

Valeur pronostique des profils d'expression génique dans le lymphome diffus à grandes cellules B

Jean-Philippe JAIS
Faculté de Médecine René Descartes EA222
AP-HP Hôpital Necker-Enfants Malades
jais@necker.fr

Lymphomes

cancers développés à partir de cellules lymphoïdes B, T ou NK matures

- Lymphomes non Hodgkiniens (≈10000 cas/an en France)
 - Lymphomes B
 - Lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB)
 - Lymphome folliculaire
 - ...
 - Lymphomes T
- Lymphomes de Hodgkin (<1500 cas/an en France)
- Incidence en augmentation

Lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB)

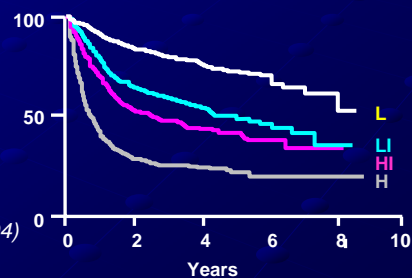
- Représente environ 1/3 des lymphomes non hodgkiniens (LNH)
- Groupe histologiquement hétérogène
 - Transformation de cellules B matures
 - Phénotype B
- Hétérogénéité génétique
 - translocation BCL6 (3q27) : 30-40%
 - translocation BCL2 (18q21) : environ 20 %
 - mutations BCL6, PIM1, RhoH/TTF, MYC, PAX5 : >50%

Profils géniques et pronostic des LDGCB, JP JAIS, Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique, Univ Paris 5, Mai 2006

Clinique

- Lymphome agressif
 - généralement chimiosensible,
 - mais survie à 5ans \approx 50%
- Index Pronostique International (IPI, Aa-IPI)
 - Age
 - Stade clinique
 - Nb localis viscérales
 - Index Performance ECOG
 - LDH

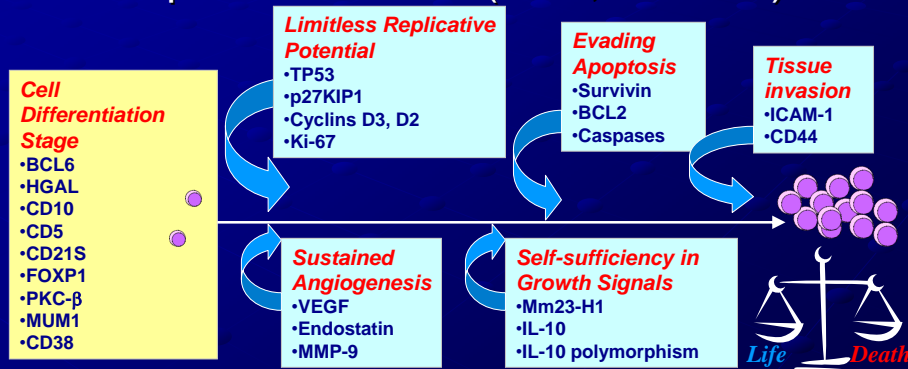
(The International Non-Hodgkin's Lymphoma
Prognostic Factors Project, NEJM 1993;329:987-94)



Profils géniques et pronostic des LDGCB, JP JAIS, Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique, Univ Paris 5, Mai 2006

Recherche de nouveaux marqueurs pronostiques

- Marqueurs circulants (β_2 -microglobuline)
- Marqueurs tumoraux (RNA, Protéine)



Profilis géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

D'après Lossos & Morgensztern.
JCO. Feb 2006

Le tournant des années 2000

- Biologie du lymphome
 - Puces à ADN
- Traitement
 - Association chimiothérapie/Rituximab
 - Rituximab : anticorps monoclonal anti-CD20
 - CD20 : protéine membranaire spécifique du lymphocyte B
- Evaluation de la réponse au traitement
 - PET-SCAN au [18F]FDG

