

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2018

2018 TOU3 1627

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Sarah PÉRICART

Le 18 octobre 2018

**ÉTUDE DE L'IMMUNO-ÉCHAPPEMENT DANS LE LYMPHOME DE
HODGKIN ET LE LYMPHOME B DIFFUS A GRANDES CELLULES :**
**Approches bio-informatiques, moléculaires et
immunohistochimiques.**

Directeur de thèse : Pr Camille LAURENT

JURY

Madame le Professeur Laurence LAMANT	Président
Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET	Assesseur
Madame le Professeur Camille LAURENT	Assesseur
Madame le Docteur Solène EVRARD	Assesseur
Madame le Docteur Lucie OBERIC	Suppléant
Monsieur le Docteur Jean-Jacques FOURNIE	Membre invité



TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} septembre 2017

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Franck
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHVEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. FORTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURS Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. FABIÉ Michel	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. CABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. CHAP Hugues
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel	Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques	Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard	Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques	Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
		Professeur Honoraire	M. CLANET Michel

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur MAZIERES Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur MURAT	Professeur SIMON Jacques
Professeur MANELFE Claude	Professeur FRAYSSE Bernard
Professeur LOUVET P.	Professeur ARBUS Louis
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CARATERO Claude	Professeur SALVAYRE Robert
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur COSTAGLIOLA Michel	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur ADER Jean-Louis	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur LAZORTHES Yves	Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur LARENG Louis	Professeur CHAP Hugues
Professeur JOFFRE Francis	Professeur LAURENT Guy
Professeur BONEU Bernard	Professeur MASSIP Patrice
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BONNEVIALLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépto-Gastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BONNEVIALLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BRASSAT David	Neurologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul	M. FOURNIÉ Pierre	Ophtalmologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. GAME Xavier	Urologie
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. PERON Jean-Marie	Hépto-Gastro-Entérologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. LANGIN Dominique	Nutrition		
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne		
M. LAUWERS Frédéric	Anatomie		
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie		
M. MALVAUD Bernard	Urologie		
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique		
M. MARCHOU Bruno (C.E)	Maladies Infectieuses		
M. MAZIERES Julien	Pneumologie		
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie		
M. PARINAUD Jean (C.E)	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie		
P.U. Médecine générale		P.U. Médecine générale	
M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale	M. MESTHÉ Pierre	Médecine Générale
		P.A Médecine générale	
		POUTRAIN Jean-Christophe	Médecine Générale

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

P.U. - P.H.

2ème classe

M. ACAR Philippe	Pédiatrie
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie
M. BUJAN Louis (C. E)	Urologie-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie
M. COURBON Frédéric	Biophysique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DELABESSE Eric	Hématologie
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention
M. GROLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie
Mme HANAIRE Hélène (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR Nassim	Néphrologie
M. LARRUE Vincent	Neurologie
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile
M. RITZ Patrick	Nutrition
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie

M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
M. CHAYNES Patrick	Anatomie
Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. GARRIDO-STÖWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
M. HUYGHE Eric	Urologie
Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
M. OTAL Philippe	Radiologie
M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. TACK Ivan	Physiologie
M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. YSEBAERT Loic	Hématologie

P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve Médecine Générale

M.C.U. - P.H.

M.C.U. - P.H

M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile
M. APOIL Pol Andre	Immunologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie
M. BIETH Eric	Génétique
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie
M. CAVAIGNAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M. CONGY Nicolas	Immunologie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie
Mme DE MAS Véronique	Hématologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène
M. DUPUI Philippe	Physiologie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie
M. GANTET Pierre	Biophysique
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ Safouane	Biochimie
Mme HITZEL Anne	Biophysique
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition
Mme MOREAU Marion	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD Fabien	Physiologie
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation
M. TAFANI Jean-André	Biophysique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie
Mme TREMOLLIERES Florence	Biologie du développement
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry
Mme DUPOUY Julie

Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. CAMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
M. CHASSAING Nicolas	Génétique
M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. CORRE Jill	Hématologie
M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. DEDUIT Fabrice	Médecine Légale
M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme GALINIER Anne	Nutrition
Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
M. GASQ David	Physiologie
Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme MAUPAS Française	Biochimie
M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme PRADDAUDE Française	Physiologie
M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme VALLET Marion	Physiologie
M. VERGEZ François	Hématologie
Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel
Mme ESCOURROU Brigitte

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves
Dr CHICOULAA Bruno
Dr IRI-DELAHAYE Motoko
Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre
Dr ANE Serge
Dr BIREBENT Jordan
Dr LATROUS Leila

A Notre Maître et Présidente du jury,

Madame le Professeur Laurence LAMANT

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie - Cytologie

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en suis très reconnaissante.

J'ai une profonde admiration pour votre travail, votre pédagogie et votre rigueur scientifique. J'apprécie particulièrement votre sens de l'équité et votre bienveillance.

Je vous remercie pour votre enseignement tout au long de mon internat.

Soyez assurée de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie - Cytologie

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger mon travail.

J'ai eu la chance de bénéficier de votre enseignement et de votre savoir tout au long de mon internat et je vous en suis très reconnaissante. Je vous remercie de me permettre de continuer à travailler dans votre service.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

A ma directrice de thèse,

Madame le Professeur Camille LAURENT

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie - Cytologie

Tu m'as fait l'honneur de me proposer ce travail et de m'encadrer. Je te remercie pour ta confiance et espère en être digne.

Je te remercie surtout pour ton enseignement de qualité et ton soutien tout au long de mon internat et de mon master 2. J'ai eu l'honneur de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche à tes côtés, ce fut une véritable aventure et un grand plaisir. J'admire tes nombreuses qualités humaines, médicales et scientifiques. J'admire tout particulièrement ta persévérance, ta fiabilité et ton optimisme à toute épreuve ! La capacité que tu as d'entreprendre et de mener, avec succès, tes multiples projets, sans compter tes heures, force le respect. Merci de t'être toujours montrée juste.

Je suis heureuse que tu me permettes de continuer à travailler à tes côtés et enthousiaste à l'idée de ces futurs projets !

Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Aux membres du jury,

Madame le Docteur Solène EVRARD

Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie - Cytologie

Je te remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger mon travail.

J'ai eu la chance de bénéficier de ton enseignement mais aussi de travailler à tes côtés durant mon internat. J'admire ton travail et ta rigueur scientifique. J'apprécie ton accessibilité et ta gentillesse.

Je te suis reconnaissante de m'avoir associée à tes récents projets et espère avoir l'occasion d'en entreprendre d'autres avec toi dans le futur.

Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Aux membres du jury,

Madame le Docteur Lucie OBERIC

Praticien Hospitalier

Hématologie clinique

Je te remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger mon travail.

Je n'ai pas encore eu le plaisir de travailler à tes côtés mais de futurs projets nous le permettront et j'en suis heureuse. Je te remercie d'apporter à ce travail ton expertise et tes connaissances.

Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Aux membres du jury,

Monsieur le Docteur Jean-Jacques FOURNIE

Chercheur

Centre de recherche en cancérologie de Toulouse

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger mon travail.

Ce projet est aussi le vôtre et ce fut un honneur de travailler aux côtés d'un chercheur de votre envergure. Je vous remercie pour votre encadrement et vos précieux conseils tout au long de mon année de master 2. J'admire votre rigueur scientifique et votre créativité. J'admire également vos qualités humaines, votre optimisme et votre bonne humeur.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

Pour leur aide précieuse au cours de ce travail, je remercie :

Pr Guy Laurent, j'ai eu l'honneur de travailler avec vous lors de mon master 2, j'admire votre pédagogie et votre rigueur scientifique. Je vous remercie pour votre disponibilité et vos précieux conseils.

Pauline Gravelle, la force tranquille, parce qu'avec toi l'impasse n'existe pas: il n'y pas de problème, que des solutions ! Merci pour le temps que tu as passé à me former durant mon master 2. Tu as participé activement à l'ensemble des manips. Toujours disponible et toujours dans la bonne humeur, quel plaisir de travailler à tes côtés ! Je te remercie également de m'avoir associée à tes autres travaux.

Nadia Amara, un grand merci pour ta contribution à la récupération de l'ensemble des données et du matériel pour ce projet. J'admire ton efficacité, ta sincérité, ton humanité, mais aussi ta persévérance dans la réalisation de ta thèse. Merci pour ton soutien, tant sur le plan personnel que professionnel, tout au long de mon internat. Je suis heureuse d'avoir la possibilité de continuer à travailler avec toi.

Marie Tosolini, pour tes compétences en bio-informatique, tu as été d'une aide précieuse dans ce travail. Merci pour ta disponibilité mais surtout pour la patience dont tu as du faire preuve pour m'initier au monde de la bio-informatique !

Camille Franchet (Monsieur Camille), pour tes compétences sur *Definiens*, ton soutien et ta disponibilité. Ta patience avec ce logiciel m'impressionne ! On partage le même gout pour la nature et la marche, à quand cette randonnée ?!

Francois-Xavier Frenois, je te remercie de m'avoir formée à l'utilisation de *Definiens* et de m'avoir permise d'utiliser cet outil pour ce travail, ce n'était pas une mince affaire...

Cédric Rossi (le thésard clinicien multitâche), pour tes connaissances cliniques pointues et tes nombreux et précieux conseils. Merci pour ton aide durant ce travail, toujours dans la bonne humeur. J'admire ta motivation et ta persévérance et te souhaite plein de courage pour la dernière ligne droite.

Evelyne, Gabrielle et Stéphanie: Un grand merci pour le temps passé à scanner toutes les lames du projet. L'équipe d'immunohistochimie du service d'Anapath de l'IUC : Laurence (la papesse de l'IHC) qui a coordonné ce projet avec brio, Audray, Jessica, Charley, Arielle, Armelle et Julien, vous avez tous largement contribué à ce travail.

L'équipe du CRB, en particulier Sophie et Lisa pour le temps passé à couper les blocs pour ce projet.

L'équipe de biostatisticiens, en particulier Elodie Martin.

Je remercie mes collègues et amis du service d'Anapath de l'IUC,

A l'ensemble des médecins auprès desquels j'ai tant appris, tout au long de mon internat, merci pour la qualité de votre enseignement: Mme Delisle, Mme Escourrou, Anne, Isabelle R, Isabelle D, Emmanuelle, Magali C, Magali L, Véronique, Raphaëlle, Marie-Laure, Jacqueline, Janick, Béatrice, Marie D, Monique, Céline B, Dominique, Nada, Céline G, Martine D.

Une dédicace spéciale à Sophie pour ta gentillesse et ta bienveillance. A Eliane, une maman, pour nos discussions lors des trajets nocturnes jusqu'au parking. A Emilie, pour ta bonne humeur et ta pédagogie (et ton café aussi !). A Philippe pour tes blagues. A Florence pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton esprit fêtard (et tes fruits secs aussi !). A Oriane la meilleure, pour toutes ces frayeurs que l'on a partagé cet été (« C'est nous qui avons lu la rtv ?! »), merci pour ton soutien ces derniers mois. A Thibaut, félicitation pour ta petite famille. A Virginie, pour ta gentillesse et le temps passé à nous former en uro.

A Camille Laurent, parce qu'elle mérite une deuxième dédicace : merci pour tout *Super Woman* !

A Cathy, partie trop tôt et que l'on n'oublie pas...

A mes co-internes d'anapath passés et actuels

Audrey, la sagesse, tu m'as connue encore externe et m'a donné le goût de l'anapath, je suis heureuse de pouvoir continuer à travailler à tes côtés. Fabrice, outre de bons souvenirs de soirées, je suis heureuse d'avoir commencé l'anapath aux côtés d'un si bon pathologiste. Aichatou (« Akatou, Atatou ! » Tu en as eu des noms !), tu détiens encore le record de blocs à la macro ! Laureline et son foie exceptionnel, merci d'avoir sauvé ma voiture ce matin-là, que de bons souvenirs ! Laure, la tornade, j'admire ton dynamisme, ton énergie et ton franc parler ! Julie, la plus fun des nanapath's, partenaire de rock et de vacances, le cœur sur la main, tu es une amie formidable. Gwendoline, la polyglotte bretonne, on ne s'ennuie jamais avec toi et tes accents ! Anne-charlotte, tes éclats de rire nous manquent, je te souhaite le meilleur dans ton grand nord. Aurore, j'admire ta persévérance et ton travail, et toujours le sourire ! Charlotte D, et ses cyclopes, passionnée et passionnante ! Claire I, le cœur sur la main, je souhaite beaucoup de bonheur à ta famille qui s'agrandit. Romain, ton niveau et ton efficacité m'ont impressionnée, merci pour ton aide à Albi. Maxime, merci pour ton aide précieuse en uro, je souhaite plein de bonheur à ta petite famille. Quentin, je garderai en mémoire la classe du gars qui a publié son auto-case report ! Seb, merci pour la bonne ambiance et la bonne humeur que tu dégages. Charlotte S, la chercheuse pétillante. Claire R, une deuxième tornade dans le service, quelle énergie ! Alix, la force tranquille, toujours prête à rendre service. Cécile, tu dévotes ! Lisa, rockeuse et cuisinière de sauces indescriptibles. Justine, fêtarde et sérieuse à la fois. Gabrielle, sérieuse et soucieuse de l'avenir de la planète. Maxence, toujours de nouvelles histoires à raconter ! Nouritza, la pro du lymphocyte, ton passage en anapath restera gravé dans nos mémoires. Aux plus jeunes que je connais moins bien : Anna, jeune padawan PD-L1, tu envoies ! Margaux, souriante et sportive. Guillaume, le plus sérieux des jeunes Y. Mathilde, tu nous quittes pour d'autres horizons, j'espère que tu trouveras ta voie, au plaisir de « rocker » ensemble ! Anne-Cécile et ses paillettes, volontaire et motivée, c'est un plaisir de travailler (et de « rocker ») avec toi. Pauline, bienvenue dans le monde merveilleux de l'anapath. Sarah, sérieuse et motivée, bonne continuation.

A l'ensemble des techniciens: Merci pour le travail que vous faites chaque jour.

Une pensée particulière pour Virginie (chef sur la colline, merci pour ton travail et ta bonne humeur), Anaïs (chef-adjoint sur la colline), Aurélia (qui nous manque), Sylvie (la bonne humeur incarnée, on dirait que tu vas devoir encore supporter un bon moment mes demandes de recoupes de GB prostate !), Chantal S (reine du chibop, merci pour ton implication professionnelle), Katia, Anne, Marie C, Gisèle, Sévérine, Lucie (je garde un très bon souvenir de nos journées de macro à Purpan), Flavien, Mélanie, Nadine, Corentin (le roi de la macro), Julian, Pierre-Jean, Thomas, Justine, Devy, Marylène, Christelle, Isabelle, Aurore, Danielle, Brigitte, Marjorie, Cécile, Céline, Nicolas, Novela, Romain, Mireille, Marion, Chantal C, Maryse, Sophie D, Laura B, Chantal Cet tous les autres avec qui j'aurai encore l'occasion de travailler.

Merci aux secrétaires du service pour votre travail quotidien : Marie-Jo (merci de m'avoir défendu cet été-là, lors de mon 1^{er} stage d'externe en anapath !), Sandrine, Dounia, Céline, Ludivine, Amélie, Alice, Claudine. **Aux cadres** : Myriam et Gaël. Merci à Nathalie, Yvan, David et Frédéric. Merci à Fallek, à nos futurs projets ensemble ! Merci à Samira, toujours prête à rendre service.

Je remercie l'équipe de neurologie qui m'a accueilli durant un an. Une pensée spéciale pour Nelly, Angélique, Alexandra et Delphine, je suis ravie d'avoir appris la clinique à vos côtés. Marie B, ma co-interne préférée, sans qui je n'aurai jamais survécu en neurologie !

Je remercie l'équipe d'Anapath de Tarbes

J'ai énormément apprécié mon passage chez vous. Aux médecins : Mme Siani, Hélène, Anne-Marie. Aux secrétaires qui tapaient plus vite que leurs ombres: Evelyne et Babe. Aux techniciennes qui ont supporté mes journées macro post-soirées : Marie, Corinne, Audrey. Merci pour votre accueil, votre pédagogie et votre bonne humeur.

A mes co-internes CH'tarbaus : Grégoire, mon partenaire de soirées jusqu'à l'aube. Estelle, aussi fêtarde que ton homme. Anne et Yassine, le duo de choc, pour toutes nos soirées. Camille et Clémentine, mes partenaires de randonnées. Manon et ses licornes. Laure, et ses délires. Guillaume et ses attentats. Carole, partenaire de thé en montagne. Pauline, et sa bonne humeur. Charlotte, à nos soirées philosophiques sur le toit. Ariane et Michael, les voyageurs. Dj Louis. Nico, le fou. Margot et Guillaume...et tous les autres avec qui j'ai eu le plaisir de partager ce semestre montagnard.

Je remercie la team 9 du CRCT pour leur accueil durant mon M2R

Je suis heureuse d'avoir découvert le monde de la recherche chez vous. Olivia chef du L2, merci pour tes précieux conseils. Julie, et ses soirées très privées Wallace-Purple au Jet27 (tu m'as couché !). Don-Marc, calme et attentif, tes connaissances m'impressionnent. Sarah, la jeune maman toujours partante pour une soirée, merci pour tes conseils. Guillaume, je te souhaite le meilleur dans ta nouvelle vie. Chloé, bon courage pour la suite. Anne, merci pour le temps que vous avez passé sur mon mémoire, ce n'était pas une mince affaire ! Marie et Christine, merci pour vos conseils.

