cell lymphoma (PMBCL), were first described in 1998⁶. However, this entity still lacks a clear pathological definition² and remains a diagnostic challenge for pathologists as they may in part represent a true biological transition state between these two related lymphoma subtypes. Different series of GZL have been reported in the literature, but few of them included both, pathological and clinical data⁷⁻¹⁵, highlighting the need for central clinico-pathology review in future studies^{15, 16}. The LYMPHOPATH French registry¹⁷ and the Lymphoma Study Association (LYSA) enabled the collection of a large retrospective cohort of 139 GZL cases, all reviewed by a combined panel of LYSA expert hematopathologists and hematologists. The clinical data of this series has been in part reported previously for patients with a mediastinal localization, or MGZL¹⁸. In this study, we report the histopathological and molecular cytogenetic features as well as the correlation with clinical characteristics of mediastinal GZL (MGZL) and non-mediastinal GZL (NMGZL).

MATERIAL AND METHODS

Case selection

Cases suspected to be MGZL were retrieved from pathological departments in LYSA centers across France, Belgium and Portugal using local pathological records, records from LYSA centers and the LYMPHOPATH network (certified Inca: French National Cancer Institute), which aims to review all newly diagnosed lymphoma cases in France¹⁷. This LYMPHOPATH review is performed by an independent expert hematopathologist that will attribute an ICDO (international classification of disease for oncology) code to the case in the LYMPHOPATH database. Cases with ICDO 9596/3, corresponding to GZL, were then submitted for review to the panel for this specific study. Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks and immunohistochemistry (IHC) slides from the time of initial diagnosis were collected at the LYSA-Pathology (LYSA-P) department Henri Mondor hospital in Paris to perform a central review by a panel of expert hematopathologists. The study was conducted with approval of the participating LYSA centers and the Lyon SUD EST III ethics committee (2017-006B). None of the patients had a history of immunosuppression (inherited, iatrogenic or disease-associated).

Histological case review

Several consecutive histopathological central reviews (including 3 stages and several meetings) of all the cases with available data were performed by experts hematopathologists from the LYSA and one expert from the BCCA (British Columbia Cancer Agency) until an agreement was reached between the experts to classify these challenging cases. During the first meeting in the LYSA-P, a panel of 12 hematopathologists (ATG, TM, DD, PD, BF, CL, MP, LM, DC, BB, PG, CC) established a consensus for inclusion criteria based on previous pathological descriptions of GZL from the literature^{7, 8, 10, 13, 14} (Table 1). Based on evaluation and integration of tumor cell morphology, architecture and growth pattern, the microenvironment composition and the immunophenotype, three distinct subgroups, namely cHL-like GZL, large B cell lymphoma like GZL (LBCL-like), and composite/sequential cases were identified. Composite and sequential cases are not reported herein. Secondly, all cases were reviewed by members of the panel on a multi-head microscope, during 3 meetings. When at least 6 experts agreed on the diagnosis of GZL, the case was included. In the last stage, in 2017, the cases were reviewed by 4 experts (ATG, DD, AM, CCB) and were more precisely classified into 4 subcategories. For the most challenging of the discussed cases, the subcategory was chosen when at least 3 experts agreed. Differential diagnoses (in particular EBV-related DLBCL) were also discussed during this meeting. For the distinction of EBV+ GZL from EBV-related DLBCL we applied the following criteria: a Hodgkin-like polymorphic inflammatory background (with eosinophils), the presence of a PMBCL-like morphology, the absence of angiocentrism and/or angioinvasion. During the morphological review, the percentage of tumor cells, the inflammatory background, degree of fibrosis (high, intermediate, low) and necrosis

(present or absent) were assessed. Tissue microarrays (TMA) were constructed using standard techniques, containing three 1mm cores per case.

Immunohistochemical studies

Immunohistochemical (IHC) stainings used to establish the initial diagnosis by the primary pathologist were reviewed. For most of the cases these included: CD20, CD3, CD30, CD15. If necessary, the following stainings were repeated: CD20 (L26, Dako), CD3 (polyclonal, Dako), CD30 (BerH2, Dako), CD15 (LeuM1, Beckman Dickinson) using standard methods on an automated immunostainer (Ventana Benchmark Ultra, Tucson, AZ). Additional stainings were done if sufficient material was available: B cell transcription factors (PAX5 (SP34), OCT2 (MRQ2), BOB1 (SP92) all from Ventana), CD79a (GCB117, MS Dako), and CD23 (SP23, Termomicron). Other stainings were done on TMA sections: MAL (6D9 mAb as published¹⁹), PD-L1 (SP142, Spring Bioscience), PD-L2 (D7U8CTM, Cell Signaling) and MHC class II (HLA-DR/DP/DQ, CR3/43, Dako). Appropriate positive and negative controls were used for all IHC stainings. Scoring was done for CD20, CD30 and CD15 as follows: intensity (0-1-2-3, with 0=negative and 3=strongly positive) and percentage of positive tumor cells (0-1 (<10%)-2 (10-90%)-3 (100%)). For the other IHC staining, positivity was considered positive if at least 10% of tumor cells expressed the marker. For PD-L1 expression, a histoscore (H; range 0-300) was calculated by multiplying the percentage of positive tumor cells with staining intensity (scores 1 (weak) -2 (moderate) -3 (strong)).

EBV evaluation

Latent EBV-infection of the malignant cells was evaluated in 133 cases by in situ hybridization for EBER (6 cases were not investigated due to exhaustion of material).

FISH analysis for CIITA and PD-L1/PD-L2

Interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis for detection of *CIITA* (16p13.13) and *CD274* (PD-L1)/*PDCD1LG2* (PD-L2) (9p24.1) rearrangements and copy number alterations was performed on FFPE TMA sections as previously described²⁰.

Statistics

Event free survival (EFS) was calculated from the date of diagnosis to the date of progression, a change of therapy that was not initially scheduled (radiotherapy, high-dose therapy with autologous stem cell transplantation and other unplanned treatments) or death from any cause. Overall survival (OS) was calculated from date of diagnosis to date of death from any cause. Statistical analysis was performed using Statistica software version 7.1. Categorical variables were summarized using frequencies and

percentages, and compared using the χ^2 test. Univariate prognostic analysis was performed using the log-rank test.

RESULTS

Case selection and histological review

Out of 233 cases collected and reviewed, 28 were identified as sequential or composite lymphoma, 139 fulfilled the GZL inclusion criteria and 66 did not. Among these 66 cases, 34 were cHL (Nodular sclerosis, of which 20 classified as cHL NS-2), 20 PMBCL, 5 nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma (NLPHL), 4 T-cell/Histiocyte-rich LBCL, and 3 EBV-related DLBCL. Of note, we initially reported 147 cases in 2016¹⁸ (103 cHL-like and 44 LBCL-like); following the last review stage in 2017, 19/147 cases were finally diagnosed as: 3 EBV-related DLBCL (with CD30 expression on the majority but not all tumor cells), 15 cHL (cHL NS2) (with CD20 positivity on the majority but not all tumor cells), 1 PMBCL (with CD30 expression but not strong enough to be included as GZL). Therefore, these 19 cases were eventually excluded from the present study. Furthermore, 7 cases were reclassified as composite/sequential lymphoma based on additional information. We were able to add eighteen new cases in this present study.

Morphology and immunophenotype

From the diagnostic biopsies, 98 cases presented at nodal sites, 32 in the anterior mediastinum, and 9 biopsies were stemming from extra-nodal localizations (n=1 digestive track, n=2 epidural mass, n=3 pulmonary, n=3 retroperitoneal/peritoneal mass). Eighty-six cases were classified as cHL-like and 53 as large B-cell (LBCL)-like GZL. Each group, as presented in the section below, was then divided into 2 subgroups (namely groups 0 and 1 for cHL-like cases and 2 and 3 for LBCL-like cases) based on the distinctiveness of morphologic and immunophenotypic features (as shown in figure 1).

a. cHL-like cases

Among the 86 cHL-like cases, 43 (50%, namely “group 0”, figure 2) had a morphology more closely related to cHL but an immunophenotype of LBCL with strong and diffuse CD20 expression on all tumor cells and positivity for other B cell markers such as OCT2, BOB1, PAX5 and/or CD79a. For the other 43 cases (namely “group 1”, figure 3), the morphology included some typical cHL features and some sheets of intermediate cells and/or clear cells and more diffuse areas but with a background less rich in eosinophils and plasma cells than typically seen in cHL. In some areas that were rich in large cells, the differential diagnosis with PMBCL was more difficult based on morphological criteria alone.

The median percentage of tumor cells in all 86 cHL-like cases (groups 0 and 1) was 10% (average 14%, range \leq 1-60%), with sheets of large tumor cells present in the majority of cases. In 25% of cases prominent fibrosis with scleronodular repartition was seen, whereas fibrosis was intermediate in 27%, scarce in 22% and absent in 36%. Necrosis was absent or scarce in most of the cases.

According to our inclusion criteria, the immunophenotype was more closely related to LBCL with strong and diffuse expression of CD20 on all tumor cells in all cases, except for 2 in which CD20-expression was noted in less than 90% of the tumor cells. One of these 2 cases expressed CD79a (strong and diffuse) on all tumor cells resulting in a final panel diagnosis of GZL. The other case expressed all other B cell markers (PAX5, OCT2, BOB1 and CD79a on all tumor cells). All cases in this group expressed CD30 in a diffuse and intense manner for almost all of them. IHC results are reported in Table 2. Regarding the B cell markers (CD20, PAX5, CD79a, OCT2, BOB1), IHC staining of 3 or more markers were available in 67/86 cHL-like cases and are reported in Table 3. Among these 67 cases, 50 (75%) expressed at least 3 B cell markers including 31 (46%) with 4 or 5 markers. CD23-expression was observed in 20/66 cHL-like (30%) cases and MAL in 19/39 (49%). In 38 cases, both MAL and CD23 IHC stainings were available for review: 10 (26%) expressed MAL and CD23, 9 (24%) expressed MAL but not CD23, 3 (8%) expressed CD23 but not MAL and 16 (42%) expressed none of the 2 markers.

b. LBCL-like

Fifty-three cases (38%) were classified as LBCL-like GZL. Among those, 44 (out of 53, 83%) had an intermediate morphology with a predominance of medium to large atypical and pleomorphic tumor cells and sheets of pleomorphic tumor cells as well as sometimes clear cells, Hodgkin-like or even typical Reed-Sternberg (RS) cells (namely “group 2” figure 4). In these 44 intermediate cases, an inflammatory background with small lymphocytes, histiocytes and sometimes eosinophils was always reported. Reticular fibrosis was less prominent compared to typical PMBCL. The remaining 9 (out of 53, 17%) LBCL-like cases had a morphology more closely related to LBCL (including 6 with close resemblance of PMBCL morphology and 3 with more pleomorphic tumor cells) with intense and diffuse CD30-expression (namely “group 3”, figure 5). In one case CD30-expression was low (intensity score 1), but CD15-expression was present in 100% of the tumor cells. Among the 53 LBCL-like cases, the median percentage of tumor cell infiltration was 60% (average 55%, range 10-80%). Cases with low tumor content (n=9 with < 20%) presented with partial infiltration and/or sheets of large cells and extensive necrosis. Necrosis and fibrosis were absent or low in the majority of cases (66% had no necrosis and 76% no or little fibrosis).

IHC staining for these 53 LBCL-like cases showed negativity or partial loss of CD20-expression in 12 cases. These 12 cases were all CD30-positive and expressed at least one other B cell marker but no T

cell markers. Among the 41 cases with strong CD20-expression, some lost the expression of other B cell markers (8/27 cases were negative for CD79a, 1/29 for PAX5, 9/26 for BOB1, 6/25 for OCT2). Two cases (2/53, 4%) had low CD30-expression with high and diffuse CD15-expression resulting in the panel diagnosis of GZL. MAL expression was reported in 11/18 (61%) and CD23 in 21/43 (49%).

Interestingly, some cases with a more intermediate morphology presented with a morphological spectrum across different areas of the biopsy providing additional evidence that the 4 different subgroups as defined in this study represent truly the full spectrum of GZL (Figure 1). Cases with more typical cHL morphology but LBCL phenotype (group 0, figure 2) and those with more typical LBCL morphology but cHL phenotype (group 3, figure 5) could be considered “extremes” of this spectrum, that encompasses also GZL with intermediate morphology and immunophenotype (group 1 and 2, figure 3 and 4).

Of note, the proportion of EBV-positive or -negative cases was similar in both cHL and LBCL-like GZL. Specifically, among the 32 EBV-positive MGZL cases, 21 (66%) were classified as cHL-like (N=16 group 0 and N=5 group 1) and 11 (34%) as LBCL-like (N=11 group 2), as compared to 59% cHL-like (60/101) and 41% (41/101) LBCL-like in EBV- cases (Chi-square, $p=0.4$).

Twenty-two cases had no mediastinal involvement, of which 13 (59%) presented with a cHL-like morphology (N=5 group 0 and N=8 group 1) and 9 (41%) with a LBCL-like morphology (all group 2).

CIITA and PD-L1/PD-L2 FISH abnormalities and PDL1, MHC class II expression

FISH for the *CIITA* and *CD274(PD-L1)/PDCD1LG2(PD-L2)* loci (Table 4) was performed in 83 cases on TMA slides and evaluable in 72 and 68 cases, respectively. We observed a high rate of abnormalities including 17% *PD-L1/PD-L2* break-apart positive cases, and 37% with signal patterns indicative of a chromosomal break in the *CIITA* locus (referred to as *CIITA* rearrangement). Copy number variations (CNV) were also frequent, with 56% gain/amplification of the *PD-L1/PD-L2* locus and 29% for the *CIITA* locus (referred to as 16p gains/amplification as previously reported in cHL²¹). LBCL-like GZL presented more frequently *PD-L1/PD-L2* (32% vs. 9%, $p=0.02$) and *CIITA* structural alterations (52% vs. 28%, $p=0.07$) than cHL-like cases. *CIITA* acts as the master transcriptional regulator of MHC (major histocompatibility complex) class II expression and cases with 16p gains/amplifications tended to present more often with membranous MHC class II expression than cases without (16/19, 84% vs. 27/46, 59%, $p=0.08$, chi-square). Cases showing a *CIITA* break and in addition 16p gain/amp expressed more membranous MHC class II compared to patients without gain/amp (8/8 vs. 9/17, $p=0.03$, supplementary table 1). The expression of PD-L1 ($>10\%$ with an intensity of 1 or 3; supplementary table 2) on tumor cells was observed in 49/70 cases (70%): 26 of these cases had a rearrangement of

PD-L1/PD-L2 and 18 had not (data not available in 5 cases). Among the 18 cases that expressed PD-L1 without *PD-L1/PD-L2* rearrangement detected, 6 were EBV+ and 12 EBV- suggesting that likely other mechanisms are causing overexpression. EBV+ cases tend to have a higher median H score than EBV- cases (140 versus 20, $p=0.2$, Mann-Whitney-test). Cases with cHL-like GZL expressed more frequently PD-L1 than cases with LBCL-like morphology (35/44, 80%, median H score 150 vs. 14/26, 54%, median H score 20) (supplementary table 2).

Clinical data and outcome

Clinical and follow up data were available for 113 cases (supplementary table 3). The vast majority ($n=91/113$, 81%) presented with mediastinal involvement. The distribution of cHL-like and LBCL-like cases was identical ($p=0.8$) between MGZL and NMGZL. Except for age there was no difference in clinical and biological characteristics between MGZL and NMGZL, with NMGZL being older than MGZL (median age of 54 vs. 39 years, respectively, $p=0.008$, Mann-Whitney-test). Of note, patients with a morphological Group 0 GZL were slightly younger (32 years vs 44 years for all the others, $p=0.004$, Mann-Whitney-test), 17/33 were female (similar sex ratio compared to the other cases, $p=1$). and the majority 29/33 (89%) had a mediastinal involvement (like all the other cases (63/80, 79%, $p=0.3$)). All patients with NMGZL presented with lymph node involvement and half of them had stage III/IV disease. Eight patients also had extra-nodal involvement (bone, liver, spleen, muscle or lung). EBV association was slightly, but not significantly, higher in NMGZL compared to MGZL (29% vs. 16%, $p=0.21$, Chi-square). NMGZL presented more frequently with gain of the 16p locus (7/11, 64%) than MGZL (7/43, 16%, $p=0.003$) but similar rate of *CIITA* break-apart positivity (5/11, 45% versus 16/43, 37%, $p=0.7$). MGZL and NMGZL also presented similar rates of *PD-L1/PD-L2* break and CNV (supplementary table 4). PD-L1 expression was observed in both MGZL and NMGZL, with similar rates in cHL-like cases (6/7 (86%) and 24/28 (86%) for NMGZL and MGZL respectively) but lower expression in NMGZL LBCL-like cases compared to MGZL LBCL-like (1/5 (20%) versus 12/16 (75%), $p=0.04$). Regarding EBV-positivity ($N=32$) and morphological characteristics, the proportion of cHL- and LBCL-like GZL in EBV + or - cases was similar. Among the 11 LBCL-like EBV+ GZL, all presented an intermediate morphology (i.e. group 2). The 21 other EBV+ cases presented cHL-like morphology. EBV+ cases presented similar rates of *PD-L1/PD-L2* FISH abnormalities than EBV- cases but less *CIITA/16p* structural alterations (table 5). Finally, patients with an EBV+ GZL had a median age of 47 years (16-93 years), compared to 41 years for EBV- GZL ($p=0.1$ Mann-Whitney-test).

Regarding overall survival (OS) and event-free survival (EFS), EBV association and GZL subtype (“cHL” versus “LBCL-like”, $p=0.45$; or group “0” versus “1, 2 and 3”, $p=0.84$) had no significant impact on patient outcomes, neither had CD15-positivity nor intensity of CD30-expression. A trend towards a

better outcome for patients with NMGZL compared to MGZL was observed although the difference was not significant (3 year-EFS 64% (SE 5%) vs. 75% (SE 10%) $p=0.3$, and 3 year-OS 88% (SE 8%) vs. 76% (SE 5%) $p=0.1$, supplementary figure 1). Furthermore, patients without MHC class II membranous expression (N=19) had shorter EFS than patients with membranous MHC class II (N=41), although the difference was not significant (3 year-EFS 62% (SE 11%) vs. 77% (SE 7%) $p=0.2$, and 3 year-OS 72% (SE 10%) vs. 85% (SE 6%) $p=0.1$; supplemental figure 2). Neither PDL1 expression nor *PD-L1/PD-L2* abnormalities were associated with outcome. These data should be interpreted with caution given the heterogeneity of the treatment (supplementary table 3).

DISCUSSION:

As recently described in the literature¹⁵, the diagnosis of GZL remains challenging and more applicable guidelines are warranted in daily routine practice. Based on this large series of carefully selected and reviewed challenging cases, we propose a classification into 4 subcategories that proved to be an innovative method to reach a consensus diagnosis. Moreover, this classification depicts the full spectrum of GZL within the boundaries of two clearly described extremes (group 0 and 3). Nevertheless, the diagnosis of GZL will likely remain a challenge in routine clinical practice and the existence of divergent morphologic areas in some cases may render their inclusion in group 1 or 2 subcategories difficult. Group 0 corresponds to cases with more typical morphology of cHL, but with a strong and diffuse CD20-expression on all tumor cells and expression of other B cell markers, whereas group 3 is represented by cases with a more typical morphology of LBCL but an intense and diffuse CD30- and/or CD15-expression. Between the two extremes of the spectrum, we identified cases with a more intermediate morphology (groups 1 and 2) and divergent immunophenotype: acquisition or loss of B cell markers was inversely correlated to the morphology. A transition between the two intermediate categories could be seen. In our series, 24% of GZL were associated with EBV and 17% had no mediastinal localization (NMGZL). These NMGZL cases tended to have similar morphological and clinical features as MGZL, although slightly older and more frequently (but not significantly) associated with EBV.

Several differential diagnoses were discussed and ruled out based on multiple criteria. First, most of the cases proposed for review and excluded from this analysis corresponded to cHL-NS rich in tumor cells (NS2). The same observation was made in the pathological review reported recently by Pilichowska et al¹⁵. In this study, 27 of 68 cases, initially reported as GZL¹⁶ from academic institutions, were reclassified as cHL-NS (10 cHL NS2). Importantly in Pilichowska's series¹⁵, cHL NS2 appeared to have inferior PFS compared with cHL and DLBCL and outcomes were more similar to confirmed GZL.

In other reports, CD20-expression in cHL is described, but with a weak to moderate intensity and not in all tumor cells and its prognostic impact remains unclear^{1, 23, 24}. In our report, the intense and diffuse CD20-expression on 100% of tumor cells, associated with the expression of other B cell markers, and the presence of sheets of large tumor cells, was in favor of GZL. In our cohort, the so-called group 0, with a morphology resembling cHL but strong CD20 expression, tended to be younger than the other cases, although they had a similar rate of mediastinal involvement and sex ratio. Given these data, it should be acknowledged that these so called “Group 0” GZL might be classified as cHL with CD20 expression by some pathologists. The second differential diagnosis was CD30+ DLBCL. Indeed, Slack et al²⁵ reported CD30-expression on at least one tumor cell in 95 of 385 DLBCL cases (25% of them showing extensive CD30 positivity with more than 80% CD30+ cells), associated with prolonged PFS. Hao et al²⁶ reported CD30-positivity (>20% of tumor cells) in 15.7% of DLBCL with an unfavorable outcome for these patients. In our analysis, the diagnosis of CD30+ LBCL was discussed in 9 cases, and GZL diagnosis was favored over CD30+ DLBCL (N=3) or CD30+ PMBCL (N=6) based on diffuse and intense CD30-expression on all tumor cells and CD15-co-expression in 5 cases. However, the absence of CD15 expression in these cases does not exclude the diagnosis of GZL. Thirdly, in this series, 5 cases proposed for review were excluded and diagnosed as NLPHL. In those cases, few tumoral cells were CD30 positive. In addition, these cases showed typical CD23+ follicular dendritic cell networks and PD1+ T-cells forming rosettes around tumor cells²⁷ with admixed small CD20+ B cells, making the diagnosis of GZL less likely. Lastly, the most difficult differential diagnosis was EBV-related DLBCL, notably those with GZ-like morphology reported by Nicolae et al.²⁸ in 7/46 cases of EBV+ DLBCL among young patients. In our series, 24% of the cases presented an association with EBV. The association between GZL and EBV has also been described by others^{10, 16, 29}. Both GZL and EBV+ DLBCL share morphological and phenotypical characteristics making it difficult to render a final diagnosis which remains controversial overall. Therefore, molecular studies are clearly warranted to provide a better characterization of these lymphomas and add in the differential diagnosis between EBV-positive GZL and EBV-related DLBCL with GZ-like morphology.

As described in PMBCL and cHL^{20, 30-32}, we report in this series of GZL a high rate of immune escape features. These data support the concept that GZLs represent the missing link between PMBCL and cHL in a pathological continuum, rather than DLBCL that has been shown to harbor less frequent *CIITA* rearrangements (4/131, 3%²⁰). Furthermore, in this series, EBV+ cases also presented immune escape features with similar rate of *PD-L1/PD-L2* FISH abnormalities than EBV- cases but less *CIITA* breaks. Cases with LBCL-like morphology had more *PD-L1/PD-L2* or *CIITA* rearrangements than cHL-like cases. Compared to Eberle et al¹², who analyzed these abnormalities in a series of GZL (probe set for PDL locus: *JAK2/PDL2*, 9p24.1 and for *CIITA* 16p13.13), we describe more *CIITA* breaks (37% versus 27%),

CIITA CNV (31% versus 10%), *PD-L1/PD-L2* break (17% versus *JAK2/PDL* breaks in 1/31 (3%)) and a similar rate of *PD-L1/PD-L2* CNVs (56% versus 55% CNV in *JAK2/PDL* locus). Interestingly, in our report, similar rates of *CIITA* break-apart positivity and *PD-L1/PD-L2* FISH abnormalities were observed between NMGZL and MGZL. These data indicate that NMGZL might be part of the same spectrum of disease. However, more *16p* gain, explored with *CIITA* probe, was observed in NMGZL cases (64% vs. 16% for patients with MGZL) that might be indicative of larger scale gains of *16p*²¹ with other driver genes implicated in PMBCL lymphomagenesis such as *IL4R*²². In the literature, PMBCL at non-mediastinal sites have also been identified applying a specific PMBCL gene expression signature⁶. Furthermore, Eberle et al¹² described more *CIITA* abnormalities among NMGZL compared to MGZL (44% vs. 33%) and also less *PD-L1* CNVs (38% vs. 61%). The rate of *CIITA* CNVs in our report requires further investigations to understand the functional consequences behind this abnormality, particularly in NMGZL. We also observed an overexpression of PD-L1 in 70% of cases and in 74% of EBV+-GZL, comparable to PD-L1 overexpression reported in the literature for PMBCL, cHL and EBV+ DLBCL (more frequently than in DLBCL)^{28,33-35}. Mechanisms underlying this overexpression are multiple, from cytogenetic abnormalities, EBV positivity and others³⁴. In our series, EBV positivity was associated with higher H score but few cases without FISH abnormalities or EBV positivity also expressed PD-L1, suggesting that other mechanisms can be causative for this dysregulation in GZL. Finally, LBCL-like NMGZL expressed less frequently PD-L1 than the others.

Regarding clinical correlation, we could not find any association between CD15 expression and outcome, as previously reported by Wilson et al³⁶ in a prospective series of GZL. These authors also reported that patients with DC-SIGN-positive tumor-infiltrating dendritic cells/activated macrophages showed a worse EFS and OS. Unfortunately, we were not able to test these markers in the present study. However, in our report MHC class II expression tended to be associated with better outcome, although heterogeneity between the different treatment regimens might create a bias¹⁸, emphasizing the important role of immune escape in this entity. These data should be interpreted with caution given the non-significant statistical analysis, possibly due to the low number of cases analyzed. Of note, some studies, including patients treated before the rituximab era, also reported that level of MHC class II expression on DLBCL tumors cells correlated with patient survival³⁷. Nevertheless, in a large gene expression based DLBCL study, MHC class II signature was not associated with survival in the R-CHOP cohort³⁷.

In conclusion, we report here a large series of carefully reviewed GZL reflecting a morphological and phenotypical spectrum. The proposed classification into 4 subcategories, besides being a method to reach consensus among experts, help to describe the spectrum of those challenging cases. It could

also be especially helpful for the interpretation of future molecular research in order to reach a final consensual definition for this entity. A divergence between morphology and immunophenotype with loss or acquisition of B cell markers inversely correlated to the morphology, the presence of transitional areas with sheets of large cells in cHL-like cases and RS cells in LBCL-like cases, as well as pleomorphic tumor cells, a more or less inflammatory background and sclerosis represent important diagnostic features to consider. With this study, we provide a better characterization of GZL, with description of important immune escape features, to finally allow improvement in therapeutic management. Indeed, in typical LBCL and cHL, the antibody drug conjugate targeting CD30 (brentuximab vedotin) and immune checkpoint inhibitors (pembrolizumab and nivolumab) are effective without excess toxicities^{33, 38-41}. Until recently, and due to the absence of biological studies, the majority of GZL patients could not benefit from these new therapeutics. The biological features described here provide a strong rationale for clinical assessment of anti-CD30 therapy (NCT01994850) and PD1 blockade in clinical trials as recently reported in 3 cases³⁸ (NCT03255018).

The clear definition of the borders of the spectrum, the relation between GZL and EBV or a particular immune escape mechanism among NMGZL, remain open questions. Molecular studies are necessary and might allow a better understanding of this spectrum to better define this entity.

Acknowledgements:

LYSA and the LYSA Pathology group and platform for digital slides: Aurélie Gaultier, Véronique Jalloux, Nadine Vaihen, Anne Viola, Cassandre Houdin, Jacqueline Polyte, Maryse Baia. The platform for digital slides of the INSERM Eq9 unit of the Institut Mondor de Recherche Biomedicale (IMRB) was supported by the ARC foundation and submitted to a validation plan executed by the LYSARC.

We thank the lymphopath consortium for sending their samples and for their participation in the consensus meeting: Prof. P.Gaulard (Hôpital Henri Mondor, Créteil, France); Prof. V. Costes Martineau and V Szablewski (CHU de Montpellier, France); Dr. J Brière and V Meignan (CHU Saint Louis, Paris, France); Dr. I. Soubeyran (Institut Bergonié, Bordeaux, France); Dr. C Chassagne-Clement (Centre Léon Bérard, Lyon, France); Prof. L. Xerri (Institut Paoli Calmettes, Marseille, France); Dr. A Moreau and Dr. C Bossard (CHU de Nantes, France); Prof. M.C. Coppin and Dr. Bouchindhonne (CHU de Lille, France); Dr. J.M. Picquenot (Centre Henri Becquerel, Rouen, France); Dr. F Charlotte (CHU la Pitié Salpêtrière, Paris, France); Dr. M Patey (CHU Reims); Dr. T Petrella and Dr. P Tas (CHU Dijon, France). We thank the LYSA center for collecting clinical data: Dr. Anne Bannos (Bayonne), Dr. Julien Lazarovici (IGR), Dr. Jérôme Cornillon (Saint Etienne), Prof. Olivier Casasnovas (Dijon), Prof. Guillaume Cartron (Montpellier), Dr. Rémy Gressin (Grenoble), Dr. Alexandre Morel (Necker), Dr. Sylvain Carras (Grenoble), Dr. Nicolas Daguindau (Annecy), Dr. Reman (Caen), Dr. Bruno Anglaret (Valence), Dr. Morgane Cheminant and Dr. Richard Delarue (CHU Necker, Paris), Prof. Roch Houot and Dr. Tony Marchand (Rennes), Prof. Steven LeGouill (Nantes), Prof. Arnaud Jaccard (Limoges), Dr. Luc Fornecker

(Strasbourg), Dr. Sophie Cereja (CH Sud Francilien), Dr. Jérôme Cornillon (Saint Etienne), Dr Richard Lemal and Prof. Olivier Tournillac (Clermont-Ferrand).

References

- [1] Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe AS, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW: WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.
- [2] Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES: The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016, 127:2375-90.
- [3] Rosenwald A, Staudt LM: Gene expression profiling of diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymph* 2003, 44:S41-S7.
- [4] Staudt LM: Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N Engl J Med* 2003, 348:1777-85.
- [5] Weinstock DM, Dalla-Favera R, Gascoyne RD, Leonard JP, Levy R, Lossos IS, Melnick AM, Nowakowski GS, Press OW, Savage KJ, Shipp MA, Staudt LM: A roadmap for discovery and translation in lymphoma. *Blood* 2015, 125:2175-7.
- [6] Rudiger T, Jaffe ES, Delsol G, deWolf-Peeters C, Gascoyne RD, Georgii A, Harris NL, Kadin ME, MacLennan KA, Poppema S, Stein H, Weiss LE, Muller-Hermelink HK: Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases ('grey zone' lymphoma). *Annals of Oncology* 1998, 9:31-8.
- [7] Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, Sorbara L, Alonso MA, Raffeld M, Jaffe ES: Mediastinal Gray Zone Lymphoma: The Missing Link Between Classic Hodgkin's Lymphoma and Mediastinal Large B-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2005, 29:1411-21.
- [8] Garcia JF, Mollejo M, Fraga M, Forteza J, Muniesa JA, Perez-Guillermo M, Perez-Seoane C, Rivera T, Ortega P, Piris MA: Large B-cell lymphoma with Hodgkin's features. *Histopathology* 2005, 47:101-10.
- [9] Oschlies I, Burkhardt B, Salaverria I, Rosenwald A, d'Amore ES, Szczepanowski M, Koch K, Hansmann ML, Stein H, Moller P, Reiter A, Zimmermann M, Rosolen A, Siebert R, Jaffe ES, Klapper W: Clinical, pathological and genetic features of primary mediastinal large B-cell lymphomas and mediastinal gray zone lymphomas in children. *Haematologica* 2011, 96:262-8.
- [10] Quintanilla-Martinez L, de Jong D, de Mascarel A, Hsi ED, Kluin P, Natkunam Y, Parrens M, Pileri S, Ott G: Gray zones around diffuse large B cell lymphoma. Conclusions based on the workshop of the XIV meeting of the European Association for Hematopathology and the Society of Hematopathology in Bordeaux, France. *Journal of hematopathology* 2009, 2:211-36.
- [11] O'Malley DP, Fedoriw Y, Weiss LM: Distinguishing Classical Hodgkin Lymphoma, Gray Zone Lymphoma, and Large B-cell Lymphoma: A Proposed Scoring System. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2015.
- [12] Eberle FC, Salaverria I, Steidl C, Summers TA, Jr., Pittaluga S, Neriah SB, Rodriguez-Canales J, Xi L, Ylaya K, Liewehr D, Dunleavy K, Wilson WH, Hewitt SM, Raffeld M, Gascoyne RD, Siebert R, Jaffe ES: Gray zone lymphoma: chromosomal aberrations with immunophenotypic and clinical correlations. *Mod Pathol* 2011, 24:1586-97.
- [13] Minami J, Dobashi N, Asai O, Yano S, Osawa H, Takei Y, Yahagi Y, Takahara S, Ogasawara Y, Yamaguchi Y, Kobayashi T, Morikawa N, Nikaido T, Aiba K, Usui N: Two cases of mediastinal gray zone lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 2010, 50:143-9.
- [14] Gualco G, Natkunam Y, Bacchi CE: The spectrum of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: a description of 10 cases. *Mod Pathol* 2012, 25:661-74.
- [15] Pilichowska M, Pittaluga S, Ferry J, J. H. C, J. K, Sehn L, Feldman T, Abramson J, Kritharis A, hernandez-Ilizaliturri F, Lossos I, Press O, Fenske T, Friedberg J, Vose J, Blum A, Jagadeesh D, Woda B, Gupta G, Gascoyne R, Jaffe ES, Evens A: Clinicopathologic consensus study of gray zone lymphoma with features intermediate between DLBCL and classical HL. *Blood Advances* 2017, DOI 10.1182.
- [16] Evens AM, Kanakry JA, Sehn LH, Kritharis A, Feldman T, Kroll A, Gascoyne RD, Abramson JS, Petrich AM, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Al-Mansour Z, Adeimy C, Hemminger J, Bartlett NL, Mato A, Caimi PF, Advani RH, Klein AK, Nabhan C, Smith SM, Fabregas JC, Lossos IS, Press OW, Fenske TS,

Friedberg JW, Vose JM, Blum KA: Gray zone lymphoma with features intermediate between classical hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: Characteristics, outcomes, and prognostication among a large multicenter cohort. *Am J Hematol* 2015.

[17] Laurent C, Baron M, Amara N, Haioun C, Dandoit M, Maynadie M, Parrens M, Vergier B, Copie-Bergman C, Fabiani B, Traverse-Glehen A, Brousse N, Copin MC, Tas P, Petrella T, Rousselet MC, Briere J, Charlotte F, Chassagne-Clement C, Rousset T, Xerri L, Moreau A, Martin A, Damotte D, Dartigues P, Soubeyran I, Peoch M, Dechelotte P, Michiels JF, de Mascarel A, Berger F, Bossard C, Arbion F, Quintin-Roue I, Picquenot JM, Patey M, Fabre B, Sevestre H, Le Naoures C, Chenard-Neu MP, Bastien C, Thiebault S, Martin L, Delage M, Filleron T, Salles G, Molina TJ, Delsol G, Brousset P, Gaulard P: Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. *J Clin Oncol* 2017, 35:2008-17.

[18] Sarkozy C, Molina T, Ghesquieres H, Michallet AS, Dupuis J, Damotte D, Morsschauser F, Parrens M, Martin L, Dartigues P, Stamatoullas A, Hirsch P, Fabiani B, Bouabdallah K, da Silva MG, Maerevoet M, Laurent C, Coiffier B, Salles G, Traverse-Glehen A: Mediastinal gray zone lymphoma: clinico-pathological characteristics and outcomes of 99 patients from the Lymphoma Study Association. *Haematologica* 2017, 102:150-9.

[19] Copie-Bergman C, Gaulard P, Maouche-Chretien L, Briere J, Haioun C, Alonso MA, Romeo PH, Leroy K: The MAL gene is expressed in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 1999, 94:3567-75.

[20] Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, Johnson NA, Zhao Y, Telenius A, Neriah SB, McPherson A, Meissner B, Okoye UC, Diepstra A, van den Berg A, Sun M, Leung G, Jones SJ, Connors JM, Huntsman DG, Savage KJ, Rimsza LM, Horsman DE, Staudt LM, Steidl U, Marra MA, Gascoyne RD: MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion partner in lymphoid cancers. *Nature* 2011, 471:377-81.

[21] Steidl C, Telenius A, Shah SP, Farinha P, Barclay L, Boyle M, Connors JM, Horsman DE, Gascoyne RD: Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood* 2010, 116:418-27.

[22] Vigano E, Gunawardana J, Mottok A, Van Tol T, Mak K, Chan FC, Chong L, Chavez E, Woolcock B, Takata K, Twa D, Shulha HP, Telenius A, Kutovaya O, Hung SS, Healy S, Ben-Neriah S, Leroy K, Gaulard P, Diepstra A, Kridel R, Savage KJ, Rimsza L, Gascoyne R, Steidl C: Somatic IL4R mutations in primary mediastinal large B-cell lymphoma lead to constitutive JAK-STAT signaling activation. *Blood* 2018, 131:2036-46.

[23] Tzankov A, Zimpfer A, Pehrs AC, Lugli A, Went P, Maurer R, Pileri S, Dirnhofer S: Expression of B-cell markers in classical Hodgkin lymphoma: A tissue microarray analysis of 330 cases. *Modern Pathology* 2003, 16:1141-7.

[24] Canioni D, Deau-Fischer B, Taupin P, Ribrag V, Delarue R, Bosq J, Rubio MT, Roux D, Vasiliu V, Varet B, Brousse N, Hermine O: Prognostic significance of new immunohistochemical markers in refractory classical Hodgkin lymphoma: a study of 59 cases. *PLoS ONE* 2009, 4:e6341.

[25] Slack GW, Steidl C, Sehn LH, Gascoyne RD: CD30 expression in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study from British Columbia. *Br J Haematol* 2014, 167:608-17.

[26] Hao X, Wei X, Huang F, Wei Y, Zeng H, Xu L, Zhou Q, Feng R: The expression of CD30 based on immunohistochemistry predicts inferior outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One* 2015, 10:e0126615.

[27] Gloghini A, Bosco A, Ponzoni M, Spina M, Carbone A: Immunoarchitectural patterns in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: pathologic and clinical implications. *Expert Rev Hematol* 2015, 8:217-23.

[28] Nicolae A, Pittaluga S, Abdullah S, Steinberg SM, Pham TA, Davies-Hill T, Xi L, Raffeld M, Jaffe ES: EBV-positive large B-cell lymphomas in young patients: a nodal lymphoma with evidence for a tolerogenic immune environment. *Blood* 2015, 126:863-72.

- [29] Elsayed AA, Satou A, Eladl AE, Kato S, Nakamura S, Asano N: Grey zone lymphoma with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathological study of 14 Epstein-Barr virus-positive cases. *Histopathology* 2017, 70:579-94.
- [30] Mottok A, Woolcock B, Chan FC, Tong KM, Chong L, Farinha P, Telenius A, Chavez E, Ramchandani S, Drake M, Boyle M, Ben-Neriah S, Scott DW, Rimsza LM, Siebert R, Gascoyne RD, Steidl C: Genomic Alterations in CIITA Are Frequent in Primary Mediastinal Large B Cell Lymphoma and Are Associated with Diminished MHC Class II Expression. *Cell Rep* 2015, 13:1418-31.
- [31] Twa DDW, Chan FC, Ben-Neriah S, Woolcock BW, Mottok A, Tan KL, Slack GW, Gunawardana J, Lim RS, McPherson AW, Kridel R, Telenius A, Scott DW, Savage KJ, Shah SP, Gascoyne RD, Steidl C: Genomic rearrangements involving programmed death ligands are recurrent in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2014, 123:2062-5.
- [32] Roemer MG, Advani RH, Ligon AH, Natkunam Y, Redd RA, Homer H, Connelly CF, Sun HH, Daadi SE, Freeman GJ, Armand P, Chapuy B, de Jong D, Hoppe RT, Neuberg DS, Rodig SJ, Shipp MA: PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J Clin Oncol* 2016, 34:2690-7.
- [33] Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, Schuster SJ, Millenson MM, Cattrly D, Freeman GJ, Rodig SJ, Chapuy B, Ligon AH, Zhu L, Grosso JF, Kim SY, Timmerman JM, Shipp MA, Armand P: PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2015, 372:311-9.
- [34] Gravelle P, Burrioni B, Pericart S, Rossi C, Bezombes C, Tosolini M, Damotte D, Brousset P, Fournie JJ, Laurent C: Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget* 2017, 8:44960-75.
- [35] Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, Chapuy B, Takeyama K, Neuberg D, Golub TR, Kutok JL, Shipp MA: Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010, 116:3268-77.
- [36] Wilson WH, Pittaluga S, Nicolae A, Camphausen K, Shovlin M, Steinberg SM, Roschewski M, Staudt LM, Jaffe ES, Dunleavy K: A prospective study of mediastinal gray-zone lymphoma. *Blood* 2014, 124:1563-9.
- [37] Lenz G, Wright G, Dave SS, Xiao W, Powell J, Zhao H, Xu W, Tan B, Goldschmidt N, Iqbal J, Vose J, Bast M, Fu K, Weisenburger DD, Greiner TC, Armitage JO, Kyle A, May L, Gascoyne RD, Connors JM, Troen G, Holte H, Kvaloy S, Dierickx D, Verhoef G, Delabie J, Smeland EB, Jares P, Martinez A, Lopez-Guillermo A, Montserrat E, Campo E, Brazier RM, Miller TP, Rimsza LM, Cook JR, Pohlman B, Sweetenham J, Tubbs RR, Fisher RI, Hartmann E, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Wrench D, Lister TA, Jaffe ES, Wilson WH, Chan WC, Staudt LM, Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling P: Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2008, 359:2313-23.
- [38] Melani C, Major A, Schowinsky J, Roschewski M, Pittaluga S, Jaffe ES, Pack SD, Abdullaev Z, Ahlman MA, Kwak JJ, Morgan R, Rabinovitch R, Pan Z, Haverkos BM, Gutman JA, Pollyea DA, Smith CA, Wilson WH, Kamdar M: PD-1 Blockade in Mediastinal Gray-Zone Lymphoma. *N Engl J Med* 2017, 377:89-91.
- [39] Kasamon YL, de Claro RA, Wang Y, Shen YL, Farrell AT, Pazdur R: FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Relapsed or Progressive Classical Hodgkin Lymphoma. *Oncologist* 2017, 22:585-91.
- [40] Zinzani PL, Ribrag V, Moskowitz CH, Michot JM, Kuruville J, Balakumaran A, Zhang Y, Chlosta S, Shipp MA, Armand P: Safety and tolerability of pembrolizumab in patients with relapsed/refractory primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2017, 130:267-70.
- [41] Scott LJ: Brentuximab Vedotin: A Review in CD30-Positive Hodgkin Lymphoma. *Drugs* 2017, 77:435-45.

Table 1: Inclusion criteria

Subgroups	Morphology more closely related to:	Phenotype
cHL-like GZL	cHL (lacunar cells, inflammatory background, nodular sclerosis)	CD20 high and diffuse on all tumor cells, CD30 +++, CD15+/-
LBCL-like GZL	DLBCL/PMBCL (reticular fibrosis, clear cells, sheets of large cells)	CD20 +++, CD30+ high and diffuse, CD15 +/- CD20+ +++, CD30+/-, CD15+ high and diffuse CD20-, CD79a+, CD30+, CD15+
Composite	As expected in each component	As expected in each component
Sequential	Diagnosis of cHL or PMBCL and relapse as PMBCL or cHL	Diagnosis of cHL or PMBCL and relapse as PMBCL or cHL

Table 2:

139 cases	cHL-like, 86 cases (62%)	LBCL-like, 53 cases (38%)
CD20 (cases available)	86	53
0	0	8
1	1	4
2	1	2
3	84 (98%)	39 (72%)
CD30 (cases available)	86	53
0	0	0
1	4	2
2	9	1
3	73 (85%)	50 (94%)
CD15 (cases available)	85	53
0	38	21
1	19	12
2	11	4
3	17 (20%)	16 (31%)
PAX5 (cases available)	64	40
0	1	1
1	63 (98%)	39 (98%)
OCT2 (cases available)	50	33
0	14	11
1	36 (71%)	22 (67%)
BOB1 (cases available)	57	34
0	26	14
1	31 (54%)	20 (59%)
CD79a (cases available)	58	37
0	23	12
1	35 (61%)	26 (68%)
MAL (cases available)	39	18
0	20	7
1	19 (48%)	11 (61%)
CD23 (cases available)	66	43
0	46	22
1	20 (30%)	21 (50%)
EBV (cases available)	81	52
EBV related	21 (26%)	11 (21%)
Non-EBV related	60	41

Immunophenotype in classical Hodgkin-like (cHL-like) and Large B cell-like (LBCL-like) grey zone lymphoma.

Table 3:

Positive B cell markers (/67 patients)	5 markers available (34 patients)	4 markers available (20 patients)	3 markers available (7 patients)
1 marker + (2)	0	1	1
2 markers + (15)	6	5	4
3 markers + (19)	6	5	8
4 markers + (18)	9	9	-
5 markers + (13)	13	-	-

B cell markers among classical Hodgkin lymphoma-like grey zone (cHL-like) with at least 3 B cells markers available (N=67/86) (CD20, PAX5, CD79, OCT2, BOB1).

Table 4: CD274(PD-L1)/PDCD1LG2(PD-L2) and CIITA FISH analysis

PDL1/PDL2	ALL	cHL-like	LBCL-like	P, Fisher (cHL vs LBCL like)
BA	12/72 (17%)	4/47 (9%)	8/25 (32%)	0.02
GAIN	22/72 (31%)	14/47 (30%)	8/25 (32%)	0.
AMP	18/72 (25%)	10/47 (21%)	8/25 (32%)	0.
CIITA/16p	ALL	cHL-like	LBCL-like	P, Fisher (cHL vs LBCL like)
BA	25/68 (37%)	12/43 (28%)	13/25 (52%)	0.07
GAIN	14/68 (20%)	7/43 (16%)	7/25 (28%)	0.4
AMP	6/68 (9%)	3/43 (7%)	3/25 (12%)	0.7
DEL	1/68 (1%)	0	1/25 (4%)	

Abbreviations: CIITA: class II major histocompatibility complex transactivator; PDL1: program death ligand; BA: break apart, AMP: amplification, DEL: deletion; cHL-like: classical Hodgkin lymphoma-like; LBCL-like: large B cell lymphoma like

Table 5: FISH abnormalities in EBV+ and EBV- cases

FISH	EBV+			EBV-		
PDL1/PDL2	ALL	CHL-like	LBCL-like	ALL	CHL-like	LBCL-like
BA	4/19 (21%)	2/13 (15%)	2/6 (33%)	8/53 (15%)	2/34 (6%)	6/19 (32%)
GAIN	8/19 (42%)	4/13 (31%)	4/6 (67%)	14/53 (26%)	10/34 (30%)	4/19 (16%)
AMP	2/19 (10%)	1/13 (8%)	1/6 (17%)	16/53 (30%)	9/34 (27%)	7/19 (37%)
CIITA/16p	ALL	CHL-like	LBCL-like	ALL	CHL-like	LBCL-like
BA	3/18 (21%)	2/12 (17%)	1/6 (17%)	22/50 (44%)	10/31 (32%)	12/19 (63%)
GAIN	4/18 (22%)	3/12 (25%)	1/6 (17%)	10/50 (20%)	4/31 (13%)	6/19 (32%)
AMP	0	0	0	6/50 (12%)	3/31 (10%)	3/19 (16%)
DEL	0/18	0/12	0/6	1/50	0/31	1/19

Figure Legends:

Figure 1: Grey-Zone lymphoma spectrum

Grey zone lymphoma, with intermediate morphology and immunophenotype between large B cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma, represent a spectrum. For each group, H&E staining (x15, x100, x200), CD20 and CD30 staining are presented. The first extremity of the spectrum (on the left, group 0) corresponds to cases with more typical morphology of cHL, with scleronodular morphology on the top and a strong and diffuse CD20 and CD30 expression on all tumor cells. The second extremity (on the right, group 3) show cases with more typical morphology of LBCL with an intense and diffuse CD30 and CD20 expression. Between these 2 extremities, cases with more intermediate morphology and divergent immunophenotype are shown (in the middle, group 1 and 2). Group 1 GZL have a morphology closer to cHL with sheet of large CD30 and CD20+ tumor cells. Group 2 GZL have a morphology closer to LBCL with CD30 expression and numerous HL-like tumor cells in an inflammatory background. In this figure, group 2 is represented with lost CD20 expression (observed in 8 cases of this series). In these two intermediate groups, transitional areas could be seen (not shown).

Figure 2: Grey zone lymphoma Group 0

H&E staining (x15, x200, x400) shows a classical hodgkin like morphology with a scleronodular architecture (A), Reed Sternberg (RS) cells in an inflammatory background (B and C). The tumoral cells express CD30 (D), strong and diffuse CD20 (E) on 100% of cells and others B cell markers, as OCT-2 (F), CD79a (G) and PAX5 (H).

Figure 3: Grey zone lymphoma Group 1

H&E staining (x200) shows a classical hodgkin like morphology with a more intermediate architecture, less fibrosis, and more sheet of large cells in an inflammatory background compared to group 0 (A). CD30 and CD20 staining show a higher tumor infiltrate compared to group 0 (B and C), with partial CD15 positivity (D) and expression of B cell markers as BOB-1 (E) and OCT-2 (F).

Figure 4: Grey zone lymphoma Group 2

H&E staining (x100 and x200, A, B and C) shows a large B cell like morphology (A) with Reed Sternberg like cells in an inflammatory background (B). Tumoral cells present diffuse and strong expression of CD30 (D), CD15 (E) and PAX5 (F). CD20 is negative (G), as observed in 8 cases of this series (B cell origin confirmed by clonality and/or other B cell markers expression, not shown) .

Figure 5: Grey zone lymphoma Group 3

H&E staining (x15, x100, x200) shows a large B cell like morphology with a complete destruction of the architecture and a diffuse infiltrate of tumor cells (A). Fibrosis can be observed around small sheet of large cells (B and C). Tumoral cells are strongly positive for CD20 (D), for CD30 (E) and CD15 (F).

Figure 1

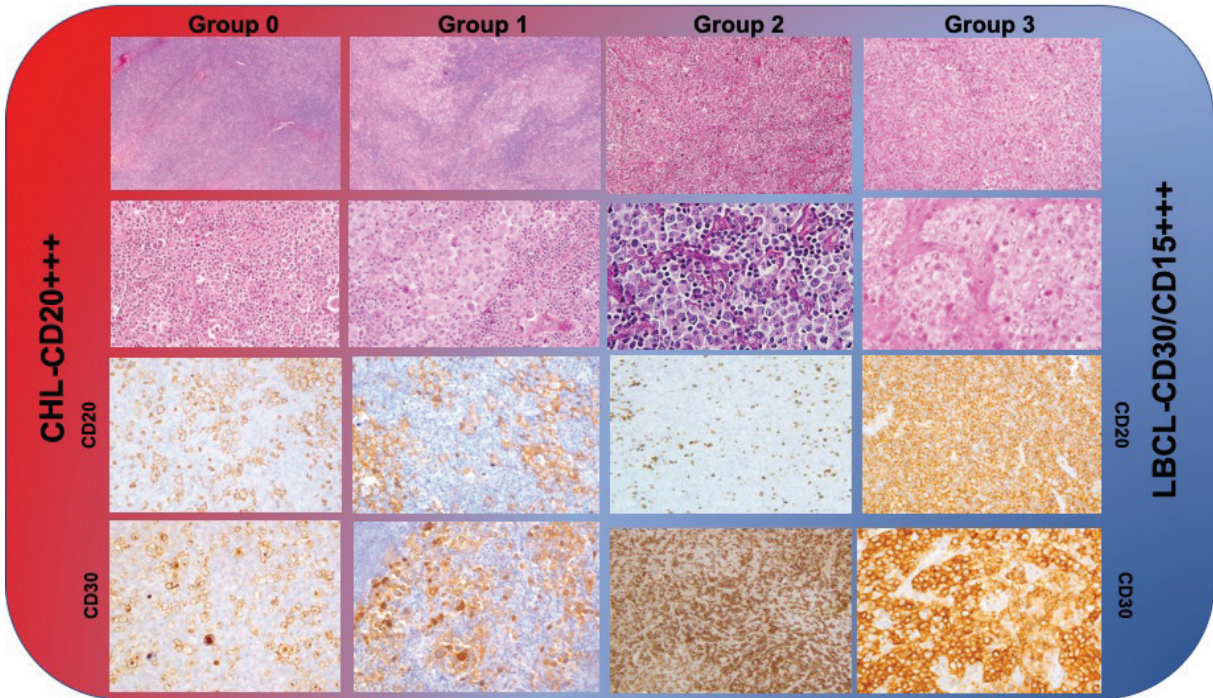


Figure 2

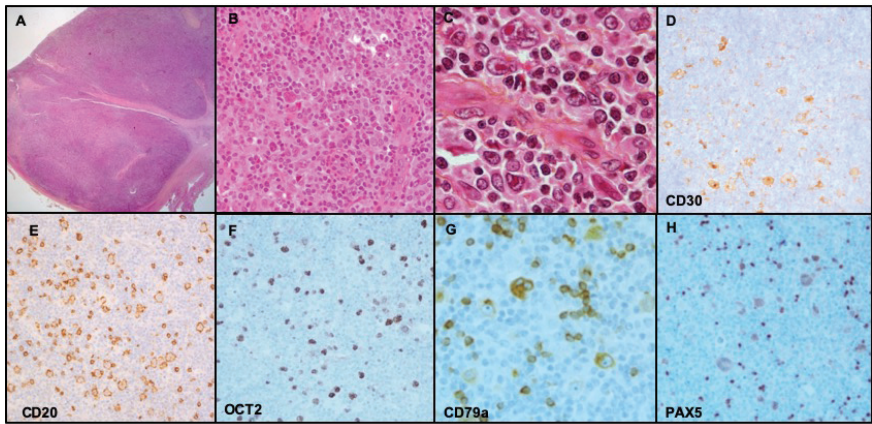


Figure 3:

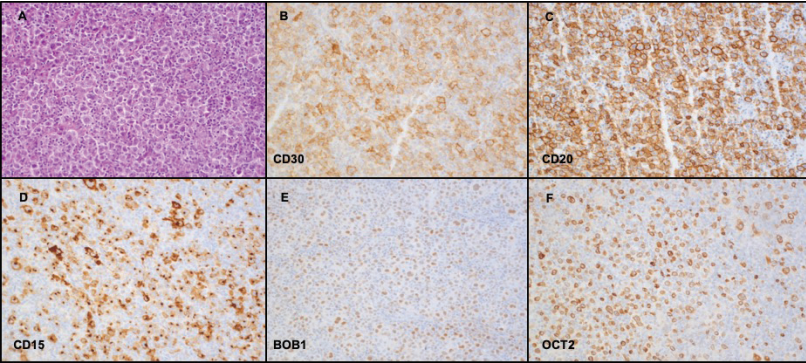


Figure 4:

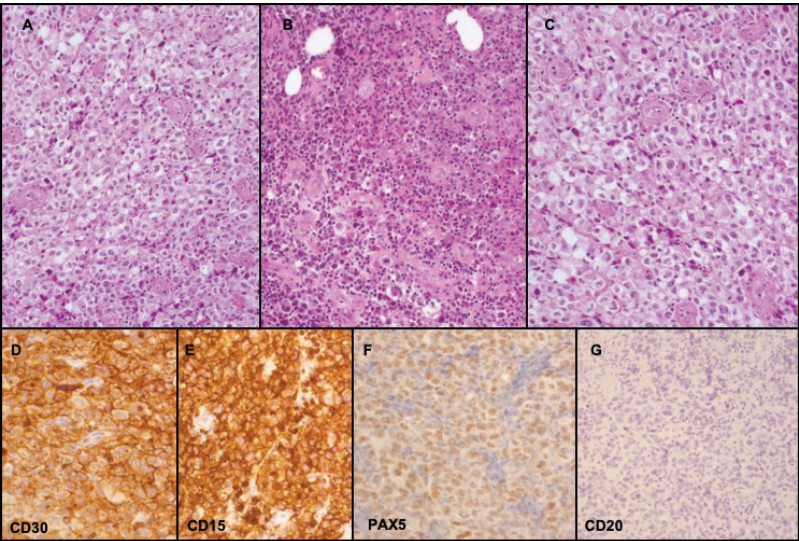
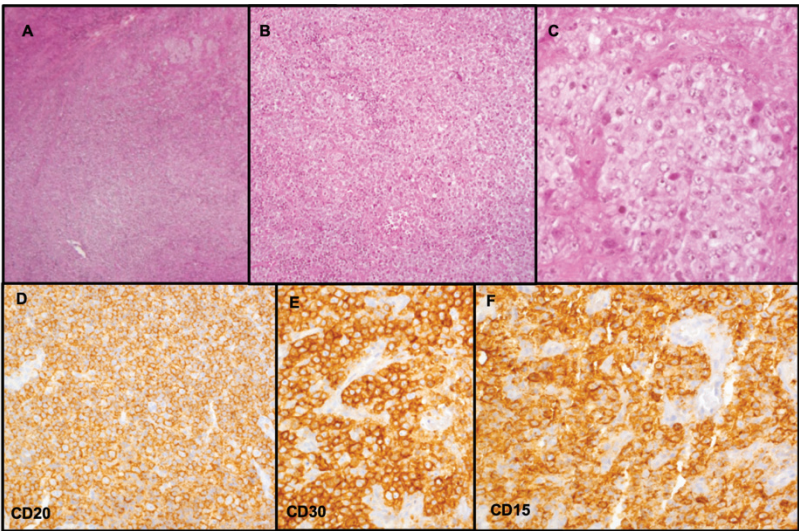
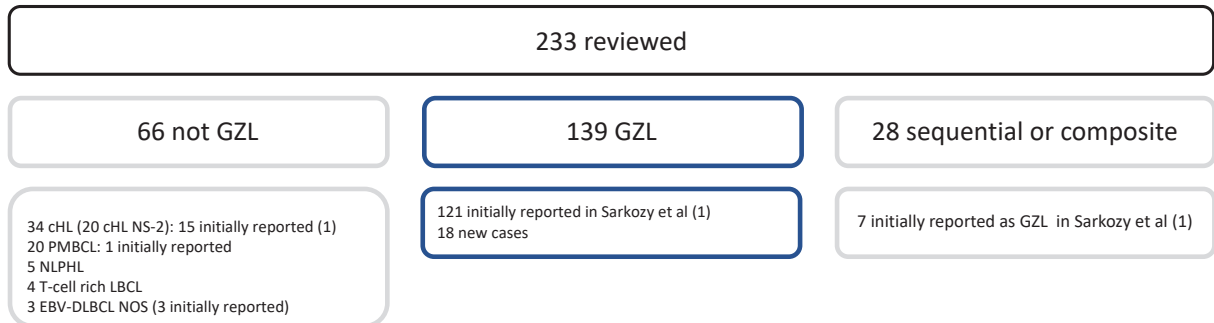


Figure 5:



Supplemental Flow Chart:



Abbreviations: MGZL: mediastinal grey zone lymphoma; cHL: classical Hodgkin lymphoma; PMBCL: primary mediastinal large B cell lymphoma; NLPHL: nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma; LBCL: large B cell lymphoma; DLBCL: diffuse large B cell lymphoma

(1) Sarkozy C, Molina T, Ghesquieres H, Michallet AS, Dupuis J, Damotte D, Morsschauser F, Parrens M, Martin L, Dartigues P, Stamatoullas A, Hirsch P, Fabiani B, Bouabdallah K, da Silva MG, Maerevoet M, Laurent C, Coiffier B, Salles G, Traverse-Glehen A: Mediastinal gray zone lymphoma: clinico-pathological characteristics and outcomes of 99 patients from the Lymphoma Study Association. *Haematologica* 2017, 102:150-9.