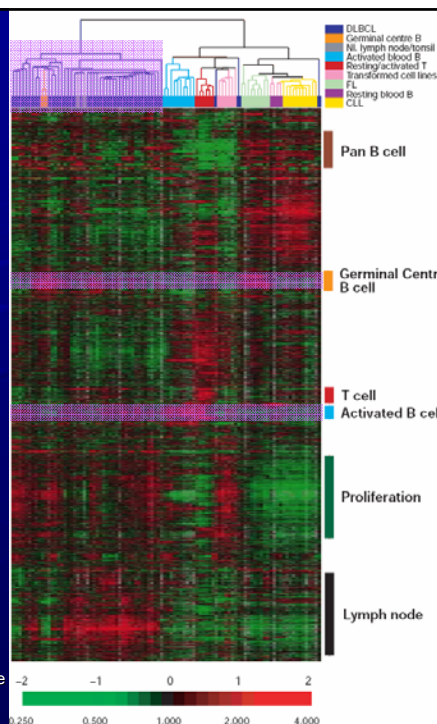
Profilis géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling

Alizadeh & AI, Nature, fev 2000

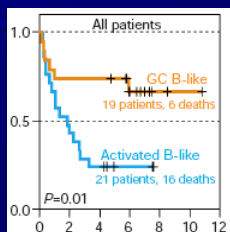
- Echantillons tumoraux
 - 42 LDGCB
 - Lymphomes folliculaires
 - Leucémies lymphoïdes chroniques
 - Lignées tumorales
- Cellules non tumorales
 - Lymphocytes B et T circulants
 - Lymphocytes B et T « activés »
 - ganglion et amygdale
- « Lymphochip » : puce 18000 ADNc enrichie en séquences lymphoïdes
- clustering hiérarchique (eisenogramme)

Profils géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

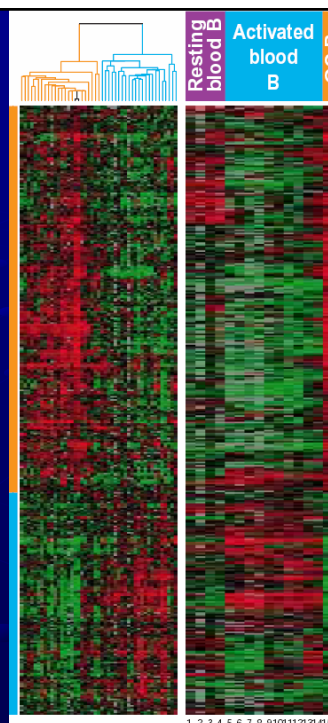


Caractérisation de deux sous-groupes

- signature de type « centre germinatif » : GC B-like (GCB), pronostic favorable.
- Signature de type « cellules B activées » : Activated B Cells-like (ABC), pronostic défavorable.

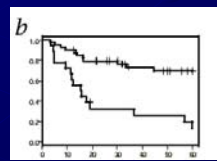
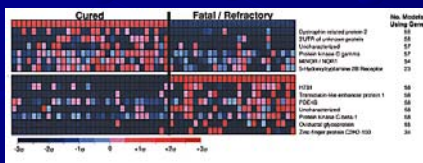


Profils géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006



Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene expression profiling and supervised machine learning (Shipp, Nature Med, jan 2002)

- 58 pts : 32 guéris + 26 dcds
- Affy HU6800 (6817 probesets)
- méthode de classification supervisée :
- « weighted voting » + validation croisée → prédicteur basé sur 13 gènes
- Aucun n'appartient à la signature GCB ABC d'Alizadeh
- Idem avec autres algorithmes : SVM, *k*-NN
- modèle prédictif indépendant de l'IPI