A mes amis:

Ornella, ma toute première amie toulousaine : partenaire du club AG, de férias, de soirées improbables et de films documentaires en tout genre, merci pour tous ces éclats de rires. Gauthier, merci de la rendre heureuse (et d'avoir décalé ton voyage !). Célia, la paparazzi du club AG, j'admire ta force et ton courage dans toutes les épreuves que tu as du traverser...Chaque épreuve t'a rendue plus forte et ta façon de gérer les choses force le respect. Je suis contente de te voir heureuse avec ta petite famille, Nico et Aelya. Cindy, à nos années jeunesse, à nos filatures. Julie R, loin des yeux mais pas du cœur. Damien, le maître dans l'art du déguisement, tant de souvenirs depuis les bancs de la fac, j'espère en construire pleins d'autres ! « Un rock ce soir ?! » Maud, la métalleuse, adjointe au maître du déguisement, toujours le sourire et toujours partante ! Camille, mon *Alter-ego*, tu ne réponds plus de rien avec *Aline*, tant de souvenir, et tant à venir ! J'admire ta volonté et ton ambition. Merci pour ton soutien, en particulier cette année. Floriane, pour nos soirées, nos fêtes, et nos futures vacances *girly*. Issam, le magicien de la lévitation, toujours partant pour la fiesta! Julie B, devenue rockeuse pro ! Marion et Xav, pour ces années jeunesse folles et ces soirées privées à Estentens. Après toutes les épreuves que vous avez traversées, je vous souhaite le meilleur. Florence, ma co-locataire de choc ! A mes autres amis de l'externat : Emma, Julia, Elodie, Aurélie, Maxime, Eléonore... pour tous ces bons souvenirs. Mélanie, mon amie d'enfance avec qui j'ai appris à lire. Maria, merci d'être si présente pour la famille. Une pensée particulière pour les provençaux: Mireille, Mallorie et Sophie, je ne vous oublie pas.

Une pensée spéciale pour Monsieur Brice Petit, un professeur exceptionnel, sans qui je n'aurai probablement jamais entrepris ces études.

Enfin, je remercie mes proches,

Mes parents qui me soutiennent depuis toujours, j'espère être digne de votre confiance. Ce travail est aussi le vôtre. Merci pour la vie, l'éducation et l'amour que vous m'avez transmis. Papa, mon modèle, « le monde appartient à ceux qui se lèvent tôt », merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu sur tous les plans, tout au long de ces études. Ma chère maman, mon soutien éternel, merci d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir soutenue et même supportée dans les moments les plus critiques. J'ai un souvenir ému de nos tisanes nocturnes durant ma première année.

A mon frère Louis, à toutes nos bêtises d'enfants. Je suis heureuse et fière de te voir épanoui aujourd'hui et construire un bel avenir. **A Samantha**, maître zen, félicitations Docteur ! Merci du soutien que tu apportes tous les jours à Louis.

A l'ensemble de ma famille, en particulier mes grands-parents : Papi Maurice et Mamie Rose, merci pour votre soutien et votre accompagnement depuis mes premiers pas. Mamique et grand père qui veillent sur nous et à qui l'on pense souvent. A mes oncles, mes tantes, cousins et cousines. Pensées spéciales pour Ivan et Annalyn merci de m'avoir accueillie, merci pour ces vacances philippines, ces soirées parisiennes et ces karaokés. A Delphine, j'admire ton ambition, ta curiosité et ta culture. A Hélène, Marc et Nico. A Véronique qui fait le plus beau métier du monde, Pascal l'humoriste, toujours de bonne humeur (un jour je vous accompagnerai au vélo...un jour !) et vos quatre magnifiques enfants. A Sandrine et sa famille. A Catherine et sa famille. A Isabelle que l'on n'oublie pas. A mon parrain préféré, François et à ma marraine, Isabelle.

Serment d'Hippocrate

*Sur ma conscience, en présence de mes maîtres et de mes condisciples, je jure d'exercer la médecine suivant les lois de la morale, de l'honneur et de la probité.
Je pratiquerai scrupuleusement tous mes devoirs envers les malades, mes confrères et la société.*

**ETUDE DE L'IMMUNO-ECHAPPEMENT DANS LES
LYMPHOMES DE HODGKIN ET LYMPHOMES B DIFFUS A
GRANDES CELLULES :**

**Approches bio-informatiques, moléculaires et
immunohistochimiques**

ABREVIATIONS	3
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	5
INTRODUCTION	6
I. Généralités sur le lymphome de Hodgkin (LH)	6
A. Epidémiologie, clinique, facteurs pronostiques et traitement	6
B. Diagnostic histologique	9
C. Physiopathologie et oncogénèse	11
II. Généralités sur le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC)	14
A. Epidémiologie, clinique, facteurs pronostiques et traitement	14
B. Diagnostic histologique des LBDGC	16
C. Voies oncogéniques dans le LBDGC	17
III. Généralités sur les populations cellulaires du micro-environnement tumoral dans les lymphomes	19
A. Les cellules stromales mésenchymateuses	20
B. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)	20
C. Les cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-derived suppressor cells/ MDSC)	21
D. Les cellules dendritiques (DCs)	21
E. Lymphocytes T cytotoxiques (CTLs)	22
F. Les Lymphocytes T régulateurs (LTreg)	22
G. Les cellules Natural Killer (NK)	23
H. Cytokines, chimiokines et facteurs solubles	24
I. Stroma tumoral	24
IV. Immunité anti-tumorale dans les lymphomes	25
A. Concept de <i>l'immunoediting</i>	25
B. Immuno-évasion dans les lymphomes	28
1. Camouflage de la cellule tumorale	28
2. Surexpression des points de contrôle immunitaire inhibiteurs (« checkpoints immunitaire »)	28
3. Micro-environnement immunosupresseur	35
V. Bloqueurs des points de contrôle immunitaire (« immune checkpoints ») dans les lymphomes : Voies thérapeutiques actuelles et futures	36
VI. Immune Escape Gene Set/IEGS : approche moléculaire globale de l'immuno-évasion	37
OBJECTIFS DU TRAVAIL	40
ARTICLE	40
CONCLUSION et DISCUSSION	62
BIBLIOGRAPHIE	66

ABREVIATIONS

Ac: Anticorps

Ag: Antigène

ASCT: Autologous hematopoietic stem cell transplantation (greffe autologue de cellules souches)

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: Cellule présentatrice de l'antigène

CTL: Cytotoxic T lymphocyte (lymphocyte T cytotoxique)

CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DC: Dendritic cell (cellule dendritique)

EBV: Epstein-Barr virus

EORTC: European Organisation for Research and Treatment of Cancer

FISH: Hybridation in situ en fluorescence

GELA: Groupe d'étude des lymphomes de l'adulte

GSHG: German Hodgkin Lymphoma Study Group

HLA: Human leukocyte antigen

HRS: Hodgkin Reed Sternberg

ICC : Intra class coefficient

IDO: Indoleamine 2,3-dioxygénase

IE: Immuno-evasion

IEGS: Immune escape gene set

IF: Immunofluorescence

Ig: Immunoglobuline

IGH: Immunoglobuline heavy

IHC: Immunohistochimie

iNOS: Inducible oxide nitric synthase

LAG-3: Lymphocyte activation gene 3

LB: lymphocyte B

LBDGC ABC: Lymphome B diffus à grandes cellules « Activated B cell »

LBDGC GC: Lymphome B diffus à grandes cellules « germinal center »

LBDGC: Lymphome B diffus à grandes cellules

LH: Lymhome de Hodgkin
LHc: Lymphome de Hodgkin classique
LHPLN: Hodgkin à prédominance lymphocytaire nodulaire.
LNH: Lymphome non hodgkiniens
LT: lymphocyte T
LTreg: Lymphocyte T régulateur
MDSC: Myeloid-derived suppressor cells (cellules myéloïdes suppressives)
MET : micro-environnement tumoral
NK: Natural killer
PCI: Points de contrôle immunitaire inhibiteur
PD-1: Programmed cell death 1,
R/R : Rechuteur/réfractaire
RMA: Robust Multi-array Average
SES: Sample enrichment score
TAM: Tumor associated macrophages
TEP: Tomographie par émission de positrons
TFH : T follicular helper
TGFβ: Transforming growth factor β
TIL: Tumor iniltrating lymphocyte (lymphocytes infiltrant la tumeur)
TIM-3: T cell immunoglobulin and-mucin-domain containing-3
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Histologie du LH classique

Figure 2 : Schématisation de la voie canonique NFκB

Figure 3 : Mécanismes prolifératifs et anti-apoptotiques dans le LH

Figure 4 : Histologie des LBDGC

Figure 5 : Algorithme de Hans

Figure 6 : Principales voies de signalisations dérégulées dans le LBDGC GC et cibles thérapeutiques potentielles

Figure 7: Principales voies de signalisations dérégulées dans le LBDGC ABC et cibles thérapeutiques potentielles

Figure 8 : Schématisation du MET

Figure 9 : Concept de *l'immuno-editing* selon Schreiber

Figure 10 : Mécanismes à l'origine de la surexpression de PD-L1/L2 dans les LBDGC

Figure 11: Etude d'immunofluorescence avec multiplexage de CD30/CD68/CD163/PD-L1 illustrant la formation d'une niche « immuno-protective » par les TAMs PD-L1+ dans le LH

Figure 12 : Schématisation de l'ensemble des mécanismes d'IE pouvant être mis en jeu dans le lymphome

Figure 13 : Corrélation entre SES IEGS33 et T-cell activation gene set dans les LBDGC et les lymphomes folliculaires par une approche en datamining

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classification d'Ann Arbor

Tableau 2: Scores pronostiques dans le LH

Tableau 3: Index pronostique international dans le LBDGC

Tableau 4: Synthèse des résultats des essais cliniques concernant les inhibiteurs des « checkpoints immunitaire » dans le LH

Tableau 5: Synthèse des résultats des essais cliniques concernant les inhibiteurs des « checkpoints immunitaire » dans les LBDGC

INTRODUCTION

Les lymphomes représentent un groupe très hétérogène de tumeurs hématologiques dont l'incidence en France est relativement faible, d'environ 10000 nouveaux cas par an. La classification de ces tumeurs est basée sur la cellule d'origine dont dérive la cellule tumorale. On distingue deux grandes classes de lymphomes : les lymphomes Hodgkiniens (LH) et les lymphomes non hodgkiniens (LNH). Parmi les LNH, 70 % sont des lymphomes B et 30 % sont des lymphomes T.

I. Généralités sur le lymphome de Hodgkin (LH)

A. Epidémiologie, clinique, facteurs pronostiques et traitement

Le terme de lymphome de Hodgkin (LH) regroupe en fait deux entités distinctes tant sur le plan histopathologique que sur le plan clinique.¹ On distingue en effet le lymphome de Hodgkin classique (LHc) du lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire nodulaire (LHPLN).

Le LH est classiquement une maladie de l'adulte jeune cependant, l'incidence, estimée à 1 880 nouveaux cas/an en France, se distribue selon un mode bimodale avec un premier pic vers l'âge de 25 ans et un deuxième pic vers 60 ans (*InVS 2012*). Le LHPLN touche préférentiellement les jeunes adultes et représente moins de 10% des LH.

Le LH classique est une maladie globalement de bon pronostic, particulièrement chimio et radio-sensible avec une survie globale en France, tout stade confondu, estimée à environ 80%.² Le LHNPL est de meilleur pronostic car il se présente le plus souvent sous forme localisée, cependant il peut s'accompagner de rechutes et présente à long terme un risque de transformation en lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) estimé de 1 à 2% par an.

D'un point de vue clinique, le LHc se révèle le plus souvent par un tableau de polyadénopathies superficielles et/ou profondes (cervicales, sus claviculaires, axillaires, médiastinales voire sous diaphragmatiques). Dans un quart des cas, il s'y associe des signes généraux appelés « symptômes B » caractérisés par une fièvre, des sueurs

nocturnes et une perte de poids.² Le LHNPL se révèle par un tableau d'adénopathies superficielles et localisées (cervicales et axillaires) sans symptômes généraux.

Au diagnostic, les patients vont être stratifiés selon la classification d'Ann Arbor et selon des scores pronostiques permettant une prise en charge thérapeutique optimale. L'examen de référence permettant d'évaluer le stade de la maladie est le TEP-scanner. La classification d'Ann Arbor basée sur le degré d'extension permet de définir 4 stades en fonction de la localisation de la maladie (**Tableau 1**). On distingue ainsi les stades « localisés » (stades I/II) des stades « avancés » ou « disséminés » (stades III/IV). A cette classification s'ajoute un index pronostique international ou score de Hasenclever pour les stades avancés ³ ainsi que d'autres scores pronostiques comme les scores de l'EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) ⁴ ou du GSHG (German Hodgkin Lymphoma Study Group) pour les stades localisés ²(**Tableau 2**).

Classification d'Ann Arbor modifiée selon Cotswolds

Stade Ann Arbor

I Atteinte d'une seule aire ganglionnaire ou d'une seule structure lymphoïde

II Atteinte de 2 aires ganglionnaires ou plus, du même côté du diaphragme

III Atteintes ganglionnaires de part et d'autre du diaphragme

IV Atteintes extraganglionnaire distincte d'une localisation extraganglionnaire contiguë

Modification des caractéristiques

A Pas de signes B

B Présence de signes B définis par : fièvre supérieure à 38 °C pendant plus d'une semaine sans infection documentée ; et/ou amaigrissement de plus de 10 % du poids du corps au cours des six derniers mois ; et/ou sueurs nocturnes profuses, obligeant le patient à changer de vêtements

X Maladie « Bulky » : masse médiastinale de diamètre égal ou supérieur au tiers du diamètre transverse thoracique au niveau du disque intervertébral T5-T6 (rapport M/T > 0,33 sur un cliché thoracique de face) ; ou masse ganglionnaire égale ou supérieure à 10 cm

E Atteinte d'un seul viscère contigu ou situé à proximité d'un territoire ganglionnaire atteint

Tableau 1: Classification d'Ann Arbor (d'après Turpin A et al, Bulletin du cancer 2017). On utilise en plus la lettre « A » pour absence et la lettre « B » pour présence de signes généraux. Une atteinte médiastinale volumineuse (« Bulky » sera indiqué par la lettre « X » et une atteinte splénique par la lettre « s ». Enfin les lettres « a » et « b » peuvent être utilisées pour signaler la présence ou l'absence de syndrome inflammatoire biologique.

Facteurs pronostiques	Groupes thérapeutiques	Traitement standard
Facteurs pronostiques défavorables de l'EORTC pour les stades I-II sus-diaphragmatiques [4]		
Âge ≥ 50 ans	Favorable : Aucun facteur défavorable	ABVD x 3 + 30 Gy Territoires ganglionnaires atteints
Aires ganglionnaires envahies > 3 Symptômes B et VS ≥ 30 mm 1 ^{re} heure ou absence de symptômes et VS ≥ 50		
Masse ganglionnaire volumineuse (≥ 10 cm ou rapport MT ≥ 0.35)	Défavorable : Au moins un facteur	ABVD x 4 + 30 Gy Territoires ganglionnaires atteints
Score pronostique international pour les lymphomes hodgkiniens de stades III-IV [5]		
Âge ≥ 45 ans	0 – 2 facteurs	ABVD x 8
Sexe masculin		
Stade IV	≥ 3 facteurs	ABVD x 8
Albuminémie < 40 g/L		
Hémoglobine < 10,5 g/L		
Leucocytes > 15 x 10 ⁹ /L		
Lymphopénie < 0,6 x 10 ⁹ /L ou < 8 %		
Critères du GSHG [6]		
Masse médiastinale volumineuse	Stades localisés II sans facteur défavorable	ABVD x 2 + 30 Gy Territoires ganglionnaires atteints
Atteinte splénique massive		
Atteinte extra ganglionnaire	Stades intermédiaires : stades II avec facteurs défavorables et stades III sans facteurs défavorables	ABVD x 4 + 30 Gy Territoires ganglionnaires atteints
Symptômes B et VS ≥ 30 mm 1 ^{re} heure ou absence de symptômes et VS ≥ 50		
Aires ganglionnaires envahies ≥ 3		
	Stades IIIB - IV	ABVD x 8

Tableau 2: Scores pronostiques dans le LH (d'après Société Française d'Hématologie, Hématologie, vol 13, sept-oct 2007)

Pour les stades localisés, le traitement de référence en première ligne repose sur une poly-chimiothérapie de type ABVD (doxorubicine, bléomycine, vinblastine, dacarbazine), avec 3 ou 4 cycles suivi d'une radiothérapie de clôture (**Tableau 2**). Récemment plusieurs études ont montré que l'absence de rémission complète (RC) évaluée par le TEP scanner après 2 cycles d'ABVD est associée à un mauvais pronostic et doit s'accompagner d'une modification du schéma thérapeutique au profit d'une chimiothérapie de type BEACOPP renforcé (bléomycine, étoposide, doxorubicine, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, predisone).²

L'essai clinique de phase II (protocole LYSA BREACH) évaluant l'association brentuximab (anticorps anti-CD30) - vedotin (poison du fuseau) - chimiothérapie (AVD) a récemment montré des résultats prometteurs chez les patients atteints de LH de stade localisé.

Pour les stades avancés, le traitement de référence repose sur une poly-chimiothérapie comportant 6 à 8 cycles soit d'ABVD soit de BEACOPP renforcé.

La combinaison brentuximab-vedotin-AVD en première ligne pour le traitement des stades avancés de patients LH est également en cours d'essai clinique (essai de phase III ECHELON-I).