Supplementary table 1: MHC class II expression according to *CIITA* FISH abnormalities

Cases with FISH and IHC data	MHC class II membranous expression
All, N=65	43 (66%)
<i>CIITA</i> BA Yes, N=25	17 (68%)
<i>CIITA</i> BA No, N=40	26 (65%)
<i>CIITA/16p</i> gain/amp, N=19	16 (84%)
<i>CIITA/16p</i> no gain/amp N=46	27 (59%)
<i>CIITA</i> BA no gain/amp, N=17	9 (53%)
<i>CIITA</i> BA and gain/amp, N=8	8 (100%)

Abbreviations: *CIITA*: class II major histocompatibility complex transactivator, MHC class II: major histocompatibility complex 2. BA: break apart; AMP: amplification.

Supplementary table 2: PDL1 and MHC class II immunohistochemistry expression

Markers	ALL	cHL-like	LBCL-like	EBV-	EBV+
PD-L1 (available)	70	44	26	51	19
- >10%, intensity 1+	49 (70%)	35 (80%)	14 (54%)	35 (69%)	14 (74%)
- H score: mediane (range)	65 (0-300)	130 (0-300)	20 (0-300)	20 (0-300)	140 (0-300)
PD-L2 (available)	78	50	28	57	21
>10%	9 (12%)	6 (12%)	3 (11%)	8 (14%)	1 (5%)
MHC class II	77	48	29	56	21
membranous expression	52 (68%)	30 (63%)	22 (76%)	38 (68%)	14 (67%)

Abbreviations: cHL-like: classical Hodgkin lymphoma-like; LBCL-like: large B cell lymphoma like, EBV: Epstein Barr Virus; MHC class II: major histocompatibility complex 2.

Supplementary table 3: clinical data

Characteristics, N=113	Mediastinal involvement N=91	No Mediastinal involvement, N=22	Chi-square test P
Age (median)	39 (13-93)	54 (14-92)	
> 60 years	17 (19%)	8 (36%)	0.09
>= 45 years	35 (38%)	16 (72%)	0.004
Gender (M/F)	43 / 48	11/11	1
Vena Cava Syndrome	14 / 73	NA	
Ann Arbor			
I / II	42	9	1
III / IV	48	11	
NA	1	0	
Pleural/pericardial effusion / contigus localization	21	NA	-
Bone Marrow involvement			0.7
Yes / No / NA	9 (10%) / 79 / 3	3 (15%) / 17 / 2	
ECOG-PS ≥ 2			0.3
Yes / No / NA	24 (27%) / 66 / 1	3 (14%) / 19 / 0	
B symptoms			0.3
Yes / No / NA	56 (62%) / 34 / 1	11 (50%) / 11 / 0	
Extra nodal involvement > 1			1
Yes / No / NA	16 (18%) / 75 / 0	4 (18%) / 18 / 0	
Bulky disease			
> 7 cm (Yes / No / NA)	38 (48%) / 41 / 12	6 (29%) / 15 / 1	0.1
> 10 cm (Yes / No / NA)	21 (26%) / 59 / 11	5 (24%) / 16 / 1	1
Anemia (Hemoglobin < 10.5 g/dL)			0.4
Yes / No / NA	19 (24%) / 61 / 11	3 (14%) / 19 / 0	
Leukocytes > 15G/l			0.7
Yes / No / NA	11 (13%) / 70 / 8	2 (10%) / 20 / 0	
Lymphopenia < 0.6G/l or < 8% leukocyte yes / No / NA			0.2
	28 (35%) / 51 / 12	4 (19%) / 17 / 1	
Albuminemia < 35 g/l			0.4
Yes / No / NA	25 (38%) / 41 / 25	5 (26%) / 14 / 3	
ESR > 50 or > 30 + B symptoms			0.4
Yes / No / NA	46 (63%) / 27 / 18	10 (53%) / 9 / 3	
LDH > UNL			1
Yes / No / NA	49 (58%) / 36 / 6	12 (57%) / 9 / 1	

B2 microglobulin > UNL			1
Yes / No / NA	15 (31%) / 33 / 43	4 (33%) / 8 / 10	
IPlaa			1
0-1	56 (62%)	14 (64%)	
2- 3	34 (38%)	8 (36%)	
NA	1	0	
IPS			1
0-2	45 (54%)	11 (55%)	
3 +	38 (46%)	9 (45%)	
NA	8	2	
EBV			0.21
Positive	14 (16%)	6 (29%)	
Negative	73 (84%)	15 (71%)	
NA	4	1	
Morphology			0.8
cHL-like	58 (64%)	13 (59%)	
LBCL-like	33 (36%)	9 (41%)	
Treatment			0.06
Non-Intensive	41 (45%)	15 (68%)	
Intensive	50 (55%)	7 (32%)	
Rituximab			0.07
Yes	60 (66%)	19 (86%)	
No	31 (34%)	3 (14%)	
Radiation			1
Yes	18 (20%)	4 (18%)	
No	73 (80%)	18 (82%)	

Intensive treatment is defined by R-ACVBP (Rituximab, doxorubicin, methylprednisolone, cyclophosphamide, bleomycin and vindesine) or escBEACOPP regimen (escalated BEACOPP: methylprednisolone, doxorubicin, cyclophosphamide, procarbazine, etoposide, bleomycin and vincristine). Non-intensive schedule is defined by R-CHOP (rituximab, doxorubicin, methylprednisolone, cyclophosphamide and vincristine) or ABVD (doxorubicin, vinblastine, bleomycin and dacarbazine) regimen.

Supplementary table 4: FISH abnormalities according to mediastinal involvement

<i>PDL1/PDL2</i>	MGZL			NMGZL		
	ALL	cHL-like	LBCL-like	ALL	cHL-like	LBCL-like
BA	7/45 (15%)	2/29 (7%)	5/16 (31%)	3/13 (23%)	1/8 (13%)	2/5 (40%)
GAIN	15/45 (33%)	9/29 (31%)	6/16 (38%)	3/13 (23%)	2/8 (25%)	1/5 (20%)
AMP	11/45 (24%)	5/29 (17%)	6/16 (38%)	5/13 (38%)	4/8 (50%)	1/5 (20%)
<i>CIITA/16p</i>	ALL	cHL-like	LBCL-like	ALL	cHL-like	LBCL-like
BA	16/43 (37%)	8/27 (30%)	8/16 (50%)	5/11 (45%)	2/7 (29%)	3/4
GAIN	7/43 (16%)	4/27 (15%)	3/16 (19%)	7/11 (64%)	3/7 (57%)	4/4 (100%)
AMP	3/43 (7%)	1/27 (4%)	2/16 (12%)	1/11 (9%)	1/7 (14%)	0/4
DEL	1/43 (2%)	0/27 (0%)	1/16(6%)	0	0	0

MGZL: mediastinal grey zone lymphoma; NMGZL: non-mediastinal grey zone lymphoma; cHL: classical Hodgkin like; LBCL-like: Large B cell like

Supplementary table 5: FISH abnormalities in EBV+ and EBV- cases

FISH	EBV+			EBV-		
	ALL	cHL-like	LBCL-like	ALL	cHL-like	LBCL-like
<i>PDL1/PDL2</i>	ALL	cHL-like	LBCL-like	ALL	cHL-like	LBCL-like
BA	4/19 (21%)	2/13 (15%)	2/6 (33%)	8/53 (15%)	2/34 (6%)	6/19 (32%)
GAIN	8/19 (42%)	4/13 (31%)	4/6 (67%)	14/53 (26%)	10/34 (30%)	4/19 (16%)
AMP	2/19 (10%)	1/13 (8%)	1/6 (17%)	16/53 (30%)	9/34 (27%)	7/19 (37%)
<i>CIITA/16p</i>	ALL	cHL-like	LBCL-like	ALL	cHL-like	LBCL-like
BA	3/18 (21%)	2/12 (17%)	1/6 (17%)	22/50 (44%)	10/31 (32%)	12/19 (63%)
GAIN	4/18 (22%)	3/12 (25%)	1/6 (17%)	10/50 (20%)	4/31 (13%)	6/19 (32%)
AMP	0	0	0	6/50 (12%)	3/31 (10%)	3/19 (16%)
DEL	0/18	0/12	0/6	1/50	0/31	1/19

Supplemental figure:

Figure S1: EFS and OS for mediastinal and non-mediastinal GZL

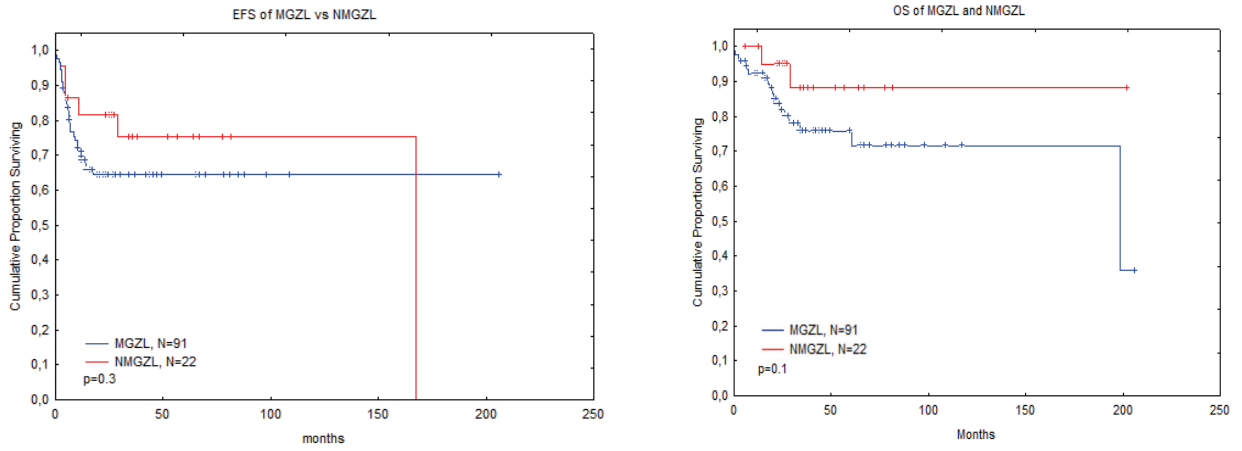
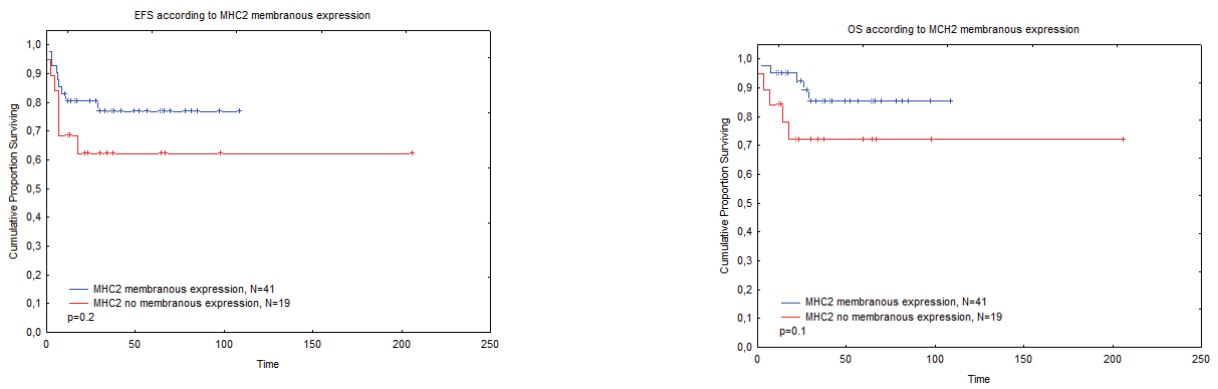


Figure S2: EFS and OS according to MHC expression



II. Caractérisation du profil d'expression génique et du

MET : article 2

Gene expression profiling of gray zone lymphoma.

Clémentine Sarkozy, Lauren Chong, Katsuyoshi Takata, Elizabeth A. Chavez, Tomoko Miyata-Takata, Gerben Duns, Adèle Telenius, Merrill Boyle, Graham W. Slack, Camille Laurent, Pedro Farinha, Thierry J. Molina, Christiane Copie-Bergman, Diane Damotte, Gilles A. Salles, Anja Mottok, Kerry J. Savage, David W. Scott, Alexandra Traverse-Glehen*, Christian Steidl*. Blood Adv. 2020;4(11):2523–2535

Gene expression profiling of grey zone lymphoma

Clémentine Sarkozy^{1,2}, Lauren Chong², Katsuyoshi Takata², Elizabeth A. Chavez², Tomoko Miyata-Takata², Gerben Duns², Adèle Telenius², Merrill Boyle², Graham W. Slack², Camille Laurent³, Pedro Farinha², Thierry Molina⁴, Christiane Copie-Bergman⁵, Diane Damotte⁶, Gilles Salles^{1, 7}, Anja Mottok⁸, Kerry J. Savage², David W. Scott², Alexandra Traverse-Glehen^{1,9*} and Christian Steidl^{2*}.

*Both authors share senior authorship of this work.

¹INSERM Unité Mixte de Recherche (UMR)-S1052, Centre National de la Recherche UMR 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France-Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer. ²Centre for Lymphoid Cancer, British Columbia Cancer, Vancouver, BC, Canada. ³Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse, CHU Toulouse, INSERM U.1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse-Purpan, France. ⁴Pathology Department, Necker Enfants Malades Hospital, Université Paris Descartes, APHP. ⁵Pathology Department, Henri Mondor-Albert Chennevier Hospital, APHP, Créteil, F-94010, France. Paris Est-Créteil (UPEC) University, Faculty, Créteil, F-94010, France. UMR-S 955, INSERM, Créteil, F-94010, France. ⁶Département de pathologie, Groupe Hospitalier Cochin, APHP, Paris, France. Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁷Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Service d'Hématologie, 69495 Pierre Bénite Cedex, France. ⁸Institute of Human Genetics, Ulm University and Ulm University Medical Center, Ulm, Germany. ⁹Hospices Civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Service d'Anatomie Pathologique, 69495 Pierre Bénite Cedex, France

Corresponding author: Christian Steidl, csteidl@bccancer.bc.ca, 675 W 10TH AVENUE, V5Z1L3 Vancouver BC, Canada, phone: +1 (604) 675-8046

Text word count: 4012

Abstract word count: 223

Figures: 6

Tables: 2

References: 41

Key Points:

- 1- Macrophage infiltration is a key feature of the tumor microenvironment across the GZL spectrum
- 2- GEP distinguishes 2 subtypes of GZL, resembling PMBCL versus DLBCL phenotypes that are associated with clinical presentation in the “thymic” anatomical niche.

Abstract

Grey zone lymphoma (GZL), a B-cell lymphoma with features intermediate between large B-cell lymphoma (LBCL) and classical Hodgkin lymphoma (cHL), is a rare and poorly defined entity. Alongside GZL, a subset of EBV-positive DLBCL have been described with polymorphic/GZL-like morphology (polymorphic-EBV-L). To fill the important gap in our understanding of the pathogenic process underlying these entities, we performed a gene expression study of a large international cohort of GZL and polymorphic-EBV-L, combined with cHL and primary mediastinal large B-cell lymphoma (PMBCL) cases. In an unsupervised principal component analysis, GZLs presented with intermediate scores in a spectrum between cHL and PMBCL, whereas polymorphic-EBV-L clustered distinctly. The main biological pathways underlying the GZL spectrum were related to cell cycle, reflecting tumor cell content, and extra-cellular matrix signatures related to the cellular tumor micro-environment (TME). Differential expression analysis and phenotypic characterization of the TME highlighted the predominance of regulatory macrophages in GZL compared to cHL and PMBCL. Two distinct subtypes of GZL were distinguishable that were phenotypically reminiscent of PMBCL and DLBCL, and we observed an association of PMBCL-type GZL with clinical presentation in the “thymic” anatomical niche. In summary, GEP analysis enabled us to add precision to the GZL spectrum, describe the biological distinction compared to polymorphic-EBV-L, and distinguish cases with and without thymic involvement as two sub-groups of GZL, namely PMBCL-like and DLBCL-like GZL.

Introduction:

Lymphomas are a heterogeneous group of cancers categorized in the World Health Organization (WHO) classification into more than 60 distinct entities based on morphology, immunophenotype, genetic alterations and clinical features¹. Next generation sequencing (NGS) and gene expression profiling (GEP) studies, in revolutionary fashion, changed the definition and classification of different entities resulting in changes in treatment paradigms and discovery of new drugs². However, despite these recent advances in our understanding of lymphomas, there remain cases that cannot be accurately classified into any of the recognized entities. Such cases have been referred to as “grey zone lymphomas” (GZLs), and their currently nebulous definition may lead to confusion for diagnosis and treatment. Among these, “GZLs with intermediate features between diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and classical Hodgkin lymphoma (cHL)”, initially described in 1998³, entered the WHO classification in 2008 as a specific entity presenting intermediate clinical, morphological and phenotypical features between cHL and large B-cell lymphoma (LBCL), and in particular, primary mediastinal (thymic) B-cell lymphoma (PMBCL)¹. Given the commonalities in GEP and mutational landscape between cHL and PMBCL^{4,5}, it has been postulated that GZL might represent a biological transition state between these two entities, with a thymic B-cell as the common cell-of-origin (COO)⁶. Alongside GZL, a subset of EBV-positive LBCL have been described with polymorphic and GZ-like morphology (polymorphic-EBV-L)⁷, and these cases have been classified as a form of EBV-positive DLBCL NOS in the WHO¹.

The pathological definition of GZL implies an intermediate morphology and discordant phenotype¹, but the diagnostic boundaries with the parental entities is not clear. In order to add precision to the GZL characterization, we have previously proposed a morphological and phenotypical spectrum ranging from cHL to LBCL, comprised of 4 categories (group 0 to 3)⁸. Briefly, Group 0 corresponds to cases with morphology and cytological appearance more typical of cHL, but with expression of B cell program markers (i.e. strong and diffuse expression of CD20 on all tumor cells, frequently associated with other B cell markers on all tumor cells), whereas group 3 is represented by cases with a more typical morphology of LBCL but with intense and diffuse CD30 expression. Between these two extremes are cases with a more intermediate morphology and divergent immunophenotypes (groups 1 and 2, herein referred to as bona-fide-GZL based on their concordance with the WHO definition¹).

Despite this recent progress in describing GZL diversity, some important controversies and unmet questions persist: 1) EBV infection is virtually absent in PMBCL, but is reported in up to 20% of nodular sclerosis cHL (NS). Polymorphic-EBV-L⁹ have a closely related morphology with cHL features^{1,7,10}, and the impact of EBV on the molecular phenotype of the tumor cells and tumor micro-environment (TME) compared to GZL is poorly characterized. 2) Around 30% of patients with a GZL diagnosis do not clinically present with mediastinal involvement, and a large anterior mass in particular^{8,11-13}. This observation highlights the open question of the cell of origin for GZL (i.e. thymic vs non-thymic B cell). 3) The WHO classification defines GZL as an “intermediate” morphology group (bona-fide-GZL), but its molecular features compared to the parental entities are not well characterized.

To provide a better characterization of GZL and decipher underlying biological pathways, we performed GEP using whole-transcriptome RNA sequencing (RNA-seq) of a large retrospective and multi-centre GZL cohort, jointly with polymorphic-EBV-L, cHL and PMBCL samples. Combined with immunohistochemistry (IHC) validation, this analysis revealed that macrophage infiltration is a key feature of the TME along the GZL spectrum, and that EBV is a key modulator of gene expression among B cell lymphomas with intermediate morphology. We also identified 2 subtypes of bona-fide-GZL phenotypically resembling PMBCL and DLBCL, with PMBCL-type GZL being associated with a “thymic” anatomical location.

Methods:

Study cohort

Cases were collected from the LYSA and the Centre for Lymphoid Cancer (CLC; Canada) tissue repositories and were all centrally reviewed by an international panel of experts in hematopathology (Supplementary Figure 1), as previously reported⁸ and explained in detail in the supplementary Methods. In this study, all large B cell lymphoma EBV-positive cases with a polymorphic morphology were labelled as polymorphic-EBV-L, and all GZL were EBV negative, in accordance with the WHO classification¹. As described in our previous report⁸, cases with a morphology and cytological appearance more typical of cHL, but with strong and diffuse expression of CD20 on all tumor cells (group 0), and cases with LBCL morphology with CD30 expression on all tumor cells (Group 3) were included to help with the definition of molecular boundaries.

Beside the GZL and polymorphic-EBV-L cohorts, cHL and PMBCL cohorts were included in the study, as a comparator.

Nucleic acid extraction

Following deparaffinization, RNA was extracted from up to five 10 μ m formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPET) full sections using Formapure[®] kit according to manufacturer's instructions, including DNase treatment. RNA was quantified using a spectrophotometer (Nanodrop; ThermoFisher, Germany).

Library construction and sequencing

RNA were subjected to library construction using NEBNext[®] rRNA depletion Ultra II kit and 7 minutes of enzymatic fragmentation (RNase H). Cases were sequenced in pooled libraries on the Illumina NextSeq platform (paired-end 75bp reads).

Alignment and quality control

RNA-seq reads were aligned to GRCh38 and per-gene counts were generated using the STAR aligner (v2.5.3a_modified; see Supplementary Methods). Picard (v2.18.1) was used to calculate the proportion of usable bases (bases mapping to an exon or UTR) in each sample. A threshold for this value was calculated as the median minus two median absolute deviations, and samples with usable bases below this threshold were removed from downstream analysis (see Supplementary Figure 1 for detailed patient numbers).

Differential expression (DE) analysis

The final cohort for GEP included 85 GZL-spectrum, 27 polymorphic-EBV-L, 14 cHL, and 14 PMBCL cases. GEP analysis was performed in R (v3.4.4) using the DESeq2 package (v1.18.1). Raw count data was used to identify genes with counts per million ≥ 1 in at least 5% of the samples. Normalized log counts for these genes were calculated using the *vst* function, and were used as input for principal component analysis (PCA) and expression visualization. DE comparisons were performed using the *DESeq* function.

Gene set enrichment analysis (GSEA)

Pre-ranked analysis was performed using GSEA (v4.0.3). For enrichment based on DE, genes were ranked with a DE score calculated as $-\log_{10}(q\text{-value}) * \text{sign}(\log_2\text{FC})$. For enrichment of pathways associated with PCs, genes were ranked by Pearson correlation between expression of the gene and the PC score.

IHC analysis

Tissue micro-array (TMA) and antibody information are provided in the supplementary Methods. TMAs were stained for T lymphocyte markers (CD4, CD8, CD3, FOXP3, PD-1, LAG-3), macrophage markers (CD68, CD163), HLA-A/B/C (MHC-I) and HLA-DP/DQ/DR (MHC-II). Proportion of positive cells among all nucleated cells was independently calculated by 3 expert hematopathologists (KT, TM-T and PF). Discordant cases were discussed to reach consensus. MHC-I/II and PD-L1/2 scoring procedures are explained in supplementary methods.

Results:

Clinical characteristics of the GZ, cHL and PMBCL cohorts

As shown in Figure 1A, among the 85 GZL-spectrum cases, 56 cases (65%) were classified as bona-fide-GZL (31 group 1, 36%; 25 group 2, 29%), 11 cases (13%) group 0, and 18 cases (21%) group 3 (detailed clinical characteristics are provided in Table 1). The median age of the bona-fide-GZL patients was 48 years and the sex ratio 1.1 (F/M) (Table 1). The median age of the polymorphic-EBV-L was 53 years and sex ratio 0.5. The majority (63%) of bona-fide-GZL patients had anterior-mediastinal (referred to as “thymic”) involvement on CT/PET-scan at diagnosis, and the remaining cases had either non-anterior mediastinal involvement (12%) or no mediastinal involvement (25%) (referred to as “non-thymic”). Polymorphic-EBV-L cases had less thymic involvement (33%) compared to bona-fide-GZL cases ($p=0.002$), a similar rate of extra-nodal (EN) disease (52% vs 45% for polymorphic-EBV-L vs bona-fide-GZL), but with a distinct distribution of EN sites (mainly spleen and liver in polymorphic-EBV-L vs lung and bone marrow in bona-fide-GZL). Characteristics of the cHL cohorts (N=14 RNAseq and N=22 TMA) and the PMBCL (N=14) are presented in Supplementary Table 1. Outcome data for R-CHOP- and ABVD-treated patients are provided in Supplementary Table 2.

TME biology and thymic anatomical location are main drivers of GZL variance

Principal components analysis (PCA) was performed on GEP data from the cHL, GZL (2 cases were excluded due to the presence of more than 50% lung tissue in the FFPE section), polymorphic-EBV-L, and PMBCL cases. Much of the total variance was explained by PC1 and PC2 (20 and 17%, respectively; Supplementary Figure 2). The distribution of the samples based on their PC1 and PC2 scores produced a spectrum from cHL to PMBCL, with the GZL samples in-between. As shown in Figure 1B, cHL, bona-fide-GZL (group 1-2) and group 0 samples tended to be more interspersed with each other compared to PMBCL and group 3.

The main pathways enriched in the PC1- and PC2-associated genes were cell-cycle, DNA replication (enriched in PMBCL/group 3 cases), TME (T cells, NK cells, humoral immune response, MHC-I presentation) and extra-cellular matrix (matrisome). The top 10 genes in the significantly enriched GSEA pathways could be grouped into 7 major classes, and expression of these showed expected variance across the data-set (Figure 2). PMBCL and group 3 cases were mostly clustered and exhibited a high replication signature ("Cell cycle"), whereas cHL cases tended to be more mixed with bona-fide-GZL and group 0 cases. Most polymorphic-EBV-L cases formed a cluster enriched in TME and interferon (IFN) related genes.

As a second step, we performed PCA with only the group 0, bona-fide-GZL, and group 3 cases to further examine the spectrum. In this analysis, PC1 reflected 20% of the variance and was strongly correlated with group 3 status ($p=2.4e^{-5}$; Figure 3A). Within the bona-fide-GZL, group 1 and 2 presented a similar PC1 score ($p=0.25$; Figure 3A), suggesting that they could be analyzed jointly at the gene expression level. In contrast to group 3, group 0 cases were not significantly distinguishable from bona-fide-GZL in any of the first 5 PCs (reflecting 96% of the total variance). PC1 was also associated with thymic status ($p=4.8e^{-5}$), and with the MHC-I processing pathway by pre-ranked GSEA ($p<0.001$). This is consistent with IHC data where cases with thymic involvement were almost exclusively negative for MHC-I surface expression in contrast to non-thymic cases (97% and 66% respectively, Chi-squared $p=0.0066$, Figure 3B).

Detailed characterization of thymic bona-fide-GZL:

PC analysis identified bona-fide-GZL with thymic involvement as a relatively uniform group. Therefore, we compared these cases (N=31, referred to as thymic-GZL) to EBV^{neg} cHL

(N=12, SN morphology) and PMBCL (N=14) and performed differential gene expression analysis (DEA) between bona-fide-GZL with “thymic-GZL” and cHL, and thymic-GZL and PMBCL. Concordant with a “spectrum” hypothesis reflecting the tumor content, the expression level of known genes expressed by malignant cells (*JAK2*, *STAT1*, *PDCD1LG2*, *TRAF1*) increased from cHL to thymic-GZL to PMBCL. Reciprocally, the expression level of TME-related genes (*CD3E*, *CD3D*, *CD4*, *CD8B*) decreased.

We next aimed to identify GZL-specific genes by identifying those significantly up or down-regulated in both the thymic-GZL/cHL and thymic-GZL/PMBCL comparisons (q-value <0.05 and absolute $\log_2FC \geq 1$), but not significantly differentially expressed between cHL and PMBCL. We identified 8 genes down-regulated and 61 up-regulated in thymic-GZL. Pathway enrichment analysis of the up-regulated genes (GSEA MSigDB) highlighted TME-related biology in addition to some tumor-related pathways, including TNF α signaling via NF κ B, MAPKinase, and the AP-1 pathway (Table 2), which are also commonly disrupted in cHL biology¹⁴. Unsupervised clustering using expression of the GZL-specific genes identified a GZL-predominant cluster and a cHL- and PMBCL-predominant cluster as expected (Figure 4). Interestingly, 2 PMBCL cases clustered with thymic-GZL. One of them (PMBCL-39) was characterized by a region of the tumor with Reed-Sternberg (RS)-like cells, and the other (PMBCL-90) by extensive macrophage infiltration. Four of the 8 down-regulated genes were related to the presence of B-cells or plasma cells (*i.e.* TME B cells in the cHL samples and tumor cells in the PMBCL samples; *VPREB3*, *CD79A*, *CD79B*, *IGKV3OR2-268*) suggesting that thymic-GZL are characterized by low B cell content in the TME compared to cHL (Supplementary Figure 3A-B).

Among the GZL-specific pathways related to the TME was IL10 signaling (*IL1B*, *LIF*, *PTGS2*, *CXCL8*, *IL1RN*) suggesting a strong regulatory immune profile in thymic-GZL. Interestingly, at the IHC level, the expression of the regulatory T cell (Treg) marker FOXP3 tended to be higher in thymic-GZL compared to cHL and PMBCL (median % of FOXP3+ nucleated cells 10%, 4% and 3% in thymic-GZL, cHL, and PMBCL, respectively) (Figure 5A and B). Other TME-related pathways included matrisome (*IL1B*, *LIF*, *CXCL3*, *CXCL8*, *IL1RN*, *THPO*, *HPX*, *MMP13*, *ADAMTS18*, *HYAL4*, *ASPN*, *EYS12*) and metallothioneins (*MT2A*, *MT1F*, *MT1G*, *MT1H*, *MT1M*). Metallothioneins have been shown to promote tumor survival via inhibition of apoptosis and NF κ B pathway stimulation¹⁵, and immune escape through tumor associated

macrophages (TAM)¹⁶, reduction of MHC-I expression¹⁷, angiogenesis and extra-cellular matrix formation. Interestingly, all the thymic-GZL tumors showed loss of membranous MHC-I expression by IHC (Supplementary Figure 4A-B).

This prompted us to further investigate the TME in thymic-GZL, cHL and PMBCL by IHC. The total percentage of CD3+ T cells in the thymic-GZL TME was intermediate between cHL and PMBCL, as well as CD4+ T lymphocytes, in agreement with the GE findings. The presence of Treg markers LAG-3, PD1 and FOXP3, clearly showed an immunosuppressive TME. Indeed, the fraction of positive cells was similar compared to cHL, even though the total number of CD4+ T cells was significantly less (Figure 5A and B). As suggested by the GSEA signature, the bona-fide-GZL TME was enriched in TAMs, demonstrated by strong CD163 positivity and a significantly greater infiltrate compared to both cHL and PMBCL.

The thymic versus non-thymic bona-fide-GZL comparison sheds light on the specificity of the anatomical niche

We next investigated the relationship between thymic (N=31) and non-thymic (N=19) bona-fide-GZL cases (thymic involvement was unknown for 4 cases). We used the genes comprising the Lymph3Cx gene-set signature¹⁸, which distinguishes PMBCL from DLBCL, to perform hierarchical clustering of the bona-fide-GZL cases. DLBCL-related genes formed a uniform cluster, suggesting that these genes provide insight into tumor cell expression phenotypes (Figure 6A). The majority of the non-thymic cases clustered together with higher expression of the DLBCL genes, compared to thymic cases which presented stronger expression of the PMBCL-related genes. However, several non-thymic cases also showed expression of some PMBCL genes, which might reflect the presence of RS-like cells known to have a similar GE profile to PMBCL^{4,5}. A pre-ranked GSEA interrogating genes in the Lymph3Cx gene-set confirmed strong enrichment of the PMBCL-related genes in thymic bona-fide-GZL, and of the DLBCL-related genes in non-thymic cases (Figure 6B).

Moreover, loss of MHC-I membranous expression was found in all PMBCL and thymic bona-fide-GZL cases (Supplementary Figure 4A) vs 24% and 39% cHL and non-thymic bona-fide-GZL respectively ($p=0.0007$). PD-L2 (24% positive *versus* 0%, $p=0.02$) and also PD-L1 (78% with H-score >150 *versus* 23%, $p=4.e^{-4}$) expression was higher in the thymic vs non-thymic cases (Figure 6C and D). MHC-II expression was similar across PMBCL, cHL, thymic and non-

thymic bona-fide-GZL (loss of membranous expression in 40%, 27%, 44% and 38% of cases, respectively).

These data support the concept of 2 distinct types of GZL: one related to NS-cHL and PMBCL (with a postulated thymic B cell COO), and a second more related to cHL (non-NS) and DLBCL. TME features in the non-thymic cases were consistent with an intermediate morphology and a spectrum of T lymphocyte infiltration with exhaustion or regulatory markers. The greater TAM infiltrate, specific to GZL, was also found in the non-thymic cases (Supplementary Figure 4B). The clinical presentation also supports the concept of a PMBCL *versus* DLBCL dichotomy (Table 1 and Supplementary Table 4) where patients presenting with thymic GZL were younger and frequently presented with localized and bulky disease, in contrast to non-thymic GZL cases that were characterized by disseminated disease with different extra-nodal sites.

In summary, the non-thymic cases ('DLBCL-like GZL'), although presenting with intermediate morphology and ME features between cHL and LBCL, are distinct from the thymic cases ('PMBCL-like GZL') and are not part of the same cHL-GZL-PMBCL spectrum.

Group 0 and group 3: Where should we draw the GZL border?

We next sought to revisit the GZL-spectrum extremes and assess their relationship with the parental entities, cHL (EBV^{neg}) and PMBCL, to determine if group 0 and 3 should be considered part of the GZL spectrum.

We performed DE between cHL (EBV^{neg}) and the group 0 cases (N=11). Among the genes downregulated in group 0 versus cHL, we observed many immunoglobulin genes, reflecting the abundance of small B cells in the cHL TME. This was further confirmed at the IHC level, where group 0 had less small B cell infiltrate compared to cHL (although evaluation was limited to the TMA area), but higher TAM infiltration (CD163 and CD163/CD68 ratio) (Supplementary Figure 5A and B). GZL-specific genes identified in bona-fide-GZL were also enriched within group 0 compared to cHL (Supplementary Figure 5C), suggesting that these cases might be part of the GZL spectrum with an intermediate phenotype between cHL and bona-fide-GZL consistent with the overall PCA analysis (Figure 1B).

In the group 3 versus PMBCL PCA analysis, PC2 (13% of the variance) reflected the LymphC3x classification^{18,19} (assessed via DLBCL90 Nanostring assay¹⁸, supplementary

methods), with clear separation of the samples based on their DLBCL/PMBCL status (Supplementary Figure 6A). In contrast, GZL-specific gene expression was not correlated with PC2 and could not discriminate Group 3 samples from PMBCL (Supplementary Figure 6B-C).

These data confirm the results of the initial PC analysis where bona-fide-GZL and group 0 were intermingled and group 3 cases clustered separately in PC3. In summary, this suggests that group 0 cases should be included in the GZ spectrum, while group 3 more closely resembles DLBCL/PMBCL.

EBV associated phenotypes

To further investigate the relationship between GZL and polymorphic-EBV-L, we sought to perform DEA between these 2 entities. Given the close relationship between bona-fide-GZL and group 0 demonstrated by DE and PCA, we included group 0 in this analysis. Polymorphic-EBV-L cases were not significantly older (53 vs 46 y/o) with a male bias (70% vs 46%, $p=0.03$). They presented with less thymic (27% vs 66%, $p<0.001$) and less bulky disease compared to thymic cases (12% bulky in polymorphic-EBV-L versus 31% in GZL, $p=0.1$, Supplementary Table 5).

The DEA included 27 polymorphic-EBV-L and 65 GZL cases that passed quality filtering (as before, 2 cases were excluded due to lung involvement). 743 genes passed the significance threshold ($q\text{-value} < 0.05$ and absolute $\log_2FC \geq 1$; Supplementary Figure 7A). Among the most significant genes up-regulated in polymorphic-EBV-L, *CD160* is a glycoprotein strongly associated with NK and CD8+ lymphocytes, which was confirmed by IHC where polymorphic-EBV-L cases had more CD8 cells compared to GZL ($p=0.06$). Conversely, various interleukin receptors and ligands, such as *IL17RB*, *IL13RA2*, *IL5RA*, and *CCR4* were up-regulated in GZL cases, whereas the *CCR4* paralog *CX3CR1* was significantly upregulated in polymorphic-EBV-L, highlighting the modulation in chemokine expression induced by EBV. Using GSEA pre-ranked we examined the enrichment of the GZL-specific genes in the polymorphic-EBV-L versus GZL DE results. As shown in Supplementary Figure 7A, GZL were strongly enriched in the GZL-specific signature compared to polymorphic-EBV-L cases. Concordantly, the TNF α via NF κ B pathway and IL2/STAT5 signaling pathways (GSEA hallmarks) were significantly up-regulated in GZL cases, while IFN-gamma and TCR signaling pathways were up-regulated in polymorphic-EBV-L (supplementary table 6). By IHC, CD163 and CD8 cells were enriched in polymorphic-

EBV-L versus GZ cases (mean 25% vs 17% and 39% vs 28% respectively, $p=0.02$; Supplementary Figure 7B).

Discussion:

We present here the molecular characterization and description of the TME in a large series of GZL and polymorphic-EBV-DLBCL. Using RNA-seq analysis we highlight the main biological processes underlying the cHL-GZL-PMBCL spectrum related to immune cell infiltration and extra-cellular matrix components. Although heterogeneous, GZL are characterized by a specific immuno-modulatory TME composed of TAMs and T cell subsets expressing regulatory markers. Leveraging the comparison of GZL to polymorphic-EBV-L, we highlight the correlates of latent EBV infection on the level of changes in GEP and TME composition. Moreover, within the GZL, two subtypes could be distinguished: 1) Cases resembling PMBCL that were associated with the thymic anatomical location niche ('PMBCL-like GZL') and 2) Cases resembling DLBCL that presented predominantly in non-thymic locations ('DLBCL-like GZL'). PMBCL-like GZL ("thymic-GZL") presented a prominent immune escape phenotype with loss of MHC-I expression in nearly 100% of cases, expression of CD4 inhibitory markers (FOXP3, LAG-3 and PD-1) and high abundance of TAMs.

Our results suggest macrophages as a key element of the GZL ME. Interestingly, the presence of macrophages was associated with a low small B cell content, a feature that is consistent with findings in cHL at both pretreatment and relapse time points²⁰ and has been described to be associated with poor treatment outcome²¹⁻²³. These data synergize with a study by Pittaluga et al²⁴ reporting a stronger macrophage signature in 20 mediastinal-GZL patients compared to PMBCL, but weaker compared to cHL. This TAM-rich cHL-like ME might in part explain the previously reported chemo-refractory phenotype among GZL^{25,26}, even though the prognostic impact of TAMs in other B cell malignancies remains controversial²⁷. Interestingly, the Pittaluga²⁴ study identified a NFkB signature that was stronger in MGZL compared to PMBCL, but it remains an open question if this signature is reflecting mostly tumor cells or macrophage biology or both. Of note, Wilson et al²⁶ reported that among 24 GZL treated with DA-EPOCH-R DC-SIGN, infiltration was associated with inferior outcome. We also found that a higher infiltration of CD163/CD68 cells tended to be associated with worse outcome in our GZL cohort (data not shown), but the heterogeneity of treatment has to be

considered as a major confounder here. Recently, a macrophage immune checkpoint inhibitor blocking CD47²⁸ has shown promising activity in NHL when combined with rituximab, further emphasizing the importance of this finding for GZL.

A key feature revealed by our analysis is the presence of associations with a thymic or anterior mediastinal involvement, as reported in PMBCL or nodular-sclerosis cHL. The younger age of patients with mediastinal involvement was previously reported by others²⁹, but the detailed characterization of the distinct clinical presentation shown here adds further support towards a distinction from non-thymic cases. Moreover, the DEA analysis revealed distinct phenotypic differences between thymic and non-thymic GZL, reminiscent of a previously described PMBCL *versus* DLBCL dichotomization^{5,18}. This suggests a potentially distinct cell of origin for these 2 groups of GZL, with implications for differential modes of evolution and acquisition of somatic gene mutations yet to be uncovered. Supporting the DEA, we also found that PD-L1 and PD-L2 protein expression was higher in the thymic cases. This is consistent with data from Eberle et al²⁹ that reported 9p24.1 gain/amplification in 3/8 (38%) of non-mediastinal samples versus 14/23 (61%) of mediastinal samples, which further supports the rationale for PD-1 checkpoint inhibition in this disease³⁰. A similar frequency of 9p alterations was also found in a previous LYSA report³¹, even though no significant distinction between thymic and non-thymic cases was observed (Supplementary Table 7). Finally, the pattern of MHC-I expression across the full cohort was of particular interest. Indeed, all the PMBCL as well as all the thymic-GZL cases presented MHC-I membranous loss of expression, as opposed to only 76% of the EBV^{neg}-cHL and 61% of the non-thymic GZL. We also confirmed the loss of MHC-I membranous expression as a specific PMBCL feature in a larger cohort of 68 cases (97% of loss, data not shown). Frequent loss of MHC-I expression in PMBCL has been previously reported^{32,33}, but not to this extent. The pattern observed in the non-thymic GZL is consistent with the 55% of MHC-I loss reported in DLBCL^{34,35}. One of the underlying mechanisms responsible for this loss of expression includes deleterious *B2M* mutations reported in up to 50% of PMBCL cases^{36,37}, but extrapolation of this mechanism to GZL requires further mutational analysis.

To provide a full spectrum of phenotypic and morphological variation between LBCL- and cHL-like cases, we purposefully included group 3 (CD30+ LBCL) and group 0 (CD20+ HL-like) in our analysis⁸. For group 3, our data suggests removal of these cases from the GZL

spectrum due to strong BCR signaling and the absence of a GZL- specific signature. For the group 0 cases, there is significant inconsistency in the literature and in pathological practice how cases with a cHL morphology and expression of B cell program markers are classified (i.e. GZL or cHL). Indeed in this cohort, half of the group 0 cases were treated with a DLBCL-like regimen including rituximab. This provided the primary rationale to study these cases on the molecular level. In our data, the GZL-like GE signature and TME-features of the group 0 cases, with low number of small B cells and a high TAM infiltrate, imply that they should be defined as part of the GZL spectrum. Additional molecular data and/or confirmatory results in an independent cohort would be of great interest to inform on future GZL classification systems.

Finally, EBV status was a key modulator of GE in this data-set. EBV-specific pathways related to IFN γ , cytotoxic T cells, antigen processing and innate immunity with a greater TAM content, as previously described in EBV^{pos} cHL^{38,39}, were highlighted. Others previously reported a specific TME for EBV-DLBCL versus DLBCL, with an elevated M2 macrophage score as assessed by Nanostring⁴⁰. These EBV-LBCL might benefit from improved therapeutic approaches, such as emerging EBV-specific cellular therapy options^{41,42}.

In conclusion, we provide a comprehensive phenotypic characterization of GZL, highlighting the importance of TME biology and macrophage infiltration in particular. We confirmed and further characterized the existence of two distinct groups of GZL with presumably distinct cells of origin and evolutionary modes. Mutational analysis is warranted to further explore the biological mechanisms leading to these distinct phenotypes.

Acknowledgments:

This study was supported by the Allen Frontiers Group (Allen Distinguished Investigator Award to C. Steidl), the Terry Fox Research Institute (team grant #1061) and the BC Cancer Foundation.

LYSA and the LYSA-Pathology group: Véronique Jalloux, Nadine Vailhen, Aurélie Gaultier, Pauline Desormeaux, Lauriane Brand, Cassandre Houdin. The platform for digital slides of the Institut Mondor de Recherche Biomedical (IMRB) was supported by the ARC foundation and submitted to a validation plan executed by the LYSARC.

The authors thank the lymphopath consortium for sending their samples.

C.S. is supported by the Nuovo Soldati foundation and a fellowships grant from Plan Cancer 2014-2019, soutien 2017 de l'ITMO Cancer pour la formation à la recherche translationnelle en cancérologie 2017 (Allocation ASC17021CSA, projet C17021CS).

C. Steidl is supported by the Michael Smith Foundation for Health Research (Career Investigator Award) and the Canadian Institutes of Health Research (New Investigator Award).

Authorship Contributions:

C.S., L.C, A.T.G and C.St designed and performed the research, analyzed and interpreted data, and wrote the paper.

E.C performed library construction and RNA sequencing.

K.T, T.T, P.F, A.M, A.T.G, C.C.B, D.D: contributed to the pathological review of the cases.

K.T, T.T and P.F stained and scored IHC work.

G.D provided bioinformatic assistance.

C.S., M.B and A.T. performed RNA extractions and helped in samples collection.

C.L, C.C.B., T.M, P.F., G.S, and A.T.G provided the patients samples.

C.S, D.W.S, K.J.S and G.S treated the patients and collected the clinical data.

R.K., A.S.G., D.V., L.H.S., K.J.S., and J.M.C. assembled and interpreted clinical data.

C.St. supervised the study.

References:

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127(20):2375–2390.
2. Rosenquist R, Beà S, Du MQ, Nadel B, Pan-Hammarström Q. Genetic landscape and deregulated pathways in B-cell lymphoid malignancies. *J Intern Med* 2017;282(5):371–394.
3. Rudiger T, Jaffe ES, Delsol G, et al. Workshop report on Hodgkin’s disease and related diseases (“grey zone” lymphoma). *Ann Oncol* 1998;9(suppl 5):S31–S38.
4. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med* 2003;198(6):851–862.
5. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003;102(12):3871–3879.
6. Traverse-Glehen A, Pittaluga S, Gaulard P, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: The missing link between classic Hodgkin’s lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2005;29(11):1411–1421.
7. Nicolae A, Pittaluga S, Abdullah S, et al. EBV-positive large B-cell lymphomas in young patients: A nodal lymphoma with evidence for a tolerogenic immune environment. *Blood* 2015;126(7):863–872.
8. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D, et al. Gray-zone Lymphoma between cHL and Large B-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol*;43(3):.
9. Elsayed AA, Satou A, Eladl AE, Kato S, Nakamura S, Asano N. Grey zone lymphoma with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathological study of 14 Epstein–Barr virus-positive cases. *Histopathology* 2017;70(4):579–594.
10. Elsayed AA, Asano N, Ohshima K, Izutsu K, Kinoshita T, Nakamura S. Prognostic significance of CD20 expression and Epstein-Barr virus (EBV) association in classical Hodgkin lymphoma in Japan: A clinicopathologic study. *Pathol Int* 2014;64(7):336–345.
11. Garcia JF, Mollejo M, Fraga M, et al. Large B-cell lymphoma with Hodgkin’s features. *Histopathology* 2005;47(1):101–110.
12. Gualco G, Natkunam Y, Bacchi CE. The spectrum of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: A description of 10 cases. *Mod Pathol* 2012;25(5):661–674.
13. Pilichowska M, Pittaluga S, Ferry JA, et al. Clinicopathologic consensus study of gray zone lymphoma with features intermediate between DLBCL and classical HL. *Blood Adv* 2017;1(26):2600–2609.
14. Mottok A, Steidl C. Biology of classical Hodgkin lymphoma: Implications for prognosis and novel therapies. *Blood* 2018;131(15):1654–1665.
15. Si M, Lang J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *Journal of Hematology and Oncology* 2018;11(1):107.
16. Emri E, Egervari K, Varvolgyi T, et al. Correlation among metallothionein expression, intratumoural macrophage infiltration and the risk of metastasis in human cutaneous malignant melanoma. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2013;27(3):e320–e327.
17. Youn J. Metallothionein-induced suppression of cytotoxic T lymphocyte function: an

- important immunoregulatory control. *Toxicol Sci* 1999;52(2):199–208.
18. Mottok A, Wright G, Rosenwald A, et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. *2019;132(22):2401–2406.*
 19. Ennishi D, Jiang A, Boyle M, et al. Double-hit gene expression signature defines a distinct subgroup of germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. In: *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2019. p190–201.
 20. Chan FC, Mottok A, Gerrie AS, et al. Prognostic model to predict post-autologous stem-cell transplantation outcomes in classical hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 2017;35(32):3722–3733.
 21. Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin’s Lymphoma. *N Engl J Med* 2010;362(10):875–885.
 22. Koh YW, Park CS, Yoon DH, Suh C, Huh J. CD163 Expression was associated with angiogenesis and shortened survival in patients with uniformly treated classical Hodgkin lymphoma. *PLoS One* 2014;9(1):e87066.
 23. Tan KL, Scott DW, Hong F, et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: A correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood* 2012;120(16):3280–3287.
 24. Pittaluga S, Nicolae A, Wright GW, et al. Gene Expression Profiling of Mediastinal Gray Zone Lymphoma and Its Relationship to Primary Mediastinal B-cell Lymphoma and Classical Hodgkin Lymphoma. *Blood Cancer Discov* [Epub ahead of print].
 25. Sarkozy C, Molina T, Ghesquières H, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: Clinicopathological characteristics and outcomes of 99 patients from the Lymphoma Study Association. *Haematologica* 2017;102(1):150–159.
 26. Wilson WH, Pittaluga S, Nicolae A, et al. CLINICAL TRIALS AND OBSERVATIONS A prospective study of mediastinal gray-zone lymphoma. *Blood* 2014;124(10):1563–1570.
 27. Kridel R, Steidl C, Gascoyne RD. Tumor-Associated macrophages in diffuse large b-cell lymphoma. *Haematologica* 2015;100(2):143–145.
 28. Advani R, Flinn I, Popplewell L, et al. CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin’s Lymphoma. *N Engl J Med* 2018;379(18):1711–1721.
 29. Eberle FC, Salaverria I, Steidl C, et al. Gray zone lymphoma: Chromosomal aberrations with immunophenotypic and clinical correlations. *Mod Pathol* 2011;24(12):1586–1597.
 30. Melani C, Major A, Schowinsky J, et al. PD-1 blockade in mediastinal gray-zone lymphoma. *New England Journal of Medicine* 2017;377(1):89–91.
 31. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D, et al. Gray-zone Lymphoma between cHL and Large B-Cell Lymphoma. *Am J Surg Pathol* 2019;43(3):341–351.
 32. Möller P, Moldenhauer G, Momburg F, et al. Mediastinal lymphoma of clear cell type is a tumor corresponding to terminal steps of B cell differentiation. *Blood* 1987;69(4):1087–95.
 33. Möller P, Lämmler B, Herrmann B, Otto HF, Moldenhauer G, Momburg F. The primary mediastinal clear cell lymphoma of B-cell type has variable defects in MHC antigen expression. *Immunology* 1986;59(3):411–7.
 34. Nijland M, Veenstra RN, Visser L, et al. HLA dependent immune escape mechanisms in B-cell lymphomas: Implications for immune checkpoint inhibitor therapy?

- Oncoimmunology 2017;6(4):e1295202.
35. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, et al. Combined Genetic Inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* 2011;20(6):728–740.
 36. Dubois S, Viailly PJ, Mareschal S, et al. Next-generation sequencing in diffuse large B-cell lymphoma highlights molecular divergence and therapeutic opportunities: A LYSA study. *Clin Cancer Res* 2016;22(12):2919–2928.
 37. Mottok A, Hung SS, Chavez EA, et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2019;134(10):802–813.
 38. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood* 2009;113(12):2765–2775.
 39. Steidl C, Diepstra A, Lee T, et al. Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed-Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012;120(17):3530–3540.
 40. Keane C, Tobin J, Gunawardana J, et al. The tumour microenvironment is immunotolerogenic and a principal determinant of patient outcome in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Eur J Haematol* 2019;103(3):200–207.
 41. McLaughlin LP, Bollard CM, Keller MD. Adoptive T cell therapy for Epstein-Barr virus complications in patients with primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in Immunology* 2018;9(MAR):556.
 42. Shen RR, Pham CD, Wu M, Munson DJ, Aftab BT. CD19 chimeric antigen receptor (CAR) engineered Epstein-Barr virus (EBV) specific T cells – an off-the-shelf, allogeneic CAR T-cell immunotherapy platform. *Cytotherapy* 2019;21(5):S11.

Tables:

Table 1. Clinical characteristics of the Grey Zone Lymphoma spectrum and polymorphic-EBV-large B cell lymphoma cohorts.

Characteristics of the 56 bona-fide-GZL and 27 polymorphic-EBV-L cases are presented. In order to provide a full characterization of the spectrum, the cohort also included 11 group 0 cases (cHL-like morphology with intense and diffuse CD20 expression on all tumor cells) and 18 group 3 cases (large B cell morphology with intense and diffuse CD30 expression on all tumor cells).

Table 2. Gene set enrichment analysis (GSEA) using the 61 genes up-regulated in thymic-bona-fide GZL compared to cHL and PMBCL.

GSEA was performed using the Hallmark and C2 canonical pathway databases.

Figure Legends:

Figure 1. Principal component analysis in the combined cHL, GZL, polymorphic-EBV-L and PMBCL data-set. (A) Schematic summarizing the grey zone lymphoma (GZL) pathological spectrum. Group 0 corresponds to cases with morphology more typical of cHL, but with strong and diffuse CD20 expression on all tumor cells, whereas group 3 is represented by cases with a more typical morphology of LBCL but intense and diffuse CD30 expression. Group 3 samples can present with either PMBCL or DLBCL morphology. Between these two extremes are cases with a more intermediate morphology (labelled as bona-fide-GZL) with an immunophenotype divergent from the morphology. *: group 3 samples with PMBCL morphology can present fibrosis; †: some group 2 cases can present a partial loss of CD20 expression. RS: Reed-Sternberg; H: Hodgkin.

(B) The GZL, polymorphic-EBV-L, cHL and PMBCL cases are shown in principal component space. The x-axis represents PC1 score (explaining 20% of the variance in the dataset) and the y-axis represents PC2 score (17% of the variance). Each point represents a patient, colored based on its pathological classification (cHL, PMBCL, polymorphic-EBV-L (“EBV”) or GZL group 0-3). cHL samples have high PC2 and low PC1 scores, whereas PMBCL samples have high PC1 and low PC2 scores. GZL samples lie in between, supporting the spectrum hypothesis of GZL as a continuum between cHL and PMBCL. The majority of the polymorphic-EBV-L samples can be isolated within PC2. The main biological pathways associated with PC1 and PC2 are described in colored boxes, and the direction of the corresponding arrows reflects positive enrichment of the pathway.

Figure 2. Unsupervised clustering of the cHL, GZL, polymorphic-EBV-L and PMBCL samples based on the main biological pathways. Pathways were identified using GSEA pre-ranked analysis of genes ordered by their correlation with PC1 or PC2 scores. The top 10 genes included in the core-set of the significant pathways were selected. The pathways were grouped into functional categories including cell cycle (high in PMBCL and group 3), epithelial-mesenchymal transition (EMT)/matrisome/extra-cellular matrix (ECM), cellular micro-environment (NK cells, T cells/allograft rejection, IFN), and humoral response. Unsupervised clustering of the samples based on expression of these pathway genes revealed a spectrum

with PMBCL and group 3 at one extreme, and cHL cases mixed with GZL group 0, 1 and 2. The polymorphic-EBV-L cases formed a cluster, and non-thymic cases also clustered together.