5y OS

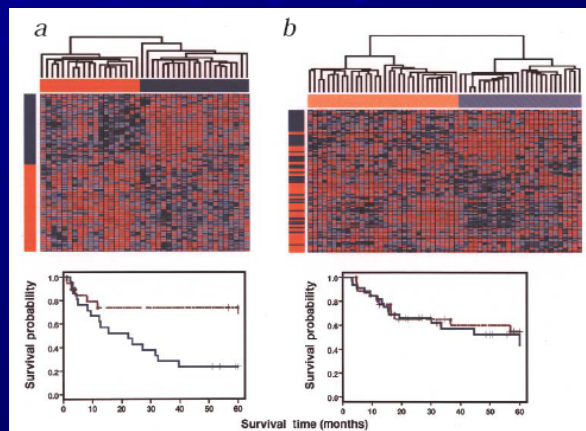
70%

12%

Profils géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Valeur de la signature GC B-like/Activated B Cells-like dans l'article de Shipp

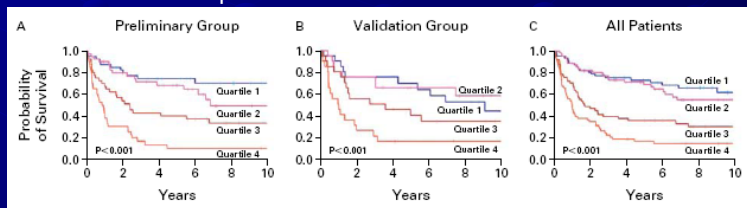
- 90 gènes de la signature d'Alizadeh retrouvée sur la HU6800
- Ces 90 gènes reclassent correctement les échantillons et est pronostique sur la série d'Alizadeh (A)
- Valeur pronostique non retrouvée sur la série de Shipp



Profils géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma A Rosenwald (NEJM 2002)

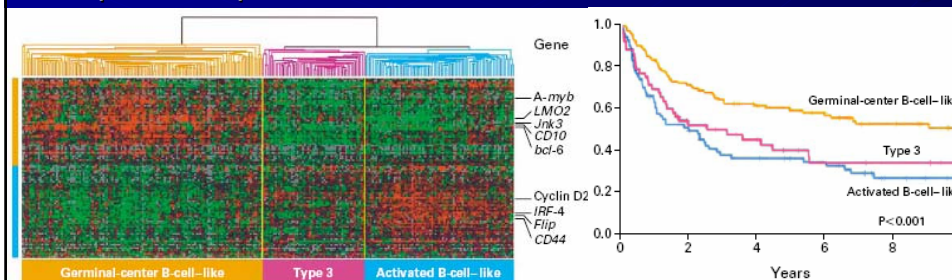
- 240 LDGCB non traités (160 training + 80 validation)
- Lymphochip
- Modèle pronostique construit en 4 étapes
 - Identification des gènes associés à la survie par un modèle de Cox univarié
 - Identification par Clustering hiérarchique parmi les 670 gènes sélectionnés de 5 classes « centre germinatif », « Complexe Majeur Histocompatibilité II », « ganglion », « prolifération » et gène BMP6
 - Sélection des 17 gènes ayant la plus grande variabilité et moyennage par classe
 - Construction d'une équation de score pronostique par un modèle de Cox
 - Valeur du score indépendant de l'IPI



Profilis géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Valeur de la signature GCB/ABC dans l'article de Rosenwald

- Étudiée à partir des 100 gènes les plus discriminants dans la série d'Alizadeh sur 274 échantillons (240 LDGCB non traités + 34 traités)
- Identification d'un groupe intermédiaire (type 3) de pronostic proche des ABC