Le traitement des patients réfractaires ou en rechute précoce repose sur une chimiothérapie dit de rattrapage qui sera choisie en fonction de la chimiothérapie instaurée en première ligne afin d'éviter l'accumulation des toxicités d'une part et d'autre part afin d'éviter des phénomènes de résistance tumorale. Les chimiothérapies de rattrapage sont le plus souvent soit le DHAP (dexaméthasone, aracytine haute dose, cisplatine) soit l'ICE (ifosfamide, carboplatine, étoposide) mais d'autres combinaisons sont possibles. Après chimiothérapie de rattrapage, une intensification thérapeutique suivie d'une autogreffe de cellules souches périphériques est généralement réalisée. Une étude plus récente a montré un bénéfice sur la survie sans progression post-autogreffe des patients LH traités par brentuximab-vedotin en entretien.⁵ En cas de rechute post-autogreffe, les traitements par GVD (gemcitabine, vinorelbine et doxorubicine), brentuximab-vedotin ou par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques sont préconisés. Malheureusement les résultats à long terme du traitement de rattrapage avec intensification thérapeutique restent faibles, les taux de survie sans récurrence et les taux de survie globale à 10 ans sont variables selon les facteurs de risques à la rechute allant respectivement de 41% à 64% et de 47% à 70%.² De plus ces patients sont exposés à un risque de second cancer plus élevé.

B. Diagnostic histologique

1. Le LH classique

Le diagnostic histopathologique du lymphome de Hodgkin classique repose sur la mise en évidence de cellules de Reed-Sternberg; grandes cellules bi ou multi-nucléées avec un volumineux nucléole éosinophile ou de cellules de Hodgkin; grandes cellules mononucléées (**Figure 1**). Ces cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg (HRS) sont présentes en faible proportion (<1%) et se dispersent dans un infiltrat réactionnel polymorphe, abondant, constitué de petits lymphocytes (principalement CD4⁺), accompagnés le plus souvent d'histiocytes, de plasmocytes et de polynucléaires éosinophiles en abondance variable. Les cellules tumorales expriment les marqueurs CD30 et CD15. Classiquement, elles n'expriment ni le CD45 ni les marqueurs B tels que CD20 et CD79a. Enfin elles expriment souvent de manière diffuse mais faible, le facteur de transcription PAX5 qui permet de conforter le diagnostic (**Figure 1**). Le facteur de transcription OCT-2 quand à lui n'est en général pas exprimé. A noter, que dans de rares cas, les cellules tumorales peuvent exprimer le CD20, mais souvent plus faiblement ou

de manière hétérogène. Dans les LH associés à l'EBV, les cellules tumorales expriment LMP1 et l'hybridation in situ avec la sonde EBER est positive.

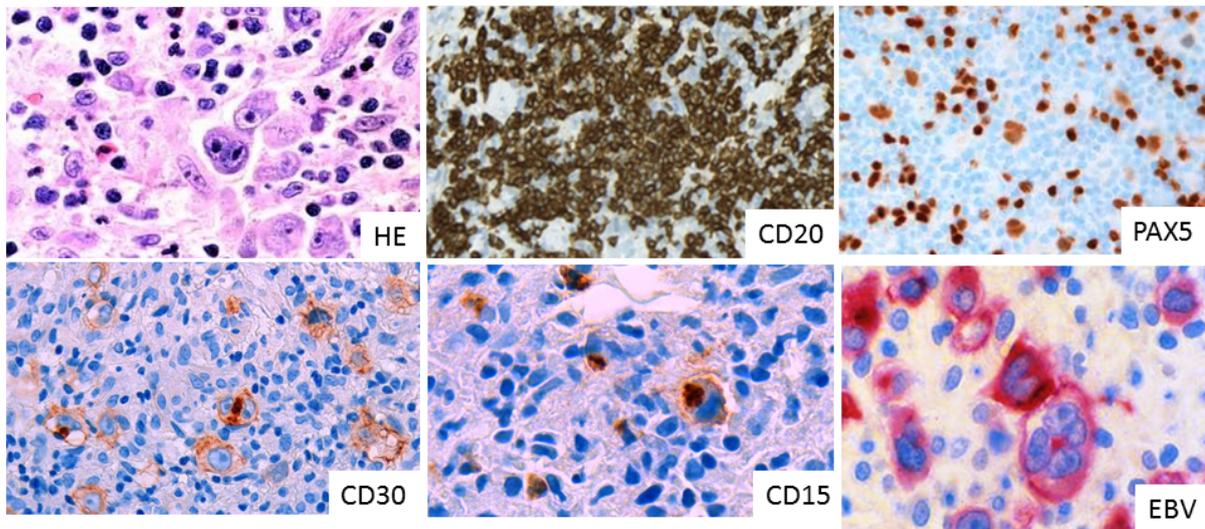


Figure 1 : Histologie du LH classique

L'OMS définit différents sous-types morphologiques du LH classique : scléro-nodulaire, à cellularité mixte, avec déplétion lymphocytaire, et riche en lymphocytes.

Le LH classique scléro-nodulaire

L'architecture ganglionnaire est détruite par une prolifération d'architecture nodulaire. Les nodules sont disséqués par des travées fibreuses, souvent épaisses. Au sein des nodules on retrouve des cellules HRS dispersées ou regroupées en petits amas, qui se dispersent sur un fond réactionnel abondant constitué d'assez nombreux lymphocytes T (LT), histiocytes et de polynucléaires éosinophiles. Parfois il existe une architecture granulomateuse qui peut être nécrotique.

Le LH classique à cellularité mixte

Il représente environ 25% des LHc et s'observe plutôt chez le sujet d'âge moyen et chez le sujet âgé. Les cellules HRS sont dispersées dans un fond inflammatoire abondant qui peut parfois prendre un aspect granulomateux. On observe la présence d'EBV dans les cellules tumorales dans 75% des cas.

Le LH classique avec déplétion lymphocytaire ou riche en cellules tumorales

Entité très rare représentant moins de 1% des LHc. Il s'observe préférentiellement chez l'adulte jeune et est plus fréquent chez le sujet VIH+. Il est souvent associé à un stade Ann Arbor avancé et à des symptômes B marqués. Dans cette entité le fond inflammatoire est moins marqué et la proportion en cellules HRS plus importante.

Le LH classique riche en lymphocytes

Il représente moins de 5% des LHc. Il s'observe surtout chez les sujets âgés et se présente sous forme d'une atteinte ganglionnaire périphérique préférentielle, souvent sans symptôme B. Les cellules HRS sont ici dispersées dans un fond inflammatoire moins polymorphe, constitué essentiellement de petits lymphocytes. Il ne doit pas être confondu avec le LHNPL.

2. Le LH nodulaire à prédominance lymphocytaire

L'architecture ganglionnaire est détruite par un infiltrat lymphoïde d'architecture nodulaire. Les nodules sont constitués de petits lymphocytes et d'histiocytes auxquels s'associent des cellules tumorales, en abondance variable. Ces cellules tumorales sont caractéristiques ; il s'agit de cellules dites « LP » ou « pop-corn cells ». Elles sont de grande taille avec un noyau polylobé et un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. L'infiltrat réactionnel est en général moins polymorphe que dans le LH classique (peu de polynucléaires éosinophiles et de plasmocytes). D'un point de vue immunohistochimique, ces cellules expriment le CD45 et les marqueurs B tels que CD20, CD79a, PAX5 et Oct-2 mais n'expriment ni le CD30, ni le CD15. Les cellules LP sont également BCL6⁺ et EMA⁺. La présence du virus EBV est classiquement absente ou rare. Les LT CD4⁺ forment habituellement des rosettes autour des cellules LP, ces lymphocytes ont classiquement un phénotype T follicular helper (TFH) exprimant CD57 et PD-1.

C. Physiopathologie et oncogénèse

La faible abondance de cellules tumorales dans le LH rend très délicate leur étude. C'est seulement grâce à des techniques de micro-dissection au laser qu'il a été possible

d'isoler et d'étudier ces cellules.^{6,7} Ainsi, la mise en évidence d'un réarrangement des gènes des immunoglobulines dans les cellules HRS prouve qu'elles dérivent d'un clone B. De plus, la mise en évidence d'hypermutations somatiques dans ces cellules indique qu'elles sont issues de cellules B post-centre germinatif, où a lieu physiologiquement ce processus. L'absence d'expression d'Ig de surface par la cellule HRS, devrait entraîner sa destruction, pourtant cette cellule échappe anormalement à l'apoptose grâce à plusieurs mécanismes.

- **Dérégulation des voies de signalisations**

Il a été montré une dérégulation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, l'inflammation et l'apoptose dans le LH. La voie NFκB est la plus étudiée. NFκB est un facteur de transcription constitué par un hétérodimère (cinq membres : Rel-A, Rel-B, c-Rel, P50 et p52). A l'état basal, cet hétérodimère est lié à son inhibiteur IκB dans le cytoplasme, ce qui empêche sa translocation dans le noyau.⁸ Lorsque que la voie NFκB est activée (par liaison d'un ligand à un récepteur cellulaire en amont), il y a une inactivation de IκB par phosphorylation et libération de NFκB, qui va alors être transloqué dans le noyau où il pourra activer la transcription de gènes cibles (**Figure 2**). De nombreuses études ont montré une activation constitutive de la voie NFκB dans la cellule HRS, par plusieurs mécanismes dont l'inactivation des régulateurs négatifs de NFκB (IκB, TNFAIP3)^{9,10} et la surexpression de composants de la voie NFκB notamment par amplification (c-Rel, CD30).^{11,12,13}

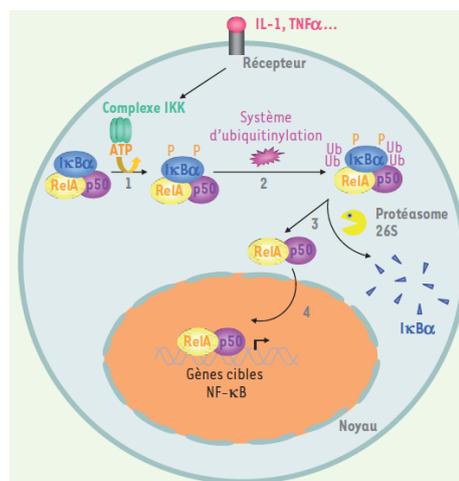


Figure 2 : Schématisation de la voie canonique NF κ B (d'après Baud V et al, *medecine et science* 2007)

Il existe également une activation constitutive de la voie JAK/STAT dans les cellules HRS soit par amplification du gène *JAK2*¹¹ soit par inactivation de régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT.¹⁴

D'autres voies de signalisation ont été identifiées comme étant activées de façon constitutive, favorisant ainsi la prolifération tumorale telles que les voies MEK/ERK et PI3K/AKT.

- **Résistance à l'apoptose**

L'absence d'expression d'Ig de surface devrait normalement conduire à l'apoptose de la cellule HRS. Ses mécanismes de résistance à l'apoptose sont variables tels qu'une surexpression de molécules c-FLIP inhibitrices de la voie extrinsèque de l'apoptose et/ou de XIAP inhibant la voie intrinsèque mitochondriale. Il a également été décrit des mutations de Fas bloquant la voie des récepteurs de morts^{15,16} (**Figure 3**).

- **Rôle de l'EBV**

L'EBV est un virus ubiquitaire, dont le génome est retrouvé dans les cellules tumorales dans 50% des LHc. L'EBV est un virus oncogène qui présente trois latences différentes :

- Type 1 : expression de EBNA 1, retrouvé dans les cellules tumorales du lymphome de Burkitt.
- Type 2 : expression de EBNA 1, LMP-1 et LMP-2, retrouvé dans les LH et lymphome T/NK.
- Type 3 : expression de EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, LMP-1 et LMP-2, retrouvé dans les syndromes lympho-prolifératifs de l'immunodéprimé.

Le fait que l'on retrouve une clonalité du virus dans les cellules HRS dans les différents sites atteints et au cours de l'évolution de la maladie est un argument fort en faveur de son implication dans l'oncogénèse de la cellule HRS.¹⁷ Ainsi, des études in vitro ont montré que les protéines de latences virales pouvaient jouer un rôle dans la prolifération et l'apoptose. A titre d'exemple, LMP-1 mimant le CD40 est capable d'activer les voies NFκB, MAP kinase et JAK/STAT et entraîne également l'activation de l'oncogène anti-apoptotique BCL2.^{18,19} L'ensemble favorise ainsi la prolifération et la résistance à l'apoptose de la cellule HRS (**Figure 3**).

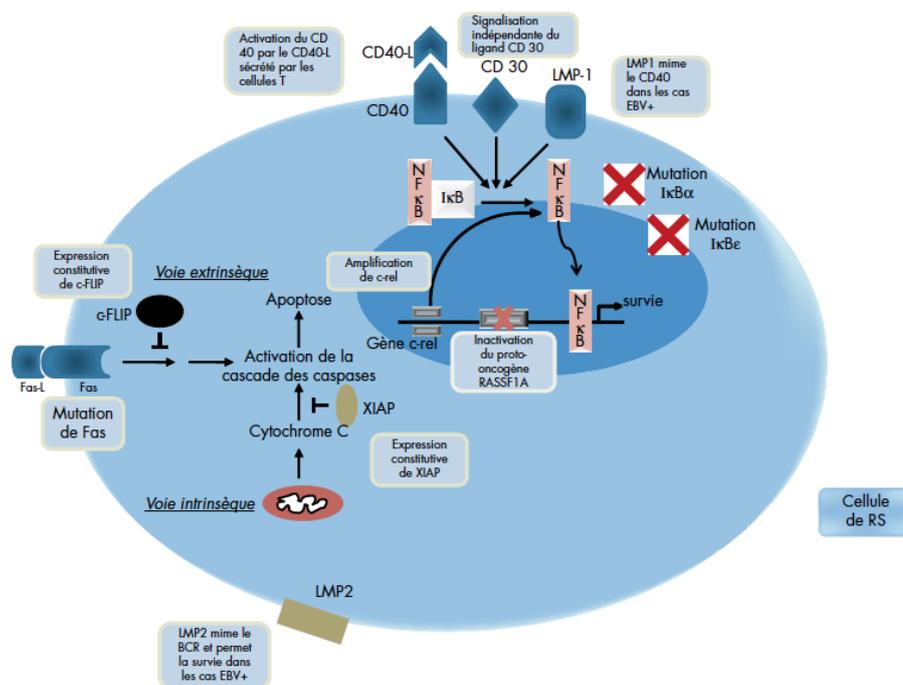


Figure 3: Mécanismes prolifératifs et anti-apoptotiques dans le LH (d'après Salmeron G, Hématologie 2010).

- **Rôle du micro-environnement tumoral (MET):**

L'abondance de l'infiltrat inflammatoire réactionnel caractéristique du LHc suggère un rôle clé du MET dans l'oncogénèse de la cellule HRS et fera l'objet d'un chapitre ultérieur de ce manuscrit (cf. chapitre MET).

II. Généralités sur le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC)

A. Epidémiologie, clinique, facteurs pronostiques et traitement

Le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) est le plus fréquent des LNH représentant 40 % des lymphomes B de l'adulte (InVS 2012). Malgré des progrès thérapeutiques importants, notamment depuis l'introduction du Rituximab, l'évolution des LBDGC reste difficile à prédire avec des pronostics hétérogènes et une survie globale de 47% à 5 ans (InVS 2012). En effet, plus d'un tiers des patients présentent une maladie réfractaire ou récidivent après primo-traitement. Il existe des critères pronostiques clinico-biologiques permettant de stratifier les patients et de guider la prise en charge thérapeutique. L'index pronostic international (IPI) comprend cinq variables (âge, nombre de localisations extra-ganglionnaires, stade, indice de

performance selon l'ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) et taux de LDH) (**Tableau 3**).

Tableau 4. Index pronostiques LDH: lactate déshydrogénase; ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group.	
Index pronostique international (IPI): Facteurs défavorables	
• Age	≥ 60 ans
• Localisations extraganglionnaires	≥ 2
• Stade d'Ann Arbor	> 2
• LDH	> Normale
• Indice de performance selon l'ECOG	≥ 2
Index pronostique international adapté à l'âge (aaIPI): facteurs défavorables	
• Stade d'Ann Arbor	> 2
• LDH	> Normale
• Indice de performance selon l'ECOG	≥ 2

Tableau 3 : Index pronostique international dans le LBDGC (d'après Bonnet C et al, Revue médicale suisse 2012).

Le traitement de référence en première ligne, repose actuellement sur une polychimiothérapie de type « CHOP » (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone) ²⁰ associée à une immunothérapie basée sur un anticorps chimérique monoclonal ciblant CD20 : le Rituximab. L'introduction du Rituximab a représenté un progrès thérapeutique notable dans le LBDGC quel que soit le sous type.²¹⁻²³ En effet le premier essai clinique mené par le groupe d'étude des lymphomes de l'adulte (GELA) évaluant le traitement R-CHOP versus CHOP seul dans le LBDGC, a mis en évidence un taux de rémission de 76% versus 63% et une amélioration de la survie globale à 10 ans de 43,5% versus 27,6% dans le groupe R-CHOP versus CHOP respectivement.²² D'autres traitements peuvent être utilisés en première ligne ou lors des rechutes tels que les polychimiothérapies R-ACVBP (rituximab, doxorubicine, cyclophosphamide, vindesine, bleomycine et prednisone), R-DHAP (rituximab, dexaméthasone, cytarabine, cisplatine), R-ICE (rituximab, ifosfamide, carboplatine et étoposide) pouvant précéder une greffe autologue de cellules souches (ASCT).²⁴

Les LBDGC représentent un groupe de maladies hétérogènes avec des pronostics hétérogènes. Ces dernières années, les signatures transcriptionnelles ont permis d'identifier, au sein du groupe majoritaire des LBDGC, trois grands sous types moléculaires de pronostics distincts : le LBDGC de type centrolliculaire (GC), de type

activé B périphérique (ABC) et de type médiastinal primitif (PMBL).^{25,26} Le sous type ABC étant de moins bon pronostic avec un taux de survie à 3 ans d'environ 45% contre 80% dans le LBDGC GC et 97% dans le PMBL.^{24,26} Nous n'aborderons que les sous types GC et ABC dans ce travail.