Figure 3. Principal component analysis of GZL.

(A) The left plot shows each group 0, bona-fide-GZL and group 3 samples in PC1 vs. PC2 space, reflecting 20% and 11% of the variance, respectively. The middle boxplot shows the distribution of PC1 scores based on GZL group (each point represents a sample). Group 3 cases have significantly distinct PC1 scores, while group 0 do not. Group 1 and 2 GZ cases (bona-fide GZL) also have similar PC1 scores (t-test $p = 0.25$). The right plot shows that BCR pathway genes were strongly negatively correlated with PC1 score, suggesting association with group 3 cases. (B) The left box plot shows PC1 scores based on thymic status within this cohort. In pre-ranked GSEA (middle panel), genes negatively correlated with PC1 score were enriched in the class I antigen presentation pathway, suggesting that non-thymic cases may present a stronger MHC-I presentation machinery compared to thymic cases. Validating the GSEA findings, cases with thymic involvement had significantly lower MHC-I expression (assessed via immunohistochemistry) compared to cases without thymic involvement (97% versus 66% for thymic *versus* non-thymic, respectively; $p=0.0006$, χ^2 test).

Figure 4. Expression of the bona-fide-GZL signature genes. Unsupervised clustering of the thymic bona-fide-GZL (group 1-2), cHL (EBV^{neg} only) and PMBCL cases shows two distinct clusters, with a small number of discordant PMBCL and GZL cases.

Figure 5. Microenvironment composition as assessed by immunohistochemistry staining. (A) Boxplots represent the percentage of nucleated cells that are positive for each given marker (p -values calculated with t-tests). T cell subsets were analyzed using CD3, CD4, CD8, FOXP3, PD1 and LAG-3. Macrophage subsets were identified using CD68 and CD163. (B) Representative images of cHL, thymic bona-fide-GZL (i.e. group 1 and 2 with thymic involvement) and PMBCL tissue stains. All images are at 400X magnification.

Figure 6. Comparison of thymic and non-thymic bona-fide-GZL cases. (A) Unsupervised clustering of the bona-fide-GZL (group 1-2) samples using the 30 genes defined in the Lymph3Cx signature. The 6 DLBCL genes form a distinct cluster, suggesting that the sample clustering may reflect tumor cell biology. The majority of non-thymic GZL cases form a cluster on the right with high DLBCL gene expression. Conversely, the thymic cases show high expression of the PMBCL genes. (B) Enrichment of the 6 DLBCL and 24 PMBCL Lymph3Cx genes was assessed in the GZL cases using GSEA pre-ranked analysis, with genes ordered by the differential-expression score between thymic vs. non-thymic GZL. Thymic cases are enriched in the PMBCL signature (adjusted p-value < 0.0001), while non-thymic cases were enriched in the DLBCL signature (adjusted p-value = 0.05). (C) Main clinical and IHC distinctions between thymic and non-thymic GZL. The H score for PDL1 was dichotomized as high (≥ 150) or low (< 150). The H score for PDL2 was dichotomized as positive (> 0) or negative ($=0$). The MHC-I score was dichotomized as negative, low (cytoplasmic or no expression, or membranous expression in less than 90% of the tumor cells), or high (membranous expression in more than 90% of the tumor cells). (D) Immunohistochemistry of representative bona-fide-GZL thymic and non-thymic tumors for PD-L1, PD-L2 and MHC-I staining.

Table 1:

N=112		GZ-SPECTRUM, N=85			Polymorphic-EBV-L, N=27	
GZ and polymorphic-EBV-L cohorts		Group 0, N=11	Bona fide (Group 1-2), N=56	Group 3, N=18	EBV, N=27	
Centre						
CLC		1 (10%)	7 (13%)	15 (83%)	3 (11%)	
LYSA		10 (90%)	49 (87%)	3 (17%)	24 (89%)	
Median age (range)		26 (14-55)	48 (19-90)	66 (19-79)	53 (16-79)	
>60y		0 (0%)	16 (33%)	12 (18%)	11 (41%)	
Sex:						
F		6 (55%)	30 (54%)	9 (50%)	8 (47%)	
M (/130)		5 (45%)	26 (46%)	9 (50%)	19 (53%)	
Mediastinal involvement		(/10)	(/52)	(/18)	(/26)	
Thymic		8 (80%)	33 (63%)*	3 (17%)	7 (27%)	
Mediastinal non-thymic (Med non-thymic)		0 (0%)	6 (12%)	4 (22%)	8 (31%)	
Non-mediastinal (Non-Med non-thymic)		2 (20%)	13 (25%)	11 (61%)	11 (42%)	
Not available		1	4	0	1	
Path_Group						**not applicable
0		11	-	-	-	
1		-	31	-	-	
2		-	25	-	-	
3		-	-	18	-	
Hemoglobin <12g/dL		4 (36%)	24 (50%)	4 (24%)	12 (57%)	
Bulky (10 cm)		2 (18%)	(/47)	(/18)	(/16)	
Ann Arbor Stage		(/11)	(/51)	(/18)	(/23)	
1-2		5 (45%)	24 (47%)	9 (50%)	8 (35%)	
3-4		6 (55%)	27 (53%)	9 (50%)	15 (65%)	
Cases with extra-nodal inv.		6 (/11, 54%)	23 (/51, 45%)	9 (/18, 50%)	12 (/23, 52%)	
Spleen enlargement		2 (33%)	6 (26%)	0	11 (92%)	
Liver		0	4 (17%)	0	4 (33%)	
Lung		3 (50%)	10 (44%)	1 (11%)	2 (16%)	
Bone marrow		1 (17%)	8 (35%)	3 (33%)	2 (16%)	
LDH >UWL		(/11)	(/45)	(/18)	(/21)	
		3 (27%)	26 (58%)	8 (44%)	10 (48%)	
aaPI		(/11)	(/47)	(/18)	(/22)	
0-1		8 (73%)	28 (60%)	10 (55%)	10 (45%)	
2-3		3 (27%)	19 (40%)	8 (45%)	12 (55%)	

*2 cases with a lung biopsy not included in differential expression analysis

**Groups for polymorphic-EBV-L are not applicable here as these cases are not defined as GZL in the WHO classification

Table 2

Gene Set Name	# Genes in Gene Set (K)	Description	# Genes in Overlap (k)	k/K	p-value	FDR q-value
REACTOME_METALLOTHIONEINS_BIND_METALS	11	Metallothioneins bind metals	MT2A, MT1F, MT1G, MTHH, MT1M	0.4545	4.1E-12	9.23E-9
REACTOME_RESPONSE_TO_METAL_IONS	14	Response to metal ions	MT2A, MT1F, MT1G, MTHH, MT1M	0.3571	1.77E-11	1.99E-8
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	200	Genes regulated by NF-kB in response to TNF [GeneID=7124].	IL1B, LIF, PTGS2, CXCL3, FOS, DUSP1, NR4A1, FOSB, NR4A2	0.0450	3.5E-11	2.62E-8
REACTOME_INTERLEUKIN_10_SIGNALING	46	Interleukin-10 signaling	IL1B, LIF, PTGS2, CXCL8, IL1RN	0.1087	1.17E-8	6.56E-6
NABA_MATRISOME	1026	Ensemble of genes encoding extracellular matrix and extracellular matrix-associated proteins	IL1B, LIF, CXCL3, CXCL8, IL1RN, THPO, HPX, MMP13, ADAMTS18, HYAL4, ASPN, EYS12	0.0117	7.15E-8	3.22E-5
PID_AP1_PATHWAY	70	AP-1 transcription factor network	FOS, FOSB, MT2A, DUSP1, CXCL8	0.0714	1.00E-07	3.75E-5
NABA_MATRISOME_ASSOCIATED	751	Ensemble of genes encoding ECM-associated proteins including ECM-affiliated proteins, ECM regulators and secreted factors	IL1B, LIF, CXCL3, CXCL8, IL1RN, THPO, HPX, MMP13, ADAMTS18, HYAL4	0.0133	3.07E-7	9.87E-5
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	200	Genes defining inflammatory response.	IL1B, LIF, CXCL8, MET, KCNJ2, FFAR2	0.0300	8.53E-7	2.4E-4
REACTOME_INTERLEUKIN_4_AND_INTERLEUKIN_13_SIGNALING	111	Interleukin-4 and Interleukin-13 signaling	IL1B, LIF, PTGS2, FOS, CXCL8	0.0450	1.01E-6	2.52E-4
REACTOME_CELLULAR_RESPONSES_TO_EXTERNAL_STIMULI	535	Cellular responses to external stimuli	MT2A, MT1F, MT1G, MTHH, MT1M, FOS, CXCL8, HSPA6	0.0150	2.22E-6	4.99E-4

Figure 1A:

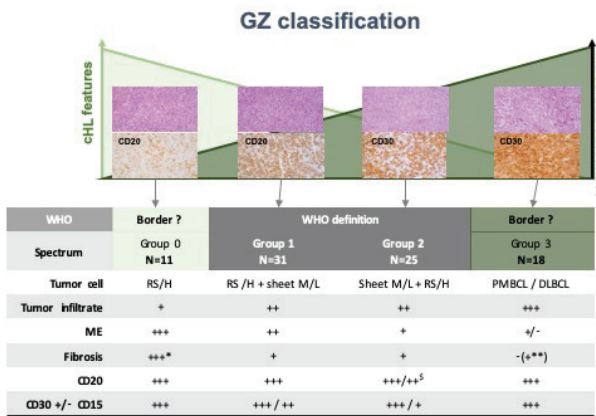


Figure 1B:

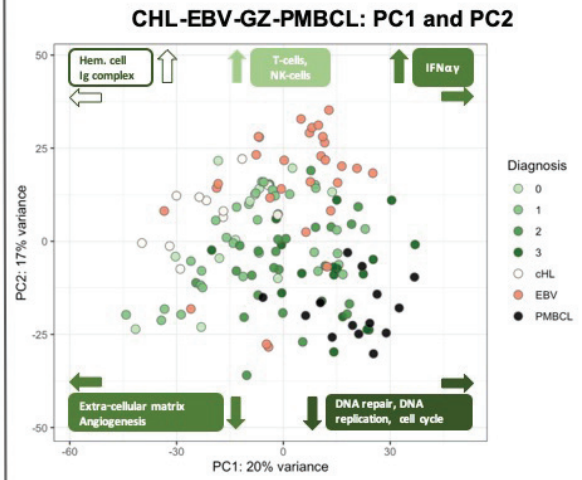


Figure 2

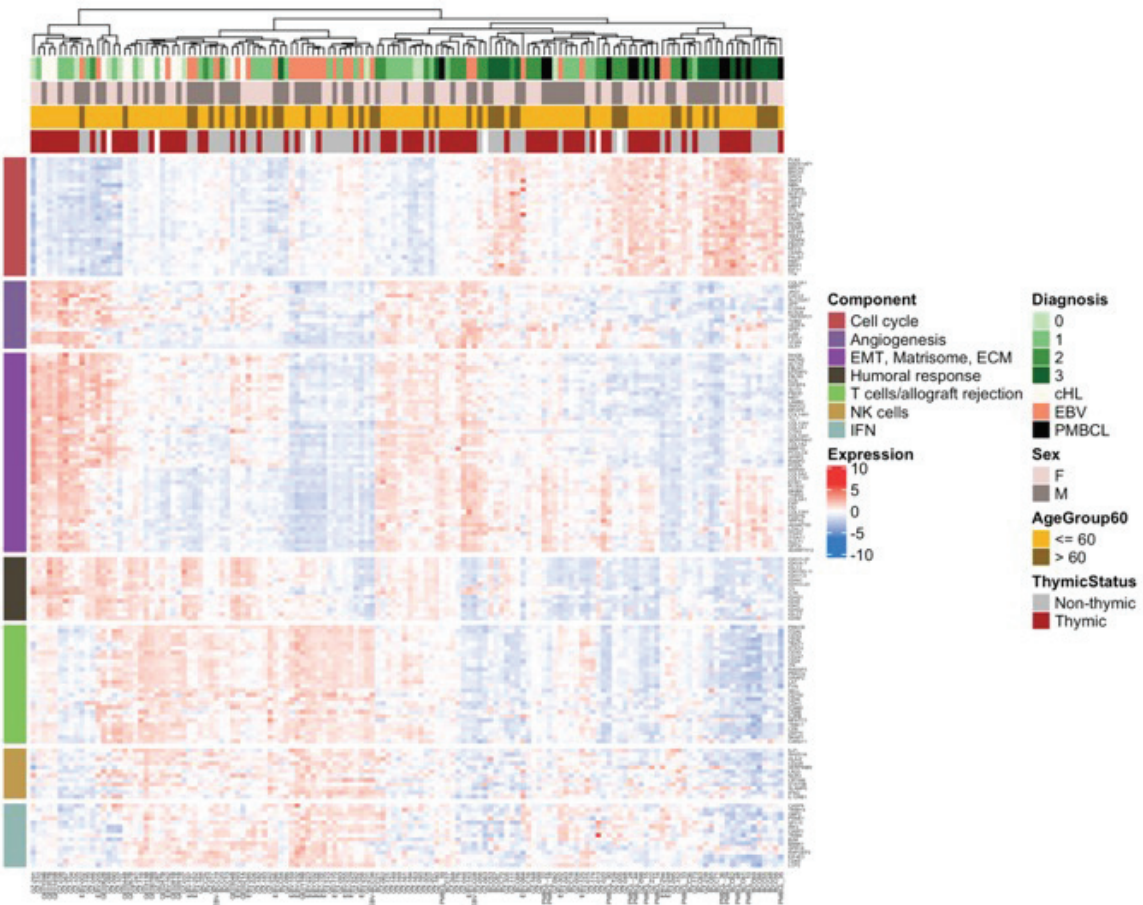


Figure 3A

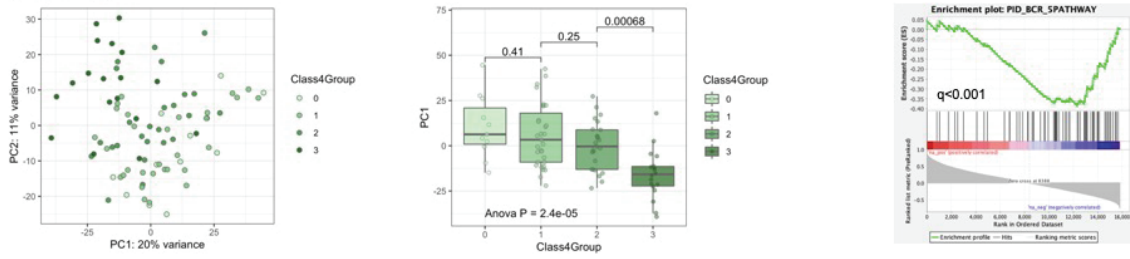


Figure 3B

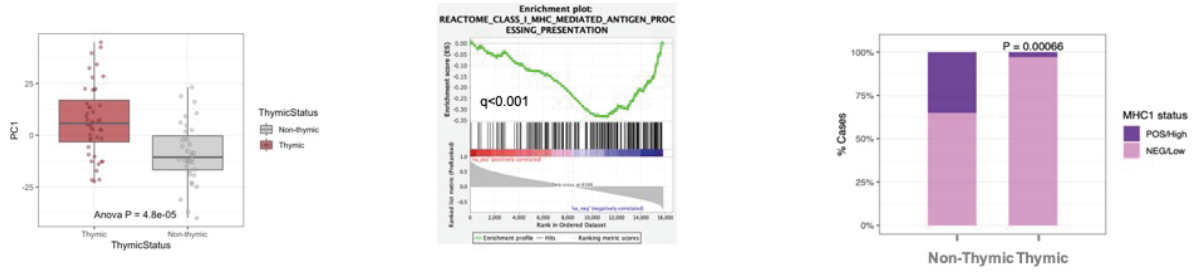


Figure 4

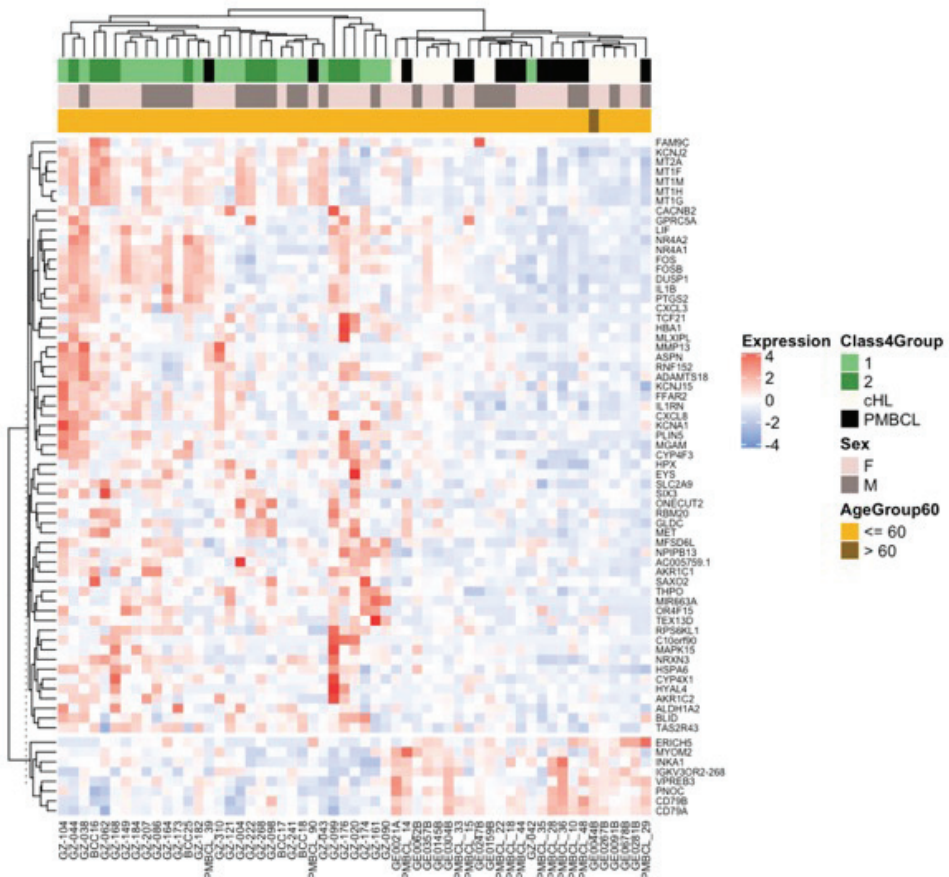


Figure 5A

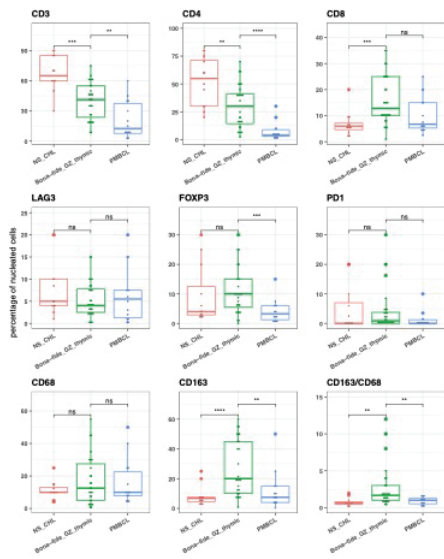


Figure 5B

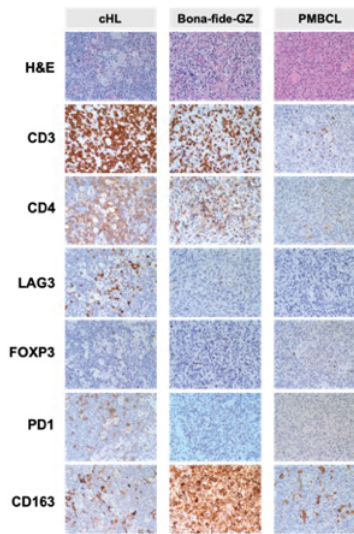
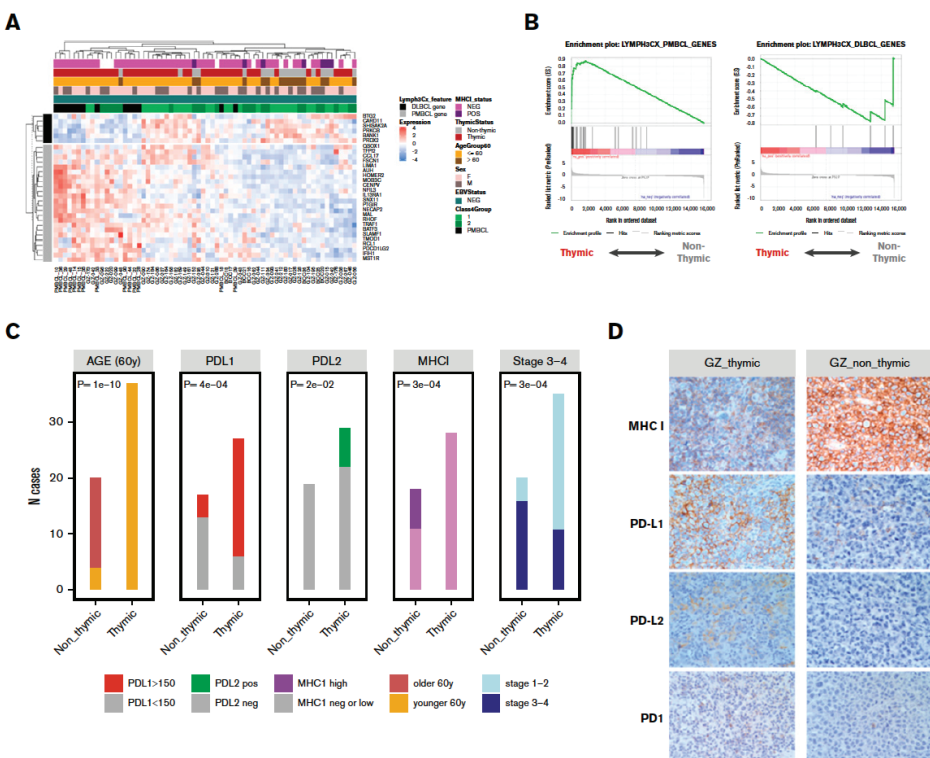


Figure 6



Molecular characterization of the GZL spectrum by GEP: **supplementary file**

I. Supplementary Methods

- *Cohort construction*

Grey zone lymphoma (GZL) and EBV-positive LBCL with polymorphic morphology (polymorphic-EBV-L) cases came from the LYSA and the Centre for Lymphoid Cancer (CLC; BC Cancer, Canada) and have been all reviewed by an international panel of experts in hematopathology. Latent EBV-infection of the malignant cells was evaluated in all cases by *in situ* hybridization for EBER.

The review process of the LYSA cases has been previously described¹. Briefly, between 2014-2016, after the review of 233 cases, 107 cases (19 Group 0, 79 bona-fide-GZL [group 1 and 2], and 9 Group 3) were included as part of the GZL spectrum and 32 cases were classified as polymorphic-EBV-L as reported in Sarkozy et al¹. Among these 139 reported cases, FFPE samples were available for 84 cases that were finally included in the gene expression profiling study (62 GZL-spectrum and 22 EBV polymorphic). In 2017, 79 new cases were reviewed, of which 17 were included, leading to a total of 101 LYSA cases: 71 GZL (13 Group 0, 54 bona-fide-GZL, 4 Group 3) and 30 polymorphic-EBV-L (Supplementary Figure 1).

GZL from the CLC (N=38) were extracted from the local database and reviewed during an international meeting in August 2018 with 3 hematopathologists from the CLC (GS, KT, TT), 1 pathologist (ATG) and 1 hematologist (CS) from the LYSA. Out of the 38 cases, 16 were included as GZL, of which 12 had a specimen that could be retrieved from the CLC tissue archives or referring hospitals (see flow chart for exclusion criteria). Among these 12 cases (9 bona-fide-GZL and 3 group 0), 3 were EBV positive and then labelled as polymorphic-EBV-L. Additionally, CD30 staining was performed on in-house CLC tissue microarrays (TMAs) of PMBCL and DLBCL (N=782 cases). Among the 782 PMBCL/DLBCL cases analyzed, 17 (2%) had CD30 expression on 100% of tumor cells and were included as Group 3 GZL, as previously described¹.

Among the 130 GZL, 6 samples failed RNA extraction (RNA amount < 50 ng), 3 failed library construction and 9 did not pass QC thresholds for RNA-seq analysis (see additional methods bellow), leading to a final cohort of 112 cases (see additional methods below).

Fourteen PMBCL cases, all reviewed by expert-hematopathologists and previously reported², were included in the study and submitted to RNA sequencing. These cases were selected

based on the availability of RNA extracted from FFPE samples, previous R-CHOP treatment and the presence of consensual clinical, morphological and molecular PMBCL features, as previously published³. As well, 16 cases of classic Hodgkin lymphoma (cHL) were selected based on the availability of RNA extracted from FFPE samples, and a central expert pathological review. Two cHL cases failed library construction and/or RNA sequencing. This study was conducted with the approval from institutional boards according to the declaration of Helsinki (LYSA: 2017-006B, BCCRC: H18-01460).

- *TMA (tissue micro-array) construction and antibodies information*

The same cohort of GZL and polymorphic-EBV-L was used for both TMA construction and RNA-seq analysis. TMAs were constructed using standard techniques, containing three (1mm) cores per case. In total, 71 and 18 of the GZL and polymorphic-EBV-L cases could be placed on a TMA. Whole tissue sections were available for 15 GZ and 6 polymorphic-EBV-L samples. The cohort of 14 PMBCL cases was used for both TMA and RNA-seq analyses (see Supplementary table 1 for clinical and biological characteristics).

For cHL, a distinct cohort of 22 cases was used for TMA construction (see supplementary table 1 for clinical and biological characteristics).

Antibodies used to assess the tumor microenvironment (TME) composition are presented in the table below.

Antigen	Antibody clone	Manufacturer
CD3	2GV6	Ventana
CD4	SP35	Ventana
CD8	C8/144B	Sigma
LAG3	D2G40	Cell Signaling Technology
FOXP3	236A/E7	Abcam
PD1	MRQ-22	Cell Marque
CD68	KP1	Dako
CD163	10D6	Novocastra
HLA-ABC	EMR8-5	Abcam
HLA-DP/DQ/DR	CR3/43	Dako
PD-L1	SP142	Abcam
PD-L2	D7U8C	Cell Signaling Technology

For MHC-I and -II scoring, moderate to strong membranous staining of 90% or more of positive cells was considered as positive, and less than 90% of positive cells, cytoplasmic

staining or weakly positive cases were considered as negative. For PD-L1 and PD-L2 expression, a histoscore (H; range 0-300) was calculated by multiplying the percentage of positive tumor cells with staining intensity (score 1-3).

- *Library construction*

The quality of the input RNA was assessed by running the RNA samples on an Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Nano Chip to determine the RNA Integrity Number (RIN). All samples were rRNA depleted with the Human NEBNext rRNA Depletion kit and libraries were generated by using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina. All procedures were performed according to the manufacturer's protocol with the exception that all samples were fragmented for 7 minutes regardless of RIN. Indexed libraries from 16 cases were pooled and sequenced on the Illumina NextSeq 550 using 75-bp paired-end reads.

- *RNA sequencing*

The proportion of usable bases was used to identify poor quality samples, defined as those with a value less than 2 median absolute deviations below the median. The samples excluded using this threshold included 7 GZL, 2 polymorphic-EBV-L and 1 cHL (GZ-045, GZ-092, GZ-178, GZ-181, EBV-194, GZ-230, EBV-254, GZ-274, GZ-299, GE0013A).

- *Nanostring DLBCL90 assay*

The DLBCL90 assay was used to assign PMCBCL vs DLBCL status as previously reported^{3,4}.

- *Outcome analysis*

Time to progression (TTP) was calculated from the date of diagnosis to the date of progression, a change of therapy that was not initially scheduled and due to lymphoma progression (radiotherapy, high-dose therapy with autologous stem cell transplantation and other unplanned treatments), or death from any cause. Disease specific survival (DSS) was calculated from date of diagnosis to date of death related to lymphoma. Statistical analysis was performed with SAS software. Categorical variables were summarized using frequencies and percentages and compared using the chi-square test.

Given the heterogeneity of the treatment, outcome correlates were analyzed for the population of patients homogeneously treated with either R-CHOP or ABVD regimens (60/105, 57%).

- *References*

1. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D, et al. Gray-zone Lymphoma between cHL

- and Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2019;43(3):.
2. Mottok A, Hung SS, Chavez EA, et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 2019;134(10):802–813.
 3. Mottok A, Wright G, Rosenwald A, et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. 2019;132(22):2401–2406.
 4. Ennishi D, Jiang A, Boyle M, et al. Double-hit gene expression signature defines a distinct subgroup of germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 2019;37(3):190–201.
 5. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D, et al. Gray-zone Lymphoma between cHL and Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2019;43(3):341–351.

II. Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Clinical characteristics of cHL and PMBCL cohort.

Characteristics	PMBCL, N=14	cHL RNA-seq, N=16*	cHL TMA, N=22
Centre	BCCRC	BCCRC	BCCRC
Median Age (range)	37 (25-45)	28.5 (17-67)	37 (20-75)
>=60y	0	2	4
Sex: F/M	9 (64%)	8 (50%)	6 (27%)
Histology classification			
Nodular sclerosis	NA	14 (88%)	12
Mixed cellularity	NA	2	9
Lymphocyte-rich	NA	0	1
EBV (yes/no)	0	3 (19%)	5 (23%)
Mediastinal involvement			
Thymic	14 (100%)	12 (75%)	8
Mediastinal, non-thymic	0	0	0
Non-mediastinal	0	4	13
Ann Arbor Stage			
1-2	11 (79%)	9 (56%)	12 (57%)
3-4	3 (21%)	7 (44%)	9 (43%)
B symptoms	9 (64%)	5 (31%)	7 (33%)
Bulky (>10cm)	11 (79%)	0 (0%)	

cHL: classic Hodgkin lymphoma; PMBCL: primary mediastinal B cell lymphoma

*2 cHL cases failed RNAseq QC metrics (2 EBV^{pos} cHL) and are not presented here.

Supplementary Table 2. Outcome for GZL, polymorphic-EBV-L, cHL and PMBCL patients treated with R-CHOP or ABVD. To provide a comparison with cHL and PMBCL treated with ABVD and RCHOP respectively, we included in this table only bona-fide-GZL, group 0, group 3 and polymorphic-EBV-L treated with either ABVD or R-CHOP.

Pathology	N	2-year TTP	2-year DSS
cHL	30	82% (68-98%)	100% (100-100%)
Group 0	2*	NA	NA
Bona-fide-GZL (Group 1-2)	34	60% (45-80%)	70% (58-90%)
Group 3	18	94% (84-100%)	94% (84-100%)
PMBCL	14	86% (69-100%)	93% (80-100%)
Polymorphic-EBV-L	20	67% (48-93%)	80% (60-100%)

cHL: classic Hodgkin lymphoma ; PMBCL: primary mediastinal B cell lymphoma ; GZL: grey zone lymphoma ; R-CHOP: rituximab, cyclophosphamide, oncovin, adriamycin, prednisone ; ABVD: adriamycin, bleomycin, vinblastin, dacarbazine; TTP: time to progression ; DSS: disease specific survival.

*Among group 0 cases, 9 were mainly treated intensively with R-ACVBP/R-COPADEM or escBEACOPP regimens and are not included here.

Supplementary Table 3. Gene set enrichment analysis using principal component score.

See Excel file “sum_GSEA_ALL.xls”.

Supplementary Table 4. Clinical characteristics of thymic and non-thymic bona-fide-GZL cases.

Characteristics	Thymic, N=33	Non-Thymic, N=19	Chi2, p-value
Median age (range)	39y (19-60)	68y (44-87)	<0.001
Sex: F/M (/130)	19/14	12/7	0.8
GZL classification			
1	21 (64%)	9 (47%)	0.25
2	12 (36%)	10 (53%)	
EBV (yes/no)	0	0	-
Mediastinal involvement			
Thymic	33	0	-
Mediastinal, non-thymic (MNT)	0	6	
Non-mediastinal	0	13	
Bulky (10 cm)	12 (43%)	4 (21%)	0.1
Ann Arbor Stage			
1-2	20 (65%)	3 (16%)	<0.001
3-4	11 (35%)	16 (84%)	
Extra-nodal site			0.05
No	23	8	
Yes :	10* (30%)	11 (58%)	
- Spleen	1 (10%)	5 (45%)	
- Liver	2 (20%)	1 (10%)	
- Lung isolated*	5 (50%)	2 (18%)	
LDH >UNL	14 (52%)	13 (68%)	0.15
aaPI			
0-1	20 (71%)	7 (37%)	0.028
2-3	8 (29%)	11 (63%)	

*Extra-nodal site was lung only in 50% of thymic cases *versus* 18% of non-thymic cases.

Supplementary Table 5. Clinical characteristics of polymorphic-EBV-L versus GZL.

Characteristics	Polymorphic-EBV-L (N=27)	GZL (N=67)	p.val (Chi2)
Centre			0.9
CLC	3 (11%)	8 (12%)	
LYSA	24 (89%)	59 (88%)	
Median Age (range)	53 (16-79)	46 (14-90)	0.1
>=60y	11 (41%)	16 (24%)	
Sex (/112)			0.03
F	8 (30%)	36 (54%)	
M	19 (70%)	31 (46%)	
Path_Group (/112)			<0.001
0*	18 (67%)	11 (16%)	
1	4 (15%)	31 (46%)	
2	5 (18%)	25 (38%)	
Mediastinal involvement	(/26)	(/62)	0.09
Mediastinal	15 (58%)	47 (76%)	
Anterior (Thymic)	7 (27%)	41 (66%)	0.0007
Non-Anterior	8 (31%)	6 (10%)	
Non-mediastinum	11 (42%)	15 (24%)	
Ann Arbor_Stage 3-4	(/21)	(/62)	0.49
1-2	8 (38%)	29 (47%)	
3-4	13 (62%)	33 (53%)	
Hemoglobin	(/22)	(/59)	0.57
<12g/dL	12 (55%)	28 (47%)	
LDH	(/21)	(/56)	0.74
>UNL	10 (45%)	29 (52%)	
aaIPI	(/22)	(/58)	0.18
0-1	10 (45%)	36 (62%)	
2-3	12 (55%)	22 (38%)	
Bulky	(/16)	(/58)	0.13
>10cm	2 (12%)	18 (31%)	

*Bona-fide-GZL and group 0 were included in this comparison.

Supplementary Table 6. Gene set enrichment analysis (Excel file:

“gsea_report_Hallmark_EBV.xls”) for differential expression between grey-zone lymphoma (group 0-1-2) and polymorphic-EBV-LBCL.

Supplementary Table 7. Genomic aberrations of the 9p24 JAK2/PDL12 locus

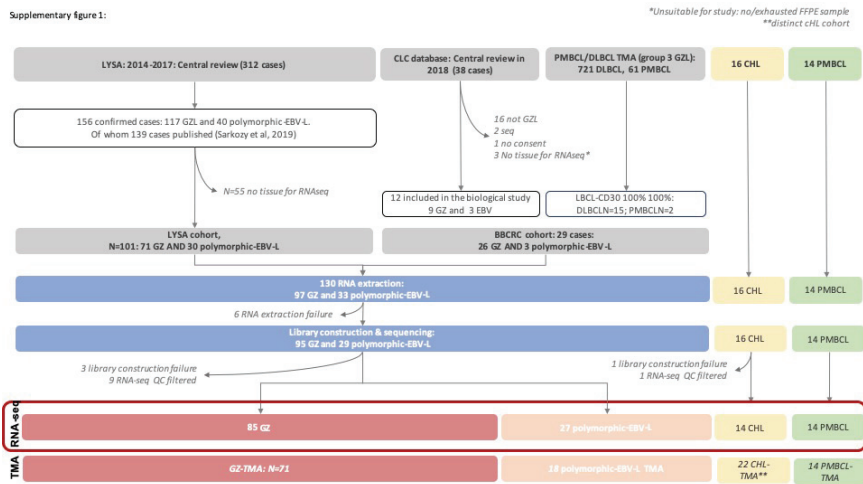
Cohort	Bona-fide GZ*, N=56	Bona-fide - thymic, N=33	Bona-fide -non thymic, N=19	Group 0, N=11
<i>JAK2-PDL12</i> CN	/47	/27	/19	/10
Gain	14 (30%)	9 (33%)	4 (21%)	3 (30%)
Amp	15 (32%)	8 (30%)	7 (37%)	3 (30%)
all	29 (62%)	17 (63%)	11 (58%)	6 (60%)
<i>JAK2-PDL12</i> BA	/47	/27	/19	/10
	9 (19%)	6 (22%)	3 (16%)	1 (10%)
<i>JAK2-PDL12</i> all	/47	/27	/19	/10
	32 (68%)	18 (67%)	13 (68%)	6 (60%)

*4 cases do not have thymic status
See ref⁵ for methods

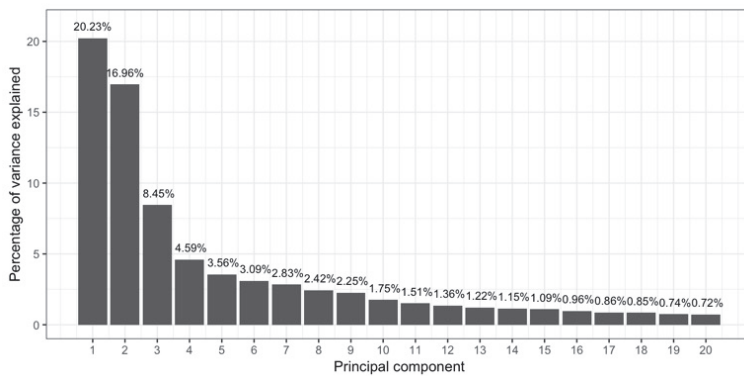
Additional Supplementary Files: available upon request: csarkozy@bccrc.ca

1. merged_DESeq2_results: merged differential expression (DE) results between (1) GZL vs cHL, (2) GZL vs PMBCL, and (3) cHL vs PMBCL
2. thymic_vs_non_DESeq2_results: DE between thymic vs. non-thymic Bona-Fide-GZL cases
3. EBV_pos_vs_neg_Group0_1_2_DESeq2_results: DE between EBV-positive polymorphic DLBCL vs GZL (Group 0 and Bona-fide)
4. Group0_vs_cHL: DE between EBV-positive polymorphic DLBCL vs GZL (Group 0 and Bona-fide)

III. Supplementary Figure

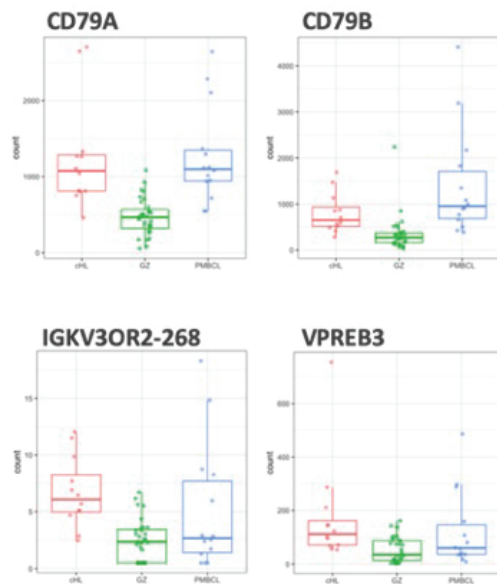


Supplementary Figure 1. Schematic flow chart of cases selected for the study cohort. CLC: Centre for Lymphoid Cancer; QC: quality control; FFPE: formalin-fixed and paraffin-embedded; PMBCL: primary mediastinal B cell lymphoma; DLBCL: diffuse large B cell lymphoma.

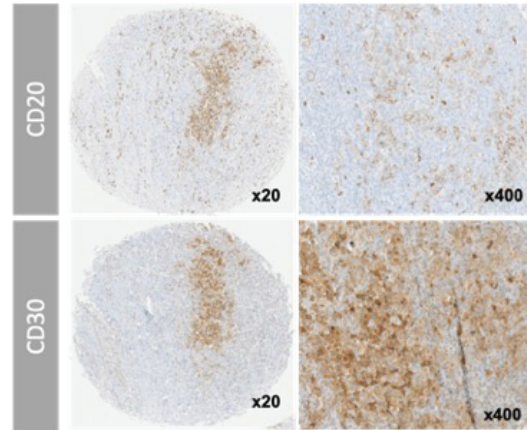


Supplementary Figure 2. Scree plot describing the percentage of variance explained by the first 20 principal components.

Supplementary figure 3A

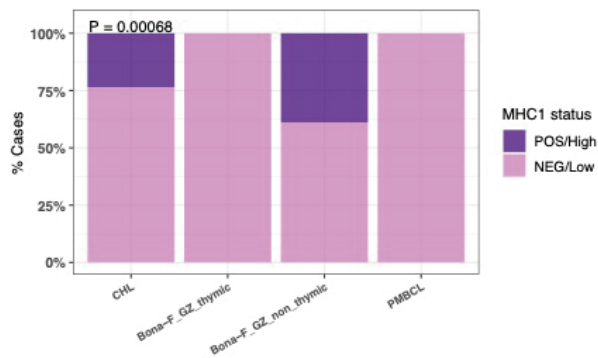


Supplementary figure 3B

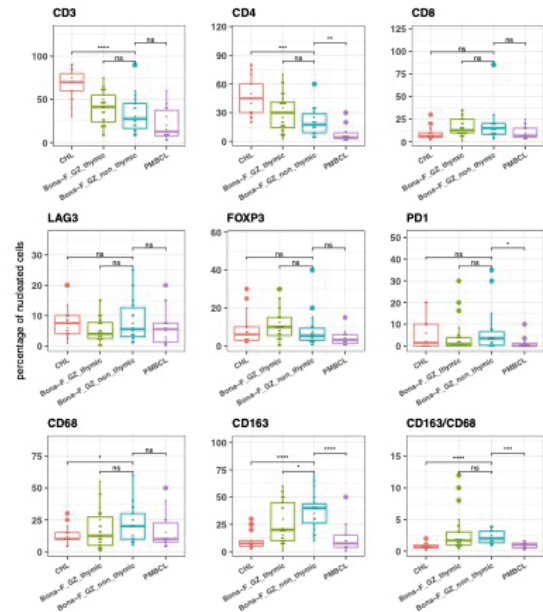


Supplementary Figure 3. Low small B cell content in the tumor micro-environment of bona-fide grey zone lymphoma. (A) GZL cases present a down regulation of specific B cell markers, suggesting smaller B cell content in their TME. Box plots show expression levels (normalized and log-transformed) of CD79A, CD79B, VPREB3 and IGKV3OR2-268 in the RNA-seq data. (B) IHC staining of CD20 for a representative bona-fide-GZL case showing low small B cell content in the TME.

Supplementary Figure 4A



Supplementary Figure 4B

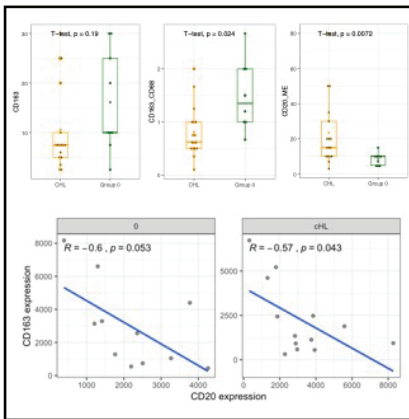


Supplementary Figure 4. TME composition in thymic and non-thymic bona-fide-GZL. (A)

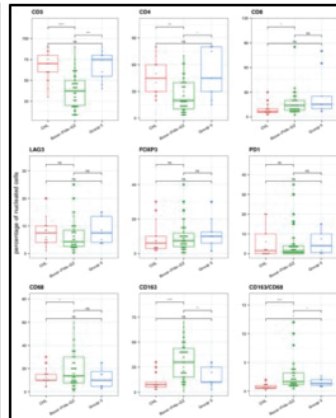
Thymic GZL and PMBCL have a complete loss of MHC-I expression (IHC). cHL: classical Hodgkin lymphoma; Bona-F_GZ_thymic: grey zone group 1-2 (bona-fide-GZL) with a thymic involvement; Bona-F_GZ_non_thymic: grey zone group 1-2 (bona-fide-GZL) without thymic involvement; PMBCL: primary mediastinal B-cell lymphoma.

(B) TME description in thymic bona-fide-GZL, non-thymic bona-fide-GZL, cHL and PMBCL. Non-thymic GZL have intermediate features between cHL and large B cell lymphoma, with an intermediate infiltration by T cells as shown by CD3, CD4 and CD8 staining. They also present a GZL-specific feature of strong macrophage (M2) involvement (CD163).

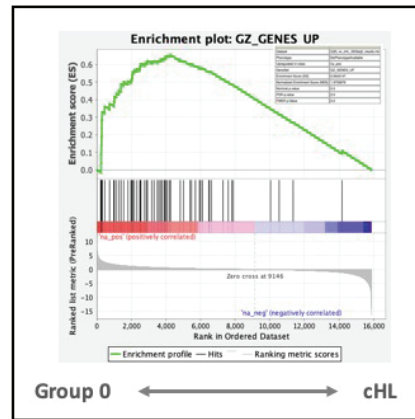
Supplementary Figure 5A:



Supplementary Figure 5B:



Supplementary Figure 5C:



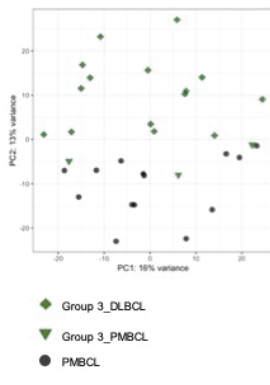
Supplementary Figure 5. Comparison of Group 0 to cHL and bona-fide-GZL (group 1-2)

(A) Small B cell content in group 0 *versus* cHL cases (EBV negative). Group 0 present less small B cell content (scored here as CD20 within the TME) compared to cHL ($p=0.0062$, top right panel). Conversely, group 0 cases have a stronger enrichment in CD163 positive cells, or macrophages (top left and middle panels show CD163 positivity, and the ratio of CD163 positivity to CD68 positivity, respectively). This inverse correlation was confirmed at the patient level using mRNA expression (lower panel, spearman).

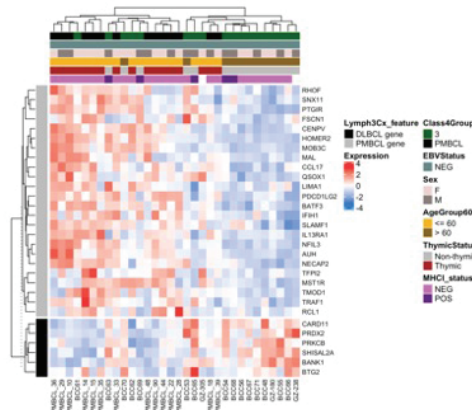
(B) TME in group 0, bona-fide-GZL (group 1-2) and cHL assessed by IHC. This analysis highlights the intermediate nature of the group 0 TME, with the same enrichment in T cells as compared to cHL, but a stronger enrichment in macrophages, further suggesting that group 0 might more closely resemble bona-fide-GZL.

(C) Pre-ranked GSEA based on differential expression score between group 0 and cHL (EBV negative) cases showed that group 0 had a stronger enrichment for the GZL signature genes compared to cHL, suggesting that these cases should be part of the GZL spectrum.

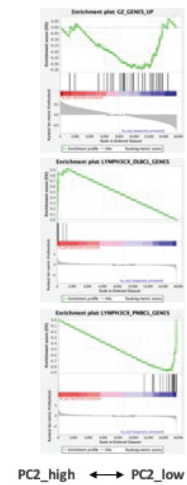
Supplementary Figure 6A:



Supplementary Figure 6B:

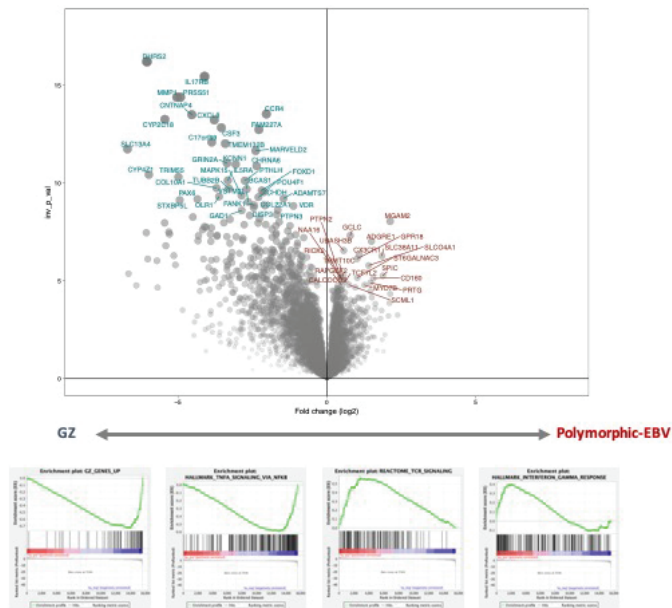


Supplementary Figure 6C:

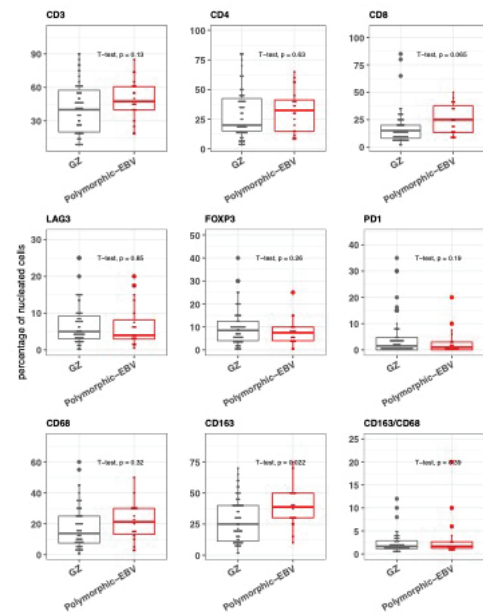


Supplementary Figure 6. Group 3 and PMBCL. (A) Principal component analysis within group 3 and PMBCL. PC2, reflecting 13% of the variance, could discriminate the PMBCL and group 3: group 3 cases had a high PC2 score, and PMBCL a low PC2 score. Interestingly, the group 3 cases with a PMBCL morphology (N=3) were located at the border between class 3 and PMBCL. (B) Unsupervised clustering of the group 3 and PMBCL samples, using expression of the Lymph3Cx gene list (Mottok et al, Blood 2018). The DLBCL and PMBCL genes each clustered together, validating the approach. The cases clustered based on the presence of thymic involvement, with a stronger DLBCL signature for extra-thymic cases and a stronger PMBCL signature for thymic cases. (C) We used the correlation score with PC2 to perform a pre-ranked GSEA with the Lymph3Cx and GZL signature gene lists. The GZL signature was not significantly associated with PC2 score (*i.e.* PMBCL vs group 3). On the contrary, the Lymph3Cx signature genes were significantly correlated with PC2 score: cases with high PC2 score (group 3) had higher expression of the DLBCL signature, as opposed to cases with a low PC2 score which had a stronger PMBCL signature.

Supplementary Figure 7A



Supplementary Figure 7B



Supplementary Figure 7. EBV related molecular and immuno-phenotypic characterization.

(A) Volcano plot summarizing differential expression between grey zone lymphoma (group 0 and bona-fide-GZL) and polymorphic-EBV-L cases. The most significantly up-regulated genes in GZL cases are highlighted in blue, and most up-regulated in polymorphic-EBV-L are highlighted in red. In the lower panel, two representative GSEA signatures are shown: EBV negative cases were enriched in the GZL-specific signature genes, whereas EBV positive cases were enriched in microenvironment-related signatures.

(B) TME composition according to EBV status. EBV positive cases are represented in red, and GZL negative in black.

III. Caractérisation du profil mutationnel : article 3

Mutational Landscape of Grey Zone Lymphoma. Clémentine Sarkozy^{1,2}, Stacy S. Hung¹, Elizabeth A. Chavez¹, Gerben Duns¹, Katsuyoshi Takata¹, Lauren Chong¹, Tomohiro Aoki¹, Aixiang Jiang¹, Tomoko Miyata-Takata¹, Adèle Telenius¹, Graham W. Slack¹, Thierry Molina³, Pedro Farinha¹, Peggy Dartigues⁴, Diane Damotte^{5,6}, Anja Mottok⁷, Olivier Casasnovas⁸, Kerry J. Savage¹, Camille Laurent⁹, David W. Scott¹, Alexandra Traverse-Glehen^{2,10} and Christian Steidl¹

Submitted in *Blood*.

Mutational Landscape of Grey Zone Lymphoma

Clémentine Sarkozy^{1,2}, Stacy S. Hung¹, Elizabeth A. Chavez¹, Gerben Duns¹, Katsuyoshi Takata¹, Lauren Chong¹, Tomohiro Aoki¹, Aixiang Jiang¹, Tomoko Miyata-Takata¹, Adèle Telenius¹, Graham W. Slack¹, Thierry Molina³, Pedro Farinha¹, Peggy Dartigues⁴, Diane Damotte^{5,6}, Anja Mottok⁷, Olivier Casasnovas⁸, Kerry J. Savage¹, Camille Laurent⁹, David W. Scott¹, Alexandra Traverse-Glehen^{2,10} and Christian Steidl¹

¹Centre for Lymphoid Cancer, British Columbia Cancer, Vancouver, BC, Canada. ²INSERM Unité Mixte de Recherche (UMR)-S1052, Centre National de la Recherche UMR 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France. ³Pathology Department, Necker Enfants Malades Hospital, Université Paris Descartes, APHP, Paris, France. ⁴Pathology Department, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, INSERM U1170, Villejuif, France. ⁵Pathology Department, Groupe Hospitalier Cochin, APHP, Paris, France. ⁶Paris Descartes University-Sorbonne Paris Cité, Paris, France. ⁷Institute of Human Genetics, Ulm University and Ulm University Medical Center, Ulm, Germany. ⁸Department of Hematology, François Mitterrand University Hospital, INSERM U1231, Dijon, France. ⁹Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse, CHU Toulouse, INSERM U.1037, Centre de Recherche en Cancerologie de Toulouse-Purpan, France. ¹⁰Hospices Civils de LYON, Centre Hospitalier Lyon-Sud, , Département de pathologie, Pierre Bénite Cedex, France

Main text word count: 3985

Abstract: 225

Figure: 6

Table: 1

References: 46

Key words:

Grey zone lymphoma, EBV-polymorphic DLBCL, mutations

Key messages:

1- The mutational landscape of GZL in the thymic niche resembles that of EBV-negative cHL and PMBCL, suggesting a shared cell of origin.

2- GZL occurring outside of the thymic niche have a distinct mutational profile with a subset of cases carrying *TP53* mutations.

Abstract (225):

The mutational landscape of grey zone lymphoma (GZL) has not yet been established and differences to related entities are largely unknown. Here, we studied coding sequence mutations of 50 EBV-negative GZL and 20 polymorphic EBV-positive DLBCL NOS (poly-EBV-L) in comparison to classical Hodgkin lymphoma (cHL), primary mediastinal large B cell lymphoma (PMBCL), and diffuse large B cell lymphoma (DLBCL). Exomes of 21 GZL and 7 poly-EBV-L cases along with paired normals were analyzed as a discovery cohort followed by targeted sequencing of 217 genes in an extension cohort of 29 GZL and 13 poly-EBV-L cases. GZL cases with thymic niche involvement (anterior mediastinal mass) displayed a mutation profile closely resembling cHL and PMBCL, with *SOCS1* (45%), *B2M* (45%), *TNFAIP3* (35%), *GNA13* (35%) and *NFKBIA* (29%) being the most recurrently mutated genes. In contrast, GZL cases without thymic niche involvement (N=18) had a significantly distinct pattern, enriched in mutations related to apoptosis defects (*TP53* (39%), *BCL2* (28%), *BIRC6* (22%)) and depleted in *GNA13*, *XPO1* or NFKB signaling pathway mutations (*TNFAIP3*, *NFKBIE*, *IKBKB*, *NFKBIA*). Poly-EBV-L cases presented a distinct mutational profile including *STAT3* and *PRKDC* mutations and a significantly lower coding-mutation load in comparison to EBV-negative GZL. Our study highlights characteristic mutational patterns in GZL associated with presentation in the thymic niche suggesting a common cell of origin with disease evolution overlapping with related anterior mediastinal lymphomas.

Introduction

Grey zone lymphoma (GZL) is a rare entity defined as B-cell lymphoma with features intermediate between large B-cell lymphoma (LBCL) and classical Hodgkin lymphoma (cHL). Even though pathological features have been extensively characterized¹⁻³, only a limited number of studies on molecular characteristics have been published to date in comparison to the related entities of GZL. Indeed, several groups^{1,4-7} have reported on the incidence of specific chromosomal aberrations such as 9p24 gain/amplification (gain/amp) or rearrangement, 16p rearrangement and 2p16 gain/amp. A large-scale DNA methylation analysis⁸ described a distinct epigenetic profile intermediate between cHL and PMBCL that was different from diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). Recently, using gene expression analysis (GEA), we and others^{9,10} (reported on the predominance of macrophages in the tumor microenvironment (TME) of GZL. Furthermore, it was confirmed that GZLs could be dichotomized into two molecular subtypes (namely “PMBCL-like” and “DLBCL-like” GZL) that strongly associated with the presence or absence of anterior mediastinal - thymic niche involvement^{4,10}. Moreover, cases with cHL-like morphology and preserved expression of B cell markers had a GE signature and microenvironment (ME) features that favored their inclusion in the GZL spectrum¹⁰. However, to complete the molecular characterization of GZL, a detailed analysis of its mutational landscape and correlation with cHL, PMBCL and DLBCL is warranted.