Profilis géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

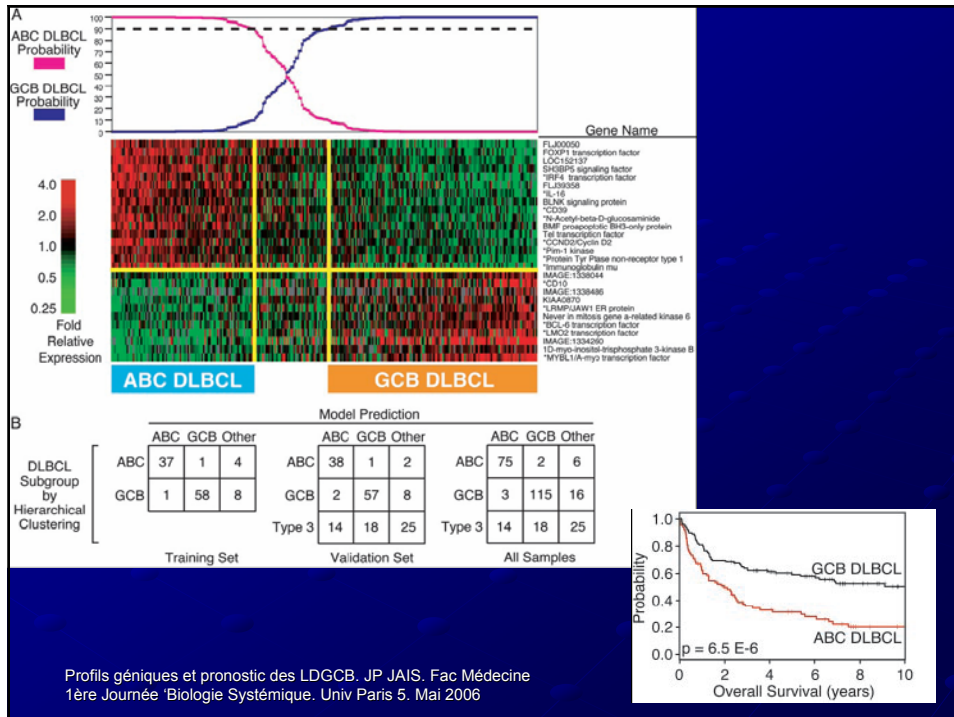
A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma (G Wright, PNAS 2003)

- Comparaison des 2 séries de Rosenwald et Shipp
- Détermination du sous ensemble de gènes les plus discriminants entre 65 GCB et 48 ABC de la série de Rosenwald
- Calcul d'un score linéaire de prédiction en utilisant comme coefficient la statistique de t obtenue pour chaque gène dans la comparaison des 2 groupes :

$$LPS(X) = \sum t_j X_j$$

- En supposant la normalité dans chacun des deux groupes et l'indépendance entre les gènes, la probabilité d'appartenance à un groupe peut être déterminée par une règle de classification bayésienne « naïve »
- cut-off de 90% pour attribuer un échantillon à une classe, si non atteint classé « other »

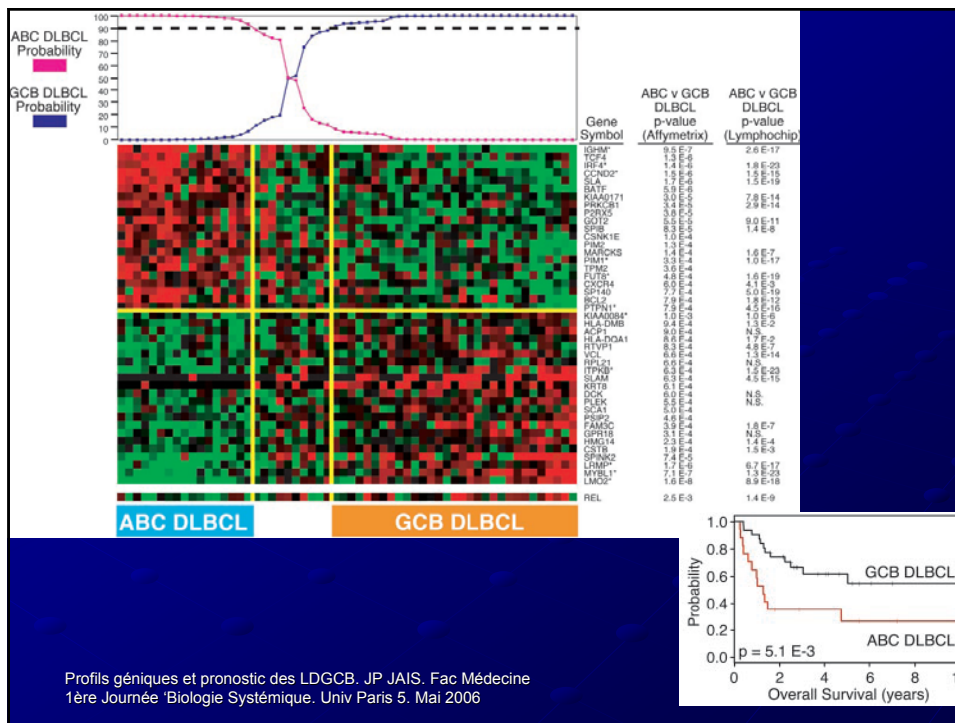
Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006