B. Diagnostic histologique des LBDGC

Le LBDGC est caractérisé par une prolifération lymphoïde constituée de grandes cellules, détruisant l'architecture ganglionnaire. Cette prolifération est caractérisée par une forte densité en cellules tumorales. Ces cellules se dispersent dans un fond inflammatoire réactionnel, moins abondant que dans le LH. D'un point de vue cytologique, les cellules tumorales peuvent être d'allure centroblastique, immunoblastique ou bien plus indifférenciées (**Figure 4**). On observe fréquemment une activité mitotique importante et des phénomènes nécrotiques. D'un point de vue immunohistochimique ces cellules ont un phénotype B CD20⁺, CD79a⁺, PAX5⁺ avec un index de prolifération Ki67 élevé. Le CD30 peut être exprimé dans 10 à 20% des cas. La présence d'EBV doit conduire au diagnostic de LBDGC EBV⁺.

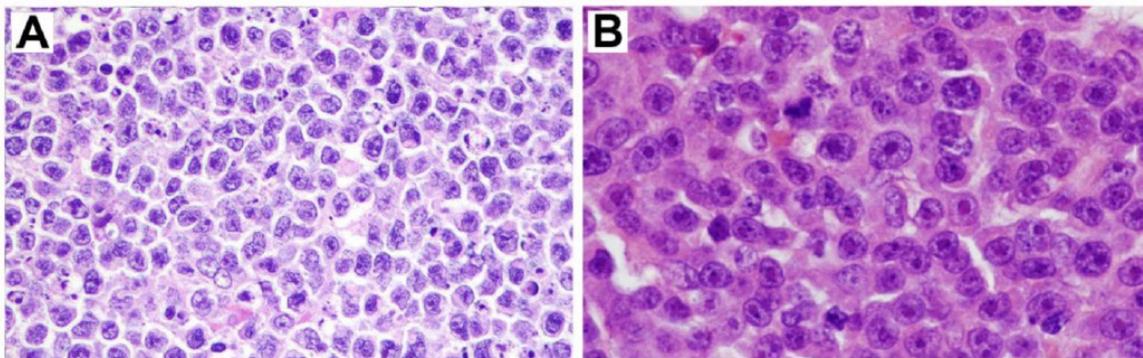


Figure 4 : Histologie des LBDGC. A. Exemple d'un variant centroblastique. **B.** Exemple d'un variant immunoblastique (d'après Xie Y et al, *semin hematol* 2016).

La caractérisation moléculaire du sous type de LBDGC est importante car elle a un impact pronostique. En pratique, on utilise l'algorithme de Hans,²⁷ basé sur l'immunohistochimie (IHC), et qui apparait bien corrélé à la classification moléculaire.²⁵ Ainsi Les LBDGC GC expriment CD10 et les LBDGC non-GC expriment MUM1 (**Figure 5**).

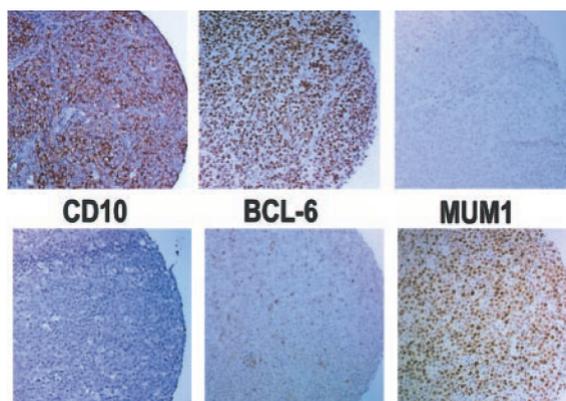
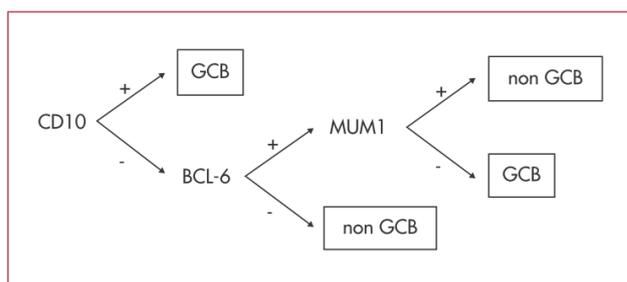


Figure 5 : Algorithme de Hans (d'après Hans CP et al, Blood 2004)

C. Voies oncogéniques dans le LBDGC

- **LBDGC GC**

Les cellules tumorales sont issues d'un clone B du centre germinatif. Les LBDGC GC présentent fréquemment une dérégulation d'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2 liée le plus souvent à une anomalie moléculaire du gène *BCL2* telle que le réarrangement *BCL2/IGH* secondaire à la translocation *t(14;18)*, classiquement observée dans le lymphome folliculaire et retrouvée dans 34% des LBDGC GC. De plus, l'apport des techniques de NGS a permis de mettre en évidence que BCL2 est l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans les LBDGC GC.²⁸ Les mutations de *MYC* et/ou de *BCL6* sont également fréquemment observées dans les LBDGC GC. Les LBDGC GC présentent fréquemment une activation de la voie PI3K/AKT, pouvant être liée à la perte de *PTEN* (gène suppresseur de tumeur, régulant de manière négative la voie PI3K) (**Figure 6**). Ceci est illustré par une perte d'expression de PTEN en IHC dans 55% des LBDGC GC²⁹ et par la détection d'une délétion du gène *PTEN* dans 11% des LBDGC GC.³⁰ Enfin les LBDGC GC sont caractérisés par la présence de mutations de régulateurs épigénétiques telles que des mutations du gène *CREBBP* codant pour une histone acétyltransférase observées dans 30% des LBDGC GC ou encore d'*EZH2* observées dans 22 % des LBDGC GC³¹ à l'origine d'une hyperméthylation de l'histone H3K27 entraînant une diminution de transcription de gènes suppresseurs de tumeurs comme *CDKN1A*.

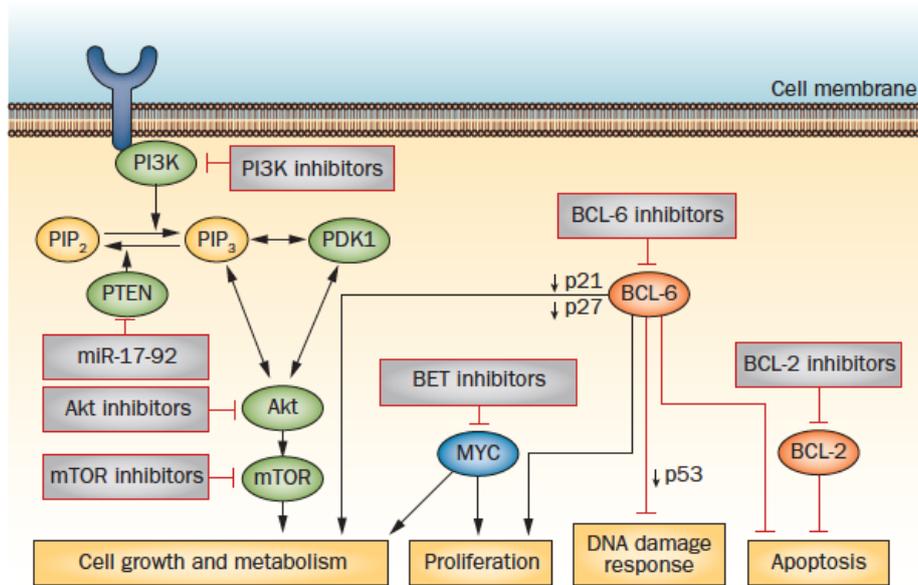


Figure 6: Principales voies de signalisations dérégulées dans le LBDGC GC et cibles thérapeutiques potentielles (d'après Roschewski M et al, Nature reviews 2014)

- **LBDGC ABC**

Les cellules tumorales sont issues d'un clone B post-GC et sont caractérisées d'un point de vue moléculaire, par une activation constitutive de la voie NFκB. NFκB représente une famille de facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'inflammation, la sécrétion cytokinique ou encore l'angiogénèse. Cette voie peut être activée lors de l'engagement du BCR (B-Cell Receptor) ou bien lors de l'engagement de récepteurs TLR (Toll-Like Receptor), également exprimés par les cellules B. L'activation constitutive de cette voie observée dans les LBDGC ABC passe par plusieurs mécanismes. Ainsi des mutations activatrices de *CARD11* (Caspase Recruitment Domain-containing protein 11), protéine impliquée dans la signalisation du BCR, sont observées dans 10% des LBDGC ABC.³² De même, des mutations du co-récepteur CD79B entraînant l'activation constitutive du BCR sont observées dans 21% des cas ³³ ou encore des mutations de *MYD88* impliquant une activation constitutive de la voie TLR sont observées dans 30% des cas.³⁴ La mutation de *MYD88* entraîne de plus une activation de la voie MAPK entraînant la production d'IL-6 et l'IL-10 elles-mêmes à l'origine d'une stimulation de la voie JAK/STAT de manière autocrine.³⁴ Enfin il a été décrit des mutations inactivatrices de *TNFAIP3* (régulateur négatif de la voie NFκB) dans 30% des LBDGC ABC ³⁵ (**Figure 7**).

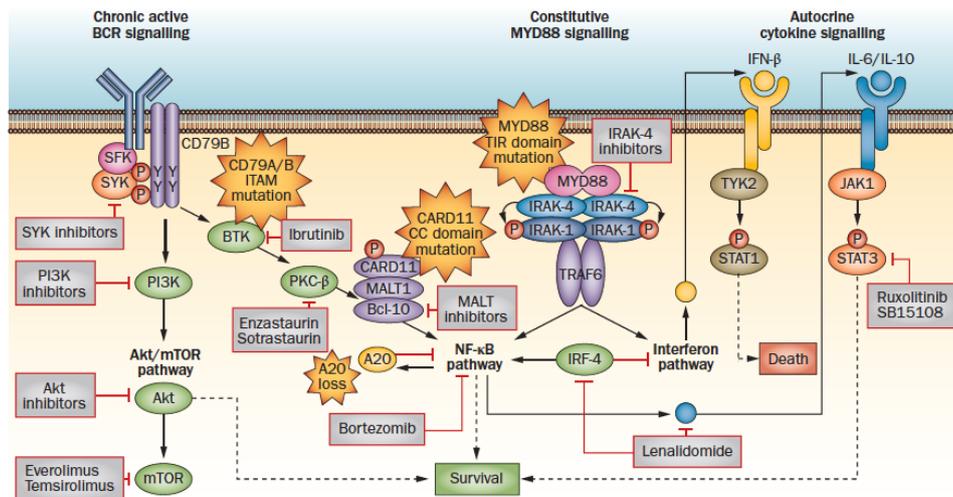


Figure 7 : Principales voies de signalisations dérégulées dans le LBDGC ABC et cibles thérapeutiques potentielles (d'après Roschewski M et al, Nature reviews 2014).

L'identification de ces voies oncogéniques et de ces mutations qui contribuent à stimuler la prolifération et limiter la mort cellulaire, représente un enjeu important car elles représentent autant de cibles thérapeutiques potentielles ²⁴ (Figure 6 et 7).

III. Généralités sur les populations cellulaires du micro-environnement tumoral dans les lymphomes

La physiopathologie du lymphome ne se résume pas aux seules cellules tumorales. Bien que moins étudié que dans les cancers solides, le micro-environnement tumoral (MET) dans les lymphomes participe activement au développement de la maladie. L'étude des signatures transcriptionnelles a montré que plusieurs composantes sont importantes dont l'angiogenèse et la composition de la matrice extracellulaire³⁶ mais aussi le système immunitaire.^{37,38} Comme dans la plupart des cancers, le MET participe à la croissance tumorale, à la résistance à la mort cellulaire et à l'immuno-évasion.³⁹ Il existe en effet une interaction dynamique entre les cellules tumorales et les cellules non tumorales du micro-environnement comme les cellules endothéliales, les composants de la matrice extracellulaire, les cellules stromales et les cellules immunes. De plus la composition du MET diffère en fonction des lymphomes et est modulée par les cellules tumorales elles-mêmes.⁴⁰⁻

A. Les cellules stromales mésenchymateuses

Ces cellules ont des propriétés immunosuppressives et participent à l'immuno-évasion. Il a été montré, *in vivo* dans un modèle murin que leur présence est associée à une augmentation des lymphocytes T régulateurs (LTreg) CD4⁺FoxP3⁺ et des cellules myéloïdes suppressives (MDSC)⁴³ favorisant la croissance tumorale et l'échappement à la surveillance immunitaire.

B. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Les macrophages sont une population abondante dans le MET des lymphomes. Schématiquement, on distingue les macrophages de type M1 (induits via la sécrétion d'IFN γ) stimulant une réponse immunitaire de type T_H1, participant ainsi à la réponse anti-tumorale ou anti-infectieuse, et les macrophages de type M2 qui représentent une différenciation alternative (induits par la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4).⁴⁴ Les macrophages M2 sont physiologiquement impliqués dans la résolution de l'inflammation et la cicatrisation, favorisant l'angiogénèse, la migration cellulaire et l'immuno-évasion.⁴⁴ Dans le MET, les macrophages sont appelés TAMs (tumor-associated macrophages) et sont classiquement polarisés en type M2, caractérisés entre autre par l'expression du cluster de différenciation CD163. Les TAMs ont une activité immunosuppressive notamment via la sécrétion d'IL-10, d'IL-4, de CCL22 et de TGF β qui favorisent le recrutement intra-tumoral de cellules immuno-suppressives telles que les LTreg, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC). Ces facteurs solubles favorisent également la polarisation des macrophages M2 et inhibent l'activité des LT CD8⁺ et la réponse T_H1.⁴⁴ De plus, notamment dans les lymphomes, ces TAMs expriment fréquemment le ligand du récepteur inhibiteur PD-1.^{45,46} De nombreux travaux ont étudié l'impact pronostique de l'infiltration intra tumorale par les TAMs dans les lymphomes, avec des résultats parfois discordants, en partie liés à l'utilisation de marqueurs différents pour caractériser ces TAMs. En effet les lignées des cellules myéloïdes et histiocytaires constituent des groupes hétérogènes (cellules dendritiques (DC), monocytes, macrophages, neutrophiles...) et ces différents types cellulaires n'expriment pas de marqueurs IHC spécifiques donc leur caractérisation dans le MET peut s'avérer difficile.⁴⁷ Les marqueurs les plus utilisés pour caractériser les TAMs dans les tissus sont le CD68 (marqueur pan-macrophages) et le CD163 qui marque plus spécifiquement les macrophages de type M2. Ainsi dans les LBDGC, des travaux ont montré un impact

pronostique positif de l'infiltrat CD68⁺.^{48,49} L'infiltrat CD163⁺, quant à lui est associé à un moins bon pronostic en analyses multivariées, concernant à la fois la survie globale et la survie sans progression.^{48,50,51} Dans les LH, les TAMs CD68⁺ et CD163⁺ sont classiquement associés à un mauvais pronostic^{38,52}, comme en témoigne une méta-analyse récente.⁵³ Cependant ces résultats restent à ce jour controversés.⁵⁴

C. Les cellules myéloïdes suppressives (Myeloid-derived suppressor cells/ MDSC)

Les cellules myéloïdes suppressives présentent des fonctions immunosuppressives notamment vis à vis des LT et des cellules *natural killer* (NK). Il a été montré que l'augmentation de ces cellules dans le sang périphérique de patients atteints de LH et de LBDGC est associée à un mauvais pronostic.^{55,56} Les MDSC constituent une sous population de cellules issues de la différenciation d'un progéniteur myéloïde, et sont ainsi caractérisées par l'expression de marqueurs myéloïdes immatures tels que CD34. Les MDSC ont une activité immunosuppressive via plusieurs mécanismes.^{57,58} Par exemple, les MDSC sécrètent des enzymes telles que l'arginase 1 et l'indoleamine 2,3-dioxygénase-1 (IDO-1) qui déplètent le milieu en L-arginine et tryptophane, acides aminés indispensables à la prolifération des LT ou encore l'*inducible oxide nitric synthase* (iNOS) qui induit une nitrosylation du TCR limitant l'activité des LT. De plus elles sécrètent des cytokines immunosuppressives tels que le TGFβ et l'IL-10 qui régulent négativement les LT CD8⁺ et les NK, et favorisent l'activité des LTreg⁵⁵ et la polarisation des macrophages en M2.

D. Les cellules dendritiques (DCs)

Les cellules dendritiques sont de véritables cellules présentatrices de l'antigène (CPAs) professionnelles. Lorsqu'elles captent des antigènes, elles vont pouvoir en présenter des peptides via les molécules de CMH de classe II qu'elles expriment de manière constitutive, permettant une activation des lymphocytes T CD4⁺. De plus, ces CPAs sont capable de présenter des antigènes exogènes via les molécules de CMH de classe I, ce processus appelé « cross presentation » permet l'activation directe des LT CD8⁺. Ainsi l'interaction CMH-peptide-TCR spécifique représente le premier signal permettant l'activation du LT. Il s'en suit un deuxième signal dit de « co-stimulation » via

l'interaction des molécules CD80/CD86 (exprimées par les CPAs) et CD28 (exprimée par les LT). L'ensemble permet la formation de la synapse immunologique et l'activation des voies de signalisation du TCR aboutissant à l'activation fonctionnelle du LT spécifique. Par ailleurs, il a été montré *in vitro*, que le contact direct entre les DCs et les cellules lymphomateuses peut protéger les cellules tumorales de l'apoptose via la surexpression du miRNA-181a qui réduit le niveau intra cellulaire de la protéine pro-apoptotique Bim.⁵⁹ Ces cellules représentent donc une cible thérapeutique intéressante, notamment en combinaison avec d'autres immunothérapies.