The polymorphic subtype of EBV-positive DLBCL NOS (poly-EBV-L) presents histological features overlapping with cHL and GZL^{3,11,12}, with a rich background of reactive immune cells and sheets of Hodgkin-like tumor cells expressing B cell markers. However, our recent study showed that poly-EBV-L can be clearly distinguished from EBV-negative GZL by GEA highlighting similar distinctions seen in other B cell lymphomas based on latent EBV infection status (i.e. a specific tumor microenvironment and IFN γ signature^{13,14}). As with GZL, the mutational landscape of poly-EBV-L has not been described, while only some mutational data on monomorphic EBV-positive DLBCL cases is available^{15,16}.

In order to complete the molecular characterization of GZL and poly-EBV-L, we performed exome sequencing analysis followed by targeted sequencing of an extension cohort to compare with the related entities cHL, PMBCL and DLBCL. Within GZL cases, we highlight a distinct mutational profile based on the presence of thymic involvement, with a

landscape closely resembling cHL and PMBCL for thymic cases, and *TP53*, *BCL2*, *CREBBP* mutations enriched in non-thymic cases. Poly-EBV-L cases also revealed a unique mutational profile with correlates to thymic vs non-thymic involvement.

Methods:

Case selection and study flow-chart:

GZL (all EBV-negative) and poly-EBV-L cases were centrally review by a panel of experts as published¹. As previously described, GZL is part of a spectrum from group 0 (cytological appearance suggesting cHL with preservation of the B-cell program on all tumor cells) to “bona-fide” GZL with a more intermediate morphology and discordant phenotype (group 1-2, with a more cHL-like or LBCL-like morphology, respectively) (**Figure 1** and supplementary methods). Among the 109 cases initially identified (76 GZL and 33 poly-EBV-L), fresh-frozen tissue (FFT) was available for 29 cases (22 GZL and 7 poly-EBV-L) submitted for laser-microdissection (LMD) in order to enrich for tumor cells and extract normal DNA for paired exome analysis (“discovery cohort”; for details on LMD and nucleic acid extraction see supplementary methods). Among the 80 samples with available formalin fixed, paraffin embedded (FFPE) tissue initially selected for the extension cohort, 27 were excluded due to low tumor content (<10%) and/or insufficient DNA to perform library construction.

Capture sequencing and bioinformatics analysis:

For discovery (exome) and extension cohorts (target panel), capture-based library construction and Illumina paired-end sequencing was applied. All reads were aligned to the human reference genome (hg19) using bwa-mem¹⁷. Paired variant calling was performed on all tumor-normal or tumor-pooled normal pairs to detect somatic SNVs and indels (< 50bp) using MuTect¹⁸, Strelka¹⁹ and VarScan²⁰. For the extension cohort, a capture panel of 217 genes was used, designed based on the results of the discovery analysis and literature^{21–30} (**supplementary Figure 2**). Eleven cases were excluded due to low coverage (<100X) (figure 1). Copy number alterations were predicted using CNVkit³¹ and analyzed for significance with

GISTIC³². A list of significantly mutated genes was identified using MutSigCV³³ in conjunction with literature data. See supplemental methods for more details.

Statistical analysis:

The incidence of mutations across cohorts was assessed using Fisher's Exact test followed by false discovery rate (FDR) correction. As a comparator, we used the coding-mutation incidence for genes of interest, as reported in a PMBCL cohort (N=94)²² and two cHL publications (EBV-negative samples only: Tiacchi et al; N=30²³ and Reichel et al²⁴; N=9).

Disease specific survival (DSS) and time to progression (TTP) were estimated using Kaplan-Meier curves and compared between groups using log-rank and a multivariate Cox regression model (see supplementary section for details).

Institutional review board was granted (LYSA: 2017-0006B, UBC/BC Cancer: H18-01460) and study was conducted according to the Declaration of Helsinki.

Results:

Clinical characteristics

Across 50 GZL patients with mutation data, median age was 46 years (range 14-90), sex ratio (F/M) was 1, 63% (N=31) had anterior mediastinal involvement (referred to as "thymic"), and 48% had advanced stage (stage 3 or 4) disease. Eight cases were classified as group 0, and 42 cases as bona-fide GZL (19 group 1 and 23 group 2). Patients with thymic GZL were younger and had more frequently localized, bulky disease (**supplementary Table 2**) compared to non-thymic cases which occurred more often at extra-nodal sites. Discovery (N=21) and extension cohorts (N=29) had comparable characteristics (**Table 1**) as well as GZL patients with (N=50) and without (N=26) mutation data (**supplementary Table 1**), and there were no differences between included and excluded GZL patients. Within the 20 poly-EBV-L patients, the median

age was slightly higher than GZL (55 years, $p=0.1$), the F/M sex ratio was 0.3, and 5 cases (31%) had thymic involvement (**Table 1**) (significantly less than GZL, $p=0.02$).

Mutational landscape of GZL and poly-EBV-L:

Among the 28 tumor-normal pairs (21 GZL, 7 poly-EBV-L), the mean coverage of tumor DNA was 96X (42-203X) and normal DNA was 76X (13-144X) (**supplementary Figure 3**). A total of 6499 variants were identified, including 3060 coding, 2735 3' UTR and 704 5' UTR variants (**supplementary Figure 4A**), with a mean of 232 (range 28-2080) and 109 (range 15-678) total and coding variants per sample, respectively. The overall mutation load in the exome capture space for the GZL cases was 3 mutations/Mbp which was significantly greater than for poly-EBV-L cases (1.9 mutations/Mbp, $p=0.001$). Concordantly, poly-EBV-L cases had fewer coding variants compared to GZL cases (mean 52 vs. 128, $p=0.03$, coverage 75X vs. 101X, **supplementary Figures 4B and C**). We then applied MutSigCV, a tool to identify significantly mutated genes, which, across GZL and poly-EBV-L cases, revealed 64 candidate oncogene genes ($p < 0.05$; **supplementary Table 3**). To comprehensively describe the mutational landscape of GZL, we defined our targeted sequencing panel to include MutSigCV candidates mutated in two or more cases, genes mutated in three or more exome cases, and genes in the literature²¹⁻³⁰ reported as being potential oncogenes in the related entities of PMBCL, cHL or DLBCL (**supplementary Figure 2**).

The mean coverage of the extension cohort (GZL: N=29; poly-EBV-L: N=13) was 503X (106-1124X). Within the 217 panel genes, the mean number of coding mutations per case was not different between the discovery and extension cohorts (13.3 vs. 11.5, $p=0.54$) (**supplementary Figure 6**). For 10 FFT cases sequenced in both exome and target experiments, 90% of SNV/indel variants were shared, with a linear relation between variant allele frequencies ($p<0.0001$) (**supplementary Figure 5A-B**). Of note, in the extension cohort, two FFPE LMD samples were included (mean coverages of 50X and 76X) with a variant count (N=9 each) comparable to that of FFT samples.

Of the 50 GZL cases, 49 had at least one coding mutation within the 217 panel genes (mean number of mutated genes per case: 10.7 (range 0-36)). The most recurrently mutated

genes were *SOCS1* (40%), *B2M* (32%), *GNA13* (24%), *NFKBIA* (22%), *TNFAIP3* (20%), *LRRN3* (20%), *TP53* (18%) and *ITPKB*, *STAT6*, *NFKBIE*, *XPO1*, *KMT2C* and *SPEN* (16% each) (**Figure 2A**) with similar frequencies across the discovery and extension cohorts (**supplementary Figure 7 and supplementary Table 4**), and no significant differences between cohorts after FDR correction. Interestingly, AID motif signature analysis revealed that, among the 217 genes, *SOCS1* was significantly enriched in mutations affecting the target guanine-cytosine base pair of AICDA recognition sites (RGYW) ($q < 0.001$), suggesting a role for aberrant somatic hypermutation.

We used gene set enrichment analysis (GSEA) (supplementary methods) to gain further insight into the biology behind recurrently mutated genes ($\geq 10\%$). Using exome data, we found overlaps within the IFN γ , NFKB and JAK-STAT pathways. Extending the analysis to the full cohort confirmed these pathways and also highlighted the P53 pathway (**supplementary Table 5**). Mutations within the epigenetic modifiers *KMT2C* (16%, with a hotspot in A1685S), *CREBBP* (as reported in FL³⁴) and *HIST1H1E* (14% each) were also recurrent, affecting 38% of the samples overall; *CREBBP* and *KMT2C* mutations were fully mutually exclusive. In contrast, very few GZL samples carried a mutation within members of the MyTBCR³⁵ pathway: *CARD11* (N=0), *MYD88* (N=1) or *CD79B* (N=1). Within the apoptosis regulation pathway, *TP53* and *BCL2* mutations were significantly co-occurring (**supplementary Figure 8A**), and tended to be mutually exclusive with mutations affecting *TNFAIP3*, *B2M* and *NFKBIA*; this revealed a split in the sample set which, interestingly, seemed to be associated with the presence of thymic niche involvement (**supplementary Figure 8B**).

We next looked at the mutations based on pathological classification. After FDR testing, the mutation landscape was not distinct between bona-fide GZL (N=42, i.e. group 1-2), and group 0 (N=8) (**Figure 2B, supplementary Table 4**). Furthermore, within bona-fide GZL cases, the mutation pattern of those having a more LBCL-like morphology (group 2) was comparable to those with a more cHL-like morphology (group 1) after FDR testing for the most recurrently mutated genes (**Figure 2C**).

Finally, within the 21 GZL exome cases, copy number alterations (CNAs) (**Figure 2D**) were assessed using CNVkit. To identify regions of significant gain or loss, GISTIC was applied and revealed gains consistent with those in cHL and PMBCL including 9p24.1 (*JAK2* and *PDL1*-

2; 84%) which was the most recurrent gain, followed by 5q13.2 (*GTF2H2* and *NAIP*; 76%), and 2p16.1 (*REL* and *BCL11A*; 67%). The most frequent regions of loss affected 7q11.21, 1p36.32, 4p16.3 or 12q24.33 (*NCOR2*).

The thymic niche is an important determinant for gene mutational patterns:

Within the exome cohort, thymic GZL had a greater mutation burden than non-thymic GZL (3.6 mutations/Mbp vs. 1.25 (p=0.03, **Figure 3A**)). Within the full cohort, thymic GZL cases also had significantly more coding mutations (16.4 vs. 8.3, p=0.005) (**Figure 3B**). More importantly, the coding mutational landscape was mostly distinct between thymic and non-thymic cases: *TNFAIP3*, *LRRN3*, *B2M*, *GNA13*, *NFKBIE*, *ITPKB* and *ZNF217* mutations were significantly enriched in thymic cases (referred to as “thymic mutations”), compared to *TP53*, *BCL2* and *CREBBP* in non-thymic cases (**Figure 3C, supplementary Table 4**; results remained significant after FDR testing applied for the most recurrently mutated genes ($\geq 20\%$ within each group, N=14). By contrast, CNAs were not significantly different between thymic (N=15) and non-thymic (N=6) GZL cases (**supplementary Figure 10**), with the caveat of low numbers.

Within non-thymic cases, a split based on the presence of *SOCS1* or *TP53* mutations was observed (**Figure 3D**). Indeed, 7 samples had a *SOCS1*, *STAT6* and/or *B2M* mutation, while 8 others presented apoptosis-defect-related mutations (*TP53*, *BCL2* or *BIRC6*). This split was not related to pathological classification; among the six *SOCS1*-mutated non-thymic cases, two were group 0, one group 1 and three group 2 compared to one group 0, three group 1 and eight group 2 in *SOCS1* WT cases (p=0.4). Interestingly, the six *SOCS1*-mutated non-thymic cases were depleted in the co-occurring mutations found in *SOCS1*-mutated thymic-GZL (*TNFAIP3*, *ITPKB* or *NFKBIA/E*), whereas half carried *CREBBP* mutations.

Comparison with cHL, PMBCL and DLBCL mutation landscapes:

To further understand the distinctions between thymic and non-thymic GZL, we analyzed correlations with the related entities of PMBCL²² and cHL^{23,24} (**Figure 4A**). As shown in **Figure 4B-C**, the pattern of mutations observed in thymic GZL was very similar to cHL and PMBCL, without any significant differences after FDR testing for the most recurrently mutated genes ($\geq 20\%$ within each cohort). However, a few distinctions could be noticed: (1) the incidence of

NFKBIA mutations (non-sense/frame-shift) within thymic GZL (29%) was higher compared to both cHL (2.5%, $p=0.003$) and PMBCL (12%, $p=0.04$) and (2) *NBPF6* mutations were found in 13% of GZL cases (MutSigCV gene ($p=0.0008$)), but were not reported in cHL or PMBCL. On the other hand, mutations in *IL4R*, a gene recurrently mutated in PMBCL³⁶ and not in cHL, were significantly lower in thymic GZL (4% vs. 32% in PMBCL, $p=0.0007$).

Amongst non-thymic cases (N=18), *BCL2* and *TP53* mutations were found to be significantly enriched (28%, 39% respectively) compared to PMBCL (2%, 9.5%, and $p=0.001$, 0.004 respectively, **Figure 4E**) and cHL (0%, 10% and $p = 0.002$, 0.03 respectively, **Figure 4D**) after FDR adjustment. Finally, the most recurrently mutated genes within non-thymic GZL, such as *SOCS1* (33%), *CREBBP* (28%), *BCL2* (28%) and *STAT6* (16%), are commonly found in the germinal centre B-cell-like subtype of DLBCL (**supplementary Figure 10A-B & supplementary Table 4**).

A gene expression phenotype reminiscent of PMBCL is associated with “thymic mutations”:

To further examine the molecular phenotype of GZL at the expression level, 37 of the 42 bona-fide GZL (i.e. group 1-2) cases in this sequencing cohort along with 14 PMBCL cases were analyzed using RNAseq as previously reported¹⁰. PMBCL and DLBCL signature scores for each sample were calculated by taking the mean expression (normalized and log-transformed) of the corresponding Lymph3Cx signature genes³⁷. Thymic cases (GZL and PMBCL) had significantly greater expression of the PMBCL-gene signature ($p=1.5e^{-5}$) compared to non-thymic GZL cases and vice-versa for the DLBCL-gene signature ($p=0.007$). Importantly, the presence of some “thymic mutations” described in our analysis above (figure 3C, *TNFAIP3*, *B2M*, *GNA13*, or *NFKBIE*) correlated to a high PMBCL score and a low DLBCL score (**Figure 5, supplementary figure 11A&B**).

Comparison of mutational patterns between poly-EBV-L and GZL:

To explore mutational correlates associated with an EBV-driven pathogenetic mechanism and given the morphological similarity observed between poly-EBV-L and GZL^{1,11}, we contrasted their mutational landscapes. Poly-EBV-L carried fewer potential oncogenes (within our 217

gene panel) compared to GZL cases (mean 10.7 vs. 7.4, $p=0.1$). Some specific genes were more differentially affected (**Figure 6A-B, supplementary Table 4**). Indeed, poly-EBV-L had no *HLA-B* mutations and only one *B2M* start-loss mutation versus 32% of *B2M/HLA-B* the GZL cases. Poly-EBV-L cases were unmutated in *NFKBIA* (vs. 22% in GZL, $p=0.02$), *NFKBIE* (vs 16% in GZL), *TRAF-1,2,3* (vs. 12% in GZL), *ITPKB* (vs. 16% in GZL) or *XPO1* (vs. 16% in GZL). In contrast, *STAT3* (all within the $STAT\alpha$ domain) and *ATP13A4* mutations were found in 15% of poly-EBV-L cases but were unmutated in GZL cases ($p=0.02$ each).

We further explored gene mutation correlates of thymic involvement within poly-EBV-L cases, and found that mutations in *SOCS1* and *GNA13* were present in 60% of the 5 thymic poly-EBV-L cases but absent from the 13 non-thymic poly-EBV-L cases. On the other hand, *STAT3* and *ATP13A4* mutations were present only in non-thymic poly-EBV-L cases (23% each). The presence of *SOCS1* and *GNA13* mutations in thymic poly-EBV-L (**Figure 6C&D**) suggests that they might share lymphomagenesis pathways with thymic GZL and others lymphoma occurring in the thymic niche. Conversely, gene mutational patterns were dissimilar between non-thymic poly-EBV-L and non-thymic GZL (**Figure 6E**).

MYD88, *CD79B* and *CARD11* mutations were absent in poly-EBV-L cases, consistent with low frequencies as reported in a study on monomorphic-EBV-DLBCL¹⁵. However, *TET2*, *TNFRSF14* and *KMT2D*, which were recurrently mutated in the same study¹⁵, were mutated in only 10%, 0% and 0% of our polymorphic cases, respectively.

We then contrasted mutations of poly-EBV-L with those identified in pediatric EBV-Burkitt lymphoma (EBV-BL)³⁸. Poly-EBV-L cases were unmutated in genes recurrently mutated in EBV-BL (*DDX3X*, *MYC*, *CCND3*, *RHOA*, and *ARID1A*, or *FOXO1*, mutated in only 1 case each) (**supplementary Figure 12**). *ID3* and *FBXO11*, mutated in EBV-BL, were not included in our panel, however, these genes were not mutated in any of the 7 poly-EBV-L cases from the discovery exome cohort. As in EBV-BL, apoptosis related genes such as *FAS*, *TP53* and *BIRC6* were mutated at very low frequencies (0%, 5% and 10%, respectively).

Outcome correlates with clinical parameters and gene mutational data

Outcome data was available for 65 patients (17/20 poly-EBV-L and 48/50 GZL). The majority of the patients were treated with a rituximab-polychemotherapy (poly-CT) combination

(N=53, 83%), and the remaining were treated with poly-CT alone (**supplementary Table 6**). No outcome differences were observed based on treatment with and without rituximab ($p=0.5$ and 0.4 for TTP and DSS respectively). GZL and poly-EBV-L cases had similar outcomes (3y TTP 64% and 65%, $p=0.72$ and 3y DSS 84% and 77%, $p=0.29$ for GZL and poly-EBV-L respectively, **supplementary Figure 13-14**). Among the clinical parameters, an ECOG-PS greater than 2 was associated with a shorter TTP ($p=0.0005$, HR=3.5 (1.5-8.5)), whereas thymic involvement, gender, bulky disease, anemia (Hb<120g/L), stage and aalPI were not (**supplementary Figure 12-13, supplementary Table 7**). The total number of mutations ('mutation burden') was associated with a shorter TTP ($p=0.008$, continuous variable). Indeed, patients with more than 17 variants (N=13) had a 3-year TTP of 25% (SE 13.8%) vs. 74% (SE 6%), ($p=0.006$, 3.4 (1.4-7.9)) for those presenting with fewer than 17 variants (N=52). Among the most recurrently mutated genes (i.e. >15% of the full data-set), *SOCS1* ($p=0.024$), *B2M* ($p=0.01$) and *LRRN3* ($p=0.04$) were associated with a shorter TTP (**supplementary Figure 13**). Furthermore, the presence of either *SOCS1* or *B2M* mutations could identify a group (N=28) with a 3-year TTP of 41% (IC95: 26%-68%) vs. 81% (IC-95 68-94%). In a Cox regression model (including ECOG-PS, number of mutations, and the presence of *SOCS1/B2M* and *LRRN3* mutations), ECOG-PS (HR 3.1) and the presence of either *SOCS1/B2M* mutations (HR 2.8) remained independently associated with TTP (**supplementary Figure 15**). None of these parameters were associated with DSS.

Discussion

Based on the analysis of an exome discovery cohort of paired LMD samples followed by deep sequencing of an extension cohort we describe a comprehensive characterization of the mutational landscape of GZL. We have shown that GZL and poly-EBV-L have contrasting mutational profiles and that thymic niche involvement is associated with a distinct profile. These mutational data strengthen the biological rationale for the dichotomization of GZL based on anatomical disease presentation¹⁰. Indeed, the mutation landscape of thymic GZL largely overlaps with that described in cHL and PMBCL. By contrast, in non-thymic GZL, half of all cases carried abnormalities affecting apoptosis-related genes, while NFKB (*NFKBIE/A*, *TNFAP13*) and GNA13 pathway mutations, typically seen in (anterior) mediastinal lymphomas, were only rarely observed.

The limits of our study are inherent to the rarity of the disease with relatively low case numbers and the absence of exome-level data for the full cohort. However, the exome cohort included 42% of the samples and the consistency of results between both the exome and extension cohort with characterization of 217 genes provides confidence in the accuracy of these data.

The mutation landscape analysis of GZL highlights *SOCS1*, *B2M*, *GNA13* and *NFKBIA* as the most recurrently mutated genes, and apoptosis and epigenetic modifiers as being recurrently affected. On the other hand, some of the highly mutated genes in DLBCL were not observed in GZL (Activated B-cell type - *CARD11*, *MYD88*, *CD79B* or Germinal centre-type *EZH2*). We also demonstrated that there was no distinctive mutational landscape based on morphological subtyping (i.e. group 0-2) of GZL. This supports our previous findings based on GEA¹⁰ suggesting that EBV-negative thymic GZL constitutes a relatively homogeneous disease entity, irrespective of morphological features. Indeed, integration of GE and mutation data illustrates stable mutation-phenotype associations with thymic vs non-thymic involvement. In particular, we show that thymic GZL rely on the same mutation spectrum as cHL^{23,24,29} and PMBCL^{21,22,25} with the incidence of *SOCS1*, *B2M* or *GNA13* mutations comparable between the three entities.

Regarding the non-thymic GZL, the landscape was intriguing in several aspects. First, the mutation burden was significantly lower compared to thymic GZL, suggesting different lymphomagenesis processes and cell-of-origin between the two entities. Second, *BCL2*, *TP53* and *CREBBP* mutations were highlighted as significantly more recurrent in non-thymic cases, as opposed to mutations within several NFKB-pathway genes (*ITPKB*, *NFKBIE/NFKBIA/TNFAIP3*), or *GNA13*, which were more recurrent in thymic cases. The higher incidence of *GNA13* or *XPO1* mutations in thymic GZL versus non-thymic GZL might reflect the higher frequency observed in PMBCL as compared to DLBCL²⁵. Furthermore, the comparison with PMBCL and cHL highlighted *BCL2* and *TP53* as more specific to non-thymic GZL. The pivotal role of the apoptotic pathway within the non-thymic GZL was further emphasized by a split within the cases: 44% having a mutation in either *TP53*, *BIRC6* or *BCL2* that tended to be mutually exclusive with *SOCS1* or *STAT6* mutations, present in another 39% of cases. These

data do not suggest a unique cell-of-origin for the non-thymic GZL. Composite lymphoma between cHL and DLBCL at diagnosis are rare but have been reported in the literature, and molecular analysis of such cases would help in understanding the lymphomagenesis of non-thymic GZL³⁹. A theory on the origin of (non-thymic) GZL has been raised in 2009 that postulates that GZL arises as transformed disease from a previously undiagnosed indolent malignancy and subsequent immunophenotypic change at the time of transformation⁴⁰.

We also highlighted here a fully distinct pattern of mutations between poly-EBV-L and GZL, despite their closely related pathological features. First, poly-EBV-L cases had fewer coding mutations than GZL cases, a finding consistent with data reported in cHL^{23,24,29}, BL³⁸ and DLBCL¹⁵ suggesting that EBV-driven pathogenesis relies on only a limited number of additional driver mutations. Second, the pattern of mutations was consistent with the literature^{15,23,29,38,41,42} in other EBV-positive B cell lymphomas regarding the “absence” of variants within *B2M/HLA-B* genes, but also the NFKB or TP53 pathways. Key mutations reported in EBV-BL³⁸ were absent in poly-EBV-L and compared to other EBV-positive DLBCL, we did not observe the high frequency of mutations within *TET2*, *TNFRSF14*, *KMT2D*, *BCL6* reported by Kataoka et al¹⁵. However, these data require confirmation, as exome analysis was performed in only 35% (7/20) of our poly-EBV-L cases. The observed difference might also be related to the underlying morphology of the cases (polymorphic in our series). The incidence of thymic involvement (25%) was in line with other cohorts^{11,12}. Interestingly, even though based on small numbers, further dichotomization of poly-EBV-L based on thymic involvement appeared relevant in these cases as thymic poly-EBV-L cases were enriched in *SOCS1*, *GNA13*, and *CSF2RB* mutations, as found in thymic GZL. Composite lymphomas between EBV-positive cHL and EBV-positive DLBCL have been described in the literature. Particularly, Quintanilla et al. reported on four EBV-positive cases with mediastinal involvement and a cHL/PMBCL morphology⁴⁰. Taken together, these data might suggest a pathological spectrum in EBV-related B cell lymphomas, from cHL to DLBCL/PMBCL with poly-EBV-L lying in between. These data also indicate that a small subset of EBV-positive tumors share molecular hallmarks with EBV-negative GZL and therefore might need to be considered as part of the “thymic-niche lymphomas” spectrum.

Our outcome data needs to be interpreted with caution given that the treatment was not homogeneous. Poly-EBV-L and GZL have comparable outcomes, in line with other reports on EBV-DLBCL^{41,43}. Among the clinical and genomic factors, ECOG-PS and either *SOCS1/B2M* mutations were independently associated with TTP. The role of *SOCS1* mutations as activators of JAK/STAT signaling has already been assessed in cHL and PMBCL⁴⁴ as well as its prognostic value in DLBCL⁴⁵.

In conclusion, here we report the first mutational landscape description of GZL and poly-EBV-L. Even though both entities have very distinct mutational patterns, we highlight that thymic niche involvement is a major determinant of genomic abnormalities acquired in GZL and potentially also in poly-EBV-L. Mutations found in thymic GZL are closely aligned with the cHL/PMBCL spectrum whereas those found in non-thymic GZL revealed a split based on the presence of *TP53* mutations. Our results suggest distinct cells-of-origin and modes of disease evolution within the GZL spectrum.

References :

1. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D, et al. Gray-zone Lymphoma between cHL and Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2019;43(3):.
2. Pilichowska M, Pittaluga S, Ferry JA, et al. Clinicopathologic consensus study of gray zone lymphoma with features intermediate between DLBCL and classical HL. *Blood Adv.* 2017;1(26):2600–2609.
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375–2390.
4. Eberle FC, Salaverria I, Steidl C, et al. Gray zone lymphoma: Chromosomal aberrations with immunophenotypic and clinical correlations. *Mod. Pathol.* 2011;24(12):1586–1597.
5. Garcia JF, Mollejo M, Fraga M, et al. Large B-cell lymphoma with Hodgkin’s features. *Histopathology.* 2005;47(1):101–110.
6. Gualco G, Natkunam Y, Bacchi CE. The spectrum of B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: A description of 10 cases. *Mod. Pathol.* 2012;25(5):661–674.
7. Dunleavy K, Grant C, Eberle FC, et al. Gray zone lymphoma: Better treated like hodgkin lymphoma or mediastinal large b-cell lymphoma? *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 2012;7(3):241–247.
8. Eberle FC, Rodriguez-Canales J, Wei L, et al. Methylation profiling of mediastinal gray zone lymphoma reveals a distinctive signature with elements shared by classical Hodgkin’s lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 2011;96(4):558–566.
9. Pittaluga S, Nicolae A, Wright GW, et al. Gene Expression Profiling of Mediastinal Gray Zone Lymphoma and Its Relationship to Primary Mediastinal B-cell Lymphoma and Classical Hodgkin Lymphoma. *Blood Cancer Discov.* 2020;
10. Sarkozy C, Chong L, Takata K, et al. Gene expression profiling of gray zone lymphoma. *Blood Adv.* 2020;4(11):2523–2535.
11. Elsayed AA, Satou A, Eladl AE, et al. Grey zone lymphoma with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathological study of 14 Epstein–Barr virus-positive cases. *Histopathology.* 2017;70(4):579–594.
12. Nicolae A, Pittaluga S, Abdullah S, et al. EBV-positive large B-cell lymphomas in young patients: A nodal lymphoma with evidence for a tolerogenic immune environment. *Blood.* 2015;126(7):863–872.
13. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood.* 2009;113(12):2765–2775.

14. Keane C, Tobin J, Gunawardana J, et al. The tumour microenvironment is immunotolerogenic and a principal determinant of patient outcome in EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma. *Eur. J. Haematol.* 2019;103(3):200–207.
15. Kataoka K, Miyoshi H, Sakata S, et al. Frequent structural variations involving programmed death ligands in Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Leukemia.* 2019;33(7):1687–1699.
16. Gebauer N, Gebauer J, Hardel TT, et al. Prevalence of targetable oncogenic mutations and genomic alterations in Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Leuk. Lymphoma.* 2015;56(4):1100–1106.
17. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. 2013;
18. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(3):213–219.
19. Saunders CT, Wong WSW, Swamy S, et al. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics.* 2012;28(14):1811–1817.
20. Koboldt DC, Chen K, Wylie T, et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics.* 2009;25(17):2283–2285.
21. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Genomic analyses of PMBL reveal new drivers and mechanisms of sensitivity to PD-1 blockade. *Blood.* 2019;134(26):2369–2382.
22. Mottok A, Hung SS, Chavez EA, et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 2019;134(10):802–813.
23. Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2018;131(22):2454–2465.
24. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood.* 2015;125(7):1061–1072.
25. Dubois S, Viailly PJ, Mareschal S, et al. Next-generation sequencing in diffuse large B-cell lymphoma highlights molecular divergence and therapeutic opportunities: A LYSA study. *Clin. Cancer Res.* 2016;22(12):2919–2928.
26. Mata E, Díaz-López A, Martín-Moreno AM, et al. Analysis of the mutational landscape of classic Hodgkin lymphoma identifies disease heterogeneity and potential therapeutic targets. *Oncotarget.* 2017;8(67):111386–111395.
27. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* 2018;24(5):679–690.
28. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2018;378(15):1396–1407.
29. Wienand K, Chapuy B, Stewart C, et al. Genomic analyses of flow-sorted Hodgkin Reed-Sternberg cells reveal complementary mechanisms of immune evasion. *Blood Adv.*

- 2019;3(23):4065–4080.
30. Reddy A, Zhang J, Davis NS, et al. Genetic and Functional Drivers of Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cell*. 2017;171(2):481-494.e15.
 31. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Comput. Biol.* 2016;12(4):.
 32. Mermel CH, Schumacher SE, Hill B, et al. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol.* 2011;12(4):R41.
 33. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*. 2013;499(7457):214–218.
 34. Green MR. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. *Blood*. 2018;131(6):595–604.
 35. Phelan JD, Young RM, Webster DE, et al. A multiprotein supercomplex controlling oncogenic signalling in lymphoma. *Nature*. 2018;560(7718):387–391.
 36. Vigano E, Gunawardana J, Mottok A, et al. Somatic IL4R mutations in primary mediastinal large B-cell lymphoma lead to constitutive JAK-STAT signaling activation. *Blood*. 2018;131(18):2036–2046.
 37. Mottok A, Wright G, Rosenwald A, et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. *Blood*. 2018;132(22):2401–2405.
 38. Grande BM, Gerhard DS, Jiang A, et al. Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma. *Blood*. 2019;133(12):1313–1324.
 39. Aussedat G, Traverse-Glehen A, Stamatoullas A, et al. Composite and sequential lymphoma between classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal lymphoma/diffuse large B-cell lymphoma, a clinico-pathological series of 25 cases. *Br. J. Haematol.* 2020;189(2):.
 40. Quintanilla-Martinez L, de Jong D, de Mascarel A, et al. Gray zones around diffuse large B cell lymphoma. conclusions based on the workshop of the XIV meeting of the European association for hematopathology and the society of hematopathology in Bordeaux, France. *J. Hematop.* 2009;2(4):211–236.
 41. Ok CY, Li L, Xu-Monette ZY, et al. Prevalence and clinical implications of Epstein-Barr virus infection in de Novo diffuse large B-cell lymphoma in western countries. *Clin. Cancer Res.* 2014;20(9):2338–2349.
 42. Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Bräuninger A, et al. Clonal deleterious mutations in the ikb α gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J. Exp. Med.* 2000;191(2):395–401.
 43. Witte HM, Merz H, Biersack H, et al. Impact of treatment variability and clinicopathological characteristics on survival in patients with Epstein-Barr-Virus positive diffuse large B cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2020;

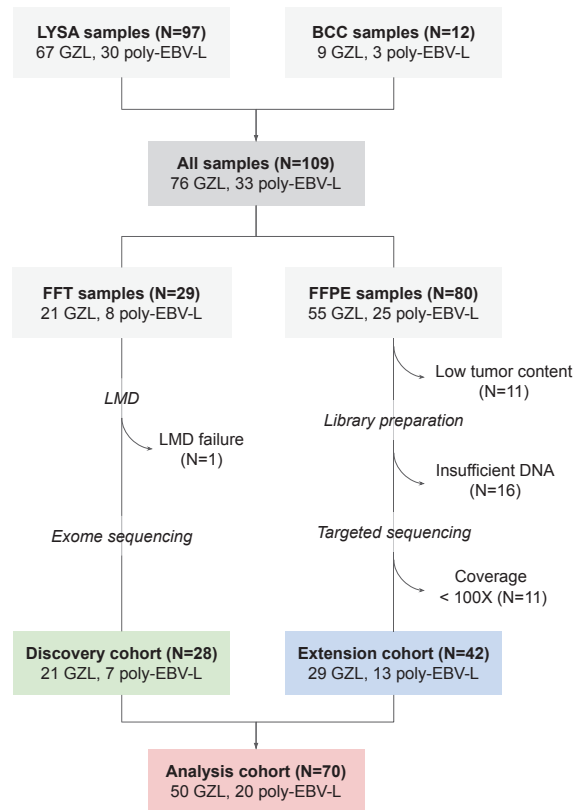
44. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 2006;25(18):2679–2684.
45. Schif B, Lennerz JK, Kohler CW, et al. SOCS1 mutation subtypes predict divergent outcomes in diffuse large B-Cell lymphoma (DLBCL) patients. *Oncotarget*. 2013;4(1):35–47.

Table 1

Characteristics	Grey Zone, N=50				Polymorphic-EBV-DLBCL NOS	
	GZ all, N=50	GZ-Exome N=21	GZ-Target N=29	p. val Chiz (exome vs target)	Poly-EBV-L, N=20	
Centre	LYSA: 44 BCC: 6	LYSA: 19 BCC: 2	LYSA: 25 BCC: 4	0.68	LYSA: 19 BCC: 1	
Mean Age (range) >=60y	46 y (14-90) 14 (28%)	(14-76) 4 (19%)	(20-90) 10 (34%)	0.17	55 (16-84) 8 (40%)	
Sex: F/M	25/25 (50%)	13 / 8 (62%)	12 / 17 (41%)	0.15	6/14 (30%)	
GZ-classification				0.95	Not Applicable for poly-EBV-L	
0	8 (16%)	3 (14%)	5 (17%)			
1	19 (38%)	8 (39%)	11 (38%)			
2	23 (46%)	10 (48%)	13 (45%)			
Mediastinal Involvement				0.3		
Thymic	31 (63%)	15 (71%)	16 (57%)		5 (28%)	
Non-thymic	18 (37%)	6 (29%)	12 (43%)		13 (72%)	
Med-non-thymic	7 (14%)	2 (10%)	5 (18%)		0	
non-mediastinal	11 (23%)	4 (23%)	7 (25%)		13 (72%)	
NA	1	0	1		2	
Ann Arbor Stage				0.23		
1-2	(/46) 24 (52%)	13 (62%)	(/25) 11 (44%)		(/16) 7 (44%)	
3-4	22 (48%)	8 (38%)	14 (56%)		9 (56%)	
Extra-nodal site, N				0.17		
Spleen	19 (/46, 41%)	6 (/19, 32%)	13 (/25, 52%)		5 (/16, 31%)	
Liver	5 (26%)	3	3		4 (80%)	
Lung	3 (16%)	1	2		4 (80%)	
Bone Marrow	7 (37%)	3	4		2	
	9 (47%)	3	6		1	
LDH	(/46)	(/20)	(/24)	0.26	(/16)	
>Upper limit of normal	26 (59%)	10 (50%)	16 (67%)		7 (44%)	
Age adjusted-IPI				0.06		
0-1	(/44)	(/20)	(/24)		(/16)	
2-3	26 (61%)	15 (75%)	11 (46%)		8 (50%)	
	18 (39%)	5 (25%)	13 (54%)		8 (50%)	

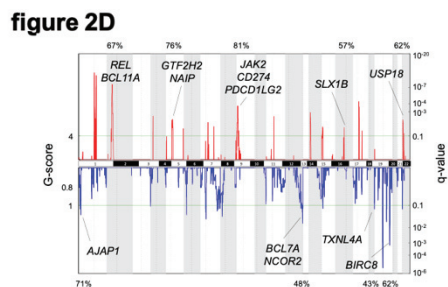
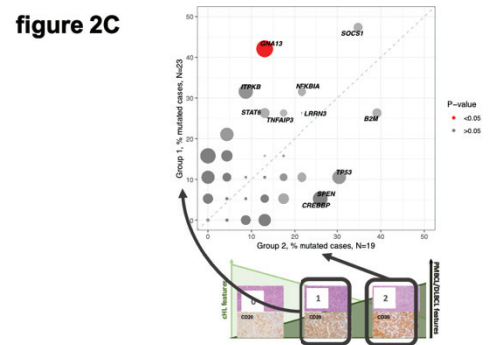
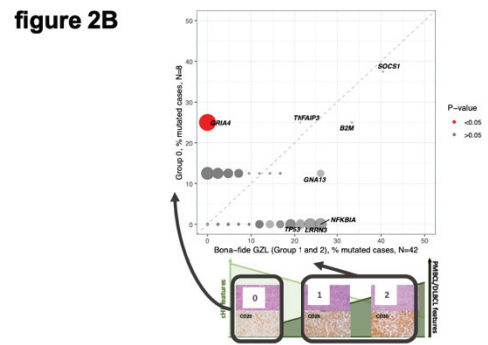
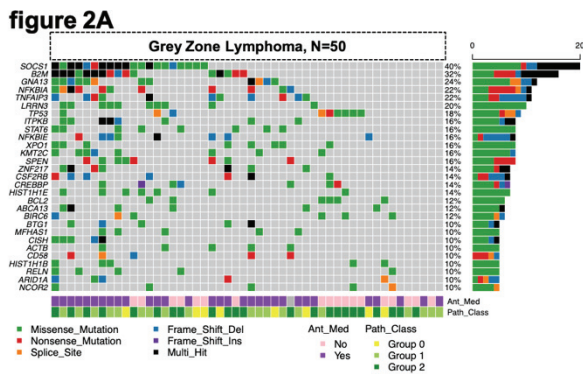
Figure:

Figure 1: Flow-chart of patient inclusion.



Cases were centrally reviewed by a panel of LYSA and BC Cancer experts in hematopathology and medical oncology. Inclusion criteria for the GZL cases were based on WHO classification; cases with a cHL-like morphology with strong and diffuse CD20 expression and other B cell markers were also included (Supplementary Methods). Cases with EBER *in situ* hybridization (ish) positivity in more than 90% of tumor cells were diagnosed as polymorphic-EBV DLBCL (poly-EBV-L). A total of 109 samples were collected, including 29 fresh frozen tissue (FFT) biopsies submitted for LMD (“discovery cohort”) and 80 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples, of which 53 could be sequenced with a capture target panel of 217 genes (“extension cohort”). Eleven cases with coverage < 100X were excluded to reduce false negative results related to low coverage.

Figure 2: Mutational Landscape of GZL.



Panel A: OncoPrint of the most recurrently mutated genes within the 50 GZL samples, with clinical annotation (Ant_Med: anterior mediastinal involvement, pathological group (Path_group)).

Panel B: Pairwise (Fisher test) comparison of the incidence of mutations within group 0, aka GZL with a cHL morphology and expression of B cell markers on all tumor cells, versus group 1 and 2 bona-fide GZL. The size of the bubble is inversely correlated to the p value. Significant results ($p < 0.05$) are colored in red. Full analysis and FDR testing are provided in supplementary table 4. After FDR correction for the 28 genes mutated in more than 20% of group 0 or group 1-2 cases, *GRIA4* mutations were no longer significantly enriched in Group 0 ($q.val=0.64$).

Panel C: Pairwise (Fisher test) comparison of the incidence of mutations within group 1, cHL-like GZL, versus group 2, large-B cell lymphoma like GZL. The size of the bubble is inversely correlated to the p value. Significant results ($p < 0.05$) are colored in red. Full analysis and FDR testing are provided in supplementary table 4. After FDR correction, for the 17 genes mutated in more than 20% of group 1 or group 2 cases, *GNA13* mutations were no longer significantly enriched in Group 1 ($q.val=0.47$).

Panel D: GISTIC plot highlighting the main copy number variation in GZL.

Data were obtained within the 21 exome cases and showed that the main gain/amplification was in 9p24.1 locus with 81% of the cases affected.

Figure 3: Mutational landscape by thymic vs non-thymic involvement.

figure 3A

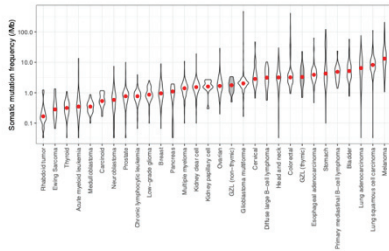


figure 3B

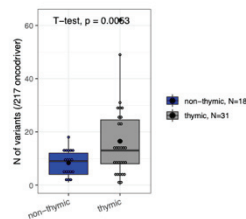


figure 3C

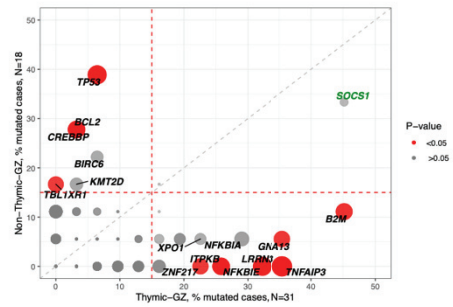
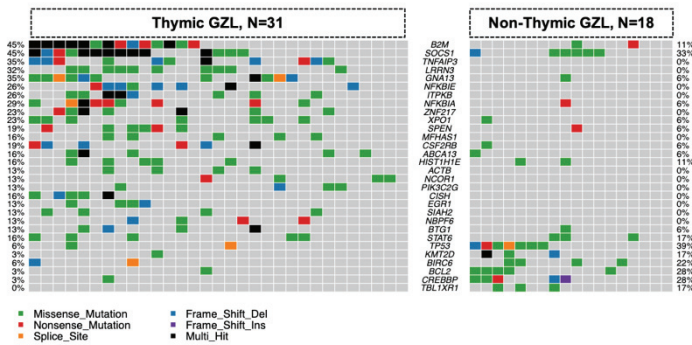


figure 3D



Panel A: Mutation burden in the exome capture space: Thymic GZL (N=15) had a greater mutation burden than non-thymic GZL (N=6).

Panel B: Coding mutations count within the 217 target genes:

Thymic-GZ (N=31) had more coding mutations compared to non-thymic GZL (N=18).

Panel C: Pairwise comparison of incidence of mutations within thymic vs non-thymic-GZL. The comparison was done using Fisher exact test among the most recurrently mutated genes, between thymic and non-thymic cases. The size of the bubble is inversely correlated to the p value. Significant results ($p < 0.05$) are colored in red. Full analysis and FDR testing are provided in supplementary table 4.

Panel D: Co-oncoplot of the most recurrently mutated genes within thymic and non-thymic GZL. Thymic GZL were characterized by the presence of mutations typically seen in PMBCL/cHL and absence of *TP53/BCL2/BIRC6* in the majority of the samples. Within non-thymic cases, 6/18 cases are characterized by presence of *SOCS1/B2M* variants and 7/18 by *TP53/BCL2/BIRC6*.

Figure 4: Comparison of Grey Zone Lymphoma to pathologically related entities.

Figure 4A

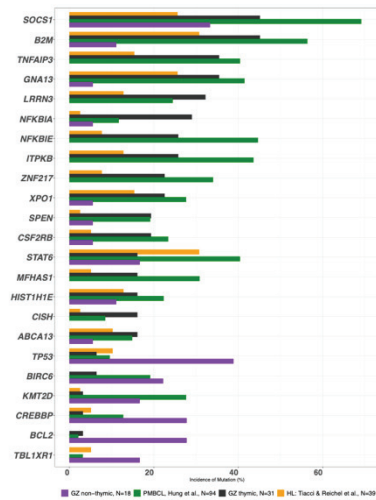


Figure 4B

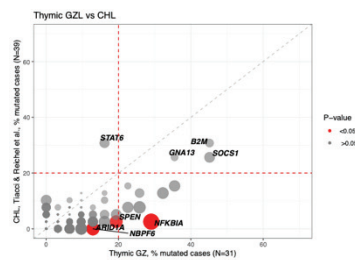


Figure 4D

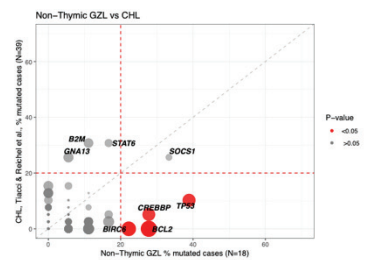


Figure 4C

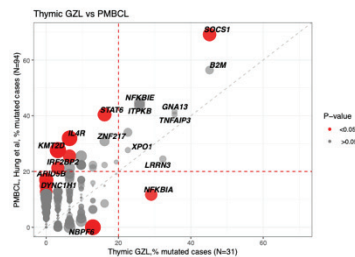
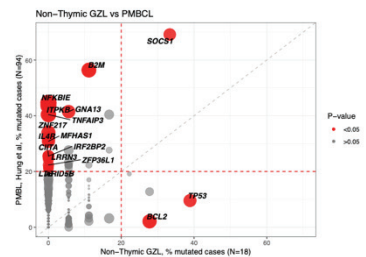


Figure 4E



Panel A: Bar plot representation of the most recurrently affected genes within thymic and non-thymic GZL. The incidence of mutations in PMBCL and cHL is based on literature data.

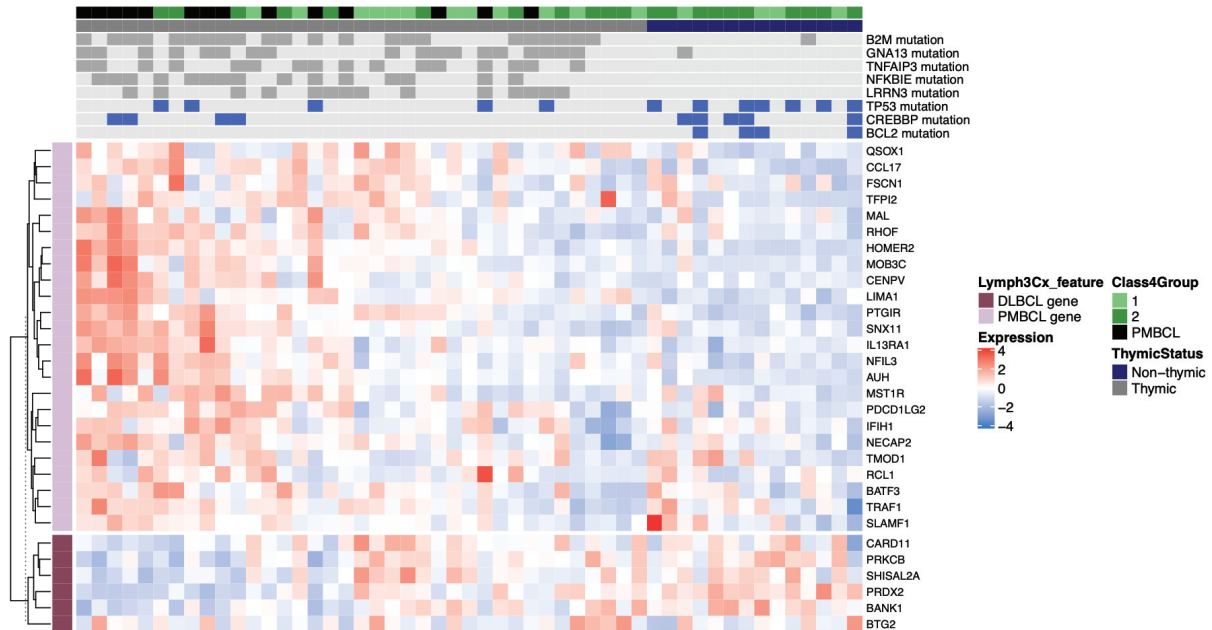
Panel B: Pairwise (Fisher exact test) comparison of the incidence of mutations within thymic-GZL and cHL. The size of the bubble is inversely correlated to the p-value. Significant results ($p < 0.05$) are colored in red. Full analysis is provided in supplementary table 4.

Panel C: Pairwise (Fisher exact test) comparison of the incidence of mutations within thymic-GZL and PMBCL.

Panel D: Pairwise (Fisher exact test) comparison of the incidence of mutations within non-thymic-GZL and cHL.

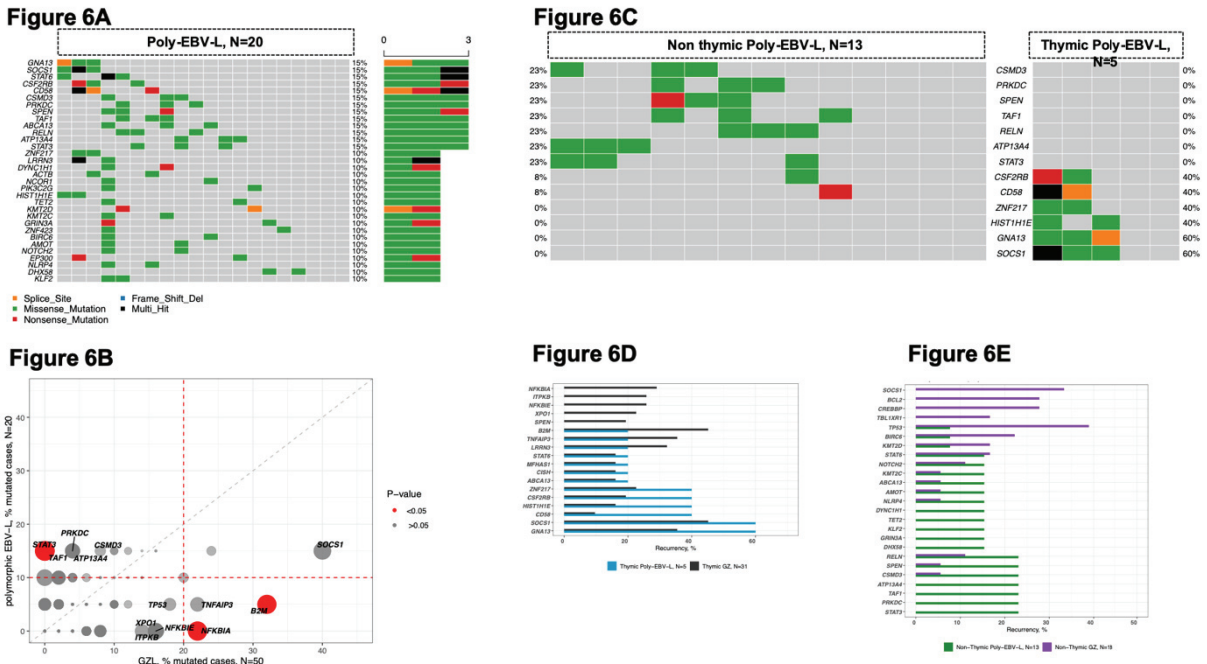
Panel E: Pairwise (Fisher exact test) comparison of the incidence of mutations within non-thymic-GZL and PMBCL.

Figure 5: Integration of mutational data with PMBCL/DLBCL gene expression signatures.



For 37 of the 42 bona-fide GZL of this cohort and 14 PMBCL, RNAseq data have been previously reported¹⁰. For each samples (columns), the heatmap shows expression (normalized and log-transformed counts) of genes (rows) comprising the Lymph3Cx³⁷ gene signature which distinguishes PMBCL from DLBCL. DLBCL-related genes and PMBCL-related genes formed two uniform clusters according to tumor cell expression patterns. For the mutation track, genes were selected based on their enrichment in thymic (*LRRN3*, *NFKBIE*, *TNFAIP3*, *GNA13*, *B2M*) and non-thymic GZL (*CREBBP*, *TP53*, *BCL2*). Filled boxes (dark grey or blue) represent cases with mutations present, and light grey boxes represent no mutation.

Figure 6: Comparison of polymorphic-EBV DLBCL NOS and grey zone lymphoma.



Panel A: Onco-plot of mutations within polymorphic EBV DLBCL. Panel B: Pairwise (Fisher exact test) comparison of the incidence of mutations within GZL and polymorphic EBV DLBCL. The size of the bubble is inversely correlated to the p value. Significant results ($p < 0.05$) are colored in red. Full analysis is provided in supplementary table 4. Panel C: co-onco-plot of most recurrent mutations within poly-EBV-L, based on the presence of thymic involvement: thymic poly-EBV-L (N=5) and non-thymic poly-EBV-L (N=13). Genes have been selected based on the recurrence within both thymic and non-thymic poly-EBV-L ($> 20\%$ in any of the cohort or in both). Panel D: Bar plot with representation of incidence of mutations within thymic poly-EBV-L (blue) and thymic GZL (grey). Panel E: Bar plot with representation of incidence of mutations within non-thymic poly-EBV-L (green) and non-thymic-GZL (purple).

Mutational Landscape of Grey Zone Lymphoma

Supplementary data:

I-Supplementary Methods

A-Cohort assembly and pathological review:

Cases for grey zone lymphoma (GZL) and EBV DLBCL with polymorphic morphology (poly-EBV-L) were obtained from LYSA and the Centre for Lymphoid Cancer (CLC; BC Cancer, Canada) and have been reviewed by an international panel of experts in hematopathology. Latent EBV-infection of the malignant cells was evaluated by *in situ* hybridization for EBER.

The review process of LYSA cases and CLC cases has been previously described^{1,2}. GZL samples were classified based on our previous report¹ as having: (i) a more Hodgkin-like morphology with few sheets of large cells (group 0) and intense expression of B cell markers (CD20, BOB-1, OCT-2, CD79A) on all tumor cells, (ii) intermediate morphology with discordant phenotype (Group 1 and 2 or bona-fide GZL) or (iii) DLBCL or PMBCL morphology with CD30 expression on all tumor cells (Group 3). Importantly, among the 130 reviewed cases, all Group 3 cases (N=21) were excluded given the results of our previous report showing that they were not part of the GZL spectrum², and 109 samples were pre-selected (76 GZL and 33 poly-EBV-L) for mutational analysis. Among these 109 samples, 29 cases with fresh frozen tissue (FFT) were used as a discovery cohort for laser-microdissection (LMD) followed by whole-exome sequencing and 80 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples as a validation cohort. Among these 80 FFPE samples, 27 were excluded due to insufficient tumor content or poor quality of the sample.

B-Discovery cohort:

1-Laser microdissection:

The discovery cohort included 29 samples with FFT available that could be submitted for LMD (using a Zeiss Axioplan 2 microscope equipped with Molecular Machines Industries technology) in order to enrich for tumor cells and obtain normal DNA from microenvironment (ME) cells for paired exome analysis.

Briefly, 6- μm FFT sections were fixed after cutting in 70% ethanol and mounted onto membrane slides. Adjacent sections were also prepared on glass slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E) and CD30 when needed, to assess cell morphology and tumor content. Membrane slides were stained for hematoxylin for 45 seconds, eosin for 15 seconds, dehydrated in ethanol bath (70%, 90% and 100%, 30 seconds each), incubated in Xylene for 1 minute and air dried for at least 2 hours before LMD. In order to dissect tumor cells and normal lymphocyte/non-tumor ME cells, 10 sections per case were stained. Depending on the tumor content, tumor cells were individually picked or dissected in larger cell groups. For each case, at least 1200 tumor cells were collected. ME cells were dissected in a second step and more than 2000 lymphocytes or 0.2 μm^2 per case were collected. Microdissected cells were subsequently stored at -80°. One sample failed the LMD process.

DNA extraction was performed using the DNA advanced Agencourt® extraction kit with overnight lysis. All DNA was then submitted for library construction, without prior genome amplification.

2-Exome library construction:

Genomic libraries were prepared using the Ovation Ultralow System V2 library kit (Nugen Technologies Inc). Adaptor-ligated libraries were amplified for 16 PCR cycles and the quality and quantity of the libraries were assessed by using the 2100 Bioanalyzer and DNA 1000 Assay. Each indexed library was then hybridized to the SureSelect Human All Exon V6+UTR capture library using the Ovation Target Capture Module for adaptor blocking and post-capture amplification. Indexed libraries from 4 tumor or 8 ME cases were pooled and sequenced on the Illumina NextSeq550 using 150 bp paired-end reads. For 8 cases, constitutional DNA extracted from PBMC (peripheral blood mononuclear cells) was also available.