Application à la série de Shipp

- 14 gènes sur les 27 retrouvés sur la HU6800
- Nécessité de standardiser les niveaux d'expression des différents gènes sur la série de Rosenwald (même moyenne, même variance en échelle log)
- Implicitement, impose une proportion GCB/ABC proche de celle de la série de Rosenwald

Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006



Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Prediction of Survival in Diffuse Large-B-Cell Lymphoma Based on the Expression of Six Genes I Lossos (NEJM 2004)

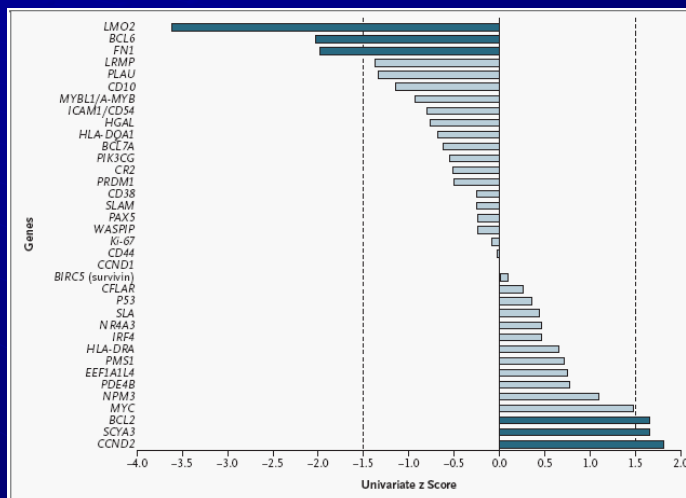
- Tentative de construction d'un « IPI moléculaire »
- Etude en PCR quantitative de 36 gènes « candidats » sur 66 patients

Table 1. Sources of Evidence for a Panel of 36 Genes Whose Expression Predicts Survival in Diffuse Large-B-Cell Lymphoma.²²

Source of Evidence	Genes
Reports identifying single prognostic genes	ICAM1/CD54, ¹⁴ PAX5, ¹⁵ Ki-67, ¹⁶ CD44, ¹⁷ P53, ^{18,19} BCL2, ²⁰⁻²³ BIRC5 (survivin), ²⁴ BCL6, ^{25,9} HGAL, ⁷⁻⁹ PRDM1, ²⁵ SCYA3, ²⁵ CCND1, ²⁶ CCND2 ²⁵⁻⁷
Alizadeh et al. ^{4,21}	LMO2, LRMP, CD10, MYBL1/A-MYB, BCL7A, PIK3CG, CR2, CD38, SLAM, WASPIP, CFLAR, SLA, IRF4, PMS1, HGAL, BCL6, BCL2
Shipp et al. ^{5,22}	NR4A3, PDE4B
Rosenwald et al. ^{6,23}	FN1, PLAU, HLA-DQA1, HLA-DRA, EEF1A1L4, NPM3, MYC, BCL6, HGAL