E. Lymphocytes T cytotoxiques (CTLs)

Les LT CD8⁺ naïfs se différencient après activation en LT effecteurs et LT mémoires. Les LT CD8⁺ effecteurs ont une activité cytotoxique contre les cellules tumorales qui a été démontrée dans des modèles expérimentaux et chez l'homme.^{60,61} Ces CTLs peuvent déclencher l'apoptose via des voies de lyse telles que le système Perforine/GranzymeB ou la voie Fas/Fas ligand. L'infiltration de CTLs en intra tumoral est associée à un meilleur pronostic dans les lymphomes B.^{62,63} Ces CTLs présentent une diminution de leur fonction au sein du MET notamment du fait de l'expression de molécules inhibitrices qui fera l'objet d'un chapitre ultérieur de ce manuscrit (cf. chapitre points de contrôle immunitaire inhibiteurs). Ainsi la restauration de l'activité fonctionnelle des CTLs est à la base de l'efficacité de la plupart des immunothérapies actuelles.

F. Les Lymphocytes T régulateurs (LTreg)

Les LT régulateurs représentent un sous type de LT CD4⁺, co-exprimant le marqueur CD25 et le facteur de transcription FOXP3. Physiologiquement, ces LTreg sont impliqués dans la tolérance immunitaire permettant la prévention des phénomènes auto-immuns et permettant le maintien de l'homéostasie immunitaire.⁶⁴ Le rôle et l'impact pronostique des LTreg au sein du MET des LH et LBDGC sont débattus. En effet de nombreuses études ont montré un impact pronostique positif de l'infiltrat intra-tumoral FOXP3⁺ aussi bien dans les LH que dans les LBDGC.⁶⁵⁻⁷⁰ L'hypothèse alors émise est que les LTreg permettraient une diminution de l'inflammation locale et donc un effet antitumoral. Cependant ces résultats sont controversés, car FOXP3 n'est pas un marqueur spécifique des LTreg immunosuppresseurs. De plus, il a été montré que les

cellules CD4⁺FOXP3⁺ peuvent être divisées en trois sous populations avec des rôles fonctionnels bien différents: les LTreg effecteurs (eTreg) qui sont de puissants immunosuppresseurs, les LTreg naïfs et des LT non régulateurs qui n'ont pas de fonction immunosuppressive.⁷¹ Ainsi Nakayam et al, ont étudié l'infiltration LTreg dans les LBDGC en utilisant un double marquage FOXP3 et CTLA-4 (CTLA-4 étant exprimé par les eLTreg) et montré que l'infiltration par des cellules FOXP3⁺ CTLA-4⁺ est associée à un pronostic défavorable.⁶⁸ De plus, Kelley et al, ont montré qu'un faible ratio de cellules FOXP3⁺/ Granzyme B⁺ est associé à une diminution de la survie sans progression et de la survie globale dans le LH alors que l'infiltrat FOXP3⁺ seul est associé à une augmentation de la survie sans progression.⁶⁷ Ces études illustrent bien la difficulté de l'étude des sous populations de LTreg et de leur impact dans la progression de la maladie. D'autres études, utilisant notamment des multiplexages de marqueurs sont donc nécessaires pour préciser le rôle fonctionnel des LTreg dans le lymphome.

G. Les cellules Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont un sous type de lymphocyte co-exprimant CD16 et CD56, appartenant au système immunitaire inné car capables d'induire l'apoptose en l'absence d'interaction spécifique avec le CMH. En effet, ils possèdent deux types de récepteurs à leur surface : des récepteurs activateurs et des récepteurs inhibiteurs. Les récepteurs inhibiteurs comme NKG2A ou les récepteurs KIRs reconnaissent les molécules CMH de classe I et leur engagement avec leur ligand inhibe l'activité du NK. Les récepteurs activateurs comme NKG2D reconnaissent des récepteurs exprimés par les cellules subissant un stress comme les cellules tumorales, cette liaison induit l'activation de l'activité cytotoxique du NK et ce même en présence de signaux inhibiteurs. Le déficit en NK est associé à une augmentation du risque de cancer suggérant leur importance dans la réponse immune anti-tumorale.⁷² Des études ont montré que le déficit quantitatif ou fonctionnel en NK dans le MET des LH contribue à l'immuno-évasion.^{73,74} En effet il a été décrit une altération de l'expression de NKG2D et une réduction de l'activité cytotoxique des NK dans les LH comparés aux autres LNH et aux tissus sains.^{73,74}

H. Cytokines, chimiokines et facteurs solubles

Le rôle des cytokines a été bien étudié dans le LH du fait de l'abondance du microenvironnement et de l'importante dérégulation de la sécrétion cytokinique. Les cellules lymphomateuses et les cellules immunitaires elles-mêmes peuvent sécréter des cytokines et chimiokines qui inhibent la maturation et les fonctions des cellules immunitaires comme l'IL-10, IL-4, CCL22, CCL5 qui vont favoriser un milieu ambiant immunosuppresseur. La production de ces cytokines a été associée à une moins bonne réponse thérapeutique dans le LH.⁷⁵ Ainsi, par exemple, il a été montré que les LT du MET du LH sécrètent CCL5 qui est chemo-attractant pour les monocytes, les polynucléaires et les LT CD4⁺.^{76,77} La sécrétion d'IL-10, de CCL1 et de CCL22 favorise la polarisation des LT CD4⁺ en LT de type T_H2.^{78,79} D'autre part, l'expression constitutive du récepteur CCR5 par les cellules HRS favorise également le recrutement de LT CD4⁺ et de polynucléaire dans le MET.⁸⁰ La sécrétion de TGF β par les cellules tumorales et par les cellules immunitaires immunosuppressives (MDSC et LT reg) inhibe l'activation et la prolifération des lymphocytes, favorise la différenciation des LTreg, la polarisation des TAM de type M2 et l'accumulation de MDSC.^{81,82} D'autre part, certaines cellules immunitaires comme les MDSC vont sécréter des enzymes telles que l'IDO et l'iNOS qui inhibent la réponse immunitaire.⁸¹

I. Stroma tumoral

La modulation de la matrice extra cellulaire via l'expression de molécules d'adhésion ou de facteurs angiogéniques tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) participe à la progression tumorale, à la migration et aux métastases. De plus, La néoangiogenèse favorise le développement d'un micro-environnement pro-tumoral en empêchant le homing des LT effecteurs⁸³ et est associée à un mauvais pronostic dans les LH et LBDGC.⁸⁴⁻⁸⁷

Au total, les composants du MET interagissent avec les cellules tumorales pour créer un MET « pro-tumoral » et immunosuppresseur (**Figure 8**). Il est maintenant connu que le MET, modelé par les cellules tumorales agit de manière active sur la croissance tumorale. Ainsi le système immunitaire est détourné et reprogrammé pour faciliter la croissance tumorale.

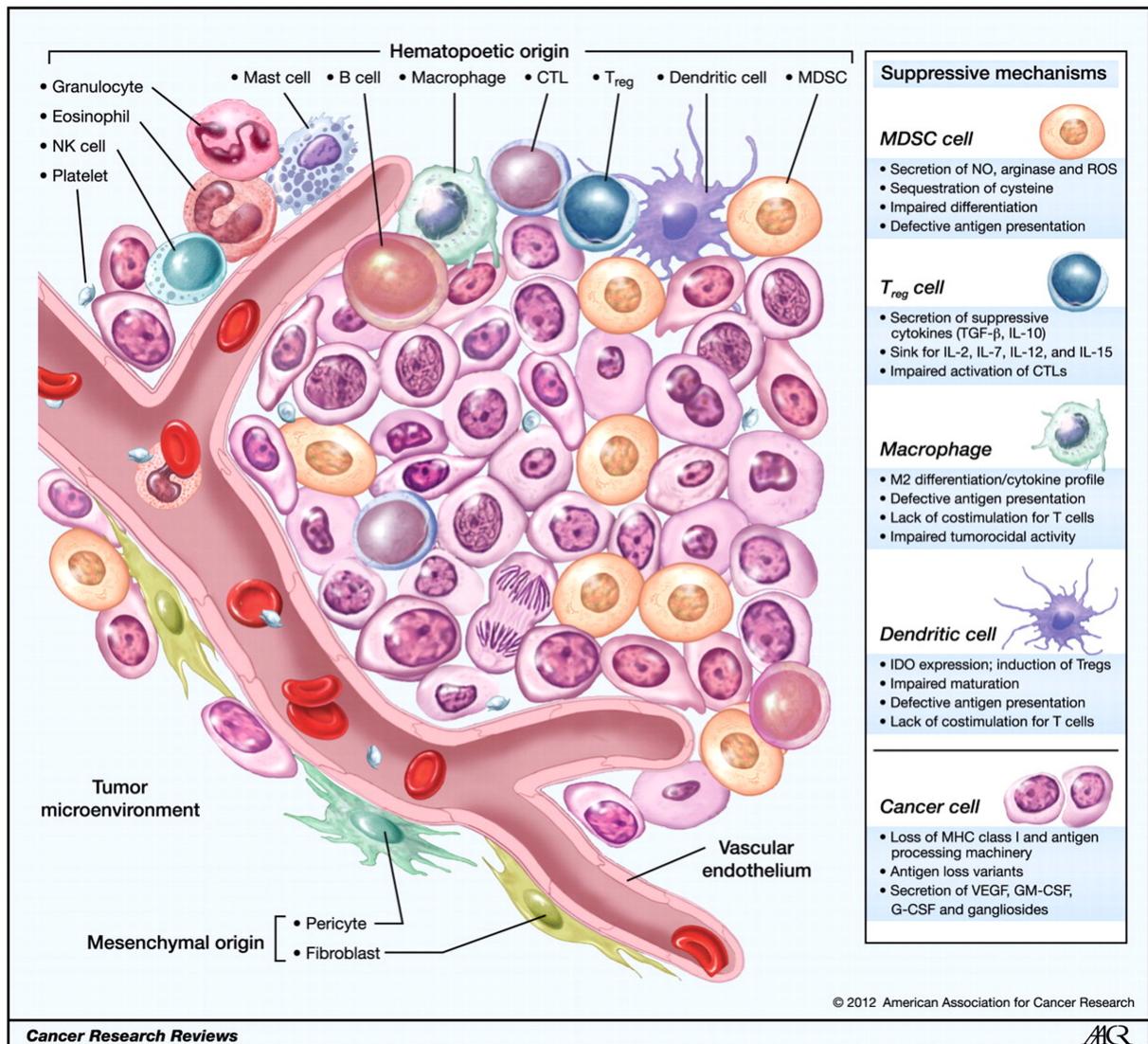


Figure 8 : Schématisation du MET (d'après Kerkar SP et al, Cancer Research 2012)

IV. Immunité anti-tumorale dans les lymphomes

A. Concept de l'immunoediting

Afin de pouvoir se développer dans un organisme, les cellules tumorales doivent échapper au contrôle du système immunitaire. En effet, il est bien établi aujourd'hui que le système immunitaire joue un rôle primordial dans la cancérogénèse.³⁹

C'est en 1909 que Paul Ehrlich émet pour la première fois l'hypothèse que le système immunitaire pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance et l'éradication des cellules tumorales.⁸⁸ Depuis de nombreux biologistes se sont intéressés au sujet mais les premières preuves de l'immunité anti-tumorale arrivent dans les années 50, où les travaux de Groyer et Gross mettent en évidence, *in vivo*, sur des modèles expérimentaux de greffes tumorales, l'existence d'antigènes tumoraux spécifiques.⁸⁸ En 1970, Franck

MacFarlane Burnet définit pour la première fois le concept d'immuno-surveillance anti-tumorale, proposant l'hypothèse que le système immunitaire est capable de détecter et détruire les cellules tumorales. ⁸⁹

Chez l'homme cette hypothèse est soutenue par l'observation d'une plus grande incidence de cancers chez les sujets immunodéprimés ⁹⁰ et par des rapports de cas relatant le développement de cancers métastatiques après transplantation d'organes comme par exemple le cas d'un patient décédé d'un mélanome métastatique après transplantation rénale, dont le donneur avait été opéré d'un mélanome 16 ans plus tôt.⁹¹

En 2002, Schreiber développe le concept de l'*immunoediting*, constitué de trois phases ⁹² (**Figure 9**)

- Phase d'élimination : Le système immunitaire est efficace et élimine les cellules tumorales, empêchant le développement tumoral.
- Phase d'équilibre : le système immunitaire ne peut détruire toutes les cellules tumorales mais contient la croissance de la tumeur. Cette phase correspond à la phase infra clinique du cancer.
- Phase d'évasion : Les cellules tumorales développent des mécanismes pour échapper au contrôle du système immunitaire, ce qui permet le développement d'un cancer cliniquement décelable.

Dans la phase d'évasion les cellules tumorales vont même développer certains mécanismes pour détourner et reprogrammer le système immunitaire, qui devient alors pro-tumoral, facilitant la progression tumorale.

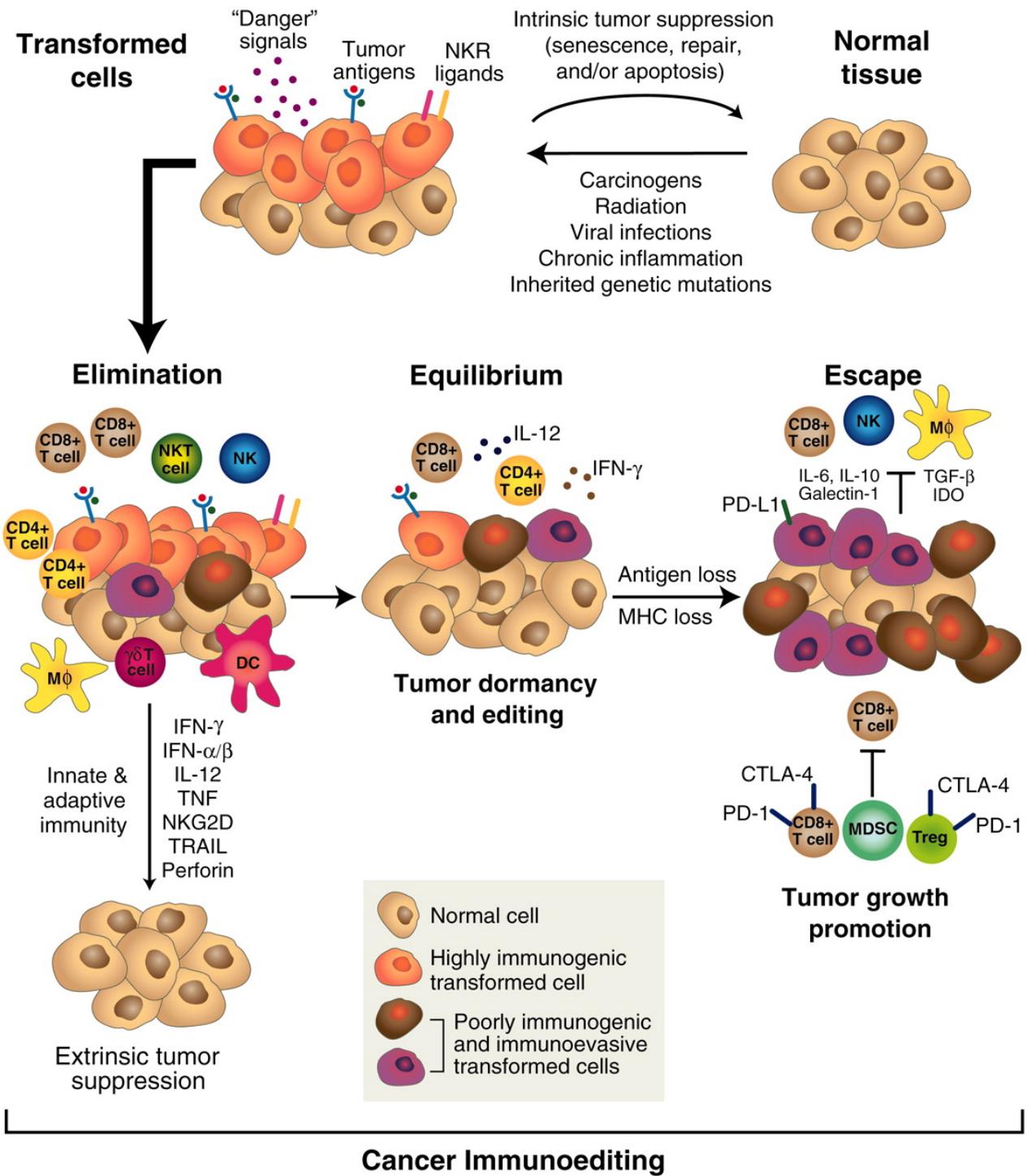


Figure 9 : Concept de l'immunoediting selon Schreiber (d'après Dunn et al, Nat immunol 2002).

B. Immuno-évasion dans les lymphomes

Le processus d'immuno-évasion (IE) est complexe impliquant de multiples voies moléculaires et cellulaires altérant la réponse immunitaire anti-tumorale.