3-Bioinformatics pipeline for exomes (LMD samples):

- Identification and filtering of somatic SNVs and indels:

For all tumors matched with a normal, somatic SNV/indel variants were identified using the intersection of calls predicted by VarScan (version 2.3.6)³, Strelka (version 1.0.13)⁴ and MuTect (version 1.1.4)⁵. A “validation” cohort consisting of LMD tumors paired with constitutional DNA from blood (n=8) were analyzed with default thresholds in all tools to optimize variant calling thresholds for LMD tumor / LMD normal pairs; additionally, to account for possible tumor contamination in normal samples, calls with a variant allele frequency (VAF) in the normal $\geq 5\%$ of the tumor VAF were excluded. For the main cohort, consisting of LMD tumor samples paired with LMD normal DNA (n=29), minimal filters (variants reads ≥ 3 , VAF $\geq 5\%$) were first applied to generate a testable set of calls that could be benchmarked against the validation cohort. One sample failed due to insufficient tumor content. ROC analyses were then performed to identify optimal values for the somatic p-value (VarScan only) and the maximum VAF in the normal that were then applied to the LMD tumor / LMD normal cohort. Final thresholds applied to main cohort were as follows: somatic p-value < 0.1375 (VarScan only), and VAF in normal $< 10\%$. To account for tumor contamination in LMD normals, variants were excluded based on the presence of SNPs in the normal, specifically excluding variants (i) present in at least two normals (not including the matching normal) or (ii) present in a single normal (not matching normal) and VAF of the normal SNP (e.g. GZ178ME) $>$ VAF peak for the corresponding tumor (e.g. GZ178T). For one tumor specimen (GZ222), where the patient’s normal DNA was found to have high tumor contamination, a pooled LMD normal was used for paired variant calling to remove platform and sequencing-related artifacts. Somatic SNV/indels were identified in a similar manner to paired tumor/normal samples, with the following additional filters to remove putative germline variants: (i) exclude variants found in dbSNP (version 137) (Sherry et al., 2001) (and not found in COSMIC), (ii) retain variants with a stop gain effect (regardless of evidence for being germline), (iii) for “low” tumor-content cases (estimated tumor fraction $\leq 20\%$), exclude variants have VAF between 40-60% or $>80\%$. All variants were annotated using SnpEff (version 4.2) (Cingolani et al., 2012) and filtered for effects predicted to have a moderate or

high impact at the protein level (frameshift, non-synonymous, stop gained, splice site acceptor).

- MutSigCV analysis:

The statistical significance of mutation frequency in each gene was determined using the MutSigCV algorithm (<http://software.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern/modules/docs/MutSigCV>)⁶. To accurately estimate the background mutation rate, synonymous mutations in addition to the full set of (non-synonymous) somatic SNVs and indels identified through the paired SNV calling pipeline was analyzed. Since the default coverage file provided by MutSigCV may not properly represent the target space utilized by our capture bait, we used CovGen (<https://github.com/tgen/CovGen>) to provide an accurate estimate of coverage in the cohort. We employed the default covariate table provided by MutSigCV, which contains for each gene the following variables: 1) global expression, 2) DNA replication time, and 3) HiC statistic. Due to our limited cohort size, a p-value < 0.05 was used to obtain a list of candidate driver genes. From this list, only genes present in RefSeq were included for downstream analyses. Genes annotated as open reading frames or immunoglobulin proteins were removed.

- Copy number calling and GISTIC analysis:

Copy number (CN) alterations for all LMD tumors were called using CNVkit⁷ using tumor fraction estimated by a pathologist. Bed files were created with the removal of inaccessible regions using a precomputed file for hg19, which excludes both the UCSC / Encode Duke mappability regions and DAC blacklisted regions. Bin sizes for on- and off-target regions were estimated based on the median BAM file size using the “autobin” function. To enhance performance, all germline samples were combined to create a pooled reference. The hg19 reference genome was used to estimate GC content and repeat-masked proportions of each region. Segmentation was performed choosing the “--drop-low-coverage” option, which ignores bins with log₂ normalized coverage values below -15. For each specimen, a “noisiness” QC value was calculated based on: [number of segments] * [Tukey’s biweight mid-variance

value]. Only cases with a noisiness score < 969 (mean + $2 \times \text{SD}$) were kept for further analysis, resulting in 2 failed tumor samples (passing rate 94% (29/31)).

In order to identify relevant regions of CN alterations, the GISTIC (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer) method described by Mermel et al. was applied to the curated segmentation results as described⁸. The GISTIC method accounts for multiple hypothesis-testing using the false-discovery rate (FDR) framework to assign a q-value to each aberration. The analysis was performed using the web interface (<http://genepattern.broadinstitute.org>) with a threshold of ± 0.3 to define amplifications/deletions, a maximum of 1000 segments, a q-value threshold of 0.1 (indicated by a vertical green line in Figure 2D), a focal length cut-off of 0.98 and the removal of overlapping amplifications/deletions (“arm peeling”). For each significant region, a peak region was identified, which is defined as the part of an aberrant region with the greatest amplitude and frequency of alteration and a minimum q-value. In addition, a “wide peak” was determined using a leave-one out algorithm to allow for errors in the boundaries on a single case level. The wide peak boundaries are more robust for identifying the most likely target genes in a given region.

C-Target sequencing of an extension and validation cohort:

1-Panel of 217 genes:

The panel was constructed in agreement between several experts in lymphoma biology (CS, DS, CS, EV, GD, TA, RM).

The panel for capture sequencing was designed based on:

- *The discovery cohort and exome data:*
 - MutSigCV analysis performed on the exome discovery cohort identified 125 candidate oncodriver genes, of which:

- Genes mutated in at least 2 cases ($\geq 5\%$) were selected and included in the panel (N=56, "MUTSIG").
- Genes mutated in only 1 case with strong biological and literature support were selected (N=7, "MUTSIG_Biology").
- We also selected genes from our exome cohort based on their recurrence and strong biological rationale although not identified by MutSigCV:
 - Recurrence $> 10\%$ (i.e. mutated in 3 or more cases) (N=10, "GZ_3")
 - Or strong biological value and mutated in 2 cases (N=25, "GZ_2") or 1 case (N=6, "GZ_1")
- Genes known to be associated with passenger mutations & not reported by MutSigCV as well as by the literature as potential oncogene were not included in the panel (i.e. *TTN*, *FBN2*, *FAT4*, *DNAH17*, *IGLL5*, *PXDNL*).

○ *Literature data:*

In order to determine the full mutation spectrum of the disease, any genes reported as recurrently mutated and considered oncogenes in cHL, PMBCL or DLBCL were included in the design (regardless of how many GZL cases were mutated). Recurrent genes included were based on: Tiacchi et al.⁹ and Reichel et al.¹⁰ for cHL; Mottok et al.¹¹, Dubois et al.¹² and Mansouri et al.¹³ for PMBCL; and Chapuy et al.¹⁴ and Reddy et al. (ref) for DLBCL (N=104, "Literature").

2-Extension cohort:

Among the 53 FFPE cases, DNA was extracted from either: (i) full sections of FFPE tissue (N=33), (ii) macro-dissection of the tumor rich area (N=14), or (iii) LMD (N=6). For LMD cases, DNA was extracted with the QIAGEN QIAMP DNA micro kit (Ref 56304) with 1 μ l of carrier RNA (overnight proteinase K lysis). For macrodissected samples, sheets of tumor cells previously identified on CD30/H&E staining were dissected on a 10 μ m glass-slide section with a scalpel (5 to 10 slides). DNA and RNA were extracted with the QIAGEN (ALLPrep) extraction kit according to the manufacturer's protocol. For all other samples (N=33), DNA was extracted from scrolls (3x10 μ m) with the Formapur[®] extraction kit, according to the manufacturer's protocol.

Using the Agilent SureDesign software (Agilent, Santa Clara, CA), a total of 15679 regions within the 217 genes, were targeted for a final capture size of 1.037 Mbp. Adaptor libraries were constructed following the 100ng SureSelect XT2 Target Enrichment System for Illumina Multiplexed Sequencing protocol version E1, June 2015 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Indexed libraries from 12 tumors were pooled and sequenced in batches on the Illumina NextSeq 550 System® using 150 bp paired-end reads.

3-Bioinformatics pipeline for target sequencing:

- Metrics and QC of targeted cohort:

Across the 53 cases submitted for target sequencing, mean coverage was 400X (2-1100X). A QC coverage threshold (100X) was determined, excluding 11 cases (4 LMD, 3 macrodissected and 4 full-section samples) leading to a final cohort of 42 cases.

- Identification and filtering of somatic SNVs and indels for targeted cohort:

For variant calling, tumor specimens were paired either with constitutional blood DNA, or with LMD normal (derived from the exome cohort). If no matching normal was available, either a pool of constitutional normals or a pool of LMD normals was used depending on tumor tissue source. Somatic SNV/indel variants were identified based on detection by at least two of VarScan, Mutect and Strelka. In order to define appropriate variant calling thresholds, ROC analyses were performed for a set of “validation” cases where frozen samples were compared against their respective exome samples, representing the gold standard dataset (Supp. Fig. 1). Precision and recall were assessed for tumor variant reads and tumor VAF. Accordingly, optimized thresholds were consolidated and defined for inclusion as follows: tumor VAF \geq 3% with at least 8 tumor variant reads (if tumor content \leq 25%) or 12 tumor variant reads (if tumor content $>$ 25%). For samples paired with a LMD normal or pool of LMD normals, variants were filtered with a somatic p-value threshold as defined in the exome cohort ($SPV < 0.1375$) in addition to the requirement for the normal VAF $< 10\%$. For all other samples, the filters $SPV < 0.05$, normal VAF $< 5\%$ of tumor VAF and normal variant reads ≤ 2 were applied. Tumors matched to a pooled constitutional normal were further filtered to remove putative germline variants: (i) exclude variants found in dbSNP (and not found in COSMIC), (ii)

exclude variants with tumor VAF between 40-60% or > 90% (except for those containing exclusively one or more COSMIC ids). For all tumor specimens, only variants located within the target gene panel and having protein-altering effects were retained for analysis or unless otherwise specified.

D-AID motif analysis (full cohort):

A custom in-house Python (version 3.6.1) program was used to determine whether target panel genes were enriched for somatic SNVs that are presumed to be caused by AICDA-mediated mutagenesis (Jones et al., 2001; Shirley et al., 2015). Mutations of interest were taken from the combined exome and target patient cohort (excluding validation target cases) and included all somatic SNV variants (based on criteria defined above) but without variant effect filters to allow for the inclusion of noncoding and silent mutations. Briefly, enrichment scores were calculated using the binomial exact test, specifically looking at mutations affecting the guanine-cytosine pair targeted by AICDA (G in RGYW motif). Enrichment scores were adjusted for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method. The algorithm and its application are fully described in Grande et al., 2019¹⁵.

E-Statistical analysis:

Categorical variables were summarized using frequencies and percentages and compared using the Chi-square test. Continuous variables were compared using the t-test. The frequencies of mutations were compared using a two-sided Fisher's exact test and the false discovery rate was calculated to account for multiple testing. Time to progression (TTP) was calculated from the date of diagnosis to the date of progression, a change of therapy that was not initially scheduled and due to lymphoma progression (radiotherapy, high-dose therapy with autologous stem cell transplantation and other unplanned treatments), or death from any cause. Disease specific survival (DSS) was calculated from date of diagnosis to date of death related to lymphoma. All statistical analyses were performed using the R package Stat.

F-Gene set enrichment analysis:

To gain further insight into the biology behind recurrently mutated genes, we used GSEA (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) to determine the overlap with other

gene sets within the Molecular Signatures Database (MSigDB: Hallmark and Canonical Pathways gene set).

G-Integration with RNAseq:

To complement our mutational analyses, we also looked at RNA-seq data from 37 bona-fide GZL cases assessed by exome or target sequencing as previously reported² and 14 PMBCL cases previously reported in Mottok et al.¹¹. RNA-seq reads were aligned to GRCh38 and per-gene counts were generated for each sample using the STAR aligner (version 2.5.3a_modified). Raw counts were read into R (version 3.6.2) using the DESeq2 package (version 1.26.0). Genes were retained for analysis if they had counts per million ≥ 1 in at least 5% of samples. Counts were normalized and log-transformed using variance stabilizing transformation (*vst* function) and were used to visualize expression patterns with the ComplexHeatmap package (version 2.2.0). PMBCL and DLBCL signature scores for each sample were calculated by taking the mean expression (normalized and log-transformed) of the corresponding Lymph3Cx signature genes¹⁶.

II-Supplementary Tables

Supplementary table 1: Clinical characteristics of cases with and without mutation data.

Characteristics	Grey Zone Lymphoma Dataset			
	GZL N=76	GZL No Mut. data, N=26	GZL Mut. Data, N=50	<i>p val, Chi2 (Mut. data vs no mut. data)</i>
Centre	LYSA: 67 CLC: 9	LYSA: 23 CLC: 3	LYSA: 44 CLC: 6	0.95
Mean Age (range) $\geq 60y$	46 y (14-90) 17 (22%)	45 y (20-85) 3 (12%)	46 y (14-90) 14 (28%)	0.1
Sex: F/M	41/35 (54%)	16/10 (62%)	25/25 (50%)	0.34

GZ-classification				0.45 (0 vs 1-2)
0	14 (18%)	6 (23%)	8 (16%)	
1	36 (48%)	17 (65%)	19 (38%)	
2	26 (34%)	3 (12%)	23 (46%)	
Mediastinal				0.24
Thymic	46 (64%)	17 (77%)	31 (63%)	
Med-Non-thymic	8	1	7	
Non-mediastinal	16	4	11	
NA	4	4	1	
Bulky				0.56
>=10cm	19 (/65, 29%)	6 (/24, 25%)	13 (/41, 32%)	
NA	11	2	9	
Ann Arbor Stage				0.4
1-2	34	10	24	
3-4	36	14	22	
LDH >UNL	34 / 30	8 / 12	26 / 18	0.16
aaIPI				0.28
0-1	42 (64%)	16 (73%)	26 (61%)	
2-3	24 (36%)	6 (27%)	18 (39%)	

aaIPI: age adjusted international Prognostic Index; LDH: Lactate dehydrogenase; UNL: upper normal limit; GZL: grey zone lymphoma; No Mut data: no mutation data; Mut Data: with mutation data. NA: not available

Supplementary table 2: Clinical characteristics of GZL based on thymic involvement status. Ch

Characteristic	GZL, N=50		
	Thymic, N=31	Non-Thymic, N=18	<i>p</i> val, Chi2 (thymic vs non-thymic)
Centre	LYSA: 29 CLC: 2	LYSA: 14 CLC: 4	0.1
Mean Age (range) >=60y	35 y (18-54) 0	63 y (14-87) 13	8.9 ^{e-7}
Sex: F/M	16/15	10/8	0.3
GZ-classification			
0	5 (16%)	3 (17%)	0 vs 1-2, p=0.96
1	15 (48%)	4 (22%)	0 vs 1 vs 2, p=0.16
2	11 (36%)	11 (61%)	
Ann-Arbor Stage			0.008
1-2	19 (68%)	5 (28%)	
3-4	9 (28%)	13 (72%)	
Extra-nodal site, N	5 (/28, 19%)	11 (/18, 58%)	0.003
Liver	0	3	
Lung	4	1	
Bone marrow	2	7	
Spleen involvement	0	5 (28%)	P<0.01
Bulky >=10cm	10 (/24, 42%)	3 (/17, 18%)	0.1
LDH >UNL	14 (/27, 52%)	12 (/17, 71%)	0.2
aaIPI			0.08
0-1	19 (70%)	7 (41%)	
2-3	8 (30%)	10 (59%)	

Supplementary table 3: MutSigCV analysis

hugo	expr	reptime	hic	N_nonsilent	N_silent	N_noncoding	n_nonsilent	n_silent	n_noncoding	nn	x	X	p	q
B2M	673122	428	36	29781	3186	0	10	0	0	22	1	751140	0,00	0,00
GNA13	811904	401	12	76410	20142	0	6	0	0	50	1	1312362	0,00	0,03
CD58	692758	418	19	52083	13527	0	3	0	0	50	0	1711530	0,00	0,08
CSF2RB	750264	469	44	174177	54054	0	4	0	0	50	0	1756161	0,00	0,44
SOCS1	632841	308	37	39420	13608	0	31	2	0	7	2	109188	0,00	0,67
ZNF217	142853	451	-30	213948	58428	0	7	1	0	50	2	1851498	0,00	1,00
NBPF6	NaN	NaN	NaN	19224	5886	0	2	0	0	50	3	1649808	0,00	1,00
TNFAIP3	315946	256	51	155871	41499	0	4	0	0	50	1	1537785	0,00	1,00
NFKBIE	1037256	312	54	89073	31293	0	3	0	0	50	0	1402515	0,00	1,00
CISH	583785	302	50	54756	17091	0	4	0	0	50	1	1451007	0,00	1,00
DUSP2	850399	251	48	58050	20169	0	3	0	0	50	1	2055348	0,00	1,00
EGR1	1202314	205	51	102492	32346	0	3	0	0	50	0	1548801	0,00	1,00
HLA-B	2552688	347	28	75681	23274	0	2	0	0	50	5	2168937	0,00	1,00
NONO	728362	NaN	26	93420	23598	0	2	0	0	50	0	2218266	0,00	1,00
ITPKB	508274	407	19	181035	55215	0	8	2	0	50	2	1617732	0,00	1,00
IRF2BP2	503819	149	31	107001	36396	0	5	2	0	44	3	1183464	0,00	1,00
PCBP1	686152	156	52	67770	20763	0	2	0	0	50	2	1257525	0,00	1,00
HEXIM1	806811	207	32	89505	19413	0	2	0	0	50	3	1723653	0,00	1,00
BCL2	207116	522	60	61911	15201	0	5	0	0	50	1	1208844	0,00	1,00
TNIP1	892080	382	27	145719	37368	0	2	0	0	50	0	1620054	0,00	1,00
SLC6A3	606209	490	30	129789	39285	0	2	0	0	50	0	2170881	0,00	1,00
ADAP1	737267	310	41	105435	29727	0	3	0	0	50	0	1691820	0,00	1,00
ARID1A	975965	182	27	440289	131436	0	4	0	0	37	0	1341495	0,00	1,00
SIAH2	348288	544	27	65070	18576	0	4	0	0	50	2	1614330	0,00	1,00
LTB	2517285	220	35	45954	14796	0	2	0	0	50	4	1547937	0,00	1,00
WEE1	553054	158	28	146772	34749	0	3	0	0	50	3	1684260	0,00	1,00
IRF4	208360	631	48	90855	24435	0	3	0	0	50	1	1409616	0,00	1,00
MAPK6	583597	153	23	125037	32211	0	2	0	0	50	0	1400976	0,00	1,00
TIGD3	4112809	242	50	86886	28323	0	2	0	0	50	2	1583064	0,00	1,00
GCNT4	479847	634	32	97929	22788	0	2	0	0	50	2	1749114	0,00	1,00
ABCC6	385823	188	23	276048	85050	0	3	0	0	49	0	1698111	0,00	1,00
LRRN3	65006	840	2	144855	38286	0	6	1	0	50	4	1504089	0,00	1,00
SHISA6	NaN	NaN	NaN	99684	30807	0	2	0	0	50	3	1674729	0,00	1,00

GOLGA8O	NaN	NaN	NaN	20925	5643	0	1	0	0	50	3	1649565	0,02	1,00
HIST1H4E	390169	544	57	18981	6615	0	1	0	0	50	1	1100358	0,02	1,00
HIST1H4H	390169	544	57	19386	6561	0	2	0	0	50	1	1100358	0,02	1,00
IKBKB	514464	361	44	192213	44118	0	3	0	0	50	0	1452978	0,02	1,00
FADD	765202	286	34	41634	12501	0	1	0	0	50	1	2100654	0,02	1,00
DSC2	213526	521	-12	179739	49842	0	2	0	0	50	1	1752678	0,02	1,00
CDA	631461	208	35	30537	7938	0	1	0	0	50	2	1648215	0,02	1,00
PTH2	2173457	290	44	19008	7263	0	1	0	0	50	0	1510164	0,02	1,00
TTC32	479338	390	9	43740	8937	0	1	0	0	50	1	2033451	0,03	1,00
RC3H2	407115	430	26	263493	67149	0	3	0	0	50	0	1833381	0,03	1,00
SSX1	603602	NaN	5	32022	7101	0	1	0	0	50	1	1438533	0,03	1,00
FRG2B	50016	525	-16	31590	8964	0	1	0	0	50	3	1805436	0,03	1,00
ARHGAP29	466144	327	-9	253935	67041	0	2	0	0	50	0	1688958	0,03	1,00
GUCA2B	418399	579	24	21438	6831	0	1	0	0	50	0	1523448	0,03	1,00
OAZ1	1603571	240	27	48168	11691	0	1	0	0	50	0	1731240	0,03	1,00
ASXL2	602691	287	31	275103	80865	0	2	0	0	50	0	1823742	0,03	1,00
DPM2	1441525	201	56	35532	8910	0	1	0	0	50	1	1466019	0,03	1,00
BTG1	114728	510	7	36801	9369	0	2	0	0	50	1	1474794	0,03	1,00
HIST1H1C	408919	685	43	39555	12960	0	1	0	0	50	0	1348110	0,03	1,00
EHMT2	2485614	188	36	246267	75735	0	3	0	0	50	2	1501281	0,03	1,00
LAPTM5	348498	411	35	48600	13770	0	2	0	0	50	0	1539675	0,03	1,00
STAT6	2122802	172	52	180630	46899	0	4	0	0	50	1	1490454	0,03	1,00
PRIMA1	311378	676	19	28269	8046	0	1	0	0	50	0	1748196	0,03	1,00
ISG15	1971475	239	15	32427	10098	0	1	0	0	50	0	1947537	0,03	1,00
POU4F3	388550	463	20	64206	19251	0	2	0	0	50	1	2288574	0,03	1,00
SNAI3	802673	189	41	54324	18171	0	1	0	0	50	0	1653102	0,03	1,00
REEP2	1196831	209	49	60237	17550	0	1	0	0	50	0	1805436	0,03	1,00
KRTAP8-1	30244	1055	-70	12285	3483	0	1	0	0	50	1	1082295	0,03	1,00
POM121L12	10922	1116	-24	54108	18144	0	3	0	0	50	3	1900854	0,03	1,00
LIN52	541052	236	43	27270	6534	0	1	0	0	50	0	1571859	0,03	1,00
SKA1	277376	392	52	54351	12771	0	1	0	0	50	0	1586682	0,03	1,00
NEUROG2	186926	647	22	52137	17334	0	1	0	0	50	0	1514268	0,03	1,00
APOF	2869106	184	52	61236	19278	0	1	0	0	50	1	2040471	0,04	1,00
TNFAIP8L3	285978	427	26	55701	15579	0	2	0	0	50	0	1558197	0,04	1,00
IGFL3	1177162	249	28	25002	6912	0	1	0	0	50	0	1324890	0,04	1,00
PTN	189251	879	-26	41283	9234	0	1	0	0	50	3	1678374	0,04	1,00

PHOX2B	308280	376	22	63099	19386	0	1	0	0	50	0	1698300	0,04	1,00
FGFR1OP2	408842	320	24	55269	12528	0	1	0	0	50	1	1728297	0,04	1,00
SIX3	133317	566	23	60426	19764	0	1	0	0	50	0	1607877	0,04	1,00
ANKRD16	649866	305	28	72603	19332	0	2	0	0	50	0	1916298	0,04	1,00
AMOT	25417	NaN	10	204120	60075	0	2	0	0	50	2	1937979	0,04	1,00
SPSB4	245950	574	22	57672	17226	0	2	0	0	50	0	1511892	0,04	1,00
IL27	1133167	269	63	45414	15336	0	1	0	0	50	3	1765854	0,04	1,00
DYNAP	NaN	NaN	NaN	42984	11988	0	1	0	0	50	3	1655910	0,04	1,00
CEBPE	1261207	185	41	56673	16929	0	1	0	0	50	1	1675917	0,04	1,00
KRTAP9-6	NaN	NaN	NaN	13473	3429	0	1	0	0	50	3	1647351	0,04	1,00
SRSF2	NaN	NaN	NaN	43146	14121	0	2	0	0	50	3	1658043	0,04	1,00
PAGE4	257202	NaN	7	22086	5616	0	1	0	0	50	1	1594404	0,04	1,00
OR2F1	368507	732	-11	56673	17631	0	1	0	0	50	0	1391067	0,04	1,00
AEN	393645	605	14	69336	19764	0	2	0	0	50	0	1697058	0,04	1,00
EMD	2277674	NaN	40	52704	14013	0	2	0	0	50	1	1513593	0,04	1,00
ZNF684	693560	457	26	78111	17793	0	1	0	0	50	0	1901961	0,04	1,00
DERL1	470881	412	33	54621	13824	0	1	0	0	50	1	1544913	0,04	1,00
RAB5C	2150553	206	33	57348	15984	0	1	0	0	50	1	1610577	0,04	1,00
NFKBIA	416091	125	31	63072	16497	0	3	0	0	50	3	1503873	0,04	1,00
POU2AF1	238940	567	19	56025	16146	0	1	0	0	50	0	1324053	0,04	1,00
SPATA17	87153	966	-21	73548	17847	0	1	0	0	50	1	2041308	0,04	1,00
MZB1	NaN	NaN	NaN	46440	8910	0	1	0	0	50	3	1652832	0,04	1,00
SPDYE2	NaN	NaN	NaN	14364	3699	0	1	0	0	50	3	1647621	0,04	1,00
CIITA	299383	410	38	217215	69336	0	2	0	0	50	1	1556847	0,04	1,00
PDCL2	237456	456	32	45360	9963	0	1	0	0	50	0	2073627	0,04	1,00
HIST1H1B	228884	634	40	42255	13608	0	2	0	0	50	1	1146609	0,04	1,00
ACTB	1906749	195	34	77598	21303	0	2	0	0	50	0	1774008	0,04	1,00
HIST1H1D	390169	544	57	41337	13311	0	2	0	0	50	1	1100358	0,04	1,00
CXCL6	233432	444	6	24003	7668	0	1	0	0	50	1	1586601	0,04	1,00
TRAJ48	NaN	NaN	NaN	3672	1269	0	1	0	0	6	0	161649	0,04	1,00
RGS1	269711	604	-12	46467	11529	0	1	0	0	50	2	1406295	0,04	1,00
UBL3	322680	335	21	36288	6237	0	1	0	0	50	0	1592757	0,04	1,00
BVES	108905	702	-1	75303	18738	0	1	0	0	50	0	1686501	0,04	1,00
CDK4	1160849	344	39	72144	17874	0	1	0	0	50	0	1614087	0,04	1,00
BHLHA15	464632	375	26	34857	11907	0	1	0	0	50	0	1524258	0,04	1,00
CLDN18	160932	572	6	67932	18441	0	1	0	0	50	0	1501173	0,05	1,00

BARX2	28721 4	440	-19	73845	18684	0	2	0	0	50	0	16206 75	0,0 5	1,0 0
DNAJA2	49887 3	362	13	87021	21384	0	1	0	0	50	0	18967 77	0,0 5	1,0 0
BUB3	21380 9	769	0	68796	17982	0	1	0	0	50	0	14876 73	0,0 5	1,0 0
DEFB112	65301	1242	-3	22356	5670	0	1	0	0	50	1	14155 83	0,0 5	1,0 0
BEX2	45595 4	NaN	17	36450	7803	0	1	0	0	50	0	15375 42	0,0 5	1,0 0
RILP	13612 71	198	27	74979	23841	0	1	0	0	50	0	16080 39	0,0 5	1,0 0
RALY	87317 1	398	61	64476	18225	0	2	0	0	50	1	16075 26	0,0 5	1,0 0
CD83	21038 0	594	40	40770	11745	0	2	0	0	50	3	13478 67	0,0 5	1,0 0
GPR137C	35648 8	313	14	83646	24894	0	2	0	0	50	0	17338 05	0,0 5	1,0 0
PROCR	13464 35	168	46	45441	14418	0	1	0	0	50	0	18124 29	0,0 5	1,0 0
HLA-DPB1	14790 00	431	28	57051	15390	0	1	0	0	50	1	13732 47	0,0 5	1,0 0
RIBC2	46072 4	199	8	77031	18981	0	2	0	0	50	0	15650 82	0,0 5	1,0 0
GRIN3A	11181 6	1063	-27	226100	64232	0	2	0	0	50	3	23773 40	0,0 4	1,0 0

Supplementary table 4: Mutation frequencies and Fisher's exact test between different groups (Excel file).

- Group 0 and bona-fide GZL,
- Group 1 and group 2 GZL,
- thymic and non-thymic cases,
- thymic and cHL/PMBCL,
- non-thymic and cHL/PMBCL,
- GZL vs polymorphic EBV DLBCL.

Supplementary table 5: GSEA analysis

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	Genes in Overlap	p-value	FDR q-value
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	Genes up-regulated in response to IFNG [GeneID=3458].	4 (<i>TNFAIP3</i> , <i>SOCS1</i> , <i>CSF2RB</i> , <i>B2M</i>)	8.29 e ⁻⁶	4.14 e ⁻⁴
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	Genes regulated by NF-kB in response to TNF [GeneID=7124].	3 (<i>TNFAIP3</i> , <i>EGR1</i> , <i>NFKBIE</i>)	2.94 e ⁻⁴	7.35 e ⁻³
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	Genes up-regulated by IL6 [GeneID=3569] via STAT3 [GeneID=6774], e.g., during acute phase response.	2 (<i>SOCS1</i> , <i>CSF2RB</i>)	1.47 e ⁻³	2.45 e ⁻²

GSEA using genes mutated in 10% or more of the exome cohort (N=21 cases, 26 genes)

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	Genes in Overlap	p-val.	FDR q-val
HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	Genes up-regulated in response to IFNG [GeneID=3458].	6 (<i>BTG1</i> , <i>TNFAIP3</i> , <i>NFKBIA</i> , <i>SOCS1</i> , <i>CSF2RB</i> , <i>B2M</i>)	7.95 e ⁻⁹	3.98 e ⁻⁷
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	Genes regulated by NF-kB in response to TNF [GeneID=7124].	4 (<i>BTG1</i> , <i>TNFAIP3</i> , <i>NFKBIA</i> , <i>NFKBIE</i>)	1.53 e ⁻⁵	3.83 e ⁻⁴
HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING	Genes up-regulated by STAT5 in response to IL2 stimulation.	3 (<i>SOCS1</i> , <i>BCL2</i> , <i>CISH</i>)	4.53 e ⁻⁴	2.91 e ⁻³
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	Genes defining early response to estrogen.	3 (<i>BCL2</i> , <i>CISH</i> , <i>NCOR2</i>)	4.6 e ⁻⁴	2.91 e ⁻³
HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE	Genes defining late response to estrogen.	3 (<i>BCL2</i> , <i>CISH</i> , <i>NCOR2</i>)	4.6 e ⁻⁴	2.91 e ⁻³
HALLMARK_HYPOXIA	Genes up-regulated in response to low oxygen levels (hypoxia).	3 (<i>BTG1</i> , <i>TNFAIP3</i> , <i>BCL2</i>)	4.6 e ⁻⁴	2.91 e ⁻³
HALLMARK_P53_PATHWAY	Genes involved in p53 pathways and networks.	3 (<i>BTG1</i> , <i>SOCS1</i> , <i>TP53</i>)	4.6 e ⁻⁴	2.91 e ⁻³

HALLMARK_WNT_BETA_CATENIN_SIGNALING	Genes up-regulated by activation of WNT signaling through accumulation of beta catenin CTNNB1 [GeneID=1499].	2 (<i>NCOR2, TP53</i>)	4.65 e ⁻⁴	2.91 e ⁻³
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	Genes up-regulated by IL6 [GeneID=3569] via STAT3 [GeneID=6774], e.g., during acute phase response.	2 (<i>SOCS1, CSF2RB</i>)	1.98 e ⁻³	1.1 e ⁻²
HALLMARK_UV_RESPONSE_UP	Genes up-regulated in response to ultraviolet (UV) radiation.	2 (<i>BTG1, NFKBIA</i>)	6.35 e ⁻³	3.17 e ⁻²

GSEA using genes mutated in 10% or more of the full cohort (N=50 cases, 29 genes)

Supplementary table 6 : Treatment

Data (% total)	All, N=65 (93%)	GZL, N=48 (96%)	EBV, N=17 (85%)
Chemo	64* (99%)	48 (100%)	16* (94%)
Rituximab-Chemo	53 (82%)	39 (81%)	14 (82%)
R-CHOP-like	49 (75%)	38 (80%)	11 (65%)
ABVD or escBEACOPP	13 (20%)	9 (19%)	4 (24%)
Intensive**			
Yes	29	23 (48%)	6 (35%)
No	36	25 (52%)	11 (65%)

*One patient treated with R alone (EBV-lymphoma)

** : Intensive strategy: Yes=R-ACVBP, R-DAEPOCH, escBEACOPP; No= RCHOP/ABVD/RCEOP

Chemo : chemotherapy

Supplementary table 7: Outcome

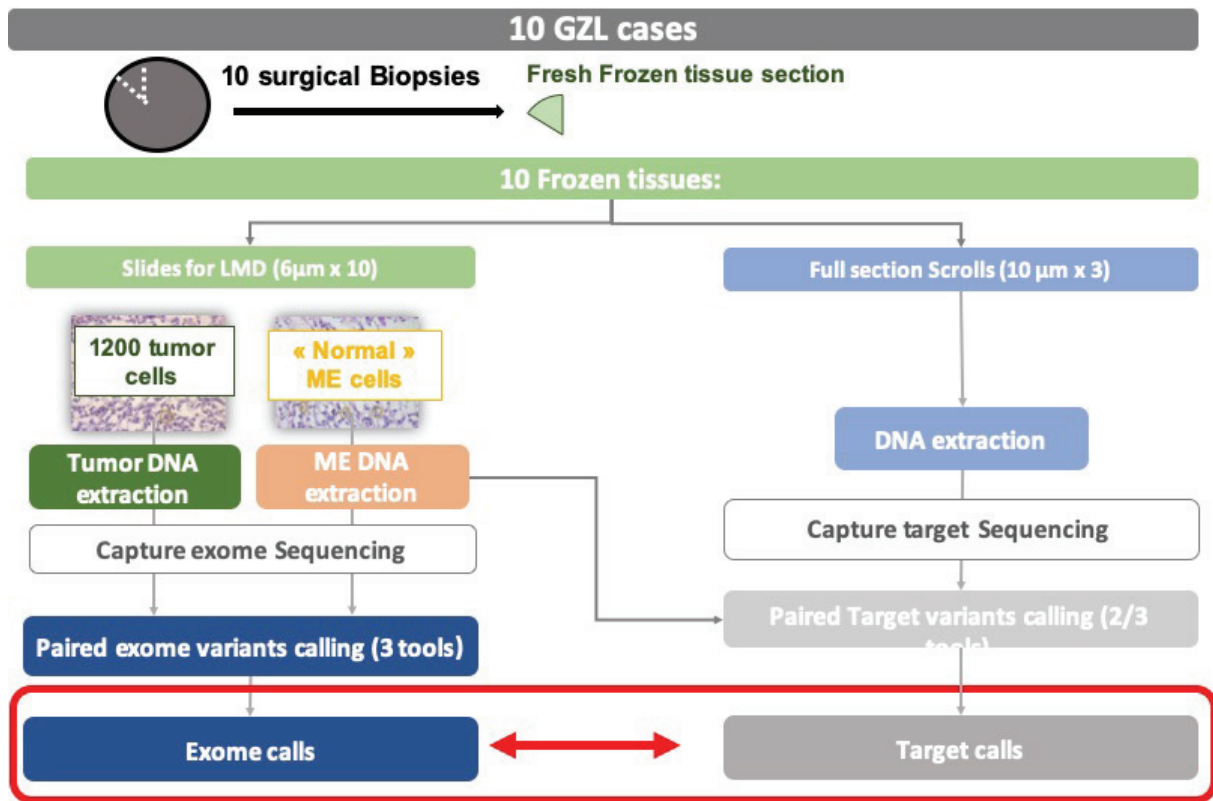
Feature	beta	HR (95% CI for HR)	wald.test	p.value	Type	inv_Log10p_value	log10HR	Variable
PS (>=2)	1.3	3.5 (1.5-8.5)	7.9	0.005	clinical	2.301	0.565	TTP
SOCS1B2M	1.3	3.5 (1.5-8.9)	7.8	0.005	mutation	2.28	0.565	TTP
NbMut (> 17)	1.2	3.4 (1.4-7.9)	7.7	0.0056	Mutation_count	2.252	0.521	TTP
NbMut (Continuous)	0.035	1 (1-1.1)	7.1	0.0078	Mutation_count	2.108	0,015	TTP
B2M	1.1	2.9 (1.2-6.7)	6	0.014	mutation	1.854	0.478	TTP
NbMutUniq	0.049	1.1 (1-1.1)	5	0.025	Mutation_count	1.602	0.021	TTP
SOCS1	0.94	2.6 (1.1-5.9)	4.8	0.029	mutation	1.538	0.408	TTP
LRRN3	0.92	2.5 (1-6.2)	4	0.045	mutation	1.347	0.400	TTP
Hb (<120)	0.84	2.3 (0.88-6.1)	2.9	0.091	clinical	1.041	0.365	TTP
GNA13	0.72	2.1 (0.86-4.9)	2.6	0.11	mutation	0.959	0.313	TTP
NFKBIA	0.75	2.1 (0.83-5.4)	2.4	0.12	mutation	0.921	0.326	TTP
SEX	0.67	2 (0.8-4.8)	2.2	0.14	clinical	0.854	0.291	TTP
aalPI	0.57	1.8 (0.72-4.4)	1.5	0.22	clinical	0.658	0.248	TTP
Mass (10cm)	0.55	1.7 (0.63-4.8)	1.1	0.29	clinical	0.538	0.239	TTP
SPEN	0.45	1.6 (0.53-4.6)	0.66	0.41	mutation	0.387	0.195	TTP
CD163	0.0086	1 (0.98-1)	0.39	0.53	clinical	0.276	0.004	TTP
STAT6	0.29	1.3 (0.49-3.6)	0.33	0.57	mutation	0.244	0.126	TTP
TNFAIP3	0.27	1.3 (0.48-3.6)	0.28	0.59	mutation	0.229	0.117	TTP
Class (0vs1-2)	-0.24	0.79 (0.27-2.3)	0.18	0.67	clinical	0.174	-0.104	TTP
EBV	0.17	1.2 (0.46-3)	0.13	0.72	clinical	0.143	0.074	TTP
Thymic	0.038	1 (0.45-2.4)	0.01	0.93	clinical	0.032	0.017	TTP
Stage (1-2 vs 3-4)	0.29	1.3 (0.56-3.2)	0.43	0.51	clinical	0.29	0.12	TTP
PS (>=2)	0.55	1.7 (0.49-6.2)	0.73	0.39	clinical	0.409	0.239	DSS
SOCS1B2M	0.11	1.1 (0.34-3.6)	0.03	0.86	mutation	0.065	0.048	DSS
Class (0vs1-2)	-0.26	0.77 (0.17-3.6)	0.11	0.74	clinical	0.131	-0.113	DSS
EBV	0.67	2 (0.57-6.7)	1.1	0.29	clinical	0.538	0.291	DSS
SEX	0.46	1.6 (0.46-5.5)	0.54	0.46	clinical	0.337	0.200	DSS
Thymic	-1.3	0.27 (0.071-1)	3.7	0.053	clinical	1.276	-0.565	DSS

Mass (10cm)	-20	3.1e-09 (0-Inf)	0	1	clinical	0.000	-8.686	DSS
aaIPI	0.68	2 (0.53-7.3)	1	0.32	clinical	0.495	0.295	DSS
CD163	0.026	1 (0.99-1.1)	1.6	0.21	clinical	0.678	0.011	DSS
Hb (<120)	1.2	3.4 (0.71-16)	2.4	0.13	clinical	0.886	0.521	DSS
SOCS1	-0.43	0.65 (0.17-2.5)	0.4	0.53	mutation	0.276	-0.187	DSS
B2M	0.93	2.5 (0.77-8.3)	2.3	0.13	mutation	0.886	0.404	DSS
GNA13	-19	3.5e-09 (0-Inf)	0	1	mutation	0.000	-8.252	DSS
TNFAIP3	-0.95	0.39 (0.05-3)	0.82	0.37	mutation	0.432	-0.413	DSS
LRRN3	-0.16	0.85 (0.18-3.9)	0.04	0.84	mutation	0.076	-0.069	DSS
SPEN	1.4	3.9 (1.1-13)	4.7	0.031	mutation	1.509	0.608	DSS
STAT6	0.097	1.1 (0.24-5.1)	0.02	0.9	mutation	0.046	0.042	DSS
NFKBIA	-0.76	0.47 (0.06-3.7)	0.53	0.47	mutation	0.328	-0.330	DSS
NbMut (continuous)	-0.0061	0.99 (0.95-1)	0.06	0.81	Mutation_count	0.092	-0.003	DSS
NbMutUniq	-0.0037	1 (0.93-1.1)	0.01	0.92	Mutation_count	0.036	-0.002	DSS
NbMut (>17)	0.25	1.3 (0.34-4.9)	0.14	0.71	Mutation_count	0.149	0.109	DSS
Stage (1-2 vs 3-4)	1.0	2.8 (0.72-11)	2.2	1.14	clinical	0.85	0.43	DSS

aaIPI: age adjusted IPI; PS: ECOG performans status; NbMut: number of mutation; NbMutUniq: number of gene mutated; Mass : Bulky ≥ 10 cm; Class: pathological classification (group 0 vs group 1-2); Stage : Ann Arbor stage 1-2 vs 3-4; LDH: lactate dehydrogenase greater than upper limit value.

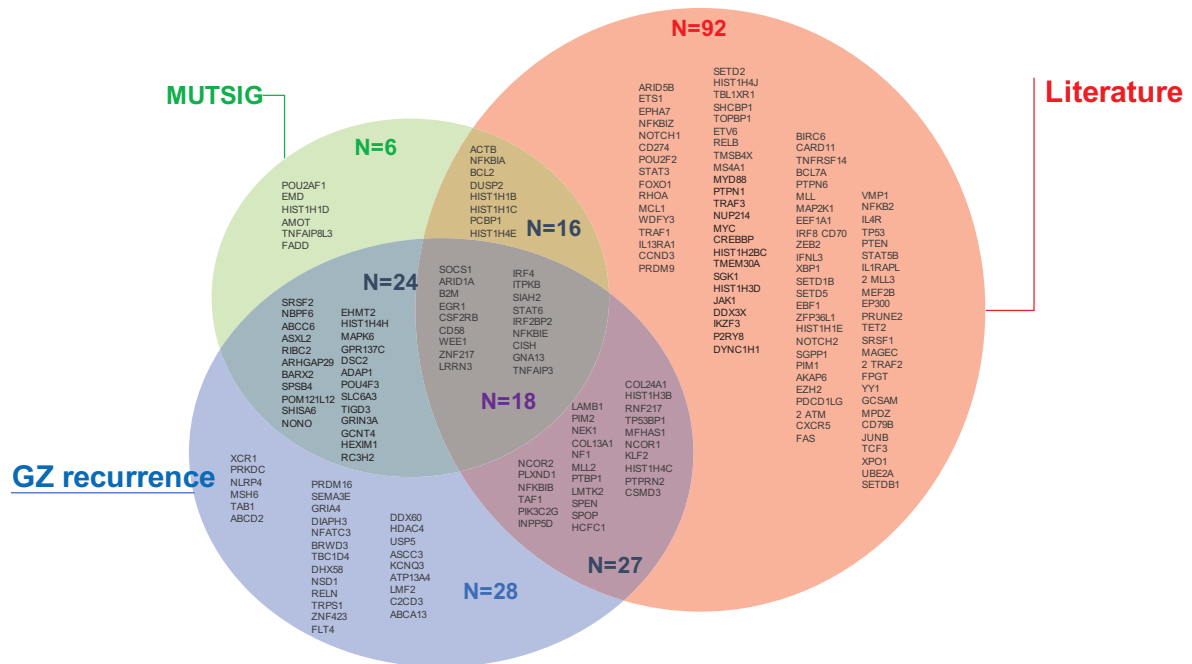
III-Supplementary Figures:

Supplementary figure 1: Exome/targeted sequencing validation strategy



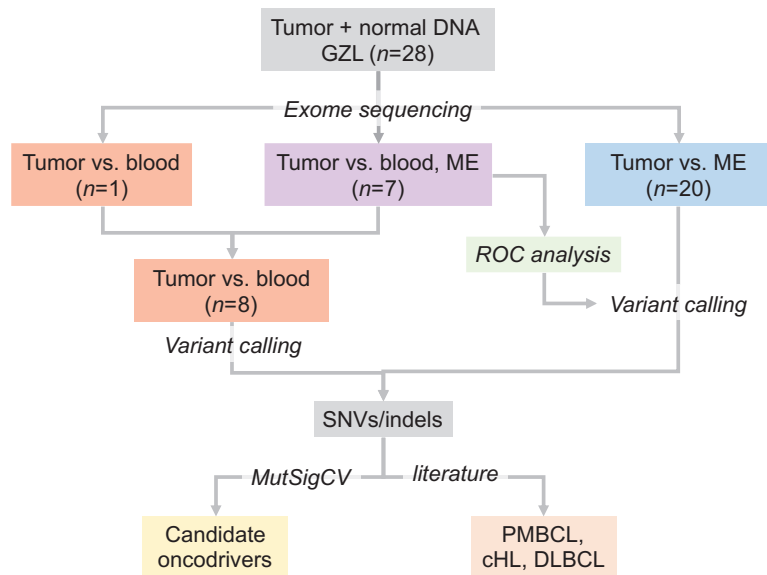
To systematically compare exome and target variant calls, we examined 10 cases, for which DNA was extracted from the same tissue source using two different methods: laser-microdissected tumor cells (exome sequencing) and full sections (targeted deep sequencing) (see supplementary figure 5).

Supplementary figure 2: 217 genes in the capture target sequencing panel:



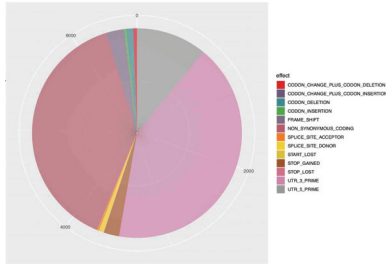
See section I.C.1 for inclusion rationale: based on exome data (MutSigCV candidates (“MUTSIG”) and mutation frequencies (“recurrence”)) and literature data (“Literature”).

Supplementary figure 3: Workflow for calling variants in exomes

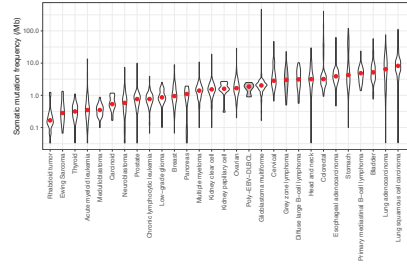


Supplementary figure 4: Mutation burden in the exomes: GZL vs polymorphic-EBV-L

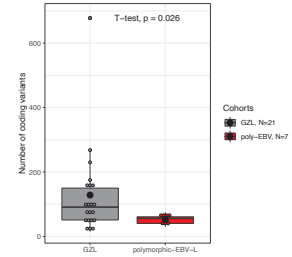
Supplementary Figure 4A:



Supplementary Figure 4C:



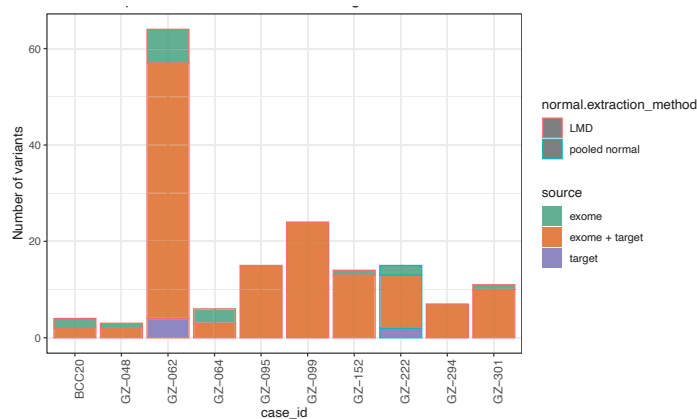
Supplementary Figure 4B:



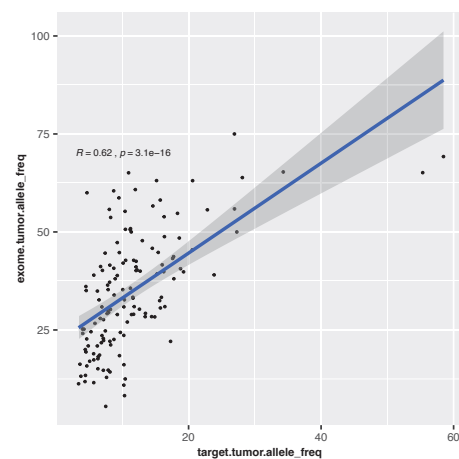
A) A total of 6499 variants were identified, including 3060 coding, 2735 3' UTR and 704 5' UTR variants, with a mean of 232 (range 28-2080) and 109 (range 15-678) total and coding variants per sample, respectively. B) The overall mutation load in the exome capture space for the GZL cases was 3 mutations/Mbp, significantly greater than for poly-EBV-L cases with 1.9 mutations/Mbp ($p=0.001$). C) Concordantly, Poly-EBV-L cases had fewer coding variants compared to GZL cases (mean 52 vs. 128, $p=0.026$, coverage 75X vs. 101X).

Supplementary figure 5: Validation of the LMD exome variants.

Supplementary Figure 5A



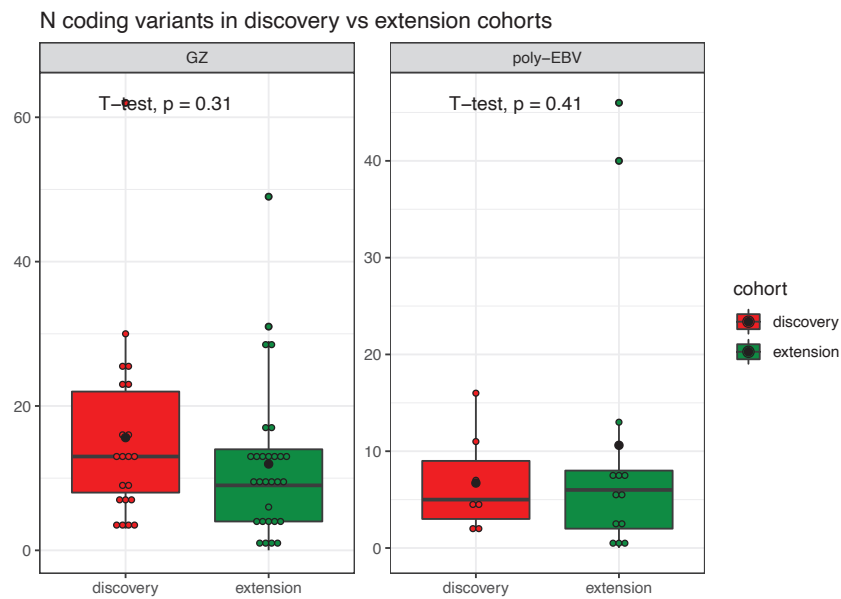
Supplementary Figure 5B



For 10 cases submitted for laser-microdissection and paired exome sequencing, DNA was extracted a second time from the full section of the same piece of frozen tissue and submitted

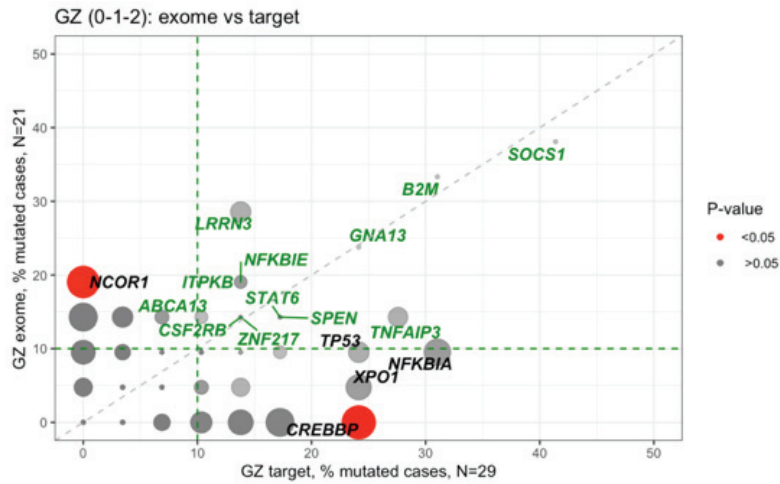
for capture sequencing. The overall concordance was 90% (148/165 of exome calls were also detected by the target calling strategy) with a linear correlation between the variant allele frequencies within both exome and target sequencing. A detailed IGV inspection confirmed that the 17 variants not detected were present in the target sequencing reads, but with support filtered out by one or more variant callers.

Supplementary figure 6: Number of variants in exome versus target cohorts.



Number of variants in the discovery (exome) and extension (target) cohorts (GZL and poly-EBV-L samples). The mean number of coding mutations per case was similar between the discovery and extension cohort in all samples (13.3 vs 11.5, $p=0.54$) as well as in GZL ($p=0.31$) or poly-EBV-L ($p=0.41$) cohorts.

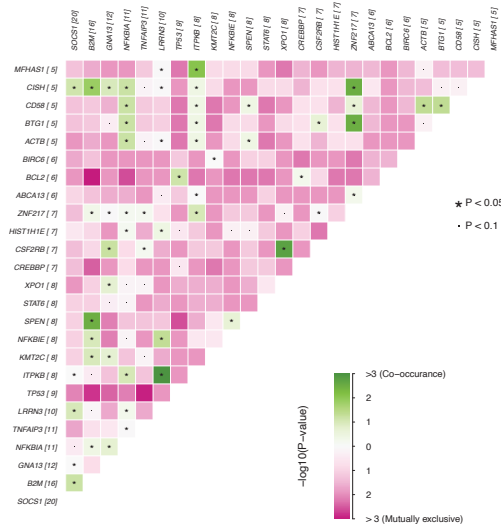
Supplementary figure 7: Frequencies of mutations in discovery vs extension cohorts.



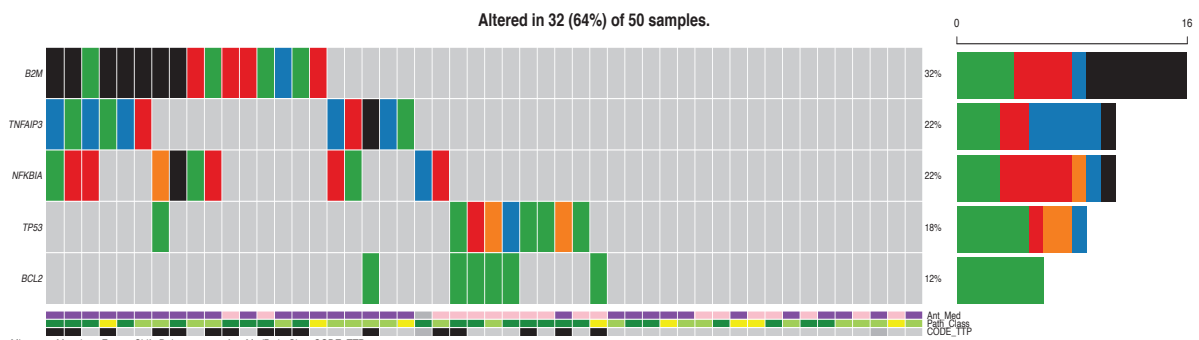
Details of the statistical analysis are provided in supplementary table 4.

Pairwise (Fisher test) comparison of the incidence of mutations within exome cases (discovery cohort, N=21), versus target (extension cohort, N=29). The size of the bubble is inversely correlated to the p value. Significant results ($p < 0.05$) are colored in red. After FDR testing for the 17 genes mutated in 20% or more of the cases *NCOR1* and *CREBBP* mutations were not significantly distinct anymore ($q.val=0.2$ each).

Supplementary figure 8: Mutual exclusivity in GZL

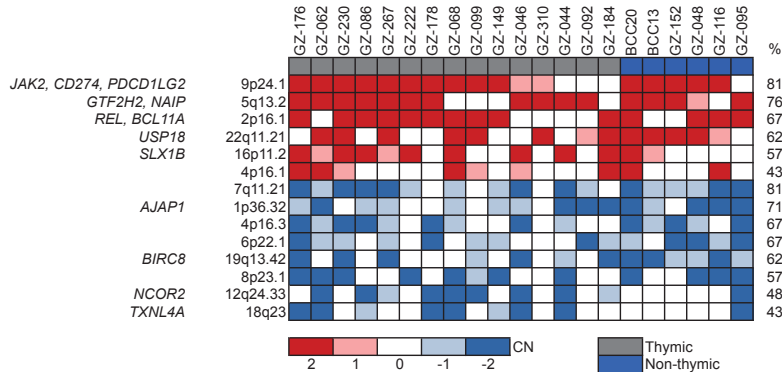


Panel A: A mutual exclusivity / co-occurrence analysis was performed across 50 GZL samples and 217 genes.



Panel B: The mutual exclusivity / co-occurrence analysis revealed a split based on the presence of *TP53/BCL2* mutations vs *B2M/TNFAIP3/NFKBIA* mutations. This split seems to be associated with the clinical presentation (anterior mediastinal or thymic niche involvement (thymic in pink and non-thymic in purple)).

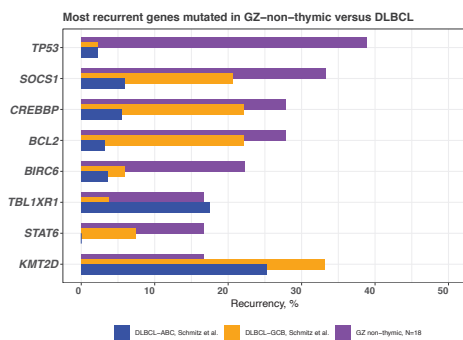
Supplementary figure 9: Copy number variation in GZL.