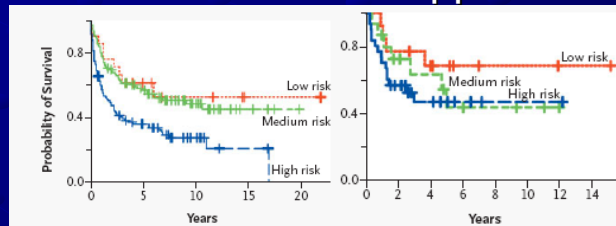
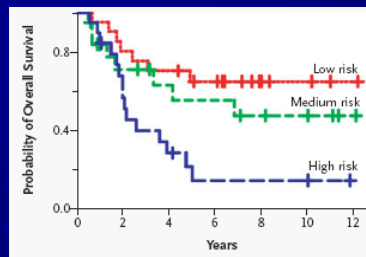
Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

- 6 gènes retenus en Cox univarié (LMO2, BCL6, FN1, BCL2, SCYA3, CCND2), mais un seul significatif (LMO2)



Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

- Construction d'un score pronostique à partir d'un Cox multivarié
- Détermination de 3 groupes de risque
- Application aux séries de Rosenwald et Shipp

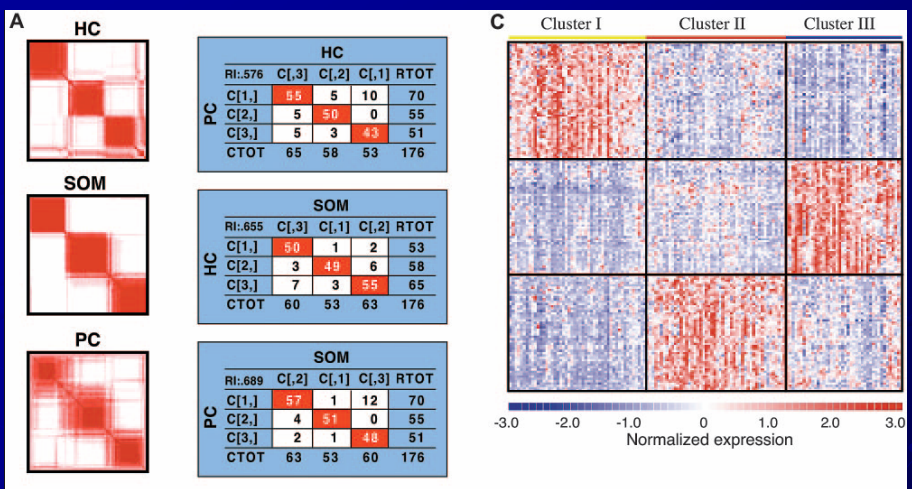


Profilis géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. S Monti (Blood, 2005)

- 176 DLBCL (128 avec données de suivi clinique) étudiés sur puces Affymetrix HU 133A+B (~33000 gènes)
- Etude en classification non supervisée sur 2000 gènes sélectionnés sur des critères de variabilité et de reproductibilité
- Détermination de clusters consensus par 3 méthodes différentes (hiérarchique, self organizing maps et model based) et rééchantillonnage
- Mise en évidence de 3 clusters de gènes
 - Métabolisme phospho-oxydatif
 - BCR/prolifération
 - Host response

Profilis géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006



- Les 3 clusters n'ont pas de valeur pronostique en survie

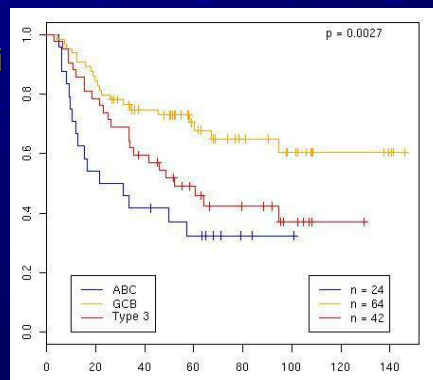
Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Signature GCB/ABC

- Affectation suivant la méthode de Wright (23 gènes sur 27 utilisés en lymphochip)
- Pas de corrélation avec la classification de Monti

COO	Consensus clusters			
	ABC	BCR/ Prolif.		CTOT
		OxPhos	HR	
ABC	9	18	8	35
GCB	23	41	15	79
Other	18	18	26	62
RTOT	50	77	49	176