1. Camouflage de la cellule tumorale

Le camouflage de la cellule cancéreuse vis à vis du système immunitaire est un des premiers mécanismes mis en jeu au cours de la progression tumorale, permettant à la tumeur d'échapper à la surveillance immunitaire. Ce processus peut se faire, par exemple, par la diminution d'expression des molécules du CMH par plusieurs mécanismes. Ainsi, des études IHC ont montré que plus de la moitié des LBDGC présentent une perte partielle ou complète de l'expression des molécules du CMH de classe I et de classe II.⁹³ La perte d'expression du CMH I est également fréquemment observée dans les LH. Cette perte est liée à une perte d'expression de la β 2-microglobuline dans 75% des cas.^{94,95} De plus une étude a également montré que les cellules tumorales du LH expriment fréquemment la molécule HLA-G impliquée dans la tolérance immunitaire en protégeant les cellules tumorales de l'activité cytotoxique des NK.⁹⁶ La diminution de l'expression des molécules CMH II représente également un mécanisme d'immuno-évasion particulièrement important dans les lymphomes comme en témoigne l'impact pronostique péjoratif de la perte du CMH II dans les LH et les LBDGC.^{97,98} Plusieurs mécanismes expliquent la perte d'expression du CMH II dont l'apparition de mutations homozygotes du gène codant le CMH II ou des réarrangements du gène *CIITA* (indispensable à la transcription du CMH II). Enfin d'autres mécanismes aboutissent à la perte du CMH comme les mutations des protéines impliquées dans le processing de l'antigène (LMP2/7)⁹⁹ ou dans le transport de l'antigène (TAP1 et TAP2).⁹³

2. Surexpression des points de contrôle immunitaire inhibiteurs (« checkpoints immunitaire »)

Lorsque le système immunitaire parvient à reconnaître les cellules tumorales comme anormales, celles-ci vont développer d'autres mécanismes de résistance pour éviter la destruction. Ainsi, d'autres mécanismes d'IE peuvent entrer en jeu notamment via la dérégulation et la surexpression de certaines molécules points de contrôle immunitaire

inhibiteurs (PCIs) ou « immune checkpoints/ICPs », qui modulent et/ou inhibent la réponse immunitaire lors de leur interaction avec leurs ligands respectifs. Physiologiquement, ces PCIs sont exprimés pour permettre le maintien d'une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs afin d'éviter un « emballement » de la réponse immunitaire qui pourrait être dommageable pour les tissus. Ces PCIs vont pouvoir être détournés par la cellule tumorale pour inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale et représentent à l'heure actuelle des cibles thérapeutiques en expansion qui feront l'objet d'un chapitre ultérieur dans ce manuscrit (cf. chapitre thérapeutiques). Les PCIs les plus étudiés sont : CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), PD-1 (Programmed cell death 1), LAG-3 (Lymphocyte activation gene 3) et TIM-3 (T cell immunoglobulin and-mucin-domain containing-3). Il existe également des points de contrôle immunitaire activateurs, que nous n'aborderons pas dans ce travail.

a. CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4/CD152)

L'activation du LT par une CPA appelée « priming » nécessite d'une part la reconnaissance du complexe CMH-peptide-Ag (1^{er} signal) mais également l'interaction de molécules de co-stimulation comme l'interaction de CD28 (exprimée à la surface du LT) et de CD80/86 (exprimées à la surface de la CPA), cette interaction représente le 2^{ème} signal, indispensable à l'activation du TCR. CTLA-4 est une molécule exclusivement exprimée par les LT activés, qui entre en compétition avec CD28 en se liant aux molécules CD80/CD86 avec une plus forte affinité. Cette interaction diminue la stimulation des LT en activant les phosphatases situées en aval du TCR.⁸¹ L'action de CTLA-4 intervient principalement au niveau des organes lymphoïdes où s'effectue l'activation des LT et va donc limiter le « priming » du LT. CTLA-4 peut être exprimé par les LT CD4⁺, mais également par les LT CD8⁺.

CTLA-4 a été le premier PCI bloqué par des anticorps à visée thérapeutique dans les cancers solides¹⁰⁰ mais reste peu étudié dans les lymphomes.

b. Axe PD-1/PD-L1 (Programmed cell death 1/CD279- Programmed death-ligand 1/CD274)

Comme CTLA-4, PD-1 n'est exprimé qu'après activation du LT mais contrairement à CTLA-4, l'expression de PD-1 n'interfère pas avec des molécules de co-stimulation. Son

engagement inhibe également la transduction du TCR via le recrutement de phosphatases.¹⁰¹ Contrairement à CTLA-4, PD-1 peut être exprimés par plusieurs types de cellules immunitaires (LT, LB, NK) et possède deux ligands : PD-L1 et PD-L2. Ainsi, l'interaction entre le récepteur PD-1 exprimé par les lymphocytes T et B, et son ligand PD-L1/2 exprimé par les cellules tumorales ou par d'autres cellules immunitaires (dont les macrophages et les CPA) induit une inhibition des LT effecteurs et joue ainsi un rôle clé dans l'échappement tumoral à la réponse immunitaire. L'inhibition des LT par l'axe PD-1 a lieu préférentiellement dans les tissus périphériques.

Axe PD-1/PD-L1 dans les LBDGC

Dans les LBDGC, PD-L1 peut être exprimé par les cellules tumorales et par les cellules du MET comme les macrophages, tandis que PD-1 est habituellement restreint aux lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs).¹⁰²⁻¹⁰⁴ De rares observations ont rapporté l'expression de PD-1 à la surface des cellules lymphomateuses.¹⁰³⁻¹⁰⁶ La fréquence d'expression de PD-L1 dans les LBDGC est de l'ordre de 20% à 30%, mais dépend du seuil de positivité retenu (celui-ci allant de 5% à 30%) et du compartiment cellulaire analysé, tumoral ou micro-environnemental.¹⁰⁷ Néanmoins l'ensemble des données de la littérature, s'accorde sur l'observation d'une plus forte expression de PD-L1 par les cellules tumorales dans les LBDGC non-GC et dans les LBDGC associés à l'EBV.¹⁰⁷ L'expression de PD-L2 est moins étudiée, du fait d'un manque d'outil fiable, mais serait également plus fréquente dans les LBDGC non-GC.¹⁰⁷ Dans une étude récente, des analyses IHC avec double marquage PD-L1/PAX5 sur échantillons de LBDGC, ont mis en évidence une expression de PD-L1 par les cellules tumorales dans 15% des cas (seuil 20%).¹⁰² Les anomalies génétiques, et en particulier les gains chromosomique *9p24.1* sont à l'origine de la surexpression de PD-L1/L2 dans 20% des LBDGC.¹⁰⁸ D'autres mécanismes tels que les translocations intéressant le gène *PD-L1/L2* fusionnant par exemple avec le gène *IGH* sont également à l'origine de la surexpression de PD-L1 ¹⁰⁸ (**Figure 10**). Ces anomalies génétiques sont plus fréquentes dans les LBDGC non-GC expliquant la fréquence plus élevée d'expression de PD-L1 par les cellules tumorales dans les LBDGC non-GC que dans les LBDGC GC. De plus, dans les LBDGC non-GC, il existe des mutations de *MYD88* dans 30% des cas induisant l'activation de la voie JAK/STAT qui aboutit également à la surexpression de PD-L1/L2.¹⁰⁷ Enfin, l'infection à EBV entraîne également une surexpression de PD-L1 dans les LBDGC associés à l'EBV

via l'activation de la voie JAK/STAT due d'une part, à la présence de cytokines inflammatoires et d'autre part, à la présence d'une protéine de latence virale LMP1 qui active le promoteur de PD-L1 via l'activation d'AP-1 et des composants C-JUN et JUN-B ¹⁰⁷ (Figure 10).

Dans les LBDGC, la surexpression de PD-L1/L2, serait associée à un pronostic plus péjoratif mais le fait que l'expression de PD-L1 soit plus fréquemment observée dans les LBDGC non-GC entraîne un biais suggérant que les deux paramètres ne sont peut-être pas indépendants.¹⁰² L'expression de PD-1 par les TILs semble être plus élevée dans les LBDGC GC que dans les non GC, et serait corrélée à une meilleure survie des patients.¹⁰⁷ Récemment, une étude sur une large série de 1253 LBDGC, a montré une meilleure survie chez les patients atteints de LBDGC ayant de nombreux TILs PD-1⁺ et peu de cellules tumorales PD-L1⁺.¹⁰²

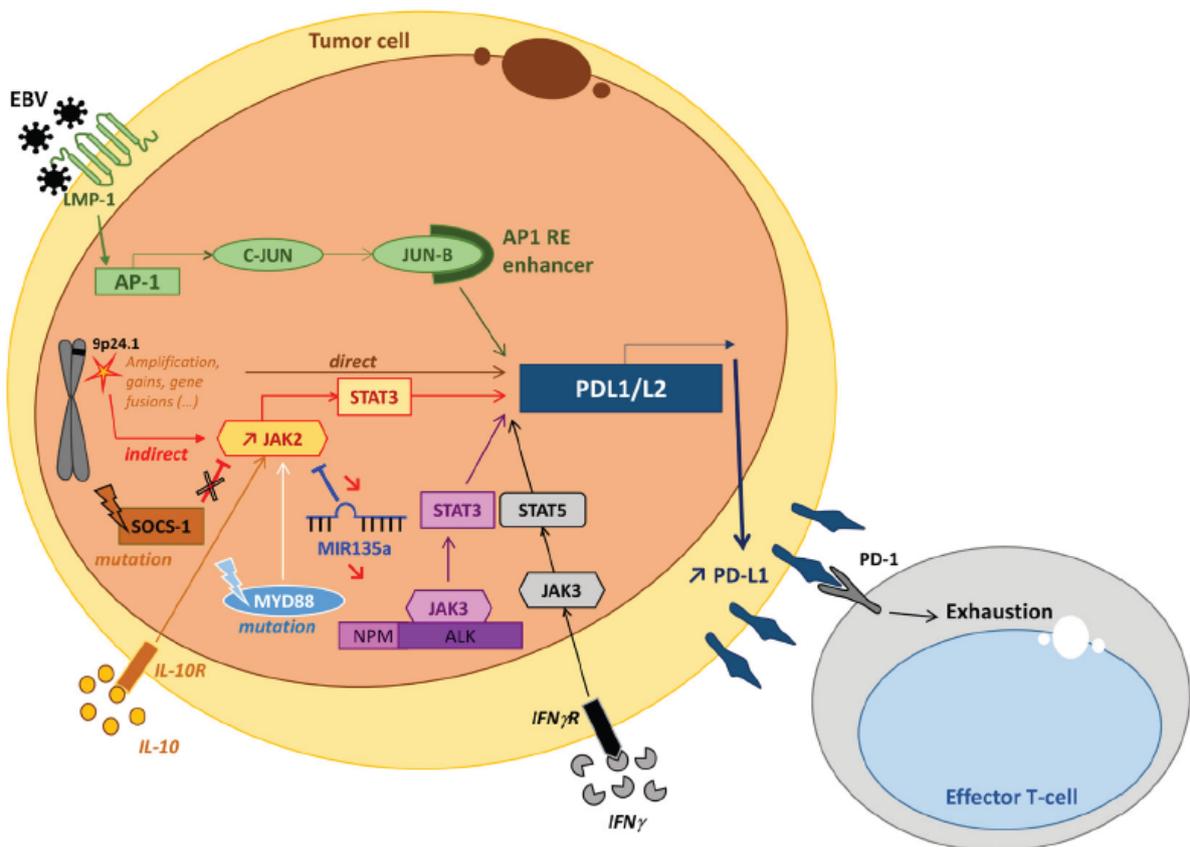


Figure 10 : Mécanismes à l'origine de la surexpression de PD-L1/L2 dans les LBDGC (d'après Gravelle et al, oncotarget 2017).

Axe PD-1/PD-L1 et LH

Comme dans les LBDGC, PD-L1 peut être exprimé par les cellules tumorales (9 à 90% des cas selon la littérature) ¹⁰⁹⁻¹¹¹ mais également par les cellules du MET. Les mécanismes impliquant la surexpression de PD-L1 par les cellules HRS sont proches de ceux observés dans les LBDGC non-GC (**Figure 10**). En effet des études après microdissection laser, ont permis d'identifier que la surexpression de PD-L1 est fréquemment liée à une amplification du locus *9p24.1*.¹¹² De plus le gain en *9p24.1* induit également la surexpression de JAK2 qui augmente l'expression de PD-L1. L'infection par EBV, fréquente dans les LH, entraîne également la surexpression de PD-L1 comme vu précédemment. Une autre étude utilisant des techniques d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) a permis de mettre en évidence une altération des loci *PD-L1/L2* dans 97% des échantillons de LH étudiés.¹¹³ De plus, dans cette étude, la réalisation d'un double marquage PD-L1/PAX5 en IHC, a permis de mettre en évidence une corrélation entre le nombre de copie de *PD-L1* et la surexpression protéique de PD-L1 par les cellules HRS.¹¹³ PD-L1 est également fréquemment exprimé par les cellules non tumorales, en particulier par les macrophages. Ainsi, Carey et al, ont montré récemment, grâce à des multiplexages d'immunofluorescence, que les macrophages CD163⁺PD-L1⁺ co-localisent avec les cellules HRS PD-L1⁺ et les LT CD4⁺PD1⁺ suggérant alors que les TAM PD-L1⁺ et les LT CD4⁺PD-1⁺ pourraient créer une « niche immuno-protective » pour les cellules HRS ⁴⁵ (**Figure 11**). Enfin, la surexpression de PD-L1 dans les LH et le nombre de TILs PD-1⁺ seraient associés à un mauvais pronostic.^{109,113}

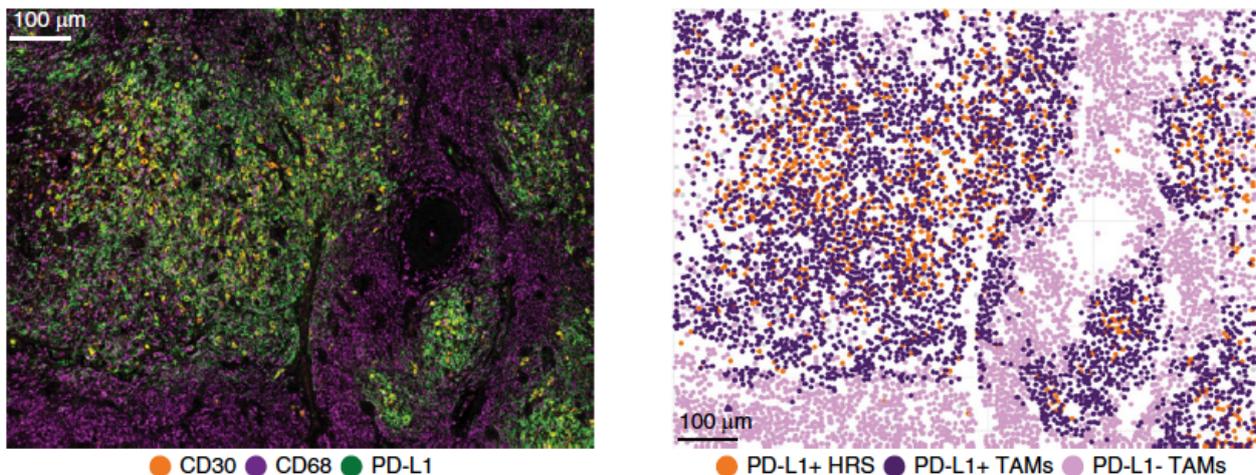


Figure 11 : Etude d'immunofluorescence avec multiplexage de CD30/CD68/CD163/PD-L1 illustrant la formation d'une niche « immuno-protective » par les TAMs PD-L1⁺ dans le LH (d'après Carey et al. Blood 2017).

c. TIM-3 (T cell immunoglobulin and-mucin-domain containing-3)

TIM-3 est une protéine trans-membranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines, contenant un domaine extra cellulaire de type IgV. Cette protéine a été initialement découverte dans des travaux caractérisant les LT de type T_H1.¹¹⁴ TIM-3 est exprimé par les LT après stimulation chronique notamment dans les infections virales chroniques mais également dans les cancers jouant un rôle clé dans l'inhibition des réponses immunes T_H1.¹¹⁵ L'expression de TIM-3 est corrélée à la suppression des fonctions des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ et est actuellement considérée comme un puissant marqueur d'*exhaustion* lymphocytaire.^{115,116} Son expression est par ailleurs étroitement associée à celle de PD-1.^{117,118} Ainsi l'expression de TIM-3 confère un stade d'*exhaustion* plus marqué que les LT effecteurs exprimant seulement PD-1.^{118,119}

L'expression de TIM-3 a été également observée dans les LTreg infiltrant la tumeur et est associée à une augmentation de la fonction immunosuppressive des LTreg.^{120,121} TIM-3 peut également être exprimé par d'autres cellules du MET (DC, macrophages, NK et cellules endothéliales).¹²⁰ D'autre part, l'expression de TIM-3 a également été décrite dans les cellules tumorales notamment de mélanome¹²², d'ostéosarcome¹²³, de carcinome rénal à cellules claires¹²⁴ et de leucémie myéloïde aigue.^{125,126} Outre ces effets sur le système immunitaire, TIM-3 favoriserait la migration cellulaire et l'invasion par différents mécanismes¹²⁷ que nous ne détaillerons pas dans ce travail.