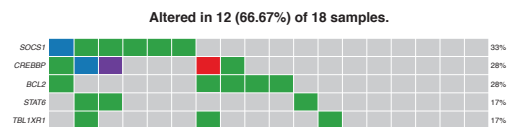
Significant CNAs in GZL exomes, as assessed by CNVkit and GISTIC. Samples have been ordered by thymic involvement and amplification / deletion status. Genes have been ordered by recurrence. Red indicates copy number gain and blue copy number loss

Supplementary figure 10: Non-thymic GZL and DLBCL GCB vs ABC.

Supplementary Figure 10A



Supplementary Figure 10B



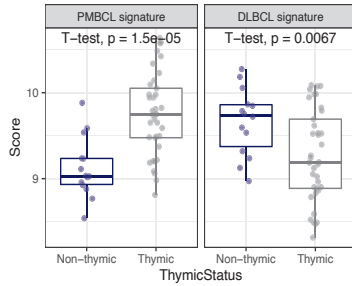
Panel A: bar-plot representing the incidence of mutations within non-thymic GZL compared to GCB and ABC DLBCL (as reported in Schmitz et al¹⁷), for genes mutated in 15% or more of non-thymic GZL.

Panel B: cumulative incidence of mutations “GCB” genes among non-thymic DLBCL.

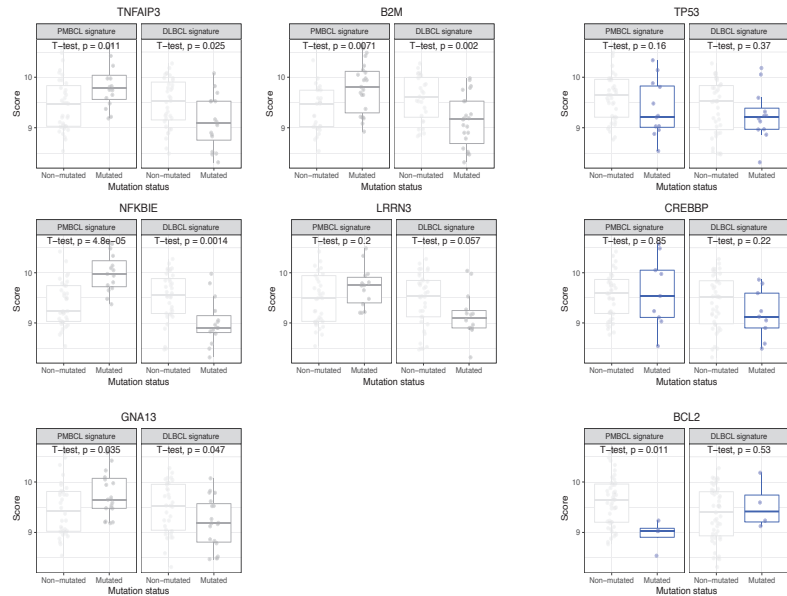
DLBCL, Diffuse large B cell lymphoma; ABC: activated B cell ; GCB : germinal center B cell

Supplementary figure 11: PMBCL and DLBCL gene expression signature.

Supplementary Figure 11A



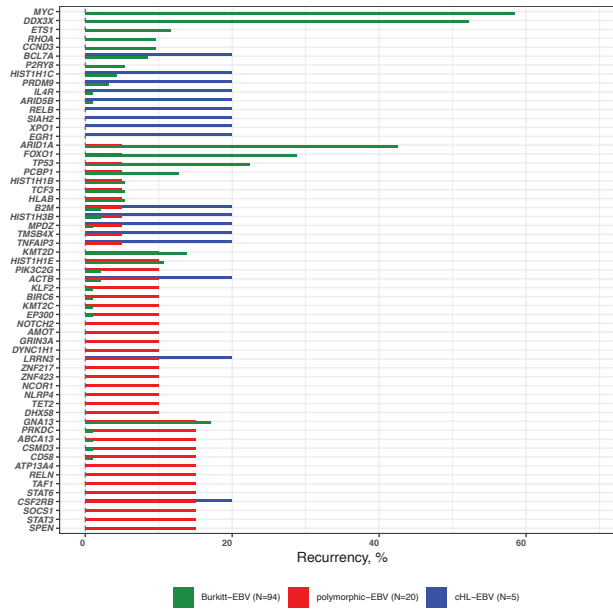
Supplementary Figure 11B



Panel A: A PMBCL and DLBCL gene expression signature was calculated for each sample by taking the mean expression levels of PMBCL- and DLBCL-specific genes as described in the Lymph3Cx assay¹⁶. Each dot represents a sample, and samples are grouped into thymic (PMBCL cases and Group 1 and 2 GZL cases) and non-thymic (Group 1 and 2 GZL cases). Group 0 GZL cases had low tumor content and were therefore excluded to avoid confounding the interpretation.

Panel B: PMBCL and DLBCL gene expression signature scores for each patient (PMBCL and GZL) based on mutation status (mutated or non-mutated) of genes associated with thymic/non-thymic status in our dataset (see Figure 3: *TNFAIP3*, *B2M*, *GNA13*, *NFKBIA* or *LRRN3* were selected as associated with thymic cases; *BCL2*, *TP53* and *CREBBP* with non-thymic cases).

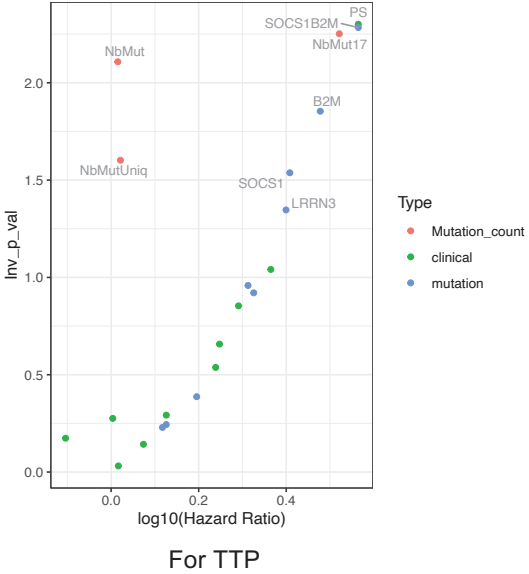
Supplementary figure 12: Comparison of frequencies of mutations within poly-EBV-L, EBV-BL, and EBV-cHL.



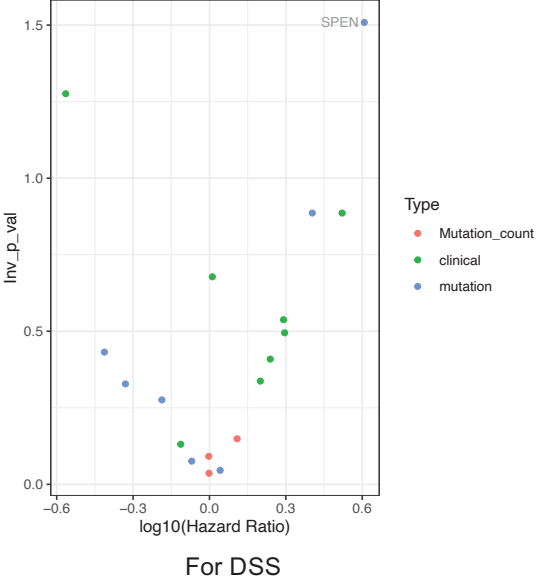
Frequencies of mutations in polymorphic EBV DLBCL NOS (poly-EBV-L, N=20), EBV-BL (Burkitt lymphoma, N=94)¹⁵, and EBV related cHL^{9,10} (classical Hodgkin lymphoma, N=5). Of note, * *ID3* and *FBXO11* are not in the panel, but were not mutated within the 7 exomes cases.

Supplementary figure 13: Time to progression univariate analysis.

Supplementary Figure 13A

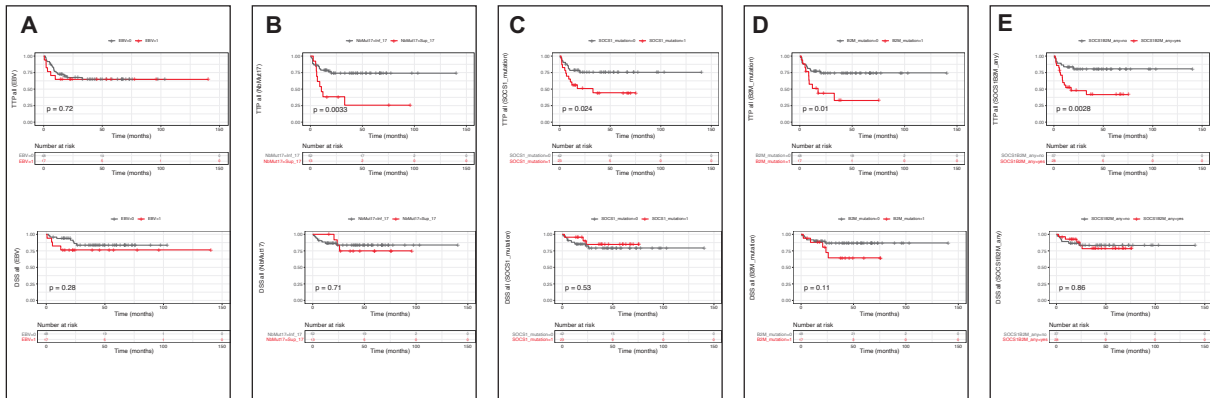


Supplementary Figure 13B



Variables included in the univariate analysis: 1-Clinical variable: ECOG-PS, Path group, EBV status, Gender, Mediastinal/thymic inv., Bulky (10 cm), IPI (0-1 vs 2-3), Hemoglobin (<120mg), CD163 (continuous staining), 2-Gene with a Mutation in > 15% of the full cohort (8 genes: *SOCS1*, *B2M*, *GNA13*, *TNFAIP3*, *LRRN3*, *SPEN*, *STAT6*, *NFKBIA*), Total number of mutations (continuous variable: NbMut, number of mutation (as a continuous variable) and unique per gene: NbMutUniq, cut-off 17 mutations: NbMut17).

Supplementary figure 14: Outcome curves for time to progression and disease specific survival.



Panel A: TTP and DSS based on EBV status

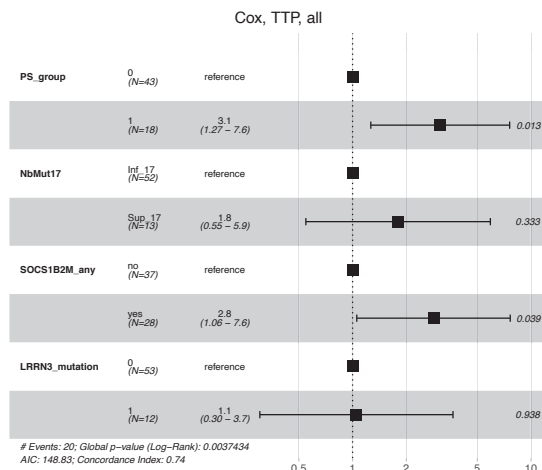
Panel B: TTP and DSS based on the total number of mutations (more or less than 17)

Panel C: TTP and DSS based on the presence of SOCS1 mutations

Panel D: TTP and DSS based on the presence of B2M mutations

Panel E: TTP and DSS based on the presence of SOCS1 and/or B2M mutations

Supplementary figure 15: COX model.



In the Cox model, variables significantly associated with a shorter TTP in univariate analysis were included; *SOCS1* and *B2M* mutations were analyzed jointly.

Supplementary data, References

1. Sarkozy C, Copie-Bergman C, Damotte D, et al. Gray-zone Lymphoma between cHL and Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2019;43(3):.
2. Sarkozy C, Chong L, Takata K, et al. Gene expression profiling of gray zone lymphoma. *Blood Adv.* 2020;4(11):2523–2535.
3. Koboldt DC, Chen K, Wylie T, et al. VarScan: variant detection in massively parallel sequencing of individual and pooled samples. *Bioinformatics.* 2009;25(17):2283–2285.
4. Saunders CT, Wong WSW, Swamy S, et al. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics.* 2012;28(14):1811–1817.
5. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat. Biotechnol.* 2013;31(3):213–219.
6. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature.* 2013;499(7457):214–218.
7. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS Comput. Biol.* 2016;12(4):.
8. Mermel CH, Schumacher SE, Hill B, et al. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol.* 2011;12(4):R41.
9. Tiacci E, Ladewig E, Schiavoni G, et al. Pervasive mutations of JAK-STAT pathway genes in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2018;131(22):2454–2465.
10. Reichel J, Chadburn A, Rubinstein PG, et al. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood.* 2015;125(7):1061–1072.
11. Mottok A, Hung SS, Chavez EA, et al. Integrative genomic analysis identifies key pathogenic mechanisms in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood.* 2019;134(10):802–813.
12. Dubois S, Viailly PJ, Mareschal S, et al. Next-generation sequencing in diffuse large B-cell lymphoma highlights molecular divergence and therapeutic opportunities: A LYSA study. *Clin. Cancer Res.* 2016;22(12):2919–2928.
13. Mansouri L, Noerenberg D, Young E, et al. Frequent NFKBIE deletions are associated with poor outcome in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Blood.* 2016;128(23):2666–2670.
14. Chapuy B, Stewart C, Dunford AJ, et al. Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. *Nat. Med.* 2018;24(5):679–690.
15. Grande BM, Gerhard DS, Jiang A, et al. Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma. *Blood.*

2019;133(12):1313–1324.

16. Mottok A, Wright G, Rosenwald A, et al. Molecular classification of primary mediastinal large B-cell lymphoma using routinely available tissue specimens. *Blood*. 2018;132(22):2401–2405.
17. Schmitz R, Wright GW, Huang DW, et al. Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2018;378(15):1396–1407.

DISCUSSION

I. Données morphologiques :

I.A. Principe de la classification et définition des cas « frontières » parmi les LFF :

La première partie du travail a consisté en une description anatomopathologique ainsi que des principales anomalies cytogénétiques retrouvées (locus de *JAK2/PDL1-2* et *CIITA*) au sein des LFF. Ce travail a été rapporté en 2019 (Clémentine Sarkozy et al. 2019). Un effort important a été fait pour permettre une inclusion des cas reposant sur une revue centralisée et internationale, afin de s'affranchir des biais liés aux cohortes uni-centriques.

Afin de permettre une analyse supervisée et intégrée des données d'expression génique et de mutations avec des patterns morphologiques particuliers, nous avons élaboré une classification en 4 groupes, reposant sur la morphologie (spectre entre LHC et LBPM/LBDGC) et l'IHC.

Comme pour toute classification reposant sur la morphologie, la reproductibilité est une critique potentielle. Celle-ci a été évaluée lors d'une réunion avec pathologistes français (ATG) et Nord-américain/Japonais où des cas du LYSA ont été reclassés en aveugle par les pathologistes de la BCCA. Pour 17 des 20 cas proposés, la classification proposée était la même. Les points de discussion étant sur l'appartenance des formes EBV+ au spectre des LFF versus LBDGC-EBV+ (2 cas, cf. infra). Ce point sera finalement tranché plus tard dans le travail, les cas EBV étant considérés dans un deuxième temps comme des LBDGC-EBV de morphologie polymorphe.

Selon la classification OMS(Swerdlow et al. 2016), les LFF présentent une morphologie intermédiaire entre LHC et LBDGC, plus particulièrement LBPM : cette définition correspond aux groupes 1 et 2 dans notre classification, ainsi appelés « bona-fide » LFF. Il est également décrit dans la classification des LFF des cas présentant un aspect cytologique de LHC avec une expression intense et diffuse des marqueurs B, CD20 et CD79A. A l'inverse, les LHC sont supposés n'exprimer le CD20 que de manière faible et hétérogène(Swerdlow et al. 2016)

comme rapporté dans les séries de la littérature (Benharroch, Nalbandyan, and Lazarev 2015; Canioni et al. 2009; Tzankov et al. 2003). Cependant, pour certains pathologistes, l'expression du CD20 n'est pas suffisante (même de manière diffuse) pour faire porter le diagnostic de LFF (Pilichowska et al. 2017). Ainsi, l'appartenance des groupes 0 au spectre des LFF versus LHC a été critiquée dans ce travail et est débattue dans la littérature. Il est important de noter que dans cette cohorte, la moitié des patients classés dans le groupe 0 ont reçu un traitement de type LBDGC avec du rituximab, reflétant bien le débat. L'identification de ces cas est donc importante et est à prendre en compte dans la décision thérapeutique.

Afin de clarifier ces points et de répondre à la question à l'aide du PEG/mutationnel, nous avons volontairement inclus des cas « extrêmes » ne présentant pas de morphologie intermédiaire perse, mais un phénotype discordant (groupe 0 et 3) afin d'étudier leur PEG et ainsi de définir s'ils devaient ou non faire partie du spectre des LFF.

I.B. LBDGC-EBV+ polymorphes, ou LFF-EBV+ ?

Un des points majeurs dans ce premier manuscrit est l'appartenance des cas EBV+ et présentant une morphologie intermédiaire entre LHC et LBDGC à la classification des LFF ou bien à celle des LBDGC-EBV+. Des cas de LFF EBV+ ont été rapportés dans la littérature (Ahmed A. Elsayed et al. 2017), et la classification WHO mentionne que 4% des cas de LFF sont EBV+ (Swerdlow et al. 2016), principalement en lien avec l'article d'E. Jaffe (Pilichowska et al. 2017) rapportant seulement 1 cas de LFF EBV+. A l'inverse, cette équipe décrit les cas de LBDGC EBV+ polymorphes comme ayant une morphologie « LFF-like » (Nicolae et al. 2015).

En effet, les LBDGC-EBV+ polymorphes ont une morphologie clairement intermédiaire, voir dans certains cas correspondant à celle des LHC (Castillo et al. 2016). D'autres éléments dans la littérature suggèrent un point commun entre LHC-EBV+ et LBDGC-EBV+. Dans le LHC, la présence de l'EBV est associée à l'âge et aux formes à CM (Weinreb, R Day, et al. 1996). En analyse de PEG le MET des formes EBV est plus riche et différent des formes non-EBV (Chetaille et al. 2009; Steidl et al. 2012). Un MET particulier a été décrit dans une étude de LBDGC-EBV de morphologie monomorphe (Keane et al. 2019a), plus tolérogène, mais la description non-exhaustive et l'inclusion monocentrique de cas uniquement

monomorphes rend l'extrapolation de ces données limitées. Dans le LHC, le pronostic diffère avec l'âge, les sujets plus âgés ayant des survies sans progression plus courte et étant plus volontiers réfractaires (Keegan et al. 2005; Koh et al. 2012; Arjan Diepstra et al. 2009). En miroir de cette observation, dans le LBDGC, l'EBV n'a d'impact pronostique que chez les patients âgés (Witte et al. 2020; Ok et al. 2014). Enfin, l'immunoscénescence (Jarrett et al. 2005) a été incriminée comme point essentiel de la physiopathologie de l'EBV dans le LHC, et dans la majorité des DLBCL-EBV+ (Keane et al. 2019c).

Ceci a fourni le rationnel de notre étude pour inclure des cas de lymphomes B EBV+ à morphologie intermédiaire entre LHC et LBDGC EBV+, initialement dénommés LFF-EBV+ au début du travail, puis LBDGC-EBV+ polymorphes à partir du deuxième manuscrit, afin de satisfaire la classification OMS.

II. Avancées dans la classification des LFF et LBDGC-EBV+ polymorphes grâce au transcriptome

II.A. Analyse en composante principale pour identifier les voies biologiques

La première étape de l'étude d'expression génique a consisté en la caractérisation de la cohorte globale (i.e. LFF, LBDGC-EBV polymorphes, LHC et LBPM) à l'aide d'une analyse en composante principale (CP). Celle-ci permet de réduire la complexité du jeu de données et le nombre de variable afin de rendre l'information moins redondante. Ainsi les données interdépendantes d'expression des gènes codants (i.e. #20 000 variables pour chaque patient), sont réduites en un nombre limité de variables indépendantes ou décorréliées les unes des autres. Chaque composante va refléter une part plus ou moins importante de la variabilité du jeu de données, ici l'expression génique, la CP1 comportant la plus forte variance et ainsi de suite.

Pour mémoire, dans les articles 2 et 3, l'envahissement médiastinal a été d'avantage détaillé. La présence d'un envahissement du médiastin antérieur a été intitulée comme **envahissement thymique**, l'absence d'envahissement du médiastin ou l'envahissement du médiastin en dehors de la loge antérieure ont été appelés « extra-thymique ».

Nous avons montré qu'il existait en analyse de CP un spectre au sein des CP1 et 2, allant du LHC, vers les groupes 0, LF bona-fide puis groupes 3 et LBPM. Par ailleurs, au sein de ce spectre, les cas de groupes 3 et LBPM semblaient toujours plus proche que les LHC, group 0 et LFF bona-fide (i.e. group 1 et 2), eux-mêmes plus intriqués en CP1 et CP2. Les LBDGC-EBV-polymorphes formaient un groupe à part avec un score CP1 et CP2 plus élevé. Enfin, l'envahissement thymique était associé avec une part importante de variance en étant fortement corrélé avec la CP2 (17% de la variance). Ceci confirme que la dichotomisation faite entre LBPM et LBDG est bien reproductible dans des entités avec un envahissement moindre en cellules tumorales. Une analyse d'enrichissement a permis de souligner que les principales voies de signalisation sous-jacente étaient reliées au MET et à la matrice extracellulaire. Les LFF de groupe 1 et 2 (i.e. bona-fide) avaient des scores de CP comparables, soulignant ici un spectre morphologique continu. En analyse de CP restreinte au groupe de LFF, nous avons pu montrer que dans la classification anatomopathologique, seul le groupe 3 avait un impact significatif sur les premières composantes. En effet, le score des cinq premières composantes étaient proches pour les patients des groupes 0, 1 et 2, alors que ceux du groupe 3 pouvaient être isolés dès la deuxième composante, associée en analyse d'enrichissement génique à une signalisation par la voie du BCR, probablement en lien avec l'inclusion d'une majorité de cas de LBDGC-CD30+++ (N=15 vs N=3 LBPM-CD30+++ dans ce groupe. De plus, la composante 1 était aussi fortement associée avec la localisation thymique reflétant la part de variance la plus importante (20.5%).

En conclusion, au sein des LFF, l'envahissement thymique était responsable de la plus grande variance, de manière bien plus significative que d'autres paramètres comme l'âge, le sexe ou même la classification anatomopathologique. Les LFF de groupes 3 semblent être gouvernés par une signalisation particulière, en lien avec une signalisation par le BCR, comme dans le LBDGC(Rosenwald et al. 2003). Les formes 0-1 et 2 sont difficilement

distinguable en analyse de CP, suggérant une réelle appartenance à un spectre commun de LFF. Enfin, l'association du statut EBV au score des deux CP1 et 2 semble valider la distinction sémantique et sera renforcée par les données de différentiel d'expression et de mutations.

II.B. Une signature d'expression génique pour les LFF

En se reposant sur la première analyse en CP, nous nous sommes servis des cas « bona-fide » (groupes 1 et 2) pour établir une signature d'expression génique « typique » des LFF, distinctes des LHC et LBPM. Nous avons ainsi identifié 68 gènes différentiellement exprimés entre les LFF et à la fois les LHC et LBPM (8 sous-exprimés et 60 surexprimés).

A l'aide d'analyse d'enrichissement génique, nous avons établi qu'une part importante de cette signature pouvait être associée à un MET particulier impliquant une signature IL10, matrisome, IL4, IL13 et de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire. Les analyses complémentaires en IHC suggèrent que la présence de macrophage, et plus particulièrement de phénotype CD163, et un faible infiltrat en petits lymphocytes B, sont des caractéristiques essentielles des LFF. Cette corrélation inverse entre macrophage et petites cellules B a été mise en évidence dans les LHC (Chan et al. 2017), où la présence de macrophage est associée à un moins bon pronostic (K. L. Tan et al. 2012; Koh et al. 2014; Steidl, Lee, et al. 2010). Ces données vont aussi dans le même sens que celles présentées par Pittaluga et al (Pittaluga et al. 2020), à ceci près que dans notre étude, l'infiltrat macrophagique était plus important dans les LFF que dans les LHC. Cet infiltrat macrophagique pourrait ainsi expliquer en partie le mauvais pronostic de ces patients (Wilson et al. 2014; C. Sarkozy et al. 2017), comme cela a aussi été décrit dans le LBDGC (Kridel, Steidl, and Gascoyne 2015).

Les LFF représentent une population candidate pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblant les macrophages (Advani et al. 2018).

II.C. Groupe 0, à la frontière avec les LHC ?

Dans un deuxième temps nous avons cherché à comprendre si les cas moins consensuels dans la littérature (i.e. les extrêmes : groupes 0 et 3) pouvaient réellement être considérés comme des LFF ou simplement comme des variantes phénotypiques des entités mères.

Comme discuté dans le chapitre des CP, les groupes 0, présentaient des scores non différents des LF bona-fide (i.e. group 1 et 2) pour les CP1 à 5, contrairement aux groupes 3 pouvant être isolé dès la CP1. De plus, une analyse de différentiel d'expression entre groupe 0 et LHC a permis de mettre en évidence un enrichissement de la signature d'expression génique des LFF-bona-fide vers les groupes 0. Parmi les gènes sous-exprimés dans les groupes 0 vs LHC, l'expression des chaînes variables d'immunoglobuline laisse penser à un MET dépourvu de petites cellules B par rapport aux LHC, comme pour les LFF bona-fide, ce que nous avons confirmé en IHC. Enfin, les cas de groupes 0 tendaient à avoir un infiltrat en macrophage plus important que les LHC.

Au total, l'ensemble de ces données suggèrent que les cas groupes 0 pourraient être inclus dans le spectre des LFF. Ceci permettrait de clarifier la situation actuelle où l'hétérogénéité des traitements administrés reflète l'ambiguïté dans la classification de ces cas.

Comme nous le verrons dans la dernière partie, les données de mutation valident aussi ce shift dans la classification en ne mettant pas en évidence de différence entre les cas de groupe 0 et ceux de groupe 1-2.

II.D. Groupe 3, à rattacher aux LBDGC/PMBCL ?

A l'opposé des groupes 0, les cas initialement inclus comme groupe 3 pouvaient être identifiés en analyse de CP comme ayant un PEG associé à une signalisation forte par la voie du BCR. De plus, un enrichissement de la signature des LFF n'a pas été retrouvé dans les groupes 3 par rapport aux LBPM. Enfin, la distinction LBPM *versus* LBDGC semblait gouverner la variance chez ces patients. En effet, les cas de groupes 3 avec une morphologie de LBPM n'étaient pas

distinguables des cas de LBPM suggérant que les LBPM exprimant le CD30 de façon intense et diffuse ne semblent pas différer des autres LBPM. Cependant, si notre étude peut affirmer que les LBDGC exprimant le CD30 de façon intense et diffuse ne font pas partie du spectre des LFF, une des limites est l'absence de comparaison de ces cas avec le PEG de LBDG. En effet, certaines études de la littérature suggèrent que les LBDGC exprimant le CD30 ont un PEG distinct des autres LBDGC, sans pour autant les rapprocher du spectre des LFF analysés ici. Dans l'étude de Hu et al (S. Hu et al. 2013), les LBDGC CD30+ (14% des LBDGC) présentaient un PEG distinct des CD30-, avec une signalisation via NFkB et la voie du BCR moins importante. Ceci ne contredit pas nos données (signalisation plus forte par le BCR dans le groupe 3) mais souligne simplement l'importance du comparateur en analyse de différentiel d'expression génique. En effet, les LBDGC-CD30+++ (groupe 3) semblent avoir une signalisation par le BCR plus forte que les LBPM ou LFF, mais plus faible que les LBDGC. Un autre point important reste le seuil d'expression du CD30 qui diffère d'une étude à l'autre, d'où le cut-off de 100% pris ici. Les données de la littérature restent controversées quant à la valeur pronostique favorable ou défavorable de l'expression du CD30. Un des biais de ces séries, est l'inclusion des formes EBV+, ne permettant pas de conclure sur le réel impact biologique de l'expression du CD30 indépendamment de l'EBV(Slack et al. 2014; Hao et al. 2015). La poursuite d'étude sur ce sous-groupe reste importante étant donné la cible thérapeutique que l'expression du CD30 représente, même si de manière surprenante, les LBPM (exprimant par définition faiblement et de façon hétérogène le CD30) ne semblent pas être très sensibles au Brentuximab Vedotin(Zinzani, Pellegrini, et al. 2017) alors qu'un seuil d'expression du CD30 très bas a été associé à une réponse dans le LBDGC(Bartlett et al. 2017; Jacobsen et al. 2015).

II.E. Des arguments pour isoler les cas de LBDGC-EBV+

En analyse de CP, les LBDGC-EBV polymorphes pouvaient être isolés des autres LFF, LHC (EBV négatifs) ou LBPM. Des analyses d'enrichissement génique réalisées à partir du profil de gènes associés à ces composantes ont permis d'identifier les voies de l'IFN, de la réponse lymphocytaire T ou de l'infiltrat inflammatoire comme associées aux LBDGC-EBV polymorphes. Ceci peut être mis en parallèle avec les études comparant le PEG des LHC en

fonction de leur statut EBV(Chetaille et al. 2009; Steidl et al. 2012). Enfin, en analyse de différentiel d'expression génique entre les cas LFF et les cas LBDGC-EBV polymorphes, les cas EBV présentait un enrichissement significativement moindre dans la signature d'expression LFF. Les données d'enrichissement génique ont pu être validée en IHC : un MET plus riche en macrophages et lymphocytes T CD8 étant mis en évidence dans les LBDGC-polymorphes EBV+ par rapport aux LFF. Ceci va dans le sens des données de la littérature(Keane et al. 2019b) rapportant un MET riche en macrophages dans les LBDGC-EBV+ de morphologie monomorphe.

Ces données d'expression et d'IHC suggèrent clairement que les LBDGC-EBV polymorphes et LFF sont deux groupes bien différents, notamment avec un MET distinct. Les données de mutations, indispensables pour pouvoir étudier d'avantage les mécanismes de lymphomagenèse dans ces deux entités, valideront également cette distinction fondamentale (cf. infra).

III. Caractérisation du profil mutationnel des LFF et LBDGC-EBV polymorphes :

Suite aux données de transcriptome, les cas de groupes 0 ont été inclus dans cette analyse en tant que LFF, et les groupes 3 exclus. La microdissection effectuée au sein de la cohorte exploratoire a permis de s'affranchir des problématiques liées à l'enrichissement en cellules tumorales mais aussi d'obtenir de l'ADN de cellule dite « normal » (i.e. non tumorale) afin d'effectuer des analyses appariées. Enfin, nous avons développé un panel très large de 217 gènes afin d'étendre nos observations sur l'ensemble de la cohorte à l'aide d'un séquençage ciblé très profond (médiane de couverture 500X en capture). En intégrant les données de la littérature, nous avons pu comparer le profil de mutations des LFF et à celui des LHC (EBV négatifs)(Reichel et al. 2015; Tiacci et al. 2018), LBPM(A. Mottok et al. 2019), LBDGC(Schmitz et al. 2018; Chapuy et al. 2018), et analyser plus en détail celui des LBDGC-EBV polymorphes en le comparant aussi au profil lymphomes de Burkitt-EBV+(Grande et al. 2019). Nos données

nous ont permis de bien décrire le profil de mutations des LFF, de confirmer que l'envahissement thymique était une variable clé, et que les LBDGC-EBV polymorphes présentaient un profil bien à part, sans pour autant que l'envahissement thymique ne soit sans importance dans cette entité.

III.A. LFF : un profil de mutations peu relié à la classification anatomo-pathologique

L'étude a mis en évidence *SOCS1*, *B2M*, *GNA13* et *NFKBIA* comme les gènes les plus fréquemment mutés au sein des 50 cas de LFF. Une analyse d'enrichissement génique réalisée à partir des gènes mutés dans 10% ou plus des exomes (donc non-biaisées) a révélé les voies IFN, JAK-STAT et NF-kB. En étendant cette analyse à la cohorte entière (panel de 217 gènes), ces voies sont confirmées, avec en sus la voie TP53 qui ressort comme significativement enrichie. Par ailleurs, les régulateurs de l'épigénétique comme *CREBBP*, *KMT2C* et *HIST1HIE*, était mutés dans 36% des patients au total. En revanche, les mutations au sein de gènes impliqués dans l'activation de la voie du BCR et fréquemment observées dans le LBDGC (Phelan et al. 2018), comme *CD79A*, *CARD11* ou *MYD88* étaient très rare voir absente, tout comme les mutations d'*EZH2*, retrouvées dans le LBDGC de sous-type centro-germinatif.

Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre le profil mutationnel des patients au sein du groupe 0 versus ceux des groupes 1 et 2 (LFF bona-fide), ni entre les groupes 1 et 2. Ainsi, les cas ayant une morphologie de LHC mais avec l'expression des marqueurs B sur l'ensemble des cellules tumorales ont un profil mutationnel comparable aux autres LFF. Au total, les données de PEG et de mutations semblent s'accorder et confirmer que les cas de groupes 0 peuvent faire partie du spectre des LFF. Les LFF présentent par ailleurs un spectre de mutations homogène d'un extrême à l'autre (groupe 0 à groupe 2). Ces données pourraient être prise en compte afin de faire évoluer et clarifier la classification et in fine homogénéiser la prise en charge thérapeutique de ces patients

Si la classification morphologique n'a pas de lien très significatif avec le profil d'expression génique ou de mutation, nos données d'analyses de CP montrant des distinctions très

significatives en fonction de l'envahissement du médiastin antérieur (ou loge thymique) se sont confirmées et renforcées avec l'analyse du profil des mutations.

III.B. L'envahissement du médiastin antérieur comme élément clé dans la lymphomagénèse des LFF

III.B.1. Distinction entre LFF-thymiques et non-thymiques

Le spectre de mutations des LFF-thymiques étaient complètement distinct de celui des LFF-non-thymiques. En effet, des mutations de nombreux gènes de la voie NF κ B (*ITPKB*, *NFKBIE* ou *TNFAIP3*), étaient exclusivement retrouvées au sein des formes thymiques, et l'incidence des mutations de *XPO1*, *GNA13* ou *B2M* étaient significativement plus importante au sein de ces formes, rappelant ainsi des distinctions entre PMBCL et LBDGC (Dubois et al. 2016). A l'inverse, les mutations de *TP53*, *BCL2* et *CREBBP* étaient significativement associées aux formes non-thymiques. Ce profil est de plus assez homogène, seulement 2 cas sur les 31 présentant une forme thymique n'ayant pas de mutations au sein des 6 gènes significativement associés à l'envahissement (suscités). Les mutations de *SOCS1* ont été retrouvées au sein des deux groupes, mais avec un profil assez différent : les formes thymiques ayant plus de mutations par cas et plus de mutations non-sens que les formes non-thymiques.

Ces profils sont à mettre en relation avec ceux des entités reliées, ie LHC, LBPM ou LBDGC pour lesquelles la cellule d'origine lymphomateuse est mieux connue.

III.B.2. LFF-thymique : le lien entre LHC et LBPM avec un profil de mutation identique

En comparant, pour les 217 gènes étudiés, le profil retrouvé au sein des 31 cas de LFF-thymiques à celui d'une grande série de LBPM (A. Mottok et al. 2019) et de deux séries de LHC (en prenant soin de ne prendre en compte que les cas EBV négatifs, (Reichel et al. 2015; Tiacci et al. 2018)), très peu de différences ont été mise en évidence et aucune n'étaient significative après ajustement statistique. On peut noter une incidence de mutation de *NFKBIA* légèrement

plus importante au sein des LFF-thymiques, ou encore des mutations au sein du gène *NBPF6*, non rapportées dans le LHC et LBPM (Dubois et al. 2016; A. Mottok et al. 2019; Chapuy et al. 2019a). A l'inverse certaines mutations semblaient être plus spécifiques des LBPM comme celles du gène *IL4R* (Vigano et al. 2018), non retrouvées dans le LHC. Le sous-type SN ou CM des cas de LHC n'est pas détaillé dans les deux cohortes analysées, ni l'envahissement de la loge thymique (Reichel et al. 2015; Tiacci et al. 2018). Cependant, en ayant exclu les cas EBV positifs, et devant la plus faible incidence de forme à cellularité-mixte EBV négatives, on peut supposer que la majorité des cas utilisés dans ces séries soient de morphologie SN. Une analyse plus fine avec ces informations permettrait certainement d'avoir une image plus précise de la comparaison.

Ainsi, les LFF-thymiques ont un profil de mutations semblable à celui des LHC (préférentiellement SN) et LBPM, apportant d'avantage d'arguments pour une cellule d'origine commune au sein du spectre LBPM/LHC-SN (Swerdlow et al. 2016).

III.B.3. LFF-non-thymique : différents sous-groupes au sein de cette entité ?

Allant dans le même sens que les données cliniques et de PEG, la comparaison du profil de mutations des LFF-non-thymiques avec celui des LHC et LBPM a mis en évidence de nombreuses différences. Notamment, l'incidence des mutations de *BLC2* et de *TP53* était plus importante dans les formes non-thymiques par rapport aux LHC et LBPM, et ceci restait significatif après ajustement statistique. Inversement, l'incidence des mutations au sein de *GNA13* et *B2M* était plus importante dans les LHC et LBPM. Après ajustement statistique, le profil des LFF-non-thymiques étaient plus éloignés de celui des LBPM que des LHC, une des limites et biais potentiels étant l'absence d'information sur le statut thymique des cas de LHC dans les deux séries étudiées (Reichel et al. 2015; Tiacci et al. 2018).

En mettant en parallèle le profil retrouvé au sein des LFF-non-thymique avec celui des LBDGC, il semble que les mutations soient plus associées aux types centro-germinatifs, avec des

mutations de *SOCS1*, *STAT6*, *BCL2* ou *CREBBP* dans 68% des cas (Schmitz et al. 2018; Dubois et al. 2016).

Enfin, au sein de ces LFF-non-thymiques, deux groupes se distinguent, l'un présentant des mutations de gènes impliqués dans la voie de l'apoptose, comme *TP53*, *BIRC6* ou *BCL2* (N=9 cas), distinct de celui ayant des mutations de *SOSC1*, *STAT6* ou *B2M* (N=6 cas). Sans qu'il n'y ait de différence significative en termes de classification pathologique entre ces deux groupes, les cas ayant des mutations de *TP53* avaient cependant préférentiellement une morphologie de groupe 2 (grandes cellules) par rapport à ceux n'ayant pas de mutation de *TP53* ($p=0.09$).

Il reste difficile d'émettre des hypothèses sur la cellule d'origine de ces LFF-non-thymiques, même si la présence de mutations de *TP53* ou *CREBBP* rend l'idée d'une prolifération B indolente en cours de transformation séduisante (Huet, Sujobert, and Salles 2018; Campo et al. 2018). Ceci peut-être étayé par l'existence dans la littérature de formes composites entre des LHC et LBDGC, c'est-à-dire présentant au diagnostic une composante LHC et une autre LBDGC avec des caractéristiques typiques et sans atteinte médiastinale (Aussedat et al. 2020).

III.C. LBDG-EBV polymorphes :

III.C.1. Un spectre de mutation bien à part

L'étude de profil de mutation a permis d'étayer la claire distinction entre les LFF et LBDGC-EBV polymorphes, deux entités présentant des similitudes morphologiques. En effet, un MET différent a été souligné au travers des études de PEG et IHC, révélant un infiltrat plus riche en macrophages ou lymphocytes CD8 pour les formes reliées à l'EBV. L'analyse des mutations a permis d'apporter des données sur le versant tumoral. Tout d'abord, au sein des exons, une charge mutationnelle globale plus faible a été observée au sein des LBDGC-EBV+ par rapport aux LFF, suggérant ici le pouvoir oncogénique et transformant de l'EBV, en accord avec les données rapportées dans le LHC (Wienand, Chapuy, Stewart, Dunford, Wu, Kim, Kamburov, Wood, Cader, Matthew, et al. 2019) ou lymphome de Burkitt (Grande et al. 2019). De plus, le profil des mutations est très différent, marqué notamment par l'absence ou la faible représentation de mutations au sein de la voie NF κ B, *HLA-B* ou *B2M* ou *TP53*. Aucun LBDGC-

EBV polymorphe ne présentait de mutations au sein de *NFKBIA* versus 22% des LFF, de même, aucune mutations d'*ITPKB* ou *NKBIE* versus respectivement 16% et 18% pour les LFF. Au total, 58% des patients de la cohorte LFF présentaient une mutation d'un des gènes de la voie NFKB, versus seulement 10% des patients de la cohorte LBDGC-EBV polymorphes ($p=3.10^{-4}$). De même, les voies d'échappement à la réponse immune étaient moins touchées (35% vs 60% des patients, $p=0.06$). Ces distinctions ne sont pas sans rappeler celles observées au sein des LHC EBV+ versus EBV- (Tiacci et al. 2018; Spina et al. 2018) ou plus récemment au sein des lymphomes de Burkitt EBV+ versus EBV- (Grande et al. 2019) et soulignent le pouvoir pathogène de l'EBV, pouvant lui-même activer la voie NFKB. Plus particulièrement, la très faible incidence de mutation de *TP53* a aussi été retrouvée au sein des lymphome de Burkitt-EBV+.

Si les différents lymphomes B reliés à l'EBV présentent des points communs caractérisés par l'absence de mutation dans certaines voies, il ne semble pas y avoir de mutations spécifiques communes retrouvées dans toutes les différentes formes. Dans notre cohorte, les mutations de *STAT3* (domaine *STAT*), *ATP13A4*, *TAF1* ou *PRKDC* étaient les plus récurrentes avec 15% des formes EBV+ mutés. Il a été démontré que *STAT3* jouait un rôle dans l'infection chronique par EBV dans les cellules T ou NK en étant constitutivement activé (Onozawa et al. 2018). Le rôle fonctionnel de mutations au sein du domaine STAT dans la lymphomagenèse B reste à démontrer in vitro, avec des cibles thérapeutiques potentielles en aval. Ces mutations ne sont pas retrouvées au sein des autres cohortes EBV de la littérature.

III.C.2. Place de l'envahissement thymique dans les lymphomes EBV ?

Dans notre série, un envahissement de la loge thymique a été retrouvé dans 30% des cas LBDGC-EBV+ polymorphes. Cette incidence reflète les données de la littérature (dans (Nicolae et al. 2015) 11% des LBDGC-EBV polymorphes avaient un envahissement du médiastin (tous de morphologie LFF-like), vs 55% des cas dans Elsayed (Ahmed A. Elsayed et al. 2017), rapportant des LFF-EBV+).

De manière très exploratoire, nous avons cherché à savoir si la distinction de profil mutationnel observé entre les formes de LFF-thymiques et non-thymiques pouvait aussi se

retrouver au sein des LBDGC-EBV polymorphes. Ceci semble être le cas, avec des mutations de *GNA13* et *SOCS1* retrouvées dans les LBDCG-EBV polymorphes avec un envahissement thymique, mais pas dans les formes non-thymiques. A l'inverse, les mutations de *STAT3*, *ATP13A4* ou encore *TAF1* et *PRKDC* (2 gènes impliqués dans la réponse immune contre les virus à ADN et survie de l'EBV(Wang et al. 2019)) étaient uniquement retrouvées dans les formes EBV-non-thymiques. La présence de mutations de *GNA13* au sein des LBDCG-EBV polymorphes suggère des voies de lymphomagenèses partagées au sein de la niche thymique. A l'inverse, une comparaison du profil de mutations des formes LFF et LBDG-EBV-non-thymiques n'a pas mis en lumière de point commun, mais a souligné des différences au niveau des voies de l'apoptose notamment. Les LFF-non-thymiques présentant des mutations au niveau du suppresseur de tumeur *TP53*, mais aussi de la protéine anti-apoptotique *BCL2* non retrouvées au sein des LBDG-EBV-non-thymiques ayant des mutations de *TAF1* et *PRKDC*, impliqués dans la réponse des virus à ADN ou cycle de vie de l'EBV(Wang et al. 2019; Ferguson et al. 2012).

IV. Limites, conclusions et perspectives :

IV.A. Limites du travail

Comme toutes études s'attachant à décrire des entités rares, notre travail a de multiples limites.

Concernant l'inclusion des cas, celle-ci s'est faite dans le cadre de relectures centralisées et avec la participation de pathologistes de plusieurs pays et groupes coopérateurs (France, Canada, Portugal et Allemagne). Cependant, les critères utilisés, et plus particulièrement la terminologie concernant les cas reliés à l'EBV et celle des LHC exprimant des marqueurs B, ont pu porter à confusion et à la non-adhésion de pathologistes plus conservateurs. L'inclusion d'avantage de cas Nord-Américains et la participation à ce travail d'une équipe ayant une autre lecture de la classification WHO aurait été un atout.

Sur le plan technique, la nature des prélèvements FFPE (trois quarts de la cohorte) a été à l'origine de l'exclusion de nombreux cas pour le travail portant sur l'étude des mutations, la mauvaise qualité de l'ADN extrait ne permettant pas la fabrication des librairies de séquençage. L'étude des caractéristiques cliniques entre patients inclus et non-inclus ne révélant pas de différence, ceci limite les biais de notre analyse.

Il aurait été souhaitable de pouvoir mieux intégrer les données d'expression et de mutations afin de mieux évaluer l'impact d'une anomalie génétique sur le profil d'expression génique. Cette étude n'a pas été envisagée au-delà du PEG de certains gènes (cf article 3), étant donnée les approches pré-analytiques différentes entre analyse des ARN et ADN. En effet, le PEG a été réalisé à partir d'ARN extrait sur section entière, mêlant donc cellules tumorales et MET. Afin de pouvoir réaliser une étude intégrée et évaluer si certaines mutations ont un impact sur le PEG des cellules tumorales, leur microdissection préalable aurait été nécessaire. Ceci n'a pas été possible au vu de la quantité limitée de tissu disponible pour la microdissection, nous poussant à privilégier l'étude des mutations sur les cas congelés. En effet, la quantité et la qualité des acides nucléiques extraits à partir de cellules microdisséquées sur des prélèvements

FFPE est nettement moindre qu'à partir de prélèvements congelés, demandant la dissection de 4 fois plus de cellules, rendant la technique difficilement applicable aux prélèvements ayant un faible enrichissement tumoral.

Enfin, le travail d'analyse du profil de mutation s'est limité à 217 gènes sélectionnés à partir des données d'exomes et de la littérature. Avec cette méthodologie nous pensons avoir couvert le spectre de mutations codantes des LFF-thymiques, comme en atteste la récurrence des anomalies retrouvées. Cependant, l'inclusion de seulement 6 cas de LFF-non-thymiques et 7 LBDG-EBV polymorphes dans la série exploratoire, et l'hétérogénéité retrouvée sur le plan mutationnel laisse suggérer des limites dans notre panel pour ces cas.

IV.B. Une classification des LFF à revoir ?

La classification actuelle des LFF évoque d'ores et déjà une distinction entre LFF avec et sans envahissement du médiastin. Cependant, les données présentées dans ce travail semblent assez cohérentes et solides pour suggérer que ces deux groupes soient séparés dans la classification, comme c'est le cas pour les LBPM et LBDG depuis plusieurs années. Concernant le statut EBV, il n'existe aucun argument précis pour conserver des cas à morphologie intermédiaire dans la classification des LFF (actuellement 4% des cas selon la WHO), étant donné qu'ils ont un PEG et de mutations bien différentes.

IV.C. Quelle cellule d'origine pour les LFF ?

La distinction très nette entre les cas ayant ou non un envahissement du médiastin antérieur fait sens dans le contexte des distinctions moléculaires, cliniques mises en évidence entre LBPM et LBDGC (A. Mottok et al. 2019; Dubois et al. 2016; Kerry J. Savage et al. 2003; Rosenwald et al. 2003). De manière intrigante, nos données suggèrent que la discussion semble pouvoir s'étendre aux LBDG-EBV polymorphes. L'existence d'une telle distinction en dans le LHC nécessite donc d'être recherchée.

Dans la littérature, le débat sur la cellule d'origine des LBPM reste ouvert : est-ce une cellule B thymique ou une cellule B centro-germinative ayant migrée secondairement dans le

thymus ? Ou encore, où a lieu le processus de transformation ? Le rôle des mutations de *GNA13* dans ce contexte est-il de maintenir la cellule dans sa niche en limitant sa capacité de circulation, induisant ainsi une charge mutationnelle importante ? Les cellules B thymiques normales ont-elles une capacité de circulation ou migration ? Ces questions ont été évoquées dans la littérature et restent pour le moment sans réponse (Yamano et al. 2015; Perera and Huang 2015). Des analyses génomiques sur cellules uniques à partir de prélèvement frais seraient utiles pour aider à caractériser les cellules B thymiques, par rapport aux cellules B centro-germinatives, une des limites étant la rareté des prélèvements.

IV.D. Lymphomes reliés à l'EBV.

Cette étude apporte des arguments moléculaires et un rationnel biologique en faveur d'une classification reposant sur le statut EBV, plus que sur la morphologie seule.

Dans le LHC, les différences cliniques, morphologiques, mais aussi moléculaires en terme de PEG et mutationnel entre les cas EBV+ et EBV- ont été mise en évidence au fur et mesure des études (Chetaille et al. 2009; Reichel et al. 2015; Spina et al. 2018; Tiacci et al. 2018). De plus, des études d'association génétiques et de SNP suggèrent aussi un rôle pathogénique important pour le virus, même si des voies communes sont aussi retrouvées entre EBV+ et - (Urayama et al. 2012). Dans le lymphome de Burkitt, le rôle de l'EBV a récemment été mis en lumière, suggérant un shift dans le paradigme « Burkitt endémique vs sporadique » vers une classification en fonction du statut EBV (Grande et al. 2019). Ces arguments biologiques analysés dans le contexte du développement de thérapies ciblées et/ou cellulaire ciblant l'EBV devrait pousser à une réflexion sur l'introduction d'une entité large regroupant les lymphomes B EBV positifs (Shen et al. 2019; McLaughlin, Bollard, and Keller 2018; "New Agents Designed to Fight EBV+ Cancers" 2019; Messick et al. 2019).

Références

- Abdul Razak, F. R., A. Diepstra, L. Visser, and A. Van Den Berg. 2016. "CD58 Mutations Are Common in Hodgkin Lymphoma Cell Lines and Loss of CD58 Expression in Tumor Cells Occurs in Hodgkin Lymphoma Patients Who Relapse." *Genes and Immunity* 17 (6): 363–66. <https://doi.org/10.1038/gene.2016.30>.
- Abdul Razak, Fazlyn Reeny, Arjan Diepstra, Lydia Visser, and Anke Van den Berg. 2015. "Mutations in CD58 and Other Immune System Related Genes in Hodgkin Lymphoma." *Blood* 126 (23): 1439–1439. <https://doi.org/10.1182/blood.v126.23.1439.1439>.
- ADDIS, B.J., and P.G. ISAACSON. 1986. "Large Cell Lymphoma of the Mediastinum: A B-Cell Tumour of Probable Thymic Origin." *Histopathology* 10 (4): 379–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1986.tb02491.x>.
- Advani, Ranjana, Ian Flinn, Leslie Popplewell, Andres Forero, Nancy L. Bartlett, Nilanjan Ghosh, Justin Kline, et al. 2018. "CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma." *New England Journal of Medicine* 379 (18): 1711–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1807315>.
- Afshar-Sterle, Shoukat, Dimitra Zotos, Nicholas J. Bernard, Anna K. Scherger, Lisa Rödling, Amber E. Alsop, Jennifer Walker, et al. 2014. "Fas Ligand-Mediated Immune Surveillance by T Cells Is Essential for the Control of Spontaneous B Cell Lymphomas." *Nature Medicine* 20 (3): 283–90. <https://doi.org/10.1038/nm.3442>.
- Agostinelli, Claudio. 2011. "Pathobiology of Hodgkin Lymphoma." *Advances in Hematology* 6 (1): 920898. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2014.040>.
- Akashi, Koichi, Lauren I. Richie, Toshihiro Miyamoto, William H. Carr, and Irving L. Weissman.

2000. "B Lymphopoiesis in the Thymus." *The Journal of Immunology* 164 (10): 5221–26. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.10.5221>.
- Al-Sharabati, Mohamed, Shashikant Chittal, Isabelle Duga-Neulat, Guy Laurent, Catherine Mazerolles, Talal Al-Saati, Pierre Brousset, and Georges Delsol. 1991. "Primary Anterior Mediastinal B-cell Lymphoma. A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 16 Cases." *Cancer* 67 (10): 2579–87. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910515\)67:10<2579::AID-CNCR2820671030>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910515)67:10<2579::AID-CNCR2820671030>3.0.CO;2-H).
- Aldinucci, Donatella, Debora Lorenzon, Karin Olivo, Barbara Rapanà, and Valter Gattei. 2004. "Interactions between Tissue Fibroblasts in Lymph Nodes and Hodgkin/Reed-Sternberg Cells." *Leukemia and Lymphoma*. Leuk Lymphoma. <https://doi.org/10.1080/10428190410001683633>.
- Alizadeh, Ash A., Michael B. Eisen, R. Eric Davis, Ch L. Ma, Izidore S. Lossos, Andreas Rosenwald, Jennifer C. Boldrick, et al. 2000. "Distinct Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identified by Gene Expression Profiling." *Nature* 403 (6769): 503–11. <https://doi.org/10.1038/35000501>.
- Amara, K, M Trimeche, S Ziadi, A Laatiri, M Hachana, and S Korbi. 2008. "Prognostic Significance of Aberrant Promoter Hypermethylation of CpG Islands in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphomas." *Annals of Oncology* 19 (10): 1774–86. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn374>.
- Anagnostopoulos, I, M L Hansmann, K Franssila, M Harris, N L Harris, E S Jaffe, J Han, et al. 2000. "European Task Force on Lymphoma Project on Lymphocyte Predominance Hodgkin Disease: Histologic and Immunohistologic Analysis of Submitted Cases Reveals 2 Types of Hodgkin Disease with a Nodular Growth Pattern and Abundant Lymphocytes." *Blood* 96 (5): 1889–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961891>.
- Anastasiadou, Eleni, Dina Stroopinsky, Stella Alimperti, Alan L. Jiao, Athalia R. Pyzer, Claudia Cippitelli, Giuseppina Pepe, et al. 2019. "Epstein–Barr Virus-Encoded EBNA2 Alters Immune Checkpoint PD-L1 Expression by Downregulating MiR-34a in B-Cell

- Lymphomas." *Leukemia* 33 (1): 132–47. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0178-x>.
- Ansell, Stephen M., Alexander M. Lesokhin, Ivan Borrello, Ahmad Halwani, Emma C. Scott, Martin Gutierrez, Stephen J. Schuster, et al. 2015. "PD-1 Blockade with Nivolumab in Relapsed or Refractory Hodgkin's Lymphoma." *New England Journal of Medicine* 372 (4): 311–19. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411087>.
- Aoki, Tomohiro, Lauren C. Chong, Katsuyoshi Takata, Katy Milne, Monirath Hav, Anthony Colombo, Elizabeth A. Chavez, et al. 2020. "Single-Cell Transcriptome Analysis Reveals Disease-Defining T-Cell Subsets in the Tumor Microenvironment of Classic Hodgkin Lymphoma." *Cancer Discovery* 10 (3): 406–21. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0680>.
- Aoki, Tomohiro, Koji Izutsu, Ritsuro Suzuki, Chiaki Nakaseko, Hiroshi Arima, Kazuyuki Shimada, Akihiro Tomita, et al. 2014. "Prognostic Significance of Pleural or Pericardial Effusion and the Implication of Optimal Treatment in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma: A Multicenter Retrospective Study in Japan." *Haematologica* 99 (12): 1817–25. <https://doi.org/10.3324/haematol.2014.111203>.
- Armand, Philippe, Andreas Engert, Anas Younes, Michelle Fanale, Armando Santoro, Pier Luigi Zinzani, John M. Timmerman, et al. 2018. "Nivolumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma After Failure of Autologous Hematopoietic Cell Transplantation: Extended Follow-Up of the Multicohort Single-Arm Phase II CheckMate 205 Trial." *Journal of Clinical Oncology* 36 (14): 1428–39. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.0793>.
- Aussedat, Guillaume, Alexandra Traverse-Glehen, Aspasia Stamatoullas, Thierry Molina, Violaine Safar, Camille Laurent, Jean Marie Michot, et al. 2020. "Composite and Sequential Lymphoma between Classical Hodgkin Lymphoma and Primary Mediastinal Lymphoma/Diffuse Large B-Cell Lymphoma, a Clinico-Pathological Series of 25 Cases." *British Journal of Haematology* 189 (2). <https://doi.org/10.1111/bjh.16331>.
- Bargou, Ralf C., Florian Emmerich, Daniel Krappmann, Kurt Bommert, Markus Y. Mapara,

- Wolfgang Arnold, Hans D. Royer, et al. 1997. "Constitutive Nuclear Factor-Kb-RelA Activation Is Required for Proliferation and Survival of Hodgkin's Disease Tumor Cells." *Journal of Clinical Investigation* 100 (12): 2961–69. <https://doi.org/10.1172/JCI119849>.
- Barth, T. F., I. Melzner, S. Wegener, A. J. Bucur, S. Brüderlein, K. Dorsch, C. Hasel, F. Leithäuser, and P. Möller. 2005. "Biallelic Mutation of SOCS-1 Impairs JAK2 Degradation and Sustains Phospho-JAK2 Action in MedB-1 Mediastinal Lymphoma Line." *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Für Pathologie* 89 (6): 234–44. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3701>.
- Barth, Thomas F.E., Frank Leithäuser, Stefan Joos, Martin Bentz, and Peter Möller. 2002a. "Mediastinal (Thymic) Large B-Cell Lymphoma: Where Do We Stand?" *Lancet Oncology*. Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00714-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00714-3).
- Barth, Thomas F E, Frank Leithäuser, Stefan Joos, Martin Bentz, and Peter Möller. 2002b. "Review Mediastinal (Thymic) Large B-Cell Lymphoma : Where Do We Stand ? Clinical Presentation of MBL." *The Lancet* 3 (April): 229–34.
- Bartlett, Nancy L., Mitchell R. Smith, Tanya Siddiqi, Ranjana H. Advani, Owen A. O'Connor, Jeff P. Sharman, Tatyana Feldman, et al. 2017. "Brentuximab Vedotin Activity in Diffuse Large B-Cell Lymphoma with CD30 Undetectable by Visual Assessment of Conventional Immunohistochemistry." *Leukemia and Lymphoma* 58 (7): 1607–16. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1256481>.
- Bea, Silvia, Andreas Zettl, George Wright, Itziar Salaverria, Philipp Jehn, Victor Moreno, Christof Burek, et al. 2005. "Diffuse Large B-Cell Lymphoma Subgroups Have Distinct Genetic Profiles That Influence Tumor Biology and Improve Gene-Expression-Based Survival Prediction." *Blood* 106 (9): 3183–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1399>.
- Benharroch, Daniel, Karen Nalbandyan, and Irina Lazarev. 2015. "CD20 Over-Expression in Hodgkin-Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin Lymphoma: The Neglected Quest." *Journal of Cancer* 6 (11): 1155–59. <https://doi.org/10.7150/jca.13107>.