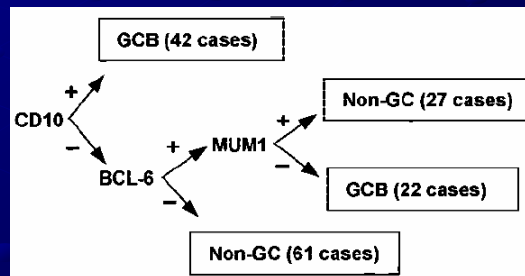
- Pronostic en survie



Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

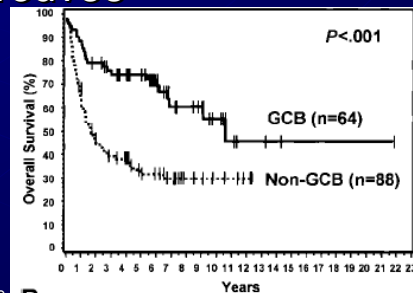
Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. C. P. Hans (Blood, 2004)

- Analyse de 152 patients dont 142 proviennent de la série de Rosenwald
- Classification en GC et non GC à partir de 2 gènes « GCB » (CD 10 et BCL6) et 1 gène « ABC » (MUM1 ou IRF4) en immunohistochimie
- Utilisation d'un arbre de décision



Profils géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

- Environ 80% d'échantillons bien classés par rapport au classement en expression ARN
- Valeur pronostique retrouvée



Profils géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Analyses des jeux d'Alizadeh et Rosenwald

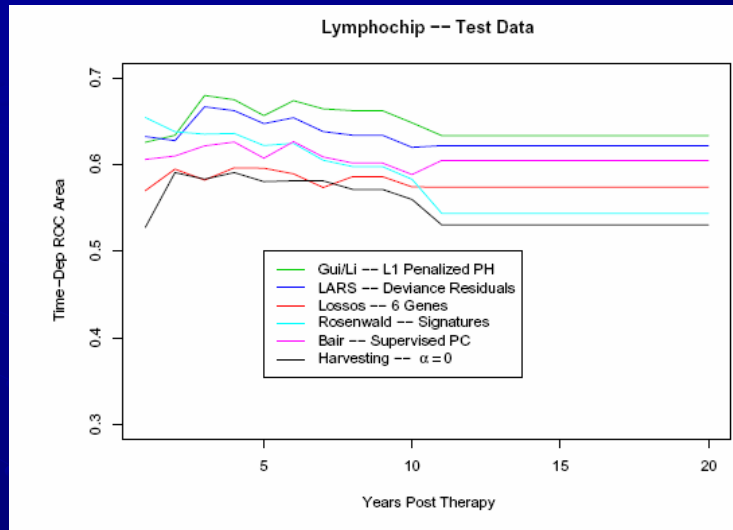
- Neural network analysis of lymphoma microarray data: prognosis and diagnosis near-perfect (O'Neill BMC bioinformatics 2003)
- Fuzzy Neural Network Applied to Gene Expression Profiling for Predicting the Prognosis of Diffuse Large B-cell Lymphoma(T Ando, Jpn. J. Cancer Res. 2002)
- Dimension reduction methods for microarrays with application to censored survival data (Li X, Bioinformatics 2004)
- Survival prediction of diffuse large-B-cell lymphoma based on both clinical and gene expression information (Li X, Bioinformatics 2006)
- Partial Cox regression analysis for high-dimensional microarray gene expression data (Li H, Bioinformatics 2004)
- Penalized Cox regression analysis in the high-dimensional and low-sample size settings, with applications to microarray gene expression data (Gui J, Bioinformatics 2005)

Profil géniques et pronostic des LDGCB, JP JAIS, Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique, Univ Paris 5, Mai 2006

Microarray Gene Expression Data with Linked Survival Phenotypes: Diffuse Large-B-Cell Lymphoma Revisited Mark R. Segal (technical report 2005)