Il a été identifié plusieurs ligands de TIM-3. La galectin-9 est une protéine extracellulaire capable de lier le domaine IgV de TIM-3. L'interaction entre TIM-3 et galectin-9 entraîne la mort des LT T_H1 et des LT CD8⁺ dans un modèle murin de cancer du côlon.¹²⁸ De plus, l'interaction TIM-3/galectine-9 au niveau des monocytes/macrophages entraîne une altération de leur production cytokinique affectant la réponse immunitaire T_H1.¹²⁸ Ceacam1 est un autre ligand de TIM-3 qui peut interagir avec TIM-3 via son domaine IgV permettant la stabilisation de TIM-3, indispensable à son activité inhibitrice.¹²⁰ TIM-3 peut également interagir avec HMGB1 qui est une protéine liant des acides nucléiques relargués dans le milieu lors de dommages cellulaires, représentant ainsi une protéine « signal de danger ». L'interaction de TIM-3 et de HMGB1 à la surface des DCs va entraîner une séquestration de HMGB1, et donc des acides nucléiques, dans les endosomes des DCs, qui aura pour conséquence un défaut de maturation des DCs et *in*

fine un défaut d'activation de la réponse immunitaire spécifique.¹²⁹

Les voies de signalisations de TIM-3 sont à l'heure actuelle encore mal élucidées, et les études réalisées *in vitro* sur les lignées cellulaires sont contradictoires. Une première étude *in vitro*, a montré que l'ajout d'un anticorps agoniste de TIM-3 dans des cultures de lignées de T_H1 ou de DCs induit une phosphorylation de diverses protéines aboutissant à l'activation de ERK et la dégradation d'IκB favorisant alors l'activation de la voie NFκB.¹³⁰ Une autre étude a montré que l'induction de l'expression de TIM-3 sur les lignées T Jurkat entraîne une activation du TCR via l'interaction de TIM-3 avec les composants de la voie de transduction du TCR (notamment Zap 70).¹³¹ D'autres études ont cependant montré un effet inhibiteur de TIM-3 sur la signalisation du TCR soit via la réduction de l'expression des facteurs de transcription c-Fos, c-Jun et NFAT¹³² ou bien via l'interaction de TIM-3 avec des composants de la synapse immunologique¹³³ empêchant l'activation du TCR. De plus une étude réalisée *in vivo*, a montré que l'interaction entre TIM-3 et Galectine 9 est associée à une régulation négative de la réponse immune T_H1 avec une diminution de la sécrétion d'IFNγ.¹³⁴

Dans les tissus tumoraux, l'expression globale de TIM-3 a été associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers solides : carcinome rénal¹³⁵, carcinome colique¹³⁶, carcinome prostatique¹³⁷, carcinome urothélial¹³⁸ et carcinome gastrique¹³⁹ mais également dans le lymphome folliculaire.¹⁴⁰

d. LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3)

LAG-3 est une protéine contenant également un domaine IgV, exprimée par les LT activés mais également par les LB activés, les NK, et les DCs. Le principal ligand de LAG-3 est la molécule CMH II. LAG-3 a été décrit comme un PCI car régule négativement l'expansion des LT CD4⁺ et CD8⁺ *in vitro* et *in vivo*.¹⁴¹ Par ailleurs il a été décrit la co-expression de PD-1 et LAG-3 par les TILs. De plus, l'inhibition de LAG-3 potentialise l'action des anticorps anti-PD-1 en entraînant une réponse immune anti-tumorale plus puissante.¹⁴² LAG-3, exprimé par les LTreg, peut également se lier au CMH II exprimé par les DCs. Cette interaction entraîne une inhibition de la maturation et de l'activation des DCs et participe à l'IE des tumeurs.¹⁴³ Les mécanismes d'actions et les conséquences sur les voies de signalisations cellulaires mis en œuvre lors de l'engagement de LAG-3

sont encore peu élucidés. Cependant, il existe actuellement quatre agents thérapeutiques anti-LAG-3 en cours d'essais cliniques dont trois anticorps anti-LAG-3 spécifiques. En pathologie lymphomateuse, des essais cliniques de phase I/IIa incluant des patients atteints de LH et des LNH B réfractaires, traités par un anti-LAG-3 seul ou en combinaison avec le nivolumab sont en cours d'évaluation (NCT02061761).

3. Micro-environnement immunosupresseur

Comme décrit précédemment, les cellules tumorales peuvent moduler la composition du micro-environnement et favorisent la création d'un milieu ambiant « pro tumoral » (Figure 12).

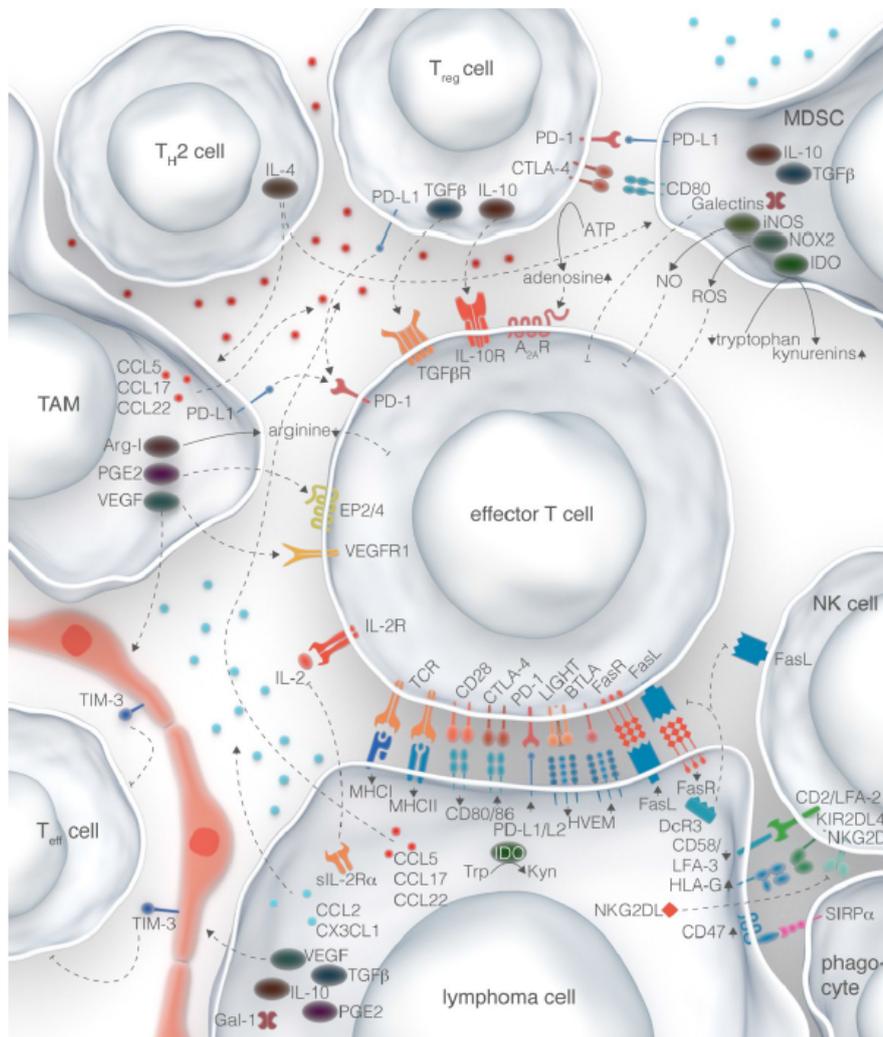


Figure 12 : Schématisation de l'ensemble des mécanismes d'IE pouvant être mis en jeu dans le lymphome (d'après Upadhyay R et al, *Cancers* 2015).

V. Bloqueurs des points de contrôle immunitaire (« immune checkpoints ») dans les lymphomes : Voies thérapeutiques actuelles et futures

L'immunothérapie basée sur les bloqueurs des PCIs a montré une efficacité dans de nombreux cancers solides (mélanome, cancer du poumon, carcinome urothéliaux).¹⁴⁴ L'utilisation de ces molécules dans les lymphomes est plus récente mais montre des effets thérapeutiques prometteurs, notamment dans le LH. Les plus étudiés à l'heure actuelle sont les traitements visant l'axe PD-1/PD-L1 et l'axe CTLA-4 avec des résultats très encourageant.

Bloqueurs de l'axe PD-1/PD-L1

Les inhibiteurs de PD-1 ont montré des résultats spectaculaires dans les LH. En effet, l'utilisation du nivolumab seul (un anticorps anti-PD-1) dans des essais de phase I et II montre des réponses objectives allant de 66% à 87% selon les essais avec principalement des réponses partielles et une stabilisation à long terme, mais également des réponses complètes ^{145,146} (**Tableau 4**). De plus, le profil de toxicité semble acceptable. Ainsi, l'excellente efficacité du nivolumab dans le LH en rechute/réfractaire (R/R) a permis l'autorisation de son utilisation par la FDA avant la fin des essais de phase III. Actuellement de nombreux essais sont en cours dont des essais évaluant les anti-PD-1 en première ligne ou associés à brentuximab-vedotin.

Les essais sur les LBDGC montrent des résultats moins spectaculaires. Une étude de phase II, conduit sur 66 patients atteints de LBDGC, a montré une réponse objective de 51% dont 34% de réponse complète et 17% de réponse partielle et une survie sans progression à 16 mois de 70% (**Tableau 5**).¹⁴⁷ Un autre essai de phase I a montré une réponse objective de 36%.¹⁴⁸ Actuellement d'autres essais cliniques de phase II sont en cours.

Bloqueurs de CTLA-4

Un essai de phase I évaluant l'association ipilimumab (anti-CTLA-4)-brentuximab (anti-CD30) couplé au vedotin dans les LH R/R a montré une efficacité prometteuse avec

un taux de réponse objective à 67% dont 42% de réponse complète (**Tableau 4**).¹⁴⁹ D'autres essais ont cependant montré des réponses plus faibles (de 17% à 33%).¹⁴⁹

Le premier essai de phase I effectué sur les LNH incluait 18 patients et a montré une réponse objective faible (11%).¹⁵⁰ Cependant des essais en cours, évaluent l'association de l'ipilimumab et du nivolumab/pembolizumab.¹⁴⁹

Drug	Ph	Target	N	ORR (%)	CR (%)	PR (%)	SD (%)	OS	PFS	Ref
Nivolumab	I	Anti-PD-1	23	87	17	70	13		2 years, 86%	10
Nivolumab	II	Anti-PD-1	80	66	9	58	NR	6 m 77%	6 m, 77%	11
Nivolumab+	I	Anti-PD-1	31	74	19	55	10	NR	NR	13
Nivolumab + BV	I	Anti-PD-1	10	100	63			NR	4m, 100%	14
Pemolizumab	Ib	Anti-PD-1	31	58	19	12	23	NR	11.4	15
Pemolizumab	II	Anti-PD-1	210	65-68	22-29					16
Ipilimumab	I	Anti-CTLA-4	12	67	42				0.74 years	19

HL: Hodgkin lymphoma; Ph: phase; N: number of patients; m: month; ORR: overall response rate; CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; OS: overall response; PFS: progression-free survival; Ref: reference; R/R: relapsed and refractory; BV: brentuximab vedotin; NR: not reached.

Tableau 4 : Synthèse des résultats des essais cliniques concernant les inhibiteurs des « checkpoints immunitaire » dans le LH (d'après Witkowska et al, J Immunol Res 2018)

Drug	Ph	Target	Disease	N	ORR (%)	CR (%)	PR (%)	SD (%)	OS	PFS	Ref
Pembrolizumab	I	Anti-PD-1	PMBCL	19	44	11	33		NR		24
Pembrolizumab	II	Anti-PD-1	DLBCL	66	51	34	17	37	NR	16 m, 70%	27
Ipilimumab	I	Anti-CTLA-4	NHL	18	11	5.5	5.5				30

Ph: phase; N: number of patients; m: month; ORR: overall response rate; CR: complete response; PR: partial response; SD: stable disease; OS: overall response; PFS: progression-free survival; Ref: reference; BV: brentuximab vedotin; NR: not reached.

Tableau 5 : Synthèse des résultats des essais cliniques concernant les inhibiteurs des « checkpoints immunitaire » dans les LBDGC (d'après Witkowska et al, J Immunol Res 2018).

VI. Immune Escape Gene Set/IEGS : approche moléculaire globale de l'immuno-evasion

L'hétérogénéité de réponse thérapeutique aux anti-PD-1 selon le sous type de lymphome et selon les patients, associée à l'observation d'évènements indésirables potentiellement graves sous anti-PD-1, rend nécessaire le développement de biomarqueurs prédictifs permettant d'identifier les patients qui seront les plus susceptibles de répondre aux bloqueurs des PCIs. Dans ce but, et pour aborder la multiplicité de ces mécanismes d'IE, nous avons développé un score transcriptionnel d'IE basé sur l'expression de 33 gènes impliqués dans l'IE.^{151,152} Ainsi, nous avons récemment

démontré *in silico* la surexpression collective de 33 gènes impliqués dans l'IE sur une série de transcriptomes de LNH publiés et disponibles dans des bases de données (*data mining*).^{151,152} Ces 33 gènes constituent le panel « Immune Escape Gene Set / **IEGS33** ». La surexpression de ces gènes a été étudiée à l'aide d'une méthode d'analyse bio-informatique appelée « Single Sample Gene Set Enrichment Analysis / ssGSEA » qui consiste à déterminer **l'enrichissement global d'un panel de gènes prédéfinis dans un échantillon**. Ainsi un score d'enrichissement « Sample Enrichment Score ou **SES** » pour ce panel de gènes est attribué à l'échantillon en fonction du nombre de gènes enrichis dans le transcriptome de l'échantillon. Les scores SES pour chaque échantillon pourront ensuite être comparés. L'application de cette méthode au panel « IEGS33 » représente un outil intéressant pour étudier l'IE car cette technique prend en compte la multiplicité des mécanismes d'IE mis en jeu dans les tumeurs. Les LNH avaient globalement des scores SES « IEGS33 » élevés comparativement aux cellules lymphoïdes non tumorales. Par ailleurs ces scores étaient différents selon les sous-types de lymphome démontrant que les mécanismes et l'amplitude de l'IE diffèrent selon les lymphomes.^{151,152} De plus, en combinant, le score « IEGS33 » à un score d'activation lymphocytaire T (SES « T cell activation/TCA » à partir d'un panel de gènes impliqués dans l'activation des LT), nous avons montré que l'on pouvait définir 4 stades d'IE (**Figure 13A**) se distribuant selon le concept de *l'immunoediting* où le stade I correspondrait aux tumeurs « froides » dépourvues de phénomène d'IE et d'activation lymphocytaire (IEGS- TCA-), le stade II correspondrait aux tumeurs immunogènes sans IE (IEGS-, TCA+), le stade III aux tumeurs immunogènes avec phénomènes d'IE (IEGS+ TCA+) et le stade 4 aux tumeurs immunogènes « dépassées » (IEGS+ TCA-). De plus, dans notre étude, nous avons montré que ces 4 stades étaient corrélés à la survie globale des LBDGC (**Figure 13B**).¹⁵² Enfin, l'utilisation d'un logiciel d'intelligence artificielle CIBERSORT a permis d'estimer l'abondance de chaque population immunitaire à partir des données transcriptomiques globales et a montré un enrichissement en LT CD4⁺ et CD8⁺ dans les stades 2 et 3 ainsi qu'un enrichissement en macrophages dans le stade 4. Ainsi, la corrélation entre le score « IEGS33 » et le score d'activation lymphocytaire T représente un outil original et puissant pour déterminer l'amplitude des mécanismes d'IE dans les LNH dans leur globalité.

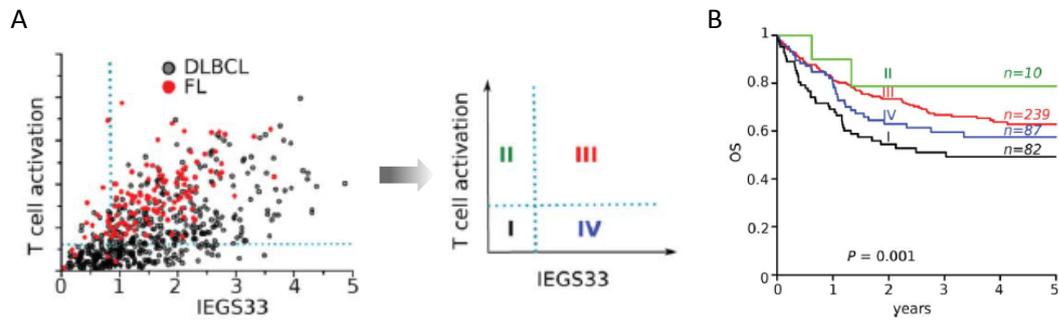


Figure 13 : Corrélation entre SES IEGS33 et T-cell activation gene set dans les LBDGC et les lymphomes folliculaires par une approche en datamining. (A) Pattern des quatre stades d'IE selon le score IEGS33 et T-cell activation gene set. (B) Courbes de survie globale des patients atteints de LBDGC en fonction du stade d'IE (d'après Tosoloni et al. *Oncoimmunol.* 2016).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Les objectifs de l'étude étaient d'identifier les mécanismes d'immuno-échappement dans le LH et de caractériser les sous populations immunitaires du micro-environnement du LH, comparativement au LBDGC, en combinant l'utilisation d'outils bio-informatiques, moléculaires et immunohistochimiques.

Article

A specific pattern of immune escape pathways in Hodgkin Lymphoma

Sarah Pericart¹⁻⁷, Marie Tosolini ¹⁻⁷, Pauline Gravelle¹⁻⁷, Cédric Rossi^{1-6,8}, Alexandra Traverse-Glehen⁹, Nadia Amara^{2,7}, Camille Franchet¹⁻⁷, Elodie Martin¹¹, Christine Bezombes¹⁻⁶, Guy Laurent^{2,5,10}, Pierre Brousset¹⁻⁷, Jean-Jacques Fournié¹⁻⁶, Camille Laurent¹⁻⁷*

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037, Toulouse, France

² Université Toulouse III Paul-Sabatier, Toulouse, France

³ ERL 5294 CNRS, Toulouse, France

⁴ Laboratoire d'Excellence 'TOUCAN', Toulouse, France

⁵ Programme Hospitalo-Universitaire en Cancérologie CAPTOR

⁶ Institut Carnot Lymphome CALYM

⁷ Département de Pathologie, CHU Toulouse, Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse France

⁸ Hématologie Clinique, CHU Dijon, 21000 Dijon, France

⁹ Hospices Civils de Lyon, Claude Bernard Lyon 1 University, INSERM 1052, Pierre-Bénite, France

¹⁰ Département d'Hématologie, CHU Toulouse, Institut Universitaire du Cancer-Oncopole de Toulouse France

¹¹ Biostatistics Unit, Institut Claudius Regaud, IUCT-O, Toulouse, France

*Correspondence: Laurent.c@chu-toulouse.fr ; Tel.: +33-053-115-6199

Received: date; Accepted: date; Published: date

Abstract: Therapeutic blockade of PD-1/PD-L1 shows promising results in Hodgkin lymphoma (HL) and in some diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients, but biomarkers predicting such responses are still lacking. In this aim, we recently developed a transcriptional scoring of immune escape (IE) in cancer biopsies. Using this method in DLBCL, we identified four stages of IE correlated with overall survival, but whether Hodgkin lymphoma (HL) also display this partition was unknown. So here, we explored the transcriptomic profiles of ~1000 HL and DLBCL by a comparative meta-analysis of their bulk microarrays. Relative to DLBCL, the HL co-clustered at the advanced stage of immune escape, showing significant enrichment of both IE and T-cell activation genes. Analyses by transcriptome deconvolution and immunohistochemistry showed more CD3⁺ and CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in HL than DLBCL. Both HL and ABC DLBCL shared a high abundance of infiltrating CD8⁺ T-cells, but HL had less CD68⁺CD163⁺ macrophages. The same cellular distribution of PD-1 and TIM-3 was observed in HL and DLBCL, though HL had more PD-L1 tumor cells and LAG-3 ME cells. This study unveils the advanced stage of immune activation and escape in HL, consistent with the response to checkpoint blockade therapies in this lymphoma.