- Bennett, M. H., K. A. MacLennan, M. J. Easterling, B. Vaughan Hudson, A. M. Jelliffe, and G. Vaughan Hudson. 1983. "The Prognostic Significance of Cellular Subtypes in Nodular Sclerosing Hodgkin's Disease: An Analysis of 271 Non-Laparotomised Cases (BNLI Report No. 22)." *Clinical Radiology* 34 (5): 497–501. [https://doi.org/10.1016/S0009-9260\(83\)80148-2](https://doi.org/10.1016/S0009-9260(83)80148-2).
- Berg, A. Van Den, L. Visser, and S. Poppema. 1999. "High Expression of the CC Chemokine TARC in Reed-Sternberg Cells: A Possible Explanation for the Characteristic T-Cell Infiltrate in Hodgkin's Lymphoma." *American Journal of Pathology* 154 (6): 1685–91. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65424-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65424-7).
- Bledsoe, Jacob R., Robert A. Redd, Robert P. Hasserjian, Jacob D. Soumerai, Ha T. Nishino, Daniel F. Boyer, Judith A. Ferry, et al. 2016. "The Immunophenotypic Spectrum of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma Reveals Prognostic Biomarkers Associated with Outcome." *American Journal of Hematology* 91 (10): E436–41. <https://doi.org/10.1002/ajh.24485>.
- Bödör, Csaba, Agnes Bognár, Lilla Reiniger, Agota Szepesi, Erika Toth, László Kopper, and András Matolcsy. 2005. "Aberrant Somatic Hypermutation and Expression of Activation-Induced Cytidine Deaminase mRNA in Mediastinal Large B-Cell Lymphoma." *British Journal of Haematology* 129 (June): 373–76. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05454.x>.
- Bonizzi, Giuseppina, and Michael Karin. 2004. "The Two NF- κ B Activation Pathways and Their Role in Innate and Adaptive Immunity." *Trends in Immunology*. Trends Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.03.008>.
- Bradley, John R., and Jordan S. Pober. 2001. "Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors (TRAFs)." *Oncogene*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204788>.
- Bräuninger, Andreas, Martin-Leo Hansmann, John G. Strickler, Reinhard Dummer, Günther Burg, Klaus Rajewsky, and Ralf Küppers. 1999. "Identification of Common Germinal-

Center B-Cell Precursors in Two Patients with Both Hodgkin's Disease and Non-Hodgkin's Lymphoma." *New England Journal of Medicine* 340 (16): 1239–47. <https://doi.org/10.1056/NEJM199904223401604>.

Bräuninger, Andreas, Hans-Heinrich Wacker, Klaus Rajewsky, Ralf Küppers, and Martin-Leo Hansmann. 2003. "Typing the Histogenetic Origin of the Tumor Cells of Lymphocyte-Rich Classical Hodgkin's Lymphoma in Relation to Tumor Cells of Classical and Lymphocyte-Predominance Hodgkin's Lymphoma." *Cancer Research* 63 (7): 1644–51.

Brune, Verena, Enrico Tiacci, Ines Pfeil, Claudia Döring, Susan Eckerle, Carel J.M. Van Noesel, Wolfram Klapper, et al. 2008. "Origin and Pathogenesis of Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma as Revealed by Global Gene Expression Analysis." *Journal of Experimental Medicine* 205 (10): 2251–68. <https://doi.org/10.1084/jem.20080809>.

Buettner, Maïke, Axel Greiner, Athanasia Avramidou, Hans Martin Jäck, and Gerald Niedobitek. 2005. "Evidence of Abortive Plasma Cell Differentiation in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin Lymphoma." *Hematological Oncology* 23 (3–4): 127–32. <https://doi.org/10.1002/hon.764>.

Cabannes, Eric, Gulfaraz Khan, Fabienne Aillet, Ruth F. Jarrett, and Ronald T. Hay. 1999. "Mutations in the I κ B α Gene in Hodgkin's Disease Suggest a Tumour Suppressor Role for I κ B α ." *Oncogene* 18 (20): 3063–70. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202893>.

Cader, Fathima Zumla, Ron C.J. Schackmann, Xihao Hu, Kirsty Wienand, Robert Redd, Bjoern Chapuy, Jing Ouyang, et al. 2018. "Mass Cytometry of Hodgkin Lymphoma Reveals a CD4⁺ Exhausted T-Effector and T-Regulatory Cell Rich Microenvironment." *Blood* 132 (8): blood-2018-04-843714. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-843714>.

Calaminici, M, K Piper, A M Lee, and A J Norton. 2004. "CD23 Expression in Mediastinal Large B-Cell Lymphomas." *Histopathology* 45 (6): 619–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01969.x>.

Campo, Elias, Florence Cymbalista, Paolo Ghia, Ulrich Jäger, Sarka Pospisilova, Richard

- Rosenquist, Anna Schuh, and Stephan Stilgenbauer. 2018. "TP53 Aberrations in Chronic Lymphocytic Leukemia: An Overview of the Clinical Implications of Improved Diagnostics." *Haematologica*. Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.187583>.
- Campo, Elias, Steven H. Swerdlow, Nancy L. Harris, Stefano Pileri, Harald Stein, and Elaine S. Jaffe. 2011. "The 2008 WHO Classification of Lymphoid Neoplasms and beyond: Evolving Concepts and Practical Applications." *Blood*. The American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-293050>.
- Camus, Vincent, Aspasia Stamatoullas, Sylvain Mareschal, Pierre Julien Viailly, Nasrin Sarafan-Vasseur, Elodie Bohers, Sydney Dubois, et al. 2016. "Detection and Prognostic Value of Recurrent Exportin 1 Mutations in Tumor and Cell-Free Circulating DNA of Patients with Classical Hodgkin Lymphoma." *Haematologica* 101 (9): 1094–1101. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.145102>.
- Canioni, Danielle, Bénédicte Deau-Fischer, Pierre Taupin, Vincent Ribrag, Richard Delarue, Jacques Bosq, Marie Thérèse Rubio, et al. 2009. "Prognostic Significance of New Immunohistochemical Markers in Refractory Classical Hodgkin Lymphoma: A Study of 59 Cases." *PLoS ONE* 4 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006341>.
- Carbone, A., A. Gloghini, V. Gattei, D. Aldinucci, M. Degan, P. De Paoli, V. Zagonel, and A. Pinto. 1995. "Expression of Functional CD40 Antigen on Reed-Sternberg Cells and Hodgkin's Disease Cell Lines." *Blood* 85 (3): 780–89. <https://doi.org/10.1182/blood.v85.3.780.bloodjournal853780>.
- Carbone, Antonino, Gianluca Gaidano, Annunziata Gloghini, Luigi M. Larocca, Daniela Capello, Vincenzo Canzonieri, Andrea Antinori, Umberto Tirelli, Brunangelo Falini, and Riccardo Dalla-Favera. 1998. "Differential Expression of BCL-6, CD138/Syndecan-1, and Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein-1 Identifies Distinct Histogenetic Subsets of Acquired Immunodeficiency Syndrome-Related Non-Hodgkin's Lymphomas." *Blood* 91 (3): 747–55. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V91.3.747>.

- Carbone, Antonino, Annunziata Gloghini, Arnaldo Caruso, Paolo De Paoli, and Riccardo Dolcetti. 2017. "The Impact of EBV and HIV Infection on the Microenvironmental Niche Underlying Hodgkin Lymphoma Pathogenesis." *International Journal of Cancer*. Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/ijc.30473>.
- Carbone, Antonino, Annunziata Gloghini, Luigi M. Larocca, Andrea Antinori, Brunangelo Falini, Umberto Tirelli, Riccardo Dalla-Favera, and Gianluca Gaidano. 1999. "Human Immunodeficiency Virus–Associated Hodgkin’s Disease Derives From Post–Germinal Center B Cells." *Blood* 93 (7): 2319–26. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V93.7.2319>.
- Carey, Christopher D., Daniel Gusenleitner, Mikel Lipschitz, Margaretha G.M. Roemer, Edward C. Stack, Evisa Gjini, Xihao Hu, et al. 2017. "Topological Analysis Reveals a PD-L1-Associated Microenvironmental Niche for Reed-Sternberg Cells in Hodgkin Lymphoma." *Blood* 130 (22): 2420–30. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-03-770719>.
- Casagrande, Naïke, Cinzia Borghese, Lydia Visser, Maurizio Mongiat, Alfonso Colombatti, and Donatella Aldinucci. 2019. "CCR5 Antagonism by Maraviroc Inhibits Hodgkin Lymphoma Microenvironment Interactions and Xenograft Growth." *Haematologica* 104 (3): 564–75. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.196725>.
- Castillo, Jorge J., Brady E. Beltran, Roberto N. Miranda, Ken H. Young, Julio C. Chavez, and Eduardo M. Sotomayor. 2016. "EBV-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly: 2016 Update on Diagnosis, Risk-Stratification, and Management." *American Journal of Hematology* 91 (5): 529–37. <https://doi.org/10.1002/ajh.24370>.
- Cattaruzza, Lara, Annunziata Gloghini, Karin Olivo, Raffaele Di Francia, Debora Lorenzon, Rosaria De Filippi, Antonino Carbone, Alfonso Colombatti, Antonio Pinto, and Donatella Aldinucci. 2009. "Functional Coexpression of Interleukin (IL)-7 and Its Receptor (IL-7R) on Hodgkin and Reed-Sternberg Cells: Involvement of IL-7 in Tumor Cell Growth and Microenvironmental Interactions of Hodgkin’s Lymphoma." *International Journal of Cancer* 125 (5): 1092–1101. <https://doi.org/10.1002/ijc.24389>.
- Cazals-Hatem, D., E. Lepage, P. Brice, A. Ferrant, M. F. D’Agay, E. Baumelou, J. Brière, et al.

1996. "Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma: A Clinicopathologic Study of 141 Cases Compared with 916 Nonmediastinal Large B-Cell Lymphomas, a GELA ('Groupe d'Utude Des Lymphomes de l'Adulte') Study." *American Journal of Surgical Pathology* 20 (7): 877–88. <https://doi.org/10.1097/00000478-199607000-00012>.
- Chan, Fong Chun, Anja Mottok, Alina S. Gerrie, Maryse Power, Kerry J. Savage, Sohrab P. Shah, Joseph M. Connors, et al. 2017. "Prognostic Model to Predict Post-Autologous Stem-Cell Transplantation Outcomes in Classical Hodgkin Lymphoma." *Journal of Clinical Oncology* 35 (32): 3722–33. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.7925>.
- Chapuy, Bjoern, Chip Stewart, Andrew J. Dunford, Jaegil Kim, Atanas Kamburov, Robert A. Redd, Mike S. Lawrence, et al. 2018. "Molecular Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma Are Associated with Distinct Pathogenic Mechanisms and Outcomes." *Nature Medicine* 24 (5): 679–90. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0016-8>.
- Chapuy, Bjoern, Chip Stewart, Andrew J. Dunford, Jaegil Kim, Kirsty Wienand, Atanas Kamburov, Gabriel K. Griffin, et al. 2019a. "Genomic Analyses of PMBL Reveal New Drivers and Mechanisms of Sensitivity to PD-1 Blockade." *Blood* 134 (26): 2369–82. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002067>.
- . 2019b. "Genomic Analyses of PMBL Reveal New Drivers and Mechanisms of Sensitivity to PD-1 Blockade." *Blood* 134 (26): 2369–82. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002067>.
- Chapuy, Bjoern, Chip Stewart, Andrew J Dunford, Jaegil Kim, Kirsty Wienand, Atanas Kamburov, Gabriel K Griffin, et al. 2019c. "Genomic Analyses of PMBL Reveal New Drivers and Mechanisms of Sensitivity to PD-1 Blockade." *Blood* 134 (26): 2369–82. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002067>.
- Chetaille, Bruno, François Bertucci, Pascal Finetti, Benjamin Esterni, Aspasia Stamatoullas, Jean Michel Picquenot, Marie Christine Copin, et al. 2009. "Molecular Profiling of Classical Hodgkin Lymphoma Tissues Uncovers Variations in the Tumor Microenvironment and Correlations with EBV Infection and Outcome." *Blood* 113 (12):

2765–75. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-168096>.

Chihara, Dai, Jason R. Westin, Roberto N. Miranda, Chan Y. Cheah, Yasuhiro Oki, Francesco Turturro, Jorge E. Romaguera, et al. 2017. “Dose Adjusted-EPOCH-R and Mediastinal Disease May Improve Outcomes for Patients with Gray-Zone Lymphoma.” *British Journal of Haematology* 179 (3): 503–6. <https://doi.org/10.1111/bjh.14226>.

Chiu, April, Weifeng Xu, Bing He, Stacey R. Dillon, Jane A. Gross, Eric Sievers, Xugang Qiao, et al. 2007. “Hodgkin Lymphoma Cells Express TACI and BCMA Receptors and Generate Survival and Proliferation Signals in Response to BAFF and APRIL.” *Blood* 109 (2): 729–39. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-015958>.

Cloos, Paul A.C., Jesper Christensen, Karl Agger, Alessio Maiolica, Juri Rappsilber, Torben Antal, Klaus H. Hansen, and Kristian Helin. 2006. “The Putative Oncogene GASC1 Demethylates Tri- and Dimethylated Lysine 9 on Histone H3.” *Nature* 442 (7100): 307–11. <https://doi.org/10.1038/nature04837>.

Connors, J. M., W. Jurczak, D. J. Straus, S. M. Ansell, W. S. Kim, A. Gallamini, A. Younes, et al. 2018. “Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin’s Lymphoma.” *New England Journal of Medicine* 378 (4): 331–44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708984>.

Copie-Bergman, C, P Gaulard, L Maouche-Chrétien, J Brière, C Haioun, M A Alonso, P H Roméo, and K Leroy. 1999. “The MAL Gene Is Expressed in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma.” *Blood* 94 (10): 3567–75.

Copie-Bergman, Christiane, Marie Laure Boulland, Catherine Dehoulle, Peter Möller, Jean Pierre Farcet, Martin J.S. Dyer, Corinne Haioun, Paul Henri Roméo, Philippe Gaulard, and Karen Leroy. 2003. “Interleukin 4-Induced Gene 1 Is Activated in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma.” *Blood* 101 (7): 2756–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2215>.

Copie-Bergman, Christiane, Anne Plonquet, Miguel A Alonso, Marie-Laure Boulland, Jeanine Marquet, Marine Divine, Peter Möller, Karen Leroy, and Philippe Gaulard. 2002. “MAL

- Expression in Lymphoid Cells: Further Evidence for MAL as a Distinct Molecular Marker of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphomas." *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15 (11): 1172–80. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000032534.81894.B3>.
- Davey, G. M., W. R. Heath, and R. Starr. 2006. "SOCS1: A Potent and Multifaceted Regulator of Cytokines and Cell-Mediated Inflammation." *Tissue Antigens* 67 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2005.00532.x>.
- Dawson, D. W., J. S. Hong, R. R. Shen, S. W. French, J. J. Troke, Y. Z. Wu, S. S. Chen, et al. 2007. "Global DNA Methylation Profiling Reveals Silencing of a Secreted Form of Epha7 in Mouse and Human Germinal Center B-Cell Lymphomas." *Oncogene* 26 (29): 4243–52. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210211>.
- Dawson, Mark A., Andrew J. Bannister, Berthold Göttgens, Samuel D. Foster, Till Bartke, Anthony R. Green, and Tony Kouzarides. 2009. "JAK2 Phosphorylates Histone H3Y41 and Excludes HP1 α from Chromatin." *Nature* 461 (7265): 819–22. <https://doi.org/10.1038/nature08448>.
- Delsol, G., F. Meggetto, P. Brousset, E. Cohen-Knafo, T. A. Saati, P. Rochaix, B. Gorguet, B. Rubin, J. J. Voigt, and S. Chittal. 1993. "Relation of Follicular Dendritic Reticulum Cells to Reed-Sternberg Cells of Hodgkin's Disease with Emphasis on the Expression of CD21 Antigen." *American Journal of Pathology* 142 (6): 1729–38.
- Delsol, G, P Brousset, S Chittal, and F Rigal-Huguet. 1992. "Correlation of the Expression of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein and in Situ Hybridization with Biotinylated BamHI-W Probes in Hodgkin's Disease." *The American Journal of Pathology* 140 (2): 247–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1310829>.
- Diepstra, A., M. Niens, E. Vellenga, G. W. Van Imhoff, I. M. Nolte, M. Schaapveld, G. Van Der Steege, et al. 2005. "Association with HLA Class I in Epstein-Barr-Virus-Positive and with HLA Class III in Epstein-Barr-Virus-Negative Hodgkin's Lymphoma." *Lancet* 365 (9478): 2216–24. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66780-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66780-3).

- Diepstra, Arjan, Gustaaf W van Imhoff, Michael Schaapveld, Henrike Karim-Kos, Anke van den Berg, Edo Vellenga, and Sibrand Poppema. 2009. "Latent Epstein-Barr Virus Infection of Tumor Cells in Classical Hodgkin's Lymphoma Predicts Adverse Outcome in Older Adult Patients." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 27 (23): 3815–21. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.5138>.
- Doerr, Jeanette R., Cindy S. Malone, Francesca M. Fike, Melinda S. Gordon, Shahe V. Soghomonian, Roman K. Thomas, Qian Tao, et al. 2005. "Patterned CpG Methylation of Silenced B Cell Gene Promoters in Classical Hodgkin Lymphoma-Derived and Primary Effusion Lymphoma Cell Lines." *Journal of Molecular Biology* 350 (4): 631–40. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.05.032>.
- Dubois, Sydney, Pierre Julien Vially, Sylvain Mareschal, Elodie Bohers, Philippe Bertrand, Philippe Ruminy, Catherine Maingonnat, et al. 2016. "Next-Generation Sequencing in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Highlights Molecular Divergence and Therapeutic Opportunities: A LYSA Study." *Clinical Cancer Research* 22 (12): 2919–28. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2305>.
- Duns, Gerben, Elena Viganò, Daisuke Ennishi, Clementine Sarkozy, Stacy Hung, Elizabeth Chavez, Katsuyoshi Takata, et al. 2019. "Diffuse Large B-Cell Lymphomas with a Molecular PMBCL Expression Signature Represent a Distinct Molecular Subtype Associated with Poor Clinical Outcome." *Blood* 134 (Supplement_1): 922–922. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-131450>.
- Dürkop, Horst, Burkhard Hirsch, Corinna Hahn, Hans-Dieter Foss, and Harald Stein. 2003. "Differential Expression and Function of A20 and TRAF1 in Hodgkin Lymphoma and Anaplastic Large Cell Lymphoma and Their Induction by CD30 Stimulation." *The Journal of Pathology* 200 (2): 214–21. <https://doi.org/10.1002/path.1351>.
- Dutton, Amanda, Gary M Reynolds, Christopher W Dawson, Lawrence S Young, and Paul G Murray. 2005. "Constitutive Activation of Phosphatidylinositol 3 Kinase Contributes to the Survival of Hodgkin's Lymphoma Cells through a Mechanism Involving Akt Kinase and MTOR." *The Journal of Pathology* 205 (4): 498–506. <https://doi.org/10.1002/path.1725>.

- Dutton, Amanda, Ciaran B. Woodman, Marilyn B. Chukwuma, James I.K. Last, Wenbin Wei, Martina Vockerodt, Karl R.N. Baumforth, et al. 2007. "Bmi-1 Is Induced by the Epstein-Barr Virus Oncogene LMP1 and Regulates the Expression of Viral Target Genes in Hodgkin Lymphoma Cells." *Blood* 109 (6): 2597–2603. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-020545>.
- Eberle, Franziska C., Jaime Rodriguez-Canales, Lai Wei, Jeffrey C. Hanson, J. Keith Killian, Sun Hong-Wei, Lisa G. Adams, et al. 2011. "Methylation Profiling of Mediastinal Gray Zone Lymphoma Reveals a Distinctive Signature with Elements Shared by Classical Hodgkin's Lymphoma and Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma." *Haematologica* 96 (4): 558–66. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.033167>.
- Eberle, Franziska C., Itziar Salaverria, Christian Steidl, Thomas A. Summers, Stefania Pittaluga, Susana Ben Neriah, Jaime Rodriguez-Canales, et al. 2011. "Gray Zone Lymphoma: Chromosomal Aberrations with Immunophenotypic and Clinical Correlations." *Modern Pathology* 24 (12): 1586–97. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.116>.
- Elsayed, Ahmed A., Akira Satou, Ahmed E. Eladl, Seiichi Kato, Shigeo Nakamura, and Naoko Asano. 2017. "Grey Zone Lymphoma with Features Intermediate between Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Classical Hodgkin Lymphoma: A Clinicopathological Study of 14 Epstein-Barr Virus-Positive Cases." *Histopathology* 70 (4): 579–94. <https://doi.org/10.1111/his.13100>.
- Elsayed, Ahmed Ali, Naoko Asano, Koichi Ohshima, Koji Izutsu, Tomohiro Kinoshita, and Shigeo Nakamura. 2014. "Prognostic Significance of CD20 Expression and Epstein-Barr Virus (EBV) Association in Classical Hodgkin Lymphoma in Japan: A Clinicopathologic Study." *Pathology International* 64 (7): 336–45. <https://doi.org/10.1111/pin.12175>.
- Emmerich, Florian, Sebastian Theurich, Michael Hummel, Antje Haeffker, Magnus S. Vry, Konstanze Döhner, Kurt Bommert, Harald Stein, and Bernd Dörken. 2003. "Inactivating I Kappa B Epsilon Mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg Cells." *Journal of Pathology* 201 (3): 413–20. <https://doi.org/10.1002/path.1454>.

- Etchin, J., J. Montero, A. Berezovskaya, B. T. Le, A. Kentsis, A. L. Christie, A. S. Conway, et al. 2016. "Activity of a Selective Inhibitor of Nuclear Export, Selinexor (KPT-330), against AML-Initiating Cells Engrafted into Immunosuppressed NSG Mice." *Leukemia* 30 (1): 190–99. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.194>.
- Evens, Andrew M., Jennifer A. Kanakry, Laurie H. Sehn, Athena Kritharis, Tatyana Feldman, Aimee Kroll, Randy D. Gascoyne, et al. 2015. "Gray Zone Lymphoma with Features Intermediate between Classical Hodgkin Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Characteristics, Outcomes, and Prognostication among a Large Multicenter Cohort." *American Journal of Hematology* 90 (9): 778–83. <https://doi.org/10.1002/ajh.24082>.
- Falini, B., S. Pileri, G. Pizzolo, H. Durkop, L. Flenghi, F. Stirpe, M. F. Martelli, and H. Stein. 1995. "CD30 (Ki-1) Molecule: A New Cytokine Receptor of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily as a Tool for Diagnosis and Immunotherapy." *Blood*. American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood.v85.1.1.bloodjournal8511>.
- Falini, Brunangelo, Barbara Bigerna, Laura Pasqualucci, Marco Fizzotti, Massimo F. Martelli, Stefano Pileri, Antonio Pinto, et al. 1996. "Distinctive Expression Pattern of the BCL-6 Protein in Nodular Lymphocyte Predominance Hodgkin's Disease." *Blood* 87 (2): 465–71. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.2.465.bloodjournal872465>.
- Farrell, Paul J. 2019. "Epstein–Barr Virus and Cancer." *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 14 (1): 29–53. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023>.
- Ferguson, Brian J., Daniel S. Mansur, Nicholas E. Peters, Hongwei Ren, and Geoffrey L. Smith. 2012. "DNA-PK Is a DNA Sensor for IRF-3-Dependent Innate Immunity." *ELife* 2012 (1). <https://doi.org/10.7554/eLife.00047>.
- Ferry, Judith A., Rita M. Linggood, Karen M. Convery, James T. Efid, Roseann Eliseo, and Nancy L. Harris. 1993. "Hodgkin Disease, Nodular Sclerosis. Type Implications of Histologic Subclassification." *Cancer* 71 (2): 457–63. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930115\)71:2<457::AID-CNCR2820710229>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930115)71:2<457::AID-CNCR2820710229>3.0.CO;2-U).

- Feuerhake, Friedrich, Jeffery L. Kutok, Stefano Monti, Wen Chen, Ann S. LaCasce, Giorgio Cattoretti, Paul Kurtin, et al. 2005. "NFκB Activity, Function, and Target-Gene Signatures in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma Subtypes." *Blood* 106 (4): 1392–99. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4901>.
- Fischer, Marie, Mikael Juremalm, Niclas Olsson, Carin Backlin, Christer Sundström, Kenneth Nilsson, Gunilla Enblad, and Gunnar Nilsson. 2003. "Expression of CCL5/RANTES by Hodgkin and Reed-Sternberg Cells and Its Possible Role in the Recruitment of Mast Cells into Lymphomatous Tissue." *International Journal of Cancer* 107 (2): 197–201. <https://doi.org/10.1002/ijc.11370>.
- Fiumara, Paolo, Virginia Snell, Yang Li, Asok Mukhopadhyay, Mamoun Younes, Ann Marie Gillenwater, Fernando Cabanillas, Bharat B. Aggarwal, and Anas Younes. 2001. "Functional Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor κB in Hodgkin Disease Cell Lines." *Blood* 98 (9): 2784–90. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.9.2784>.
- Garcia, J F, M Mollejo, M Fraga, J Forteza, J A Muniesa, M Perez-Guillermo, C Perez-Seoane, T Rivera, P Ortega, and M A Piris. 2005. "Large B-Cell Lymphoma with Hodgkin's Features." *Histopathology* 47 (1): 101–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2005.02175.x>.
- García, Juan F. 2006. "Classical Hodgkin Lymphoma: An Epigenetically Determined Disease?" *Blood*. American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-5133>.
- Gebauer, Niklas, Judith Gebauer, Tim Tristan Hardel, Veronica Bernard, Harald Biersack, Hendrik Lehnert, Dirk Rades, Alfred Christian Feller, and Christoph Thorns. 2015. "Prevalence of Targetable Oncogenic Mutations and Genomic Alterations in Epstein-Barr Virus-Associated Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly." *Leukemia and Lymphoma* 56 (4): 1100–1106. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.944522>.
- Gentry, Michael, Juraj Bodo, Lisa Durkin, and Eric D. Hsi. 2017. "Performance of a Commercially Available Mal Antibody in the Diagnosis of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma." *American Journal of Surgical Pathology* 41 (2): 189–94. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000771>.

- Georgakis, Georgios V., Yang Li, Georgios Z. Rassidakis, L. Jeffrey Medeiros, Gordon B. Mills, and Anas Younes. 2005. "Inhibition of the Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Promotes G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Hodgkin Lymphoma." *British Journal of Haematology* 0 (0): 051220022257008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05881.x>.
- Gies, Vincent, Aurélien Guffroy, and Anne Sophie Korganow. 2017. "Les Lymphocytes B Thymiques : Plus Que de Simples Spectateurs de La Lymphopoïèse T." *Medecine/Sciences* 33 (8–9): 771–78. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173308023>.
- Giulino-Roth, Lisa. 2018. "How I Treat Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma." *Blood* 132 (8): 782–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-791566>.
- Glimelius, Ingrid, Annika Edstrom, Rose-Marie Amini, Marie Fischer, Gunnar Nilsson, Christer Sundstrom, Gunilla Enblad, and Daniel Molin. 2006. "IL-9 Expression Contributes to the Cellular Composition in Hodgkin Lymphoma." *European Journal of Haematology* 76 (4): 278–83. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2005.00613.x>.
- Grande, Bruno M, Daniela S Gerhard, Aixiang Jiang, Nicholas B Griner, Jeremy S Abramson, Thomas B Alexander, Hilary Allen, et al. 2019. "Genome-Wide Discovery of Somatic Coding and Noncoding Mutations in Pediatric Endemic and Sporadic Burkitt Lymphoma." *Blood* 133 (12): 1313–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-871418>.
- Greaves, Paul, Andrew Clear, Andrew Owen, Sameena Iqbal, Abigail Lee, Janet Matthews, Andrew Wilson, Maria Calaminici, and John G. Gribben. 2013. "Defining Characteristics of Classical Hodgkin Lymphoma Microenvironment T-Helper Cells." *Blood* 122 (16): 2856–63. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508044>.
- Green, Michael R., Stefano Monti, Scott J. Rodig, Przemyslaw Juszczynski, Treeve Currie, Evan O'Donnell, Bjoern Chapuy, et al. 2010. "Integrative Analysis Reveals Selective 9p24.1 Amplification, Increased PD-1 Ligand Expression, and Further Induction via JAK2 in Nodular Sclerosing Hodgkin Lymphoma and Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma." *Blood* 116 (17): 3268–77. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282780>.

- Gruhne, B., R. Sompallae, and M. G. Masucci. 2009. "Three Epstein-Barr Virus Latency Proteins Independently Promote Genomic Instability by Inducing DNA Damage, Inhibiting DNA Repair and Inactivating Cell Cycle Checkpoints." *Oncogene* 28 (45): 3997–4008. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.258>.
- Gualco, Gabriela, Yasodha Natkunam, and Carlos E. Bacchi. 2012. "The Spectrum of B-Cell Lymphoma, Unclassifiable, with Features Intermediate between Diffuse Large B-Cell Lymphoma and Classical Hodgkin Lymphoma: A Description of 10 Cases." *Modern Pathology* 25 (5): 661–74. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.200>.
- Guitar, Chrystelle, Isabelle Dusanter-Fourt, Christiane Copie-Bergman, Marie Laure Boulland, Sabine Le Gouvello, Philippe Gaulard, Karen Leroy, and Flavia Castellano. 2004. "Constitutive STAT6 Activation in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma." *Blood* 104 (2): 543–49. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3545>.
- Gunawardana, Jay, Fong Chun Chan, Adèle Telenius, Bruce Woolcock, Robert Kridel, King L. Tan, Susana Ben-Neriah, et al. 2014. "Recurrent Somatic Mutations of PTPN1 in Primary Mediastinal B Cell Lymphoma and Hodgkin Lymphoma." *Nature Genetics* 46 (4): 329–35. <https://doi.org/10.1038/ng.2900>.
- Hamlin, Paul A., Carol S. Portlock, David J. Straus, Ariela Noy, Andrew Singer, Steven M. Horwitz, Owen A. O'Connor, Joachim Yahalom, Andrew D. Zelenetz, and Craig H. Moskowitz. 2005. "Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma: Optimal Therapy and Prognostic Factor Analysis in 141 Consecutive Patients Treated at Memorial Sloan Kettering from 1980 to 1999." *British Journal of Haematology* 130 (5): 691–99. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2005.05661.x>.
- Hanamoto, Hitoshi, Takashi Nakayama, Hajime Miyazato, Sumio Takegawa, Kunio Hieshima, Yoichi Tatsumi, Akihisa Kanamaru, and Osamu Yoshie. 2004. "Expression of CCL28 by Reed-Sternberg Cells Defines a Major Subtype of Classical Hodgkin's Disease with Frequent Infiltration of Eosinophils and/or Plasma Cells." *American Journal of Pathology* 164 (3): 997–1006. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63187-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63187-2).

- Hansen, Hinrich P., Hanna Mareike Engels, Maria Dams, Adriana F. Paes Leme, Bianca Alves Pauletti, Vijaya Lakshmi Simhadri, Horst Dürkop, et al. 2014. "Protrusion-Guided Extracellular Vesicles Mediate CD30 Trans-Signalling in the Microenvironment of Hodgkin's Lymphoma." *Journal of Pathology* 232 (4): 405–14. <https://doi.org/10.1002/path.4306>.
- Hansmann, M. L., and R. Kuppers. 1996. "Pathology and 'molecular Histology' of Hodgkin's Disease and the Border to Non-Hodgkin's Lymphomas." *Bailliere's Clinical Haematology* 9 (3): 459–77. [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(96\)80021-7](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(96)80021-7).
- Hao, Xiaoxiao, Xiaolei Wei, Fen Huang, Yongqiang Wei, Hong Zeng, Linwei Xu, Qinjun Zhou, and Ru Feng. 2015. "The Expression of CD30 Based on Immunohistochemistry Predicts Inferior Outcome in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *PLoS ONE* 10 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126615>.
- Harris, NL, ES Jaffe, H Stein, PM Banks, JK Chan, ML Cleary, G Delsol, C De Wolf- Peeters, B Falini, and KC Gatter. 1994. "A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal from the International Lymphoma Study Group [See Comments]." *Blood* 84 (5): 1361–92. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.5.1361.1361>.
- Hayden, Matthew S., and Sankar Ghosh. 2004. "Signaling to NF-KB." *Genes and Development*. Genes Dev. <https://doi.org/10.1101/gad.1228704>.
- Healy, Jane A., Adrienne Nugent, Rachel E. Rempel, Andrea B. Moffitt, Nicholas S. Davis, Xiaoyu Jiang, Jennifer R. Shingleton, et al. 2016. "GNA13 Loss in Germinal Center B Cells Leads to Impaired Apoptosis and Promotes Lymphoma in Vivo." *Blood* 127 (22): 2723–31. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-659938>.
- Herbst, Hermann, Hans Dieter Foss, Jens Samol, Iguaracyra Araujo, Heike Klotzbach, Hans Krause, Angelo Agathangelou, Gerald Niedobitek, and Harald Stein. 1996. "Frequent Expression of Interleukin-10 by Epstein-Barr Virus-Harboring Tumor Cells of Hodgkin's Disease." *Blood* 87 (7): 2918–29. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.7.2918.bloodjournal8772918>.

- Hertel, Christina B., Xiao Ge Zhou, Stephen J. Hamilton-Dutoit, and Steffen Junker. 2002. "Loss of B Cell Identity Correlates with Loss of B Cell-Specific Transcription Factors in Hodgkin/Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin Lymphoma." *Oncogene* 21 (32): 4908–20. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205629>.
- Hinz, Michael, Petra Lemke, Ioannis Anagnostopoulos, Christine Hacker, Daniel Krappmann, Stephan Mathas, Bernd Dörken, Martin Zenke, Harald Stein, and Claus Scheidereit. 2002. "Nuclear Factor Kb-Dependent Gene Expression Profiling of Hodgkin's Disease Tumor Cells, Pathogenetic Significance, and Link to Constitutive Signal Transducer and Activator of Transcription 5a Activity." *Journal of Experimental Medicine* 196 (5): 605–17. <https://doi.org/10.1084/jem.20020062>.
- Hodgkin. 1832. "On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen." *Journal of the Royal Society of Medicine* MCT-17 (1): 68–114. <https://doi.org/10.1177/095952873201700106>.
- Hong, Jung Yong, Young Hye Ko, Seok Jin Kim, and Won Seog Kim. 2015. "Epstein'Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly: A Concise Review and Update." *Current Opinion in Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000210>.
- Hove, L. E. Van Den, S. W. Van Gool, P. Vandenberghe, M. Bakkus, K. Thielemans, M. A. Boogaerts, and J. L. Ceuppens. 1997. "CD40 Triggering of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Results in Efficient Alloantigen Presentation and Cytotoxic T Lymphocyte Induction by Up-Regulation of CD80 and CD86 Costimulatory Molecules." *Leukemia* 11 (4): 572–80. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2400598>.
- Hu, Ming, Diane Krause, Mel Greaves, Saul Sharkis, Michael Dexter, Clare Heyworth, and Tariq Enver. 1997. "Multilineage Gene Expression Precedes Commitment in the Hemopoietic System." *Genes and Development* 11 (6): 774–85. <https://doi.org/10.1101/gad.11.6.774>.
- Hu, Shimin, Zijun Y. Xu-Monette, Aarthi Balasubramanyam, Ganiraju C. Manyam, Carlo Visco, Alexander Tzankov, Wei Min Liu, et al. 2013. "CD30 Expression Defines a Novel Subgroup

- of Diffuse Large B-Cell Lymphoma with Favorable Prognosis and Distinct Gene Expression Signature: A Report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study." *Blood* 121 (14): 2715–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461848>.
- Huet, Sarah, Pierre Sujobert, and Gilles Salles. 2018. "From Genetics to the Clinic: A Translational Perspective on Follicular Lymphoma." *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.127>.
- Ikeda, Jun Ichiro, Suhana Mamat, Tian Tian, Yi Wang, Nur Rahadiani, Katsuyuki Aozasa, and Eiichi Morii. 2010. "Tumorigenic Potential of Mononucleated Small Cells of Hodgkin Lymphoma Cell Lines." *American Journal of Pathology* 177 (6): 3081–88. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100089>.
- Irsch, Johannes, Jürgen Wolf, Hans Tesch, Volker Diehl, Andreas Radbruch, and Andrea Staratschek-Jox. 2001. "Class Switch Recombination Was Specifically Targeted to Immunoglobulin (Ig)G4 or IgA in Hodgkin's Disease-Derived Cell Lines." *British Journal of Haematology* 113 (3): 785–93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02818.x>.
- Isaacson, P. G., A. J. Norton, and B. J. Addis. 1987. "THE HUMAN THYMUS CONTAINS A NOVEL POPULATION OF B LYMPHOCYTES." *The Lancet* 330 (8574): 1488–91. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)92622-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)92622-5).
- Izban, K. F., M. Ergin, R. L. Martinez, and S. Alkan. 2000. "Expression of the Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factors (TRAFs) 1 and 2 Is a Characteristic Feature of Hodgkin and Reed-Sternberg Cells." *Modern Pathology* 13 (12): 1324–31. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3880243>.
- Jacobsen, Eric D., Jeff P. Sharman, Yasuhiro Oki, Ranjana H. Advani, Jane N. Winter, Celeste M. Bello, Gary Spitzer, et al. 2015. "Brentuximab Vedotin Demonstrates Objective Responses in a Phase 2 Study of Relapsed/Refractory DLBCL with Variable CD30 Expression." *Blood* 125 (9): 1394–1402. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-598763>.
- Jardin, Fabrice, Anais Pujals, Laura Pelletier, Elodie Bohers, Vincent Camus, Sylvain Mareschal, Sydney Dubois, et al. 2016. "Recurrent Mutations of the Exportin 1 Gene (XPO1) and

Their Impact on Selective Inhibitor of Nuclear Export Compounds Sensitivity in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma.” *American Journal of Hematology* 91 (9): 923–30. <https://doi.org/10.1002/ajh.24451>.

Jarrett, Ruth F., Gail L. Stark, Jo White, Brian Angus, Freda E. Alexander, Andrew S. Krajewski, June Freeland, G. Malcolm Taylor, and Penelope R.A. Taylor. 2005. “Impact of Tumor Epstein-Barr Virus Status on Presenting Features and Outcome in Age-Defined Subgroups of Patients with Classic Hodgkin Lymphoma: A Population-Based Study.” *Blood* 106 (7): 2444–51. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3759>.

Jiang, Xiang-Nan, Bao-Hua Yu, Wan-Hui Yan, Jimmy Lee, Xiao-Yan Zhou, and Xiao-Qiu Li. 2020. “Epstein–Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma Features Disrupted Antigen Capture/Presentation and Hijacked T-Cell Suppression.” *Oncolmmunology* 9 (1): 1683346. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1683346>.

Joos, S, M I Otaño-Joos, S Ziegler, S Brüderlein, S du Manoir, M Bentz, P Möller, and P Lichter. 1996. “Primary Mediastinal (Thymic) B-Cell Lymphoma Is Characterized by Gains of Chromosomal Material Including 9p and Amplification of the REL Gene.” *Blood* 87 (4): 1571–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8608249>.

Joos, Stefan, Manfred Küpper, Sibylle Ohl, Frederike Von Bonin, Gunhild Mechttersheimer, Martin Bentz, Peter Marynen, et al. 2000. “Genomic Imbalances Including Amplification of the Tyrosine Kinase Gene JAK2 in CD30+ Hodgkin Cells.” *Cancer Research* 60 (3): 549–52.

Joos, Stefan, Christiane K. Menz, Gunnar Wrobel, Reiner Siebert, Stefan Gesk, Sibylle Ohl, Gunhild Mechttersheimer, et al. 2002. “Classical Hodgkin Lymphoma Is Characterized by Recurrent Copy Number Gains of the Short Arm of Chromosome 2.” *Blood* 99 (4): 1381–87. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.4.1381>.

JR, Fromm, Thomas A, and Wood BL. 2017. “Characterization and Purification of Neoplastic Cells of Nodular Lymphocyte Predominant Hodgkin Lymphoma From Lymph Nodes by Flow Cytometry and Flow Cytometric Cell Sorting.” *The American Journal of Pathology*

187 (2). <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2016.10.007>.

Jundt, F., Ö Acikgöz, S. H. Kwon, R. Schwarzer, I. Anagnostopoulos, B. Wiesner, S. Mathas, et al. 2008. "Aberrant Expression of Notch1 Interferes with the B-Lymphoid Phenotype of Neoplastic B Cells in Classical Hodgkin Lymphoma." *Leukemia* 22 (8): 1587–94. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.101>.

Jundt, Franziska, Ioannis Anagnostopoulos, Kurt Bommert, Florian Emmerich, Gerd Müller, Hans-Dieter Foss, Hans-Dieter Royer, Harald Stein, and Bernd Dörken. 1999. "Hodgkin/Reed-Sternberg Cells Induce Fibroblasts to Secrete Eotaxin, a Potent Chemoattractant for T Cells and Eosinophils." *Blood* 94 (6): 2065–71. <https://doi.org/10.1182/blood.V94.6.2065>.

Jungnickel, Berit, Andrea Staratschek-Jox, Andreas Bräuninger, Tilmann Spieker, Jürgen Wolf, Volker Diehl, Martin Leo Hansmann, Klaus Rajewsky, and Ralf Küppers. 2000. "Clonal Deleterious Mutations in the Ikb α Gene in the Malignant Cells in Hodgkin's Lymphoma." *Journal of Experimental Medicine* 191 (2): 395–401. <https://doi.org/10.1084/jem.191.2.395>.

Juszczynski, Przemyslaw, Jing Ouyang, Stefano Monti, Scott J. Rodig, Kunihiko Takeyama, Jeremy Abramson, Wen Chen, Jeffery L. Kutok, Gabriel A. Rabinovich, and Margaret A. Shipp. 2007. "The AP1-Dependent Secretion of Galectin-1 by Reed-Sternberg Cells Fosters Immune Privilege in Classical Hodgkin Lymphoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (32): 13134–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706017104>.

Kadin, M E, B A Agnarsson, L R Ellingsworth, and S R Newcom. 1990. "Immunohistochemical Evidence of a Role for Transforming Growth Factor Beta in the Pathogenesis of Nodular Sclerosing Hodgkin's Disease." *The American Journal of Pathology* 136 (6): 1209–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2356855>.

Kanavaros, P, P Gaulard, F Charlotte, N Martin, C Ducos, M Lebezu, and D Y Mason. 1995. "Discordant Expression of Immunoglobulin and Its Associated Molecule Mb-1/CD79a Is

- Frequently Found in Mediastinal Large B Cell Lymphomas." *The American Journal of Pathology* 146 (3): 735–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7887454>.
- Kant, J. A., S. M. Hubbard, D. L. Longo, R. M. Simon, V. T. DeVita, and E. S. Jaffe. 1986. "The Pathologic and Clinical Heterogeneity of Lymphocyte-Depleted Hodgkin's Disease." *Journal of Clinical Oncology* 4 (3): 284–94. <https://doi.org/10.1200/JCO.1986.4.3.284>.
- Kanzler, Holger, Ralf Küppers, Martin Leo Hansmann, and Klaus Rajewsky. 1996. "Hodgkin and Reed-Sternberg Cells in Hodgkin's Disease Represent the Outgrowth of a Dominant Tumor Clone Derived from (Crippled) Germinal Center B Cells." *Journal of Experimental Medicine* 184 (4): 1495–1505. <https://doi.org/10.1084/jem.184.4.1495>.
- Kapatai, G., and P. Murray. 2007. "Contribution of the Epstein-Barr Virus to the Molecular Pathogenesis of Hodgkin Lymphoma." *Journal of Clinical Pathology*. BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.050146>.
- Kapp, Ursula, Wen Chen Yeh, Bruce Patterson, Andrew J. Elia, David Kägi, Alexandra Ho, Andrew Hessel, et al. 1999. "Interleukin 13 Is Secreted by and Stimulates the Growth of Hodgkin and Reed-Sternberg Cells." *Journal of Experimental Medicine* 189 (12): 1939–45. <https://doi.org/10.1084/jem.189.12.1939>.
- Kataoka, Keisuke, Hiroaki Miyoshi, Seiji Sakata, Akito Dobashi, Lucile Couronné, Yasunori Kogure, Yasuharu Sato, et al. 2019. "Frequent Structural Variations Involving Programmed Death Ligands in Epstein-Barr Virus-Associated Lymphomas." *Leukemia* 33 (7): 1687–99. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0380-5>.
- Kato, Harumi, Kenosuke Karube, Kazuhito Yamamoto, Jun Takizawa, Shinobu Tsuzuki, Yasushi Yatabe, Teru Kanda, et al. 2014. "Gene Expression Profiling of Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly Reveals Alterations of Characteristic Oncogenetic Pathways." *Cancer Science* 105 (5): 537–44. <https://doi.org/10.1111/cas.12389>.
- Kato, Motohiro, Masashi Sanada, Itaru Kato, Yasuharu Sato, Junko Takita, Kengo Takeuchi, Akira Niwa, et al. 2009. "Frequent Inactivation of A20 in B-Cell Lymphomas." *Nature* 459

(7247): 712–16. <https://doi.org/10.1038/nature07969>.

Keane, Colm, Joshua Tobin, Jay Gunawardana, Santiyagu Francis, Grace Gifford, Sara Gabrielli, Anthony Gill, et al. 2019a. “The Tumour Microenvironment Is Immuno-Tolerogenic and a Principal Determinant of Patient Outcome in EBV-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma.” *European Journal of Haematology* 103 (3): 200–207. <https://doi.org/10.1111/ejh.13274>.

———. 2019b. “The Tumour Microenvironment Is Immuno-Tolerogenic and a Principal Determinant of Patient Outcome in EBV-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma.” *European Journal of Haematology* 103 (3): 200–207. <https://doi.org/10.1111/ejh.13274>.

———. 2019c. “The Tumour Microenvironment Is Immuno-tolerogenic and a Principal Determinant of Patient Outcome in EBV-positive Diffuse Large B-cell Lymphoma.” *European Journal of Haematology* 103 (3): 200–207. <https://doi.org/10.1111/ejh.13274>.

Keegan, Theresa H M, Sally L Glaser, Christina A Clarke, Margaret L Gulley, Fiona E Craig, Joseph A Diguseppe, Ronald F Dorfman, Risa B Mann, and Richard F Ambinder. 2005. “Epstein-Barr Virus as a Marker of Survival after Hodgkin’s Lymphoma: A Population-Based Study.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (30): 7604–13. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.6310>.

Kinney, M C, J P Greer, R S Stein, R D Collins, and J B Cousar. 1986. “Lymphocyte-Depletion Hodgkin’s Disease. Histopathologic Diagnosis of Marrow Involvement.” *The American Journal of Surgical Pathology* 10 (3): 219–26.

Koh, Young Wha, Chan Sik Park, Dok Hyun Yoon, Cheolwon Suh, and Jooryung Huh. 2014. “CD163 Expression Was Associated with Angiogenesis and Shortened Survival in Patients with Uniformly Treated Classical Hodgkin Lymphoma.” *PLoS ONE* 9 (1): e87066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087066>.

Koh, Young Wha, Dok Hyun Yoon, Cheolwon Suh, and Jooryung Huh. 2012. “Impact of the Epstein-Barr Virus Positivity on Hodgkin’s Lymphoma in a Large Cohort from a Single Institute in Korea.” *Annals of Hematology* 91 (9): 1403–12.

<https://doi.org/10.1007/s00277-012-1464-8>.

- Kondratiev, Svetlana, Sekhar Duraisamy, Christine L. Unitt, Michael R. Green, Geraldine S. Pinkus, Margaret A. Shipp, Jeffery L. Kutok, Ronny I. Drapkin, and Scott J. Rodig. 2011. "Aberrant Expression of the Dendritic Cell Marker Tnfrsf25 by the Malignant Cells of Hodgkin Lymphoma and Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma Distinguishes These Tumor Types from Morphologically and Phenotypically Similar Lymphomas." *American Journal of Surgical Pathology* 35 (10): 1531–39. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31822bd476>.
- Kridel, Robert, Christian Steidl, and Randy D. Gascoyne. 2015. "Tumor-Associated Macrophages in Diffuse Large b-Cell Lymphoma." *Haematologica* 100 (2): 143–45. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.124008>.
- Kube, Dieter, Udo Holtick, Martina Vockerodt, Tahamtan Ahmadi, Birgit Haier, Iris Behrmann, Peter C. Heinrich, Volker Diehl, and Hans Tesch. 2001. "STAT3 Is Constitutively Activated in Hodgkin Cell Lines." *Blood* 98 (3): 762–70. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.3.762>.
- Kuppers, R., K. Rajewsky, M. Zhao, G. Simons, R. Laumann, R. Fischer, and M. L. Hansmann. 1994a. "Hodgkin Disease: Hodgkin and Reed-Sternberg Cells Picked from Histological Sections Show Clonal Immunoglobulin Gene Rearrangements and Appear to Be Derived from B Cells at Various Stages of Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (23): 10962–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.10962>.
- . 1994b. "Hodgkin Disease: Hodgkin and Reed-Sternberg Cells Picked from Histological Sections Show Clonal Immunoglobulin Gene Rearrangements and Appear to Be Derived from B Cells at Various Stages of Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (23): 10962–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.10962>.
- Küppers, Ralf. 2009. "The Biology of Hodgkin's Lymphoma." *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer. <https://doi.org/10.1038/nrc2542>.

- . 2010. "Side Population Cells in Hodgkin Lymphoma." *Leukemia & Lymphoma* 51 (5): 741–42. <https://doi.org/10.3109/10428191003743486>.
- Kurth, Julia, Tilmann Spieker, Jochen Wustrow, John G. Strickler, Martin Leo Hansmann, Klaus Rajewsky, and Ralf Küppers. 2000. "EBV-Infected B Cells in Infectious Mononucleosis: Viral Strategies for Spreading in the B Cell Compartment and Establishing Latency." *Immunity* 13 (4): 485–95. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00048-0).
- Lamprecht, Björn, Stephan Kreher, Ioannis Anagnostopoulos, Korinna Jöhrens, Giovanni Monteleone, Franziska Jundt, Harald Stein, Martin Janz, Bernd Dörken, and Stephan Mathas. 2008. "Aberrant Expression of the Th2 Cytokine IL-21 in Hodgkin Lymphoma Cells Regulates STAT3 Signaling and Attracts Treg Cells via Regulation of MIP-3 α ." *Blood* 112 (8): 3339–47. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134783>.
- Lapalombella, Rosa, Qingxiang Sun, Katie Williams, Larissa Tangeman, Shruti Jha, Yiming Zhong, Virginia Goettl, et al. 2012. "Selective Inhibitors of Nuclear Export Show That CRM1/XPO1 Is a Target in Chronic Lymphocytic Leukemia." *Blood* 120 (23): 4621–34. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-429506>.
- Laurent, Camille, Marine Baron, Nadia Amara, Corinne Haioun, Mylène Dandoit, Marc Maynadié, Marie Parrens, et al. 2017. "Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35 (18): 2008–17. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.2083>.
- Lazzarino, Mario, E. Orlandi, M. Paulli, J. Sträter, C. Klersy, U. Gianelli, L. Gargantini, et al. 1997. "Treatment Outcome and Prognostic Factors for Primary Mediastinal (Thymic) B-Cell Lymphoma: A Multicenter Study of 106 Patients." *Journal of Clinical Oncology* 15 (4): 1646–53. <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.4.1646>.
- Le, Kieu-Suong, Patricia Amé-Thomas, Karin Tarte, Françoise Gondois-Rey, Samuel Granjeaud, Florence Orlanducci, Etienne D. Foucher, et al. 2018. "CXCR5 and ICOS Expression Identifies a CD8 T-Cell Subset with T FH Features in Hodgkin Lymphomas ." *Blood*

- Advances* 2 (15): 1889–1900. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018017244>.
- Leithäuser, Frank, Martin Bäuerle, Minh Quang Huynh, and Peter Möller. 2001. “Isotype-Switched Immunoglobulin Genes with a High Load of Somatic Hypermutation and Lack of Ongoing Mutational Activity Are Prevalent in Mediastinal B-Cell Lymphoma.” *Blood* 98 (9): 2762–70. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.9.2762>.
- Lennert, Karl, Alfred Christian Feller, Karl Lennert, and Alfred Christian Feller. 1992. “The Kiel Classification.” In *Histopathology of Non-Hodgkin’s Lymphomas*, 13–52. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-97187-7_2.
- Li, Jamilla, Joycelyn Sim, Anskar Y.H. Leung, and Yok Lam Kwong. 2018. “Favorable Response of Relapsed/Refractory Gray-Zone Lymphoma to Brentuximab Vedotin.” *Annals of Hematology* 97 (3): 551–54. <https://doi.org/10.1007/s00277-017-3179-3>.
- Li, K. David, Rodney Miles, Sheryl R. Tripp, Martha J. Glenn, Sherrie L. Perkins, and Mohamed Salama. 2015. “Clinicopathologic Evaluation of MYC Expression in Primary Mediastinal (Thymic) Large B-Cell Lymphoma.” *American Journal of Clinical Pathology* 143 (4): 598–604. <https://doi.org/10.1309/AJCPKUGOUQO0HMDJ>.
- Li, Qiutang, and Inder M. Verma. 2002. “NF- κ B Regulation in the Immune System.” *Nature Reviews Immunology*. *Nat Rev Immunol*. <https://doi.org/10.1038/nri910>.
- Liu, Pan Pan, Ke Feng Wang, Yi Xia, Xi Wen Bi, Peng Sun, Yu Wang, Zhi Ming Li, and Wen Qi Jiang. 2016. “Racial Patterns of Patients with Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma.” *Medicine (United States)* 95 (27). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004054>.
- Loddenkemper, Christoph, Ioannis Anagnostopoulos, Michael Hummel, Korinna Jöhrens-Leder, Hans Dieter Foss, Franziska Jundt, Thomas Wirth, Bernd Dörken, and Harald Stein. 2004. “Differential μ Enhancer Activity and Expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and Immunoglobulin in Reactive B-Cell Populations, B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas, and Hodgkin Lymphomas.” *Journal of Pathology* 202 (1): 60–69. <https://doi.org/10.1002/path.1485>.

- Lollies, A., S. Hartmann, M. Schneider, T. Bracht, A. L. Weiß, J. Arnolds, L. Klein-Hitpass, et al. 2018. "An Oncogenic Axis of STAT-Mediated BATF3 Upregulation Causing MYC Activity in Classical Hodgkin Lymphoma and Anaplastic Large Cell Lymphoma." *Leukemia* 32 (1): 92–101. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.203>.
- Long, Heather M., Graham S. Taylor, and Alan B. Rickinson. 2011. "Immune Defence against EBV and EBV-Associated Disease." *Current Opinion in Immunology*. *Curr Opin Immunol*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.12.014>.
- Longo, Dan L, and Vincent T DeVita. 2018. "Progress in the Treatment of Hodgkin's Lymphoma." *The New England Journal of Medicine* 378 (4): 392–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1715141>.
- LT, Lam, Davis RE, Pierce J, Hepperle M, Xu Y, Hottelot M, Nong Y, et al. 2005. "Small Molecule Inhibitors of I κ B Kinase Are Selectively Toxic for Subgroups of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Defined by Gene Expression Profiling." *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (1).
- Lu, Ting Xun, Jin Hua Liang, Yi Miao, Lei Fan, Li Wang, Xiao Yan Qu, Lei Cao, et al. 2015. "Epstein-Barr Virus Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma Predict Poor Outcome, Regardless of the Age." *Scientific Reports* 5 (July). <https://doi.org/10.1038/srep12168>.
- Lucas, Peter C., Masakatsu Yonezumi, Naohiro Inohara, Linda M. McAllister-Lucas, Mohamed E. Abazeed, Felicia F. Chen, Shoji Yamaoka, Masao Seto, and Gabriel Núñez. 2001. "Bcl10 and MALT1, Independent Targets of Chromosomal Translocation in MALT Lymphoma, Cooperate in a Novel NF- κ B Signaling Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 276 (22): 19012–19. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009984200>.
- M, Bentz, Barth TF, Brüderlein S, Bock D, Schwerer MJ, Baudis M, Joos S, et al. 2001. "Gain of Chromosome Arm 9p Is Characteristic of Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma (MBL): Comprehensive Molecular Cytogenetic Analysis and Presentation of a Novel MBL Cell Line." *Genes, Chromosomes & Cancer* 30 (4). [https://doi.org/10.1002/1098-2264\(2001\)9999:9999::AID-GCC1105>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/1098-2264(2001)9999:9999::AID-GCC1105>3.0.CO;2-I).