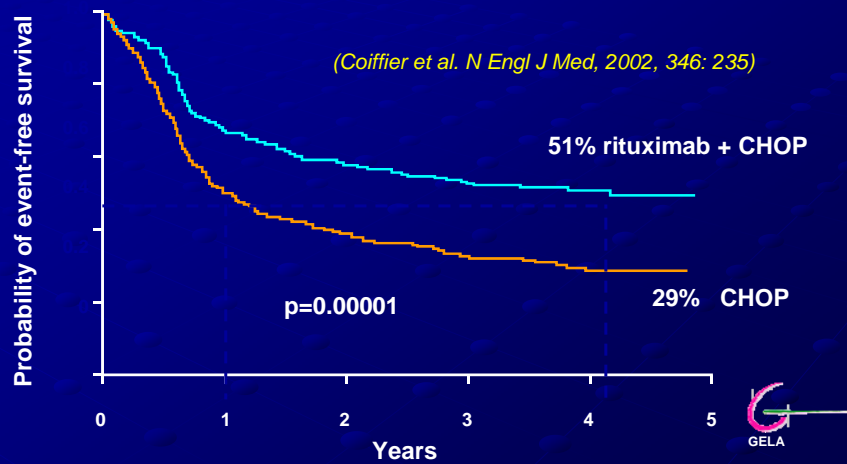
- Comparaison des performances des différentes méthodes par des « time dependent ROC-CURVES »
- Performances relativement modestes quelque soit la méthode
- Léger avantage au méthodes de type LASSO (pénalisation sur la somme des valeurs absolues des coefficients de régression, effet de selection « automatique » et de shrinkage)

Profil géniques et pronostic des LDGCB, JP JAIS, Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique, Univ Paris 5, Mai 2006



Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

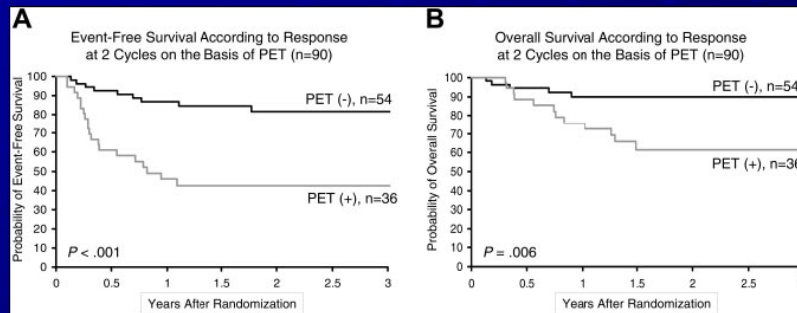
Que deviennent ces signatures avec l'introduction du rituximab ?



Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Valeur pronostique du Pet-scan en cours de chimiothérapie

- « test in vivo » de chimiosensibilité



C Haioun [18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) in aggressive lymphoma: an early prognostic tool for predicting patient outcome (Blood 2005)

Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Conclusions

- Pas de méthode gold-standard pour ces études pronostiques,
- Nécessité
 - de tenir compte de la nature censurée des données,
 - d'une validation sur des jeux de données externes,
 - d'utiliser des critères informationnels (ROC, analogues R^2),
 - de prendre en compte des facteurs pronostiques cliniques existants,
 - de développer des références standard pour comparer les jeux de données entre eux.

Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006

Remerciements

- **Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte** Karen Leroy, Corinne Haioun, Thierry Molina, Bertrand Coiffier, Françoise Berger, Christian Gisselbrecht, Josette Brière, Felix Reyes, Philippe Gaulard, Pierre Feugier, Eric Labouyrie, Hervé Tilly, Fabrice Jardin, Christian Bastard, Gilles Salles.
- **Programme "carte d'identité des tumeurs", Ligue Nationale Contre le Cancer, équipe CIT 3** : David Rickman, Aurélien de Reynies, Philippe Dessen

Profil géniques et pronostic des LDGCB. JP JAIS. Fac Médecine
1ère Journée 'Biologie Systémique. Univ Paris 5. Mai 2006