- Maggio, E, A Van Den Berg, A Diepstra, J Kluiver, L Visser, and S Poppema. 2002. "Chemokines, Cytokines and Their Receptors in Hodgkin's Lymphoma Cell Lines and Tissues." *Proceedings of the Fifth International Symposium on Hodgkin's Lymphoma* 13: 52–56. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf610>.
- Maggio, Ewerton M., Anke Van den Berg, Debora De Jong, Arjan Diepstra, and Sibrand Poppema. 2003. "Low Frequency of FAS Mutations in Reed-Sternberg Cells of Hodgkin's Lymphoma." *American Journal of Pathology* 162 (1): 29–35. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63795-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63795-9).
- Malpeli, Giorgio, Stefano Barbi, Patrick S. Moore, Maria Scardoni, Marco Chilosi, Aldo Scarpa, and Fabio Menestrina. 2004. "Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: Hypermutation of the BCL6 Gene Targets Motifs Different from Those in Diffuse Large B-Cell and Follicular Lymphomas." *Haematologica* 89 (9): 1091–99.
- Mansouri, Larry, Daniel Noerenberg, Emma Young, Elena Mylonas, Maysaa Abdulla, Mareike Frick, Fazila Asmar, et al. 2016. "Frequent NFKBIE Deletions Are Associated with Poor Outcome in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma." *Blood* 128 (23): 2666–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-704528>.
- Marafioti, T, M Hummel, I Anagnostopoulos, H D Foss, D Huhn, and H Stein. 1999. "Classical Hodgkin's Disease and Follicular Lymphoma Originating from the Same Germinal Center B Cell." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 17 (12): 3804–9. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.12.3804>.
- Marafioti, Theresa, Michael Hummel, Hans Dieter Foss, Helmut Laumen, Petra Korbjuhn, Ioannis Anagnostopoulos, Hetty Lammert, et al. 2000. "Hodgkin and Reed-Sternberg Cells Represent an Expansion of a Single Clone Originating from a Germinal Center B-Cell with Functional Immunoglobulin Gene Rearrangements but Defective Immunoglobulin Transcription." *Blood* 95 (4): 1443–50. https://doi.org/10.1182/blood.v95.4.1443.004k55_1443_1450.
- Marques-Piubelli, Mario L., Yessenia I. Salas, Carlos Pachas, Renato Becker-Hecker, Francisco

- Vega, and Roberto N. Miranda. 2020. "Epstein–Barr Virus-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders and Lymphomas: A Review." *Pathology* 52 (1): 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2019.09.006>.
- Marshall, Neil A., Linsey E. Christie, Laura R. Munro, Dominic J. Culligan, Peter W. Johnston, Robert N. Barker, and Mark A. Vickers. 2004. "Immunosuppressive Regulatory T Cells Are Abundant in the Reactive Lymphocytes of Hodgkin Lymphoma." *Blood* 103 (5): 1755–62. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-07-2594>.
- Martín-Subero, José I., W. Klapper, Anna Sotnikova, Evelyne Callet-Bauchu, Lana Harder, Christian Bastard, Roland Schmitz, et al. 2006. "Chromosomal Breakpoints Affecting Immunoglobulin Loci Are Recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin Lymphoma." *Cancer Research* 66 (21): 10332–38. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1992>.
- Martin-Subero, Jose I., Iwona Wlodarska, Christian Bastard, Jean Michel Picquenot, Jorge Höppner, Maciej Giefing, Wolfram Klapper, and Reiner Siebert. 2006. "Chromosomal Rearrangements Involving the BCL3 Locus Are Recurrent in Classical Hodgkin and Peripheral T-Cell Lymphoma [3]." *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3843>.
- Mata, Elena, Antonio Díaz-López, Ana M. Martín-Moreno, Margarita Sánchez-Beato, Ignacio Varela, María J. Mestre, Carlos Santonja, et al. 2017. "Analysis of the Mutational Landscape of Classic Hodgkin Lymphoma Identifies Disease Heterogeneity and Potential Therapeutic Targets." *Oncotarget* 8 (67): 111386–95. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22799>.
- Mathas, Stephan, Martin Janz, Franziska Hummel, Michael Hummel, Brigitte Wollert-Wulf, Simone Lusatis, Ioannis Anagnostopoulos, et al. 2006. "Intrinsic Inhibition of Transcription Factor E2A by HLH Proteins ABF-1 and Id2 Mediates Reprogramming of Neoplastic B Cells in Hodgkin Lymphoma." *Nature Immunology* 7 (2): 207–15. <https://doi.org/10.1038/ni1285>.

- Mathas, Stephan, Andreas Lietz, Martin Janz, Michael Hinz, Franziska Jundt, Claus Scheidereit, Kurt Bommert, and Bernd Dörken. 2003. "Inhibition of NF- κ B Essentially Contributes to Arsenic-Induced Apoptosis." *Blood* 102 (3): 1028–34. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1154>.
- Matsuki, Eri, and Anas Younes. 2015. "Lymphomagenesis in Hodgkin Lymphoma." *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.002>.
- McBride, J. Adelia, Jose Rodriguez, Rajyalakshmi Luthra, Nelson G. Ordóñez, Fernando Cabanillas, and William C. Pugh. 1996. "T-Cell-Rich B Large-Cell Lymphoma Simulating Lymphocyte-Rich Hodgkin's Disease." *American Journal of Surgical Pathology* 20 (2): 193–201. <https://doi.org/10.1097/00000478-199602000-00008>.
- McLaughlin, Lauren P., Catherine M. Bollard, and Michael D. Keller. 2018. "Adoptive T Cell Therapy for Epstein-Barr Virus Complications in Patients with Primary Immunodeficiency Disorders." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00556>.
- Melani, Christopher, Ajay Major, Jeffrey Schowinsky, Mark Roschewski, Stefania Pittaluga, Elaine S. Jaffe, Svetlana D. Pack, et al. 2017. "PD-1 Blockade in Mediastinal Gray-Zone Lymphoma." *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1704767>.
- Melzner, Ingo, Marc A. Weniger, Alexandra J. Bucur, Silke Brüderlein, Karola Dorsch, Cornelia Hasel, Frank Leithäuser, et al. 2006. "Biallelic Deletion within 16p13.13 Including *SOCS-1* in Karpas1106P Mediastinal B-Cell Lymphoma Line Is Associated with Delayed Degradation of JAK2 Protein." *International Journal of Cancer* 118 (8): 1941–44. <https://doi.org/10.1002/ijc.21485>.
- MENESTRINA, F., M. CHILOSI, F. BONETTI, M. LESTANI, A. SCARPA, P. NOVELLI, C. DOGLIONI, G. TODESCHINI, A. AMBROSETTI, and L. FIORE-DONATI. 1986. "Mediastinal Large-cell Lymphoma of B-type, with Sclerosis: Histopathological and Immunohistochemical Study of Eight Cases." *Histopathology* 10 (6): 589–600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1986.tb02512.x>.

- Messick, Troy E., Garry R. Smith, Samantha S. Soldan, Mark E. McDonnell, Julianna S. Deakyne, Kimberly A. Malecka, Lois Tolvinski, et al. 2019. "Structure-Based Design of Small-Molecule Inhibitors of EBNA1 DNA Binding Blocks Epstein-Barr Virus Latent Infection and Tumor Growth." *Science Translational Medicine* 11 (482). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5612>.
- Miloudi, Hadjer, Karen Leroy, Fabrice Jardin, and Brigitte Sola. 2018. "STAT6 Is a Cargo of Exportin 1: Biological Relevance in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma." *Cellular Signalling* 46 (June): 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.02.016>.
- Minami, Jiro, Nobuaki Dobashi, Osamu Asai, Shingo Yano, Hiroshi Osawa, Yutaka Takei, Yuichi Yahagi, et al. 2010. "Two Cases of Mediastinal Gray Zone Lymphoma." *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology: JCEH* 50 (2): 143–49. <https://doi.org/10.3960/jslrt.50.143>.
- Miyamoto, Toshihiro, Hiromi Iwasaki, Boris Reizis, Min Ye, Thomas Graf, Irving L. Weissman, and Koichi Akashi. 2002. "Myeloid or Lymphoid Promiscuity as a Critical Step in Hematopoietic Lineage Commitment." *Developmental Cell* 3 (1): 137–47. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00201-0](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00201-0).
- Moldenhauer, Gerhard, Sergey W. Popov, Beate Wotschke, Silke Brüderlein, Petra Riedl, Nicolas Fissolo, Reinhold Schirmbeck, Olga Ritz, Peter Möller, and Frank Leithäuser. 2006. "AID Expression Identifies Interfollicular Large B Cells as Putative Precursors of Mature B-Cell Malignancies." *Blood* 107 (6): 2470–73. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2502>.
- Molin, Daniel, Annika Edstrom, Ingrid Glimelius, Bengt Glimelius, Gunnar Nilsson, Christer Sundstrom, and Gunilla Enblad. 2002. "Mast Cell Infiltration Correlates with Poor Prognosis in Hodgkin's Lymphoma." *British Journal of Haematology* 119 (1): 122–24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2002.03768.x>.
- Möller, P, B Lämmle, B Herrmann, H F Otto, G Moldenhauer, and F Momburg. 1986. "The Primary Mediastinal Clear Cell Lymphoma of B-Cell Type Has Variable Defects in MHC

Antigen Expression.” *Immunology* 59 (3): 411–17.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3491784>.

Montes-Moreno, Santiago, Lina Odqvist, Julio A. Diaz-Perez, Ana Batlle Lopez, Sonia Gonzalez De Villambrosía, Francisco Mazorra, Maria E. Castillo, et al. 2012. “EBV-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly Is an Aggressive Post-Germinal Center B-Cell Neoplasm Characterized by Prominent Nuclear Factor-KB Activation.” *Modern Pathology* 25 (7): 968–82. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.52>.

Monti, Stefano, Kerry J. Savage, Jeffery L. Kutok, Friedrich Feuerhake, Paul Kurtin, Martin Mihm, Bingyan Wu, et al. 2005. “Molecular Profiling of Diffuse Large B-Cell Lymphoma Identifies Robust Subtypes Including One Characterized by Host Inflammatory Response.” *Blood* 105 (5): 1851–61. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2947>.

Morin, Ryan D., Maria Mendez-Lago, Andrew J. Mungall, Rodrigo Goya, Karen L. Mungall, Richard D. Corbett, Nathalie A. Johnson, et al. 2011. “Frequent Mutation of Histone-Modifying Genes in Non-Hodgkin Lymphoma.” *Nature* 476 (7360): 298–303. <https://doi.org/10.1038/nature10351>.

Mottok, A., S.S. Hung, E.A. Chavez, B. Woolcock, A. Telenius, L.C. Chong, B. Meissner, et al. 2019. “Integrative Genomic Analysis Identifies Key Pathogenic Mechanisms in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma.” *Blood* 134 (10): 802–13. <https://doi.org/10.1182/blood.2019001126>.

Mottok, Anja, Christoph Renné, Marc Seifert, Elsie Oppermann, Wolf Bechstein, Martin Leo Hansmann, Ralf Küppers, and Andreas Bräuninger. 2009. “Inactivating SOCS1 Mutations Are Caused by Aberrant Somatic Hypermutation and Restricted to a Subset of B-Cell Lymphoma Entities.” *Blood* 114 (20): 4503–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-225839>.

Mottok, Anja, and Christian Steidl. 2015. “Genomic Alterations Underlying Immune Privilege in Malignant Lymphomas.” *Current Opinion in Hematology*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MOH.000000000000155>.

- Mottok, Anja, George Wright, Andreas Rosenwald, German Ott, Colleen Ramsower, Elias Campo, Rita M. Braziel, et al. 2018. "Molecular Classification of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma Using Routinely Available Tissue Specimens." *Blood* 132 (22): 2401–5. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-05-851154>.
- Muppidi, Jagan R., Erick Lu, and Jason G. Cyster. 2015. "The G Protein-Coupled Receptor P2RY8 and Follicular Dendritic Cells Promote Germinal Center Confinement of B Cells, Whereas S1PR3 Can Contribute to Their Dissemination." *Journal of Experimental Medicine* 212 (13): 2213–22. <https://doi.org/10.1084/jem.20151250>.
- Muppidi, Jagan R, Roland Schmitz, Jesse A Green, Wenming Xiao, Adrien B Larsen, Sterling E Braun, Jinping An, et al. 2014. "Loss of Signalling via Gα13 in Germinal Centre B-Cell-Derived Lymphoma." *Nature* 516 (7530): 254–58. <https://doi.org/10.1038/nature13765>.
- Müschen, Markus, Daniel Re, Andreas Bräuninger, Jürgen Wolf, Martin-Leo Hansmann, Volker Diehl, Ralf Küppers, and Klaus Rajewsky. 2000. "Somatic Mutations of the CD95 Gene in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells." *Cancer Research* 60 (20).
- Nakashima, Makoto, Yumiko Ishii, Mariko Watanabe, Tomiteru Togano, Kazuo Umezawa, Masaaki Higashihara, Toshiki Watanabe, and Ryouichi Horie. 2010. "The Side Population, as a Precursor of Hodgkin and Reed-Sternberg Cells and a Target for Nuclear Factor-KB Inhibitors in Hodgkin's Lymphoma." *Cancer Science* 101 (11): 2490–96. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01693.x>.
- Nam-Cha, Syong H., Santiago Montes-Moreno, Maria T. Salcedo, Josefina Sanjuan, Juan F. Garcia, and Miguel A. Piris. 2009. "Lymphocyte-Rich Classical Hodgkin's Lymphoma: Distinctive Tumor and Microenvironment Markers." *Modern Pathology* 22 (8): 1006–15. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.54>.
- Natkunam, Yasodha, Pedro Farinha, Eric D. Hsi, Christine P. Hans, Robert Tibshirani, Laurie H. Sehn, Joseph M. Connors, et al. 2007. "LMO2 Protein Expression Predicts Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma in the Pre- and Post-Rituximab Treatment Eras." *Blood* 110 (11): 52–52. <https://doi.org/10.1182/blood.v110.11.52.52>.

“New Agents Designed to Fight EBV+ Cancers.” 2019. *Cancer Discovery*. NLM (Medline).
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2019-040>.

Nicolae, Alina, Stefania Pittaluga, Shahed Abdullah, Seth M. Steinberg, Thu Anh Pham, Theresa Davies-Hill, Liqiang Xi, Mark Raffeld, and Elaine S. Jaffe. 2015. “EBV-Positive Large B-Cell Lymphomas in Young Patients: A Nodal Lymphoma with Evidence for a Tolerogenic Immune Environment.” *Blood* 126 (7): 863–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-630632>.

Nomoto, Junko, Nobuhiro Hiramoto, Motohiro Kato, Masashi Sanada, Akiko M. Maeshima, Hirokazu Taniguchi, Fumie Hosoda, et al. 2012. “Deletion of the TNFAIP3/A20 Gene Detected by FICTION Analysis in Classical Hodgkin Lymphoma.” *BMC Cancer* 12 (1): 457. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-457>.

O’Shea, John J., Steven M. Holland, and Louis M. Staudt. 2013. “JAKs and STATs in Immunity, Immunodeficiency, and Cancer.” *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1202117>.

Ohshima, K., M. Akaiwa, R. Umeshita, J. Suzumiya, K. Izuhara, and M. Kikuchi. 2001. “Interleukin-13 and Interleukin-13 Receptor in Hodgkin’s Disease: Possible Autocrine Mechanism and Involvement in Fibrosis.” *Histopathology* 38 (4): 368–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2001.01083.x>.

Ok, Chi Young, Ling Li, Zijun Y. Xu-Monette, Carlo Visco, Alexander Tzankov, Ganiraju C. Manyam, Santiago Montes-Moreno, et al. 2014. “Prevalence and Clinical Implications of Epstein-Barr Virus Infection in de Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma in Western Countries.” *Clinical Cancer Research* 20 (9): 2338–49. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3157>.

Ok, Chi Young, Thomas G. Papathomas, L. Jeffrey Medeiros, and Ken H. Young. 2013. “EBV-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma of the Elderly.” *Blood* 122 (3): 328–40. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489708>.

Okazaki, Il-mi, Hiroshi Hiai, Naoki Kakazu, Shuichi Yamada, Masamichi Muramatsu, Kazuo

- Kinoshita, and Tasuku Honjo. 2003. "Constitutive Expression of AID Leads to Tumorigenesis." *Journal of Experimental Medicine* 197 (9): 1173–81. <https://doi.org/10.1084/jem.20030275>.
- Onozawa, Erika, Haruna Shibayama, Honami Takada, Ken Ichi Imadome, Sho Aoki, Mayumi Yoshimori, Norio Shimizu, et al. 2018. "STAT3 Is Constitutively Activated in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection and Can Be a Therapeutic Target." *Oncotarget* 9 (57): 31077–89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25780>.
- Oschlies, Ilske, Birgit Burkhardt, Itziar Salaverria, Andreas Rosenwald, Emanuele S.G. D'Amore, Monika Szczepanowski, Karoline Koch, et al. 2011. "Clinical, Pathological and Genetic Features of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphomas and Mediastinal Gray Zone Lymphomas in Children." *Haematologica* 96 (2): 262–68. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.030809>.
- Overbeck, Birte Malaika, Jose Inaki Martin-Subero, Ole Ammerpohl, Wolfram Klapper, Reiner Siebert, and Maciej Giefing. 2012. "Ets1 Encoding a Transcription Factor Involved in B-Cell Differentiation Is Recurrently Deleted and down-Regulated in Classical Hodgkin's Lymphoma." *Haematologica*. <https://doi.org/10.3324/haematol.2012.061770>.
- Oyama, Takashi, Koichi Ichimura, Ritsuro Suzuki, Junji Suzumiya, Koichi Ohshima, Yasushi Yatabe, Takio Yokoi, et al. 2003. "Senile EBV + B-Cell Lymphoproliferative Disorders: A Clinicopathologic Study of 22 Patients." *American Journal of Surgical Pathology* 27 (1): 16–26. <https://doi.org/10.1097/00000478-200301000-00003>.
- Perera, Jason, and Haochu Huang. 2015. "The Development and Function of Thymic B Cells." *Cellular and Molecular Life Sciences* 72 (14): 2657–63. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1895-1>.
- Perera, Jason, Liping Meng, Fanyong Meng, and Haochu Huang. 2013. "Autoreactive Thymic B Cells Are Efficient Antigen-Presenting Cells of Cognate Self-Antigens for T Cell Negative Selection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America 110 (42): 17011–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313001110>.

Phelan, James D., Ryan M. Young, Daniel E. Webster, Sandrine Roulland, George W. Wright, Monica Kasbekar, Arthur L. Shaffer, et al. 2018. “A Multiprotein Supercomplex Controlling Oncogenic Signalling in Lymphoma.” *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0290-0>.

Pileri, Stefano A., Gianluca Gaidano, Pier Luigi Zinzani, Brunangelo Falini, Philippe Gaulard, Emanuele Zucca, Federica Pieri, et al. 2003. “Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: High Frequency of BCL-6 Mutations and Consistent Expression of the Transcription Factors OCT-2, BOB.1, and PU.1 in the Absence of Immunoglobulins.” *American Journal of Pathology* 162 (1): 243–53. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63815-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63815-1).

Pilichowska, Monika, Stefania Pittaluga, Judith A. Ferry, Jessica Hemminger, Hong Chang, Jennifer A. Kanakry, Laurie H. Sehn, et al. 2017. “Clinicopathologic Consensus Study of Gray Zone Lymphoma with Features Intermediate between DLBCL and Classical HL.” *Blood Advances* 1 (26): 2600–2609. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017009472>.

Pittaluga, Stefania, Alina Nicolae, George W. Wright, Christopher Melani, Mark Roschewski, Seth Steinberg, DaWei Huang, Louis M. Staudt, Elaine S. Jaffe, and Wyndham H. Wilson. 2020. “Gene Expression Profiling of Mediastinal Gray Zone Lymphoma and Its Relationship to Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma and Classical Hodgkin Lymphoma.” *Blood Cancer Discovery*, March. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-20-0009>.

Quintanilla-Martinez, Leticia, Daphne de Jong, Antoine de Mascarel, Eric D. His, Philip Kluin, Yaso Natkunam, Marie Parrens, Stefano Pileri, and German Ott. 2009. “Gray Zones around Diffuse Large B Cell Lymphoma. Conclusions Based on the Workshop of the XIV Meeting of the European Association for Hematopathology and the Society of Hematopathology in Bordeaux, France.” *Journal of Hematopathology* 2 (4): 211–36. <https://doi.org/10.1007/s12308-009-0053-9>.

Rassidakis, George Z., L. Jeffrey Medeiros, Simonetta Viviani, Valeria Bonfante, Gian-Paolo

- Nadali, Theodoros P. Vassilakopoulos, Ofelia Mesina, et al. 2002. "CD20 Expression in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Classical Hodgkin's Disease: Associations With Presenting Features and Clinical Outcome." *Journal of Clinical Oncology* 20 (5): 1278–87. <https://doi.org/10.1200/jco.2002.20.5.1278>.
- Re, Daniel, Markus Müschen, Tahamtan Ahmadi, Claudia Wickenhauser, Andrea Staratschek-Jox, Udo Holtick, Volker Diehl, and Jürgen Wolf. 2001. "Oct-2 and Bob-1 Deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg Cells." *Cancer Research* 61 (5): 2080–84.
- Reed. 1902. "On the Pathological Changes in Hodgkin's Disease, with Special Reference to Its Relation to Tuberculosis." *The Johns Hopkins Hospital Reports*, no. 10: 133–96.
- Reichel, Jonathan, Amy Chadburn, Paul G. Rubinstein, Lisa Giulino-Roth, Wayne Tam, Yifang Liu, Rafael Gaiolla, et al. 2015. "Flow Sorting and Exome Sequencing Reveal the Oncogenome of Primary Hodgkin and Reed-Sternberg Cells." *Blood* 125 (7): 1061–72. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-610436>.
- Rengstl, Benjamin, Sebastian Newrzela, Tim Heinrich, Christian Weiser, Frederic B. Thalheimer, Frederike Schmid, Kathrin Warner, et al. 2013. "Incomplete Cytokinesis and Re-Fusion of Small Mononucleated Hodgkin Cells Lead to Giant Multinucleated Reed-Sternberg Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (51): 20729–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312509110>.
- Renné, Christoph, Jose Ignacio Martin-Subero, Maren Eickernjäger, Martin Leo Hansmann, Ralf Küppers, Reiner Siebert, and Andreas Bräuninger. 2006. "Aberrant Expression of ID2, a Suppressor of B-Cell-Specific Gene Expression, in Hodgkin's Lymphoma." *American Journal of Pathology* 169 (2): 655–64. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060020>.
- Renné, Christoph, Sarah Minner, Ralf Küppers, Martin Leo Hansmann, and Andreas Bräuninger. 2008. "Autocrine NGF β /TRKA Signalling Is an Important Survival Factor for Hodgkin Lymphoma Derived Cell Lines." *Leukemia Research* 32 (1): 163–67. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.05.019>.
- Ritz, Olga, Chrystelle Guiter, Flavia Castellano, Karola Dorsch, Julia Melzner, Jean-Philippe Jais,

- Gwendoline Dubois, Philippe Gaulard, Peter Möller, and Karen Leroy. 2009. "Recurrent Mutations of the STAT6 DNA Binding Domain in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma." *Blood* 114 (6): 1236–42. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209759>.
- Rodig, Scott J., Kerry J. Savage, Ann S. LaCasce, Andrew P. Weng, Nancy L. Harris, Margaret A. Shipp, Eric D. Hsi, Randy D. Gascoyne, and Jeffery L. Kutok. 2007. "Expression of TRAF1 and Nuclear C-Rel Distinguishes Primary Mediastinal Large Cell Lymphoma from Other Types of Diffuse Large B-Cell Lymphoma." *American Journal of Surgical Pathology* 31 (1): 106–12. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213334.40358.0e>.
- Roemer, Margaretha G.M., Ranjana H. Advani, Azra H. Ligon, Yasodha Natkunam, Robert A. Redd, Heather Homer, Courtney F. Connelly, et al. 2016. "PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome." *Journal of Clinical Oncology* 34 (23): 2690–97. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.66.4482>.
- Roemer, Margaretha G.M., Ranjana H. Advani, Robert A. Redd, Geraldine S. Pinkus, Yasodha Natkunam, Azra H. Ligon, Courtney F. Connelly, et al. 2016. "Classical Hodgkin Lymphoma with Reduced B2M/MHC Class I Expression Is Associated with Inferior Outcome Independent of 9p24.1 Status." *Cancer Immunology Research* 4 (11): 910–16. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0201>.
- Rosenwald, Andreas, George Wright, Wing C. Chan, Joseph M. Connors, Elias Campo, Richard I. Fisher, Randy D. Gascoyne, et al. 2002. "The Use of Molecular Profiling to Predict Survival after Chemotherapy for Diffuse Large-B-Cell Lymphoma." *New England Journal of Medicine* 346 (25): 1937–47. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012914>.
- Rosenwald, Andreas, George Wright, Karen Leroy, Xin Yu, Philippe Gaulard, Randy D. Gascoyne, Wing C. Chan, et al. 2003. "Molecular Diagnosis of Primary Mediastinal B Cell Lymphoma Identifies a Clinically Favorable Subgroup of Diffuse Large B Cell Lymphoma Related to Hodgkin Lymphoma." *Journal of Experimental Medicine* 198 (6): 851–62. <https://doi.org/10.1084/jem.20031074>.
- Rossi, D., M. Cerri, D. Capello, C. Deambrogi, E. Berra, S. Franceschetti, O. Alabiso, et al. 2005.

- “Aberrant Somatic Hypermutation in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma [16].” *Leukemia* 19 (12): 2363–66. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403982>.
- Rudiger, T., E. S. Jaffe, G. Delsol, C. deWolf-Peeters, R. D. Gascoyne, A. Georgii, N. L. Harris, et al. 1998. “Workshop Report on Hodgkin’s Disease and Related Diseases (‘grey Zone’ Lymphoma).” *Annals of Oncology* 9 (suppl 5): S31–38. https://doi.org/10.1093/annonc/9.suppl_5.S31.
- Rui, Lixin, N. C. Tolga Emre, Michael J. Kruhlak, Hye Jung Chung, Christian Steidl, Graham Slack, George W. Wright, et al. 2010. “Cooperative Epigenetic Modulation by Cancer Amplicon Genes.” *Cancer Cell* 18 (6): 590–605. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.013>.
- Ruland, Jürgen, Gordon S. Duncan, Andrew Elia, Ivan Del Barco Barrantes, Linh Nguyen, Sue Plyte, Douglas G. Millar, et al. 2001. “Bcl10 Is a Positive Regulator of Antigen Receptor-Induced Activation of NF- κ B and Neural Tube Closure.” *Cell* 104 (1): 33–42. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00189-1).
- Sant, Milena, Claudia Allemani, Carmen Tereanu, Roberta De Angelis, Riccardo Capocaccia, Otto Visser, Rafael Marcos-Gragera, et al. 2010. “Incidence of Hematologic Malignancies in Europe by Morphologic Subtype: Results of the HAEMACARE Project.” *Blood* 116 (19): 3724–34. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282632>.
- Sarkozy, C., C. Copie-Bergman, D. Damotte, S. Ben-Neriah, B. Burrioni, J. Cornillon, R. Lemal, et al. 2019. “Gray-Zone Lymphoma between CHL and Large B-Cell Lymphoma.” *American Journal of Surgical Pathology* 43 (3). <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001198>.
- Sarkozy, C., T. Molina, H. Ghesquières, A.-S. Michallet, J. Dupuis, D. Damotte, F. Morsschauser, et al. 2017. “Mediastinal Gray Zone Lymphoma: Clinico-Pathological Characteristics and Outcomes of 99 Patients from the Lymphoma Study Association.” *Haematologica* 102 (1). <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.152256>.
- Sarkozy, C., and G. Salles. 2019. “Updates on Non-Follicular Small Cell Lymphomas.” *Presse Medicale* 48 (7-8P1). <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2019.07.025>.
- Sarkozy, Clémentine, Christiane Copie-Bergman, Diane Damotte, Susana Ben-Neriah, Barbara

- Burroni, Jérôme Cornillon, Richard Lemal, et al. 2019. "Gray-Zone Lymphoma between CHL and Large B-Cell Lymphoma." *American Journal of Surgical Pathology* 43 (3): 341–51. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001198>.
- Sasaki, Yoshiteru, Emmanuel Derudder, Elias Hobeika, Roberta Pelanda, Michael Reth, Klaus Rajewsky, and Marc Schmidt-Suppran. 2006. "Canonical NF- κ B Activity, Dispensable for B Cell Development, Replaces BAFF-Receptor Signals and Promotes B Cell Proliferation upon Activation." *Immunity* 24 (6): 729–39. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.005>.
- Savage, K. J., N. Al-Rajhi, N. Voss, C. Paltiel, R. Klasa, R. D. Gascoyne, and J. M. Connors. 2006. "Favorable Outcome of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma in a Single Institution: The British Columbia Experience." *Annals of Oncology* 17 (1): 123–30. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdj030>.
- Savage, Kerry J., Stefano Monti, Jeffery L. Kutok, Giorgio Cattoretti, Donna Neuberg, Laurence De Leval, Paul Kurtin, et al. 2003. "The Molecular Signature of Mediastinal Large B-Cell Lymphoma Differs from That of Other Diffuse Large B-Cell Lymphomas and Shares Features with Classical Hodgkin Lymphoma." *Blood* 102 (12): 3871–79. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1841>.
- Scheeren, Ferenc A., Sean A. Diehl, Laura A. Smit, Tim Beaumont, Marianne Naspetti, Richard J. Bende, Bianca Blom, et al. 2008. "IL-21 Is Expressed in Hodgkin Lymphoma and Activates STAT5: Evidence That Activated STAT5 Is Required for Hodgkin Lymphomagenesis." *Blood* 111 (9): 4706–15. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-105643>.
- Schmid, C, L Pan, T Diss, and P G Isaacson. 1991. "Expression of B-Cell Antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg Cells." *The American Journal of Pathology* 139 (4): 701–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1656757>.
- Schmitz, Roland, Martin Leo Hansmann, Verena Bohle, Jose Ignacio Martin-Subero, Sylvia Hartmann, Gunhild Mechttersheimer, Wolfram Klapper, et al. 2009. "TNFAIP3 (A20) Is a

Tumor Suppressor Gene in Hodgkin Lymphoma and Primary Mediastinal B Cell Lymphoma.” *Journal of Experimental Medicine* 206 (5): 981–89. <https://doi.org/10.1084/jem.20090528>.

Schmitz, Roland, George W. Wright, Da Wei Huang, Calvin A. Johnson, James D. Phelan, James Q. Wang, Sandrine Roulland, et al. 2018. “Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma.” *New England Journal of Medicine* 378 (15): 1396–1407. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801445>.

Schneider, Eva Maria, Emina Torlakovic, Albert Stühler, Volker Diehl, Hans Tesch, and Bernd Giebel. 2004. “The Early Transcription Factor GATA-2 Is Expressed in Classical Hodgkin’s Lymphoma.” *Journal of Pathology* 204 (5): 538–45. <https://doi.org/10.1002/path.1664>.

Schneider, Markus, Stefanie Schneider, Reina Zühlke-Jenisch, Wolfram Klapper, Christer Sundström, Sylvia Hartmann, Martin Leo Hansmann, Reiner Siebert, Ralf Küppers, and Maciej Giefing. 2015. “Alterations of the CD58 Gene in Classical Hodgkin Lymphoma.” *Genes Chromosomes and Cancer* 54 (10): 638–45. <https://doi.org/10.1002/gcc.22276>.

Schwering, Ines, Andreas Bräuninger, Ulf Klein, Berit Jungnickel, Marianne Tinguely, Volker Diehl, Martin Leo Hansmann, Riccardo Dalla-Favera, Klaus Rajewsky, and Ralf Küppers. 2003. “Loss of the B-Lineage-Specific Gene Expression Program in Hodgkin and Reed-Sternberg Cells of Hodgkin Lymphoma.” *Blood* 101 (4): 1505–12. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0839>.

Seidemann, K, M Tiemann, I Lauterbach, G Mann, I Simonitsch, K Stankewitz, M Schrappe, et al. 2003. “Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma with Sclerosis in Pediatric and Adolescent Patients: Treatment and Results from Three Therapeutic Studies of the Berlin-Frankfurt-Münster Group.” *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (9): 1782–89. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.08.151>.

Senapedis, William T., Erkan Baloglu, and Yosef Landesman. 2014. “Clinical Translation of Nuclear Export Inhibitors in Cancer.” *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2014.04.005>.

- Shafer, Jessica A., Conrad R. Cruz, Ann M. Leen, Stephanie Ku, An Lu, Alexandra Rousseau, Helen E. Heslop, Cliona M. Rooney, Catherine M. Bollard, and Aaron E. Foster. 2010. "Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes Can Target Chemoresistant Side-Population Tumor Cells in Hodgkin Lymphoma." *Leukemia and Lymphoma* 51 (5): 870–80. <https://doi.org/10.3109/10428191003713968>.
- Shen, R.R., C.D. Pham, M. Wu, D.J. Munson, and B.T. Aftab. 2019. "CD19 Chimeric Antigen Receptor (CAR) Engineered Epstein-Barr Virus (EBV) Specific T Cells – an off-the-Shelf, Allogeneic CAR T-Cell Immunotherapy Platform." *Cytotherapy* 21 (5): S11. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.03.569>.
- Skinnider, Brian F., Andrew J. Elia, Randy D. Gascoyne, Bruce Patterson, Lorenz Trumper, Ursula Kapp, and Tak W. Mak. 2002. "Signal Transducer and Activator of Transcription 6 Is Frequently Activated in Hodgkin and Reed-Stenberg Cells of Hodgkin Lymphoma." *Blood* 99 (2): 618–26. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.2.618>.
- Slack, Graham W., and Randy D. Gascoyne. 2013. "Next-Generation Sequencing Discoveries in Lymphoma." *Advances in Anatomic Pathology*. Adv Anat Pathol. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3182862724>.
- Slack, Graham W., Christian Steidl, Laurie H. Sehn, and Randy D. Gascoyne. 2014. "CD30 Expression in de Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Population-Based Study from British Columbia." *British Journal of Haematology* 167 (5): 608–17. <https://doi.org/10.1111/bjh.13085>.
- Spina, Valeria, Alessio Bruscaggin, Annarosa Cuccaro, Maurizio Martini, Martina Di Trani, Gabriela Forestieri, Martina Manzoni, et al. 2018. "Circulating Tumor DNA Reveals Genetics, Clonal Evolution, and Residual Disease in Classical Hodgkin Lymphoma." *Blood* 131 (22): 2413–25. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-812073>.
- Steidl, Christian, Joseph M. Connors, and Randy D. Gascoyne. 2011. "Molecular Pathogenesis of Hodgkin's Lymphoma: Increasing Evidence of the Importance of the Microenvironment." *Journal of Clinical Oncology* 29 (14): 1812–26.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.8401>.

Steidl, Christian, Arjan Diepstra, Tang Lee, Fong Chun Chan, Pedro Farinha, King Tan, Adele Telenius, et al. 2012. "Gene Expression Profiling of Microdissected Hodgkin Reed-Sternberg Cells Correlates with Treatment Outcome in Classical Hodgkin Lymphoma." *Blood* 120 (17): 3530–40. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-439570>.

Steidl, Christian, and Randy D. Gascoyne. 2011. "The Molecular Pathogenesis of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma." *Blood*. American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-326538>.

Steidl, Christian, Tang Lee, Sohrab P. Shah, Pedro Farinha, Guangming Han, Tarun Nayar, Allen Delaney, et al. 2010. "Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma." *New England Journal of Medicine* 362 (10): 875–85. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905680>.

Steidl, Christian, Sohrab P. Shah, Bruce W. Woolcock, Lixin Rui, Masahiro Kawahara, Pedro Farinha, Nathalie A. Johnson, et al. 2011. "MHC Class II Transactivator CIITA Is a Recurrent Gene Fusion Partner in Lymphoid Cancers." *Nature* 471 (7338): 377–83. <https://doi.org/10.1038/nature09754>.

Steidl, Christian, Adele Telenius, Sohrab P. Shah, Pedro Farinha, Lorena Barclay, Merrill Boyle, Joseph M. Connors, Douglas E. Horsman, and Randy D. Gascoyne. 2010. "Genome-Wide Copy Number Analysis of Hodgkin Reed-Sternberg Cells Identifies Recurrent Imbalances with Correlations to Treatment Outcome." *Blood* 116 (3): 418–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257345>.

Stein, Harald, Theresa Marafioti, Hans Dieter Foss, Helmut Laumen, Michael Hummel, Ioannis Anagnostopoulos, Thomas Wirth, Gudrun Demel, and Brunangelo Falini. 2001. "Down-Regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in Classical Hodgkin Disease but Not in Lymphocyte Predominant Hodgkin Disease Correlates with Immunoglobulin Transcription." *Blood* 97 (2): 496–501. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.2.496>.

Sternberg. 1898. "Über Eine Eigenartige Unter Dem Bilde Der Pseudoleukämie Verlaufende

- Tuberkolose Des Lymphatischen." *Heilkunde*, no. 19: 21–90.
- Strahl, Brian D., and C. David Allis. 2000. "The Language of Covalent Histone Modifications." *Nature*. Nature. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- Sujobert, Pierre, Gilles Salles, and Emmanuel Bachy. 2016. "Molecular Classification of Diffuse Large B-Cell Lymphoma: What Is Clinically Relevant?" *Hematology/Oncology Clinics of North America*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2016.07.001>.
- Sun, Qingxiang, Yazmin P. Carrasco, Youcai Hu, Xiaofeng Guo, Hamid Mirzaei, John MacMillan, and Yuh Min Chook. 2013. "Nuclear Export Inhibition through Covalent Conjugation and Hydrolysis of Leptomycin B by CRM1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (4): 1303–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217203110>.
- Svoboda, Jakub, Steven M. Bair, Daniel J. Landsburg, Sunita Dwivedy Nasta, Sarah J. Nagle, Stefan K. Barta, Nadia Khan, et al. 2020. "Brentuximab Vedotin in Combination with Rituximab, Cyclophosphamide, Doxorubicin, and Prednisone as Frontline Treatment for Patients with CD30-Positive B-Cell Lymphomas." *Haematologica*, haematol.2019.238675. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.238675>.
- Svoboda, Jakub, Steven M. Bair, Christian Steidl, Marco Ruella, Daniel J. Landsburg, Sunita Dwivedy Nasta, Stefan Klaus Barta, et al. 2018. "Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma: Evaluation of Clinicopathologic Diagnosis Compared to Gene Expression Based Diagnosis in a Clinical Trial with CD30+ B-Cell Lymphomas." *Blood* 132 (Supplement 1): 2959–2959. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-115024>.
- Swerdlow, Steven H., Elias Campo, Stefano A. Pileri, Nancy Lee Harris, Harald Stein, Reiner Siebert, Ranjana Advani, et al. 2016. "The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms." *Blood*. American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>.
- Szydłowski, Maciej, Monika Prochorec-Sobieszek, Anna Szumera-Ciećkiewicz, Edyta Derezińska, Grażyna Hoser, Danuta Wasilewska, Olga Szymańska-Giemza, et al. 2017.

- “Expression of PIM Kinases in Reed-Sternberg Cells Fosters Immune Privilege and Tumor Cell Survival in Hodgkin Lymphoma.” *Blood* 130 (12): 1418–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-760702>.
- Takaba, Hiroyuki, and Hiroshi Takayanagi. 2017. “The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus.” *Trends in Immunology* 38 (11): 805–16. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.07.010>.
- Tan, David S.P., Philippe L. Bedard, John Kuruvilla, Lillian L. Siu, and Albiruni R. Abdul Razak. 2014. “Promising SINEs for Embargoing Nuclear-Cytoplasmic Export as an Anticancer Strategy.” *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1005>.
- Tan, King L., David W. Scott, Fangxin Hong, Brad S. Kahl, Richard I. Fisher, Nancy L. Bartlett, Ranjana H. Advani, et al. 2012. “Tumor-Associated Macrophages Predict Inferior Outcomes in Classic Hodgkin Lymphoma: A Correlative Study from the E2496 Intergroup Trial.” *Blood* 120 (16): 3280–87. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-421057>.
- Tanijiri, Tsutomu, Toshiki Shimizu, Kazutaka Uehira, Takashi Yokoi, Hideki Amuro, Hiroyuki Sugimoto, Yoshitaro Torii, et al. 2007. “Hodgkin’s Reed-Sternberg Cell Line (KM-H2) Promotes a Bidirectional Differentiation of CD4 + CD25 + Foxp3 + T Cells and CD4 + Cytotoxic T Lymphocytes from CD4 + Naive T Cells.” *Journal of Leukocyte Biology* 82 (3): 576–84. <https://doi.org/10.1189/jlb.0906565>.
- Thorley-Lawson, David A., Karen A. Duca, and Michael Shapiro. 2008. “Epstein-Barr Virus: A Paradigm for Persistent Infection - for Real and in Virtual Reality.” *Trends in Immunology*. Trends Immunol. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.01.006>.
- Tiacci, Enrico, Claudia Döring, Verena Brune, Carel J.M. Van Noesel, Wolfram Klapper, Gunhild Mechttersheimer, Brunangelo Falini, Ralf Küppers, and Martin Leo Hansmann. 2012. “Analyzing Primary Hodgkin and Reed-Sternberg Cells to Capture the Molecular and Cellular Pathogenesis of Classical Hodgkin Lymphoma.” *Blood* 120 (23): 4609–20. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-428896>.

- Tiacci, Enrico, Erik Ladewig, Gianluca Schiavoni, Alex Penson, Elisabetta Fortini, Valentina Pettirossi, Yuchun Wang, et al. 2018. "Pervasive Mutations of JAK-STAT Pathway Genes in Classical Hodgkin Lymphoma." *Blood* 131 (22): 2454–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-814913>.
- Torlakovic, E., A. Tierens, H. D. Dang, and J. Delabie. 2001. "The Transcription Factor PU.1, Necessary for B-Cell Development Is Expressed in Lymphocyte Predominance, but Not Classical Hodgkin's Disease." *American Journal of Pathology* 159 (5): 1807–14. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63027-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63027-1).
- Traverse-Glehen, Alexandra, Stefania Pittaluga, Philippe Gaulard, Lynn Sorbara, Miguel A. Alonso, Mark Raffeld, and Elaine S. Jaffe. 2005. "Mediastinal Gray Zone Lymphoma: The Missing Link between Classic Hodgkin's Lymphoma and Mediastinal Large B-Cell Lymphoma." *American Journal of Surgical Pathology* 29 (11): 1411–21. <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000180856.74572.73>.
- Twa, David D.W., Fong Chun Chan, Susana Ben-Neriah, Bruce W. Woolcock, Anja Mottok, King L. Tan, Graham W. Slack, et al. 2014. "Genomic Rearrangements Involving Programmed Death Ligands Are Recurrent in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma." *Blood* 123 (13): 2062–65. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-535443>.
- Tzankov, Alexandar, Annette Zimpfer, Ann Christine Pehrs, Alessandro Lugli, Philip Went, Robert Maurer, Stefano Pileri, and Stephan Dirnhofer. 2003. "Expression of B-Cell Markers in Classical Hodgkin Lymphoma: A Tissue Microarray Analysis of 330 Cases." *Modern Pathology* 16 (11): 1141–47. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000093627.51090.3F>.
- Urayama, Kevin Y, Ruth F Jarrett, Henrik Hjalgrim, Arjan Diepstra, Yoichiro Kamatani, Amelie Chabrier, Valerie Gaborieau, et al. 2012. "Genome-Wide Association Study of Classical Hodgkin Lymphoma and Epstein-Barr Virus Status-Defined Subgroups." *Journal of the National Cancer Institute* 104 (3): 240–53. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr516>.
- Ushmorov, Alexey, Frank Leithäuser, Olena Sakk, Andreas Weinhäusel, Sergey W. Popov, Peter

- Möller, and Thomas Wirth. 2006. "Epigenetic Processes Play a Major Role in B-Cell-Specific Gene Silencing in Classical Hodgkin Lymphoma." *Blood* 107 (6): 2493–2500. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3765>.
- Venkataraman, Girish, Mark Raffeld, Stefania Pittaluga, and Elaine S. Jaffe. 2011. "CD15-Expressing Nodular Lymphocyte-Predominant Hodgkin Lymphoma." *Histopathology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03829.x>.
- Vigano, Elena, Jay Gunawardana, Anja Mottok, Tessa Van Tol, Katina Mak, Fong Chun Chan, Lauren Chong, et al. 2018. "Somatic IL4R Mutations in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma Lead to Constitutive JAK-STAT Signaling Activation." *Blood* 131 (18): 2036–46. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-808907>.
- Vockerodt, Martina, Lee Fah Yap, Claire Shannon-Lowe, Helen Curley, Wenbin Wei, Katerina Vrzalikova, and Paul G. Murray. 2015a. "The Epstein-Barr Virus and the Pathogenesis of Lymphoma." *Journal of Pathology* 235 (2): 312–22. <https://doi.org/10.1002/path.4459>.
- . 2015b. "The Epstein-Barr Virus and the Pathogenesis of Lymphoma." *Journal of Pathology* 235 (2): 312–22. <https://doi.org/10.1002/path.4459>.
- Vrzalikova, K., M. Ibrahim, M. Vockerodt, T. Perry, S. Margielewska, L. Lupino, E. Nagy, et al. 2018. "S1PR1 Drives a Feedforward Signalling Loop to Regulate BATF3 and the Transcriptional Programme of Hodgkin Lymphoma Cells." *Leukemia* 32 (1): 214–23. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.275>.
- Wang, Chong, Sizun Jiang, Luyao Zhang, Difei Li, Jun Liang, Yohei Narita, Isabella Hou, et al. 2019. "TAF Family Proteins and MEF2C Are Essential for Epstein-Barr Virus Super-Enhancer Activity." *Journal of Virology* 93 (16). <https://doi.org/10.1128/jvi.00513-19>.
- Wasielewski, Reinhard Von, S. Seth, J. Franklin, R. Fischer, K. Hübner, M. L. Hansmann, V. Diehl, and A. Georgii. 2000. "Tissue Eosinophilia Correlates Strongly with Poor Prognosis in Nodular Sclerosing Hodgkin's Disease, Allowing for Known Prognostic Factors." *Blood* 95 (4): 1207–13. https://doi.org/10.1182/blood.v95.4.1207.004k34_1207_1213.
- Weinberg, Olga K., Scott J. Rodig, Olga Pozdnyakova, Li Ren, Daniel A. Arber, and Robert S.

- Ohgami. 2015. "Surface Light Chain Expression in Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphomas by Multiparameter Flow Cytometry." *American Journal of Clinical Pathology* 144 (4): 635–41. <https://doi.org/10.1309/AJCP3Q1DHWKCQRWY>.
- Weinreb, M., P. J.R. Day, F. Niggli, E. K. Green, A. O. Nyong'o, N. A. Othieno-Abinya, M. S. Riyat, F. Raafat, and J. R. Mann. 1996. "The Consistent Association between Epstein-Barr Virus and Hodgkin's Disease in Children in Kenya." *Blood* 87 (9): 3828–36. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.9.3828.bloodjournal8793828>.
- Weinreb, M, P J R Day, F Niggli, J E Powell, F Raafat, P B Hesseling, J W Schneider, et al. 1996. "The Role of Epstein-Barr Virus in Hodgkin's Disease from Different Geographical Areas." *Archives of Disease in Childhood* 74: 27–31. <https://doi.org/10.1136/adc.74.1.27>.
- Weinstock, David M., Riccardo Dalla-Favera, Randy D. Gascoyne, John P. Leonard, Ronald Levy, Izidore S. Lossos, Ari M. Melnick, et al. 2015. "A Roadmap for Discovery and Translation in Lymphoma." *Blood*. American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-01-623777>.
- Weniger, M. A., I. Melzner, C. K. Menz, S. Wegener, A. J. Bucur, K. Dorsch, T. Mattfeldt, T. F.E. Barth, and P. Möller. 2006. "Mutations of the Tumor Suppressor Gene SOCS-1 in Classical Hodgkin Lymphoma Are Frequent and Associated with Nuclear Phospho-STAT5 Accumulation." *Oncogene* 25 (18): 2679–84. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209151>.
- Weniger, Marc A., Stefan Gesk, Steve Ehrlich, José I. Martin-Subero, Martin J. S. Dyer, Reiner Siebert, Peter Möller, and Thomas F. E. Barth. 2007. "Gains OfREL in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma Coincide with Nuclear Accumulation of REL Protein." *Genes, Chromosomes and Cancer* 46 (4): 406–15. <https://doi.org/10.1002/gcc.20420>.
- Weniger, Marc A., Enrico Tiacci, Stefanie Schneider, Judith Arnolds, Sabrina Rüschenbaum, Janine Duppach, Marc Seifert, Claudia Döring, Martin Leo Hansmann, and Ralf Küppers. 2018. "Human CD30+ B Cells Represent a Unique Subset Related to Hodgkin Lymphoma Cells." *Journal of Clinical Investigation* 128 (7): 2996–3007. <https://doi.org/10.1172/JCI95993>.

- Wenzl, Kerstin, Michelle K. Manske, Vivekananda Sarangi, Yan W. Asmann, Patricia T. Greipp, Hanna R. Schoon, Esteban Braggio, et al. 2018. "Loss of TNFAIP3 Enhances MYD88 L265P-Driven Signaling in Non-Hodgkin Lymphoma." *Blood Cancer Journal* 8 (10): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0130-3>.
- Wessendorf, S., T. F.E. Barth, A. Viardot, A. Mueller, H. A. Kestler, H. Kohlhammer, P. Lichter, et al. 2007. "Further Delineation of Chromosomal Consensus Regions in Primary Mediastinal B-Cell Lymphomas: An Analysis of 37 Tumor Samples Using High-Resolution Genomic Profiling (Array-CGH)." *Leukemia* 21 (12): 2463–69. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404919>.
- Westernberg, Luise, Claire Conche, Yina Hsing Huang, Stephanie Rigaud, Yisong Deng, Sabine Siegemund, Sayak Mukherjee, Lyn'Al Nosaka, Jayajit Das, and Karsten Sauer. 2016. "Non-Canonical Antagonism of PI3K by the Kinase Itpkb Delays Thymocyte β -Selection and Renders It Notch-Dependent." *ELife* 5 (FEBRUARY2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.10786>.
- Wienand, Kirsty, Bjoern Chapuy, Chip Stewart, Andrew J. Dunford, David Wu, Jaegil Kim, Atanas Kamburov, Timothy R. Wood, Fathima Zumla Cader, Matthew D. Ducar, et al. 2019. "Genomic Analyses of Flow-Sorted Hodgkin Reed-Sternberg Cells Reveal Complementary Mechanisms of Immune Evasion." *Blood Advances* 3 (23): 4065–80. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001012>.
- Wienand, Kirsty, Bjoern Chapuy, Chip Stewart, Andrew J Dunford, David Wu, Jaegil Kim, Atanas Kamburov, Timothy R Wood, Fathima Zumla Cader, D Matthew, et al. 2019. "Genomic Analyses of Flow-Sorted Hodgkin Reed Sternberg Cells Reveal Complementary Mechanisms of Immune Evasion Genomic Analyses of Flow-Sorted Hodgkin Reed Sternberg Cells Reveal Complementary Mechanisms of Immune Evasion Correspondence :"
- Wilson, Wyndham H, Stefania Pittaluga, Alina Nicolae, Kevin Camphausen, Margaret Shovlin, Seth M Steinberg, Mark Roschewski, Louis M Staudt, Elaine S Jaffe, and Kieron Dunleavy. 2014. "CLINICAL TRIALS AND OBSERVATIONS A Prospective Study of Mediastinal Gray-

Zone Lymphoma.” *Blood* 124 (10): 1563–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-564906>.The.

Witte, Hanno M., Hartmut Merz, Harald Biersack, Veronica Bernard, Armin Riecke, Judith Gebauer, Hendrik Lehnert, Nikolas von Bubnoff, Alfred C. Feller, and Niklas Gebauer. 2020. “Impact of Treatment Variability and Clinicopathological Characteristics on Survival in Patients with Epstein-Barr-Virus Positive Diffuse Large B Cell Lymphoma.” *British Journal of Haematology*. <https://doi.org/10.1111/bjh.16342>.

Xavier de Carvalho, Ana, Helder Maiato, André F. Maia, Susana A. Ribeiro, Patrícia Pontes, Wendy Bickmore, William C. Earnshaw, and Clara Sambade. 2015. “Reed-Sternberg Cells Form by Abscission Failure in the Presence of Functional Aurora B Kinase.” Edited by Luwen Zhang. *PLOS ONE* 10 (5): e0124629. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124629>.

Yamamoto, Ryo, Momoko Nishikori, Toshio Kitawaki, Tomomi Sakai, Masakatsu Hishizawa, Masaharu Tashima, Tadakazu Kondo, et al. 2008. “PD-1 PD-1 Ligand Interaction Contributes to Immunosuppressive Microenvironment of Hodgkin Lymphoma.” *Blood* 111 (6): 3220–24. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-085159>.

Yamano, Tomoyoshi, Jelena Nedjic, Maria Hinterberger, Madlen Steinert, Sandra Koser, Sheena Pinto, Norbert Gerdes, et al. 2015. “Thymic B Cells Are Licensed to Present Self Antigens for Central T Cell Tolerance Induction.” *Immunity* 42 (6): 1048–61. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.013>.

Yoon, Heejei, Sanghui Park, Hyunjeong Ju, Sang Yun Ha, Insuk Sohn, Jisuk Jo, In Gu Do, et al. 2015. “Integrated Copy Number and Gene Expression Profiling Analysis of Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large b-Cell Lymphoma.” *Genes Chromosomes and Cancer* 54 (6): 383–96. <https://doi.org/10.1002/gcc.22249>.

Young, Lawrence S., and Alan B. Rickinson. 2004. “Epstein-Barr Virus: 40 Years On.” *Nature Reviews Cancer*. *Nat Rev Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>.

Yuan, Ji, George Wright, Andreas Rosenwald, Christian Steidl, Randy D. Gascoyne, Joseph M.

- Connors, Anja Mottok, et al. 2015. "Identification of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma at Nonmediastinal Sites by Gene Expression Profiling." *American Journal of Surgical Pathology* 39 (10): 1322–30. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000473>.
- Zahn, Malena, Ralf Marienfeld, Ingo Melzner, Janine Heinrich, Benjamin Renner, Silke Wegener, Anna Mießner, et al. 2017. "A Novel PTPN1 Splice Variant Upregulates JAK/STAT Activity in Classical Hodgkin Lymphoma Cells." *Blood* 129 (11): 1480–90. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-720516>.
- Zamò, Alberto, Giorgio Malpeli, Aldo Scarpa, Claudio Doglioni, Marco Chilosi, and Fabio Menestrina. 2005. "Expression of TP73L Is a Helpful Diagnostic Marker of Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphomas." *Modern Pathology* 18 (11): 1448–53. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800440>.
- Zhou, Honglin, Ingrid Wertz, Karen O'Rourke, Mark Ultsch, Somasekar Seshagir, Michael Eby, Wei Xiao, and Vishva M. Dixit. 2004. "Bcl10 Activates the NF-KB Pathway through Ubiquitination of NEMO." *Nature* 427 (6970): 167–71. <https://doi.org/10.1038/nature02273>.
- Zinzani, Pier Luigi, Maurizio Martelli, Marilena Bertini, Alessandro Massimo Gianni, Liliana Devizzi, Massimo Federico, Gerassimos A. Pangalis, et al. 2002. "Induction Chemotherapy Strategies for Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma with Sclerosis: A Retrospective Multinational Study on 426 Previously Untreated Patients." *Undefined*.
- Zinzani, Pier Luigi, Cinzia Pellegrini, Annalisa Chiappella, Alice Di Rocco, Flavia Salvi, Maria Giuseppina Cabras, Lisa Argnani, and Vittorio Stefoni. 2017. "Brentuximab Vedotin in Relapsed Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma: Results from a Phase 2 Clinical Trial." *Blood*. American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-764258>.
- Zinzani, Pier Luigi, Vincent Ribrag, Craig H. Moskowitz, Jean Marie Michot, John Kuruvilla, Arun Balakumaran, Yayan Zhang, Sabine Chlosta, Margaret A. Shipp, and Philippe Armand. 2017. "Safety and Tolerability of Pembrolizumab in Patients with Relapsed/Refractory

Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma.” *Blood* 130 (3): 267–70.
<https://doi.org/10.1182/blood-2016-12-758383>.