Keywords: lymphoma, immune escape, Hodgkin lymphoma, immune checkpoints, TIM-3, *Datamining*

1. Introduction

In order to develop within immunocompetent hosts, it is imperative that tumors evolve several immune escape strategies [1–3]. Among them, the pro-tumor microenvironment (ME) and its interactions with cancer cells play a key role in promoting tumor cell growth and invasion. Lastly, the impairment of functional anti-tumor responses through the up-regulation of immune checkpoint (ICP) has further expanded the list of immune-escape mechanisms [4,5]. ICPs among which the best known so far are CTLA-4, PD-1, LAG-3 and TIM-3, are lymphoid cell surface receptors which binding to their ligand down-regulate immune responses. Upon massive overexpression of ICPs by tumor or ME cells, these pathways are subverted in cancer and impair anti-tumor immunity. The most widely studied ICP is currently PD-1/PD-L1, largely due to the impressive clinical efficacy of anti-PD-1 antibodies (e.g. nivolumab) in solid cancers and some lymphomas [6–8]. Recently, we and others reported the overexpression of such ICPs in lymphomas by tumor cells and/or ME [5,9–15]. Expression of PD-1/PD-L1 in classical Hodgkin lymphoma (cHL) and in subtypes of diffuse large B cells lymphoma patients (DLBCL) have been correlated with genetic alterations to the PD-L1 and PD-L2 locus of chromosome 9p24.1 (gains, amplifications or fusions [9,11,12,16,17]. These alterations are more frequently observed in Hodgkin-Reed Sternberg cells (HRS) than in DLBCL cells, and drive PD-L1,2 overexpression on tumor cells [12]. In addition, activation of *JAK/STAT* pathway by inflammatory cytokines or activating mutations could also induce PD-L1 overexpression in these lymphoma [18–20]. Finally, EBV co-infection commonly seen in cHL, can also upregulate PD-L1 on tumor cells *via* the EBV-encoded latent membrane protein (LMP)-1 that activates AP-1 (via *cJUN/JUN-B* components) or *via* *JAK/STAT* signaling pathways which activate the enhancer or promoter, respectively, of PD-L1 [21]. It is noteworthy that HRS cells, potentially targeted by PD-1 blockade, represent only 1% of cells from the cHL lymph node, while the rest contain an abundant and reactive cellular infiltrate. DLBCL tumors, by contrast, contain large numbers of malignant B cells interspersed with far fewer non-neoplastic cells. However, the PD-1/PD-L1 axis is not exclusively expressed by tumor cells but is also expressed by TILs or myeloid cells such as tumor-associated macrophages (TAM) or myeloid derived suppressive cells (MDSC) [13,15,17,22]. Recently, multiplex immunofluorescence and digital image analysis showed that the colocalization of PD-L1⁺ TAM with PD-L1⁺ HRS cells creates an immunoprotective niche which enhances a locally augmented PD-1 signaling in cHL [13]. Despite the impressive clinical efficacy of anti-PD-1 antibodies (e.g. nivolumab) in cHL and to a lesser extent in non-relapsed/refractory DLBCL patients [7,8,23,24], the lack of defined mechanisms of action for checkpoint blockade has impaired the prediction of therapeutic response and put forward the need to define the global status of IE for stratifying patients.

Recently, we have described a molecular signature based on up-regulation of 33 immune-escape genes (IEGS signature) involved in immune escape [5,25] including genes encoding for ICPs (CTLA4, PDCD1, LAG3, HAVCR2,...), for their ligands (CD80, CD86, CD274, PDCD1LG2, LGALS9,...), for enzymes producing immunosuppressive metabolites (IDO1, ARG1, ENTPD1,...), and for immunosuppressive cytokines and chemokines (IL10, HGF, GDF15,...). Although the immune escape strategies in lymphoma may vary between individuals, transcriptomic analysis of their biopsies consistently identifies a significantly up-regulation of IEGS33 in follicular lymphoma and diffuse large B cell lymphoma. Furthermore, immunohistochemistry (IHC) of corresponding tissue microarrays were consistent in showing that such samples comprise high rates of cells expressing several ICPs [5]. Together, these observations indicated that B-cell lymphomas evolve several immune escape pathways. More recently, we were able to detect 4 different immune-escape signatures from ~1500 transcriptomes relating to 7 types of B-cell lymphoma, according to their immunogenicity and cell composition [25]. These encompass the following subtypes: 1- non-immunogenic/immunologically undetected tumours (so-called desert/cold tumours), 2- immunologically detected tumours with immune activation but no/low IE (2% of patients), 3- immunologically detected tumours with abundant immune infiltrates displaying both immune activation and IE (inflamed/hot tumours), and 4- immunologically detected tumours showing no cytolytic activity but advanced IE (~20%) [25]. This findings showed that immune-escape is a set of

coordinated but redundant mechanisms, suggestive of determinism and dynamics rather than an exclusive role from any single axis (such as PD-1/PD-L1,2). As a consequence, this model of four successive stages of cancer immune editing predicts a worse clinical outcome for B-NHL patients with a tumor at IE stages 1 or 4 [25]. This model also predicts that patients overexpressing both immune activation and ICPs genes, *i.e.* IE stage 3, should be the most relevant for ICPs blockade therapeutics.

Here, we deployed a combination of bioinformatics, molecular, cellular and IHC analytic techniques to assess the immune escape stage of tumor biopsies from cHL and DLBCL patients, and determine those most likely to benefit from immune therapeutic strategies.

2. Results

2.1. Molecular profiling of immune escape in cHL and DLBCL

We first measured and compared the enrichment score (SES) for IEGS33 in HGU 133 Plus 2.0 (Affymetrix) microarrays from a first cohort of ~1000 cHL, DLBCL and normal lymphoid tissue transcriptomes downloaded from GEO data set (Methods). This publicly available cohort included $n = 142$ cHL, $n = 908$ DLBCL including $n = 720$ ABC and 188 GC subtypes, as well as $n = 11$ non-cancer tissue controls taken from inflammatory lymphoid tissue biopsies and $n = 45$ purified B cells. As shown in **Figure 1A**, the SES for IEGS33 was significantly increased in cHL samples as compared to GC and ABC DLBCL subtypes ($p \leq 0,001$) indicating the collective up-regulation of these 33 genes in cHL as compared to DLBCL regardless of subtype. However, **Figure 1A** also showed a significantly higher SES for IEGS33 in ABC DLBCL than in GC subtypes ($p \leq 0,001$). The enrichment of 44 genes involved in T-cell activation (downloaded from MSigDB database) was scored and showed that cHL samples exhibited a higher SES for T-activation than ABC and GC DLBCL ($p \leq 0,001$) (**Figure 1A**). Since the activation of immune effectors represents the 'substrate' of immune escape, we then analyzed the relationship between these features by plotting the SES for IEGS33 versus the "T-cell activation" gene set. **Figure 1B** showed that most (97%) of cHL samples clustered together at the immune escape stage 3, which corresponds to the advanced IE stage [25] whereas DLBCL samples were partitioned in the four stages of cancer IE, among which only 32% of ABC DLBCL were at stage 3.

We then assessed SES for IEGS and T cell activation gene set from HTA 2.0 microarrays (Affymetrix) of tumor biopsies from a second cohort of ($n = 8$) cHL and ($n = 22$) DLBCL patients treated in our institute, including 10 ABC DLBCL and 10 GC DLBCL. Although the SES for random gene sets were generally higher from HTA microarrays than from HGU133 Plus 2.0 (data not shown), the SES for IEGS33 were higher in all cHL samples than in GC DLBCL ($p \leq 0,01$), but at the same level as in the ABC DLBCL samples (**Figure 1C**). Consistent with our previous results, the IEGS33 signature was significantly enriched in ABC DLBCL than in GC DLBCL ($p \leq 0,01$) transcriptomes. In addition, the genes encoding for factors promoting a tolerogenic ME or T cell exhaustion were up-regulated in cHL and ABC DLBCL relative to GC DLBCL. These genes included CCL22, CTLA4, ICOS, IDO1, CD274, IL10, LAG3, PDCD1LG2, CCL2, SOCS3, IL6ST, HAVCR2, LAIR1, HGF, CSF1, CD86, IDO2, KIR2DL1, VEGFA, TIMP1, IL23A, PVR, MSR1, JAK2 genes ($p < 0,05$). This differential gene expression pattern led to a clear-cut clustering between cHL/ ABC DLBCL and GC DLBCL samples based on the IEGS33 gene expression levels (**Figure 1D**). **Figure 1E** showed that cHL displayed a higher SES for T-activation gene set than GC DLBCL ($p < 0,05$) and a tendency of higher SES than ABC DLBCL (*ns*). When plotting the SES for IEGS33 versus the "T-cell activation" gene set, all cHL samples also clustered together at stage 3, consistent with our previous result (**Figure 1F**). Altogether, these results highlighted the advanced IE signature of cHL.

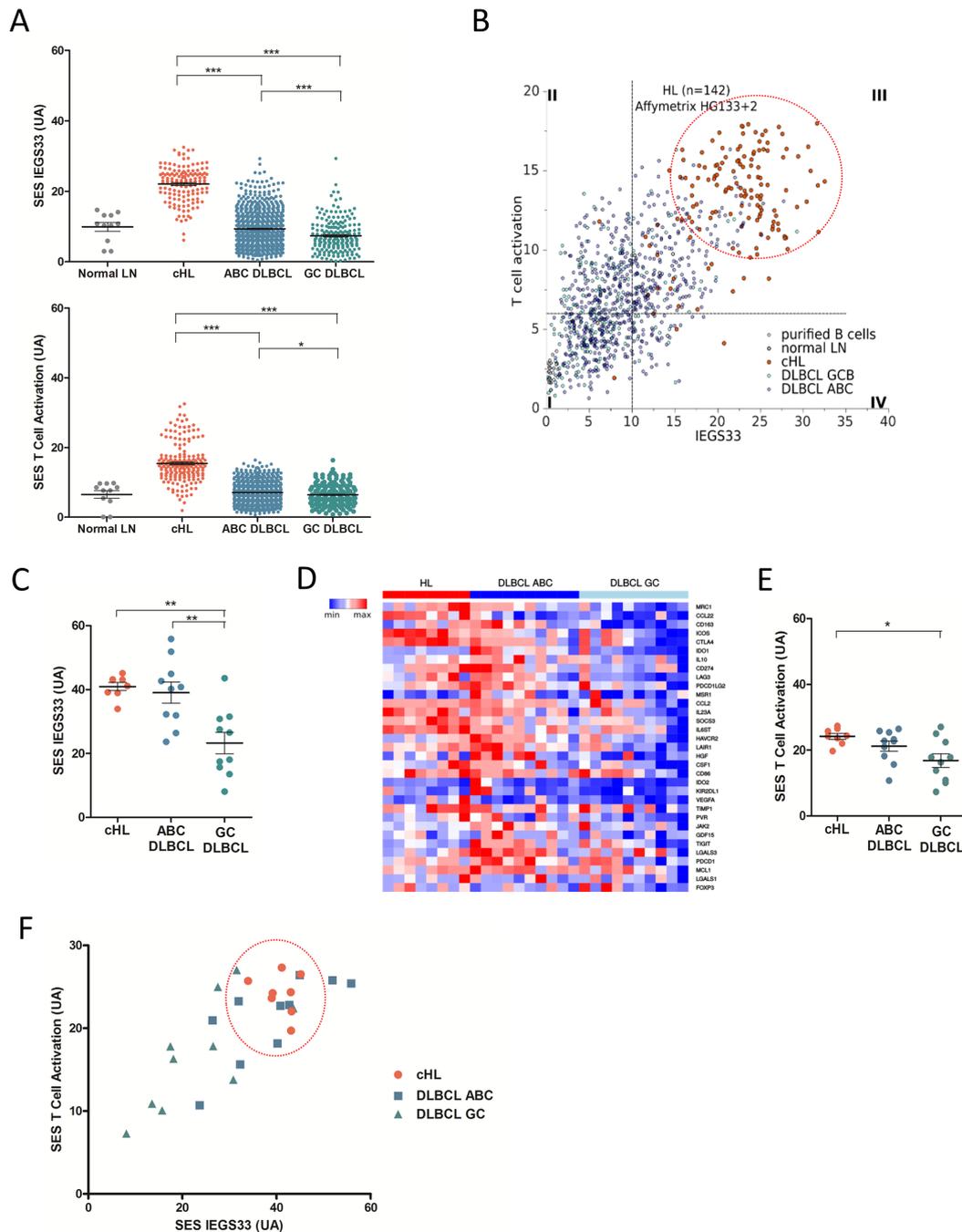


Figure 1. Molecular profiling of immune escape pathways in classical Hodgkin lymphoma and in diffuse large B cell lymphoma. (A) Sample enrichment score (SES) for immune escape gene set IEGS33 (at the top) and for T-cell activation gene set (at the bottom) in cHL, ABC DLBCL, GC DLBCL and reactive lymph node samples from public microarrays *datamining* analysis ($n = 1061$). (B) SES dot plots for IEGS33 versus T-cell activation for cHL, ABC DLBCL, GC DLBCL, normal B cell and reactive lymph node samples from public microarrays *datamining* analysis ($n = 1106$), showing a clusterization of cHL samples at stage 3 of cancer IE (red circle), according to the 4 cancer IE stages, as previously defined [25] (cancer IE stage 1 (IEGS33⁻ T-cell activation⁻), cancer IE stage 2 (IEGS33⁻ T-cell activation⁺), cancer IE stage 3 (IEGS33⁺ T-cell activation⁺), cancer IE stage 4 (IEGS33⁺ T-cell activation⁻)). (C) SES for IEGS33 in cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL samples from our private cohort ($n = 28$). (D) Heatmap of differentially expressed IE genes for cHL and DLBCL samples from our private cohort ($n = 28$). (E) SES for T cell activation gene set in cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL samples from our private cohort ($n = 28$). (F) SES dot plots for IEGS33 versus T-cell activation for cHL, ABC DLBCL, GC DLBCL samples from our private cohort ($n = 28$), showing a clusterization of cHL samples in stage 3 (red circle).

2.2. Distribution of immune cells in cHL and DLBCL tissue samples

Since cHL and ABC DLBCL samples displayed the high score of immune cell exhaustion, we wondered whether they had similar patterns of leukocyte infiltrates. To address this question, we used the CIBERSORT deconvolution algorithm [25] with modifications (Methods) to compute the proportion of each of 14 leucocyte and non-hematopoietic cell types from each sample. As shown in **Figure 2A**, deconvolution of the first cohort of $n = \sim 1000$ public microarrays showed a higher rates of CD4⁺ T lymphocytes in cHL than in DLBCL, regardless of subtypes ($p < 0,0001$). Moreover, cHL and ABC DLBCL samples were enriched in CD8⁺ T cells as compared to GC DLBCL ($p < 0,0008$). The cHL and GC DLBCL samples had less infiltrating macrophages than ABC DLBCL ($p < 0,0001$). These observations were confirmed in the second cohort from our institution, in which cHL samples were significantly enriched in CD4⁺ T cells as compared to DLBCL ($p < 0,05$) regardless of GC/ABC subtype (**Figure 2B**). In addition, cHL and DLBCL showed a tendency to have a distinct proportions of macrophages ($p = 0,06$) and CD8⁺ T cells ($p = 0,07$) (**Figure 2B**).

To further assess the immune architecture of cHL and DLBCL, we investigated the cellular composition of immune cell infiltrates by IHC and immunofluorescence analyses. We first calculated the CD3⁺ T cell infiltration on ($n = 38$) cHL and ($n = 22$) DLBCL FFPE samples by using whole slide imaging combined to automated analysis for quantification (**Figure 2C**). This analysis showed that cHL comprise a significantly higher proportion of CD3⁺ T cells (60% of total cells) than ABC or GC DLBCL (45 % and 27% of total cells, respectively) ($p < 0,0004$) (**Figure 2D**). The cHL samples were also characterized by a high abundance of CD4⁺ T cells in their ME, accounting for a median 35% of all cells. In line with our previous molecular quantification (**Figure 2A-B**), the percentage of CD4⁺ T cell in cHL was higher than in DLBCL, in which CD4⁺ T cells accounted for only 18% (ABC DLBCL) and 17% (GC DLBCL) of total cells ($p = 0,002$) (**Figure 2D**). In addition and consistent with our previous molecular data, the samples of cHL and ABC DLBCL had a higher content of CD8⁺ T cells than GC DLBCL (25% of total cell *versus* 11 % of total cells, $p = 0,01$) (**Figure 2D**).

We then calculated the macrophage infiltration by using multiplexed immunofluorescence analyses for CD68 and CD163 staining (**Figure 2E**). Consistent with the deconvolutions, the CD68⁺CD163⁺ macrophages were twice more abundant in ABC DLBCL (10% of tissue area) than in cHL (6 % of tissue area) and GC DLBCL samples (5 % of tissue area) ($p = 0,02$) (**Figure 1F**). In contrast, the percentage of CD68⁺ macrophages did not significantly vary between cHL and DLBCL regardless of subtype (15% in ABC, 13% in GC and 13% in cHL, $p = 0,7$) (**Figure 1F**). Altogether, these IHC/IF results confirmed the leucocyte infiltrate patterns quantified by CIBERSORT, namely that cHL contain more CD3⁺ and CD4⁺ T cell infiltrates than DLBCL, but share high rates of CD8⁺ T cells with ABC DLBCL and low rates of CD68⁺CD163⁺ TAM with GC DLBCL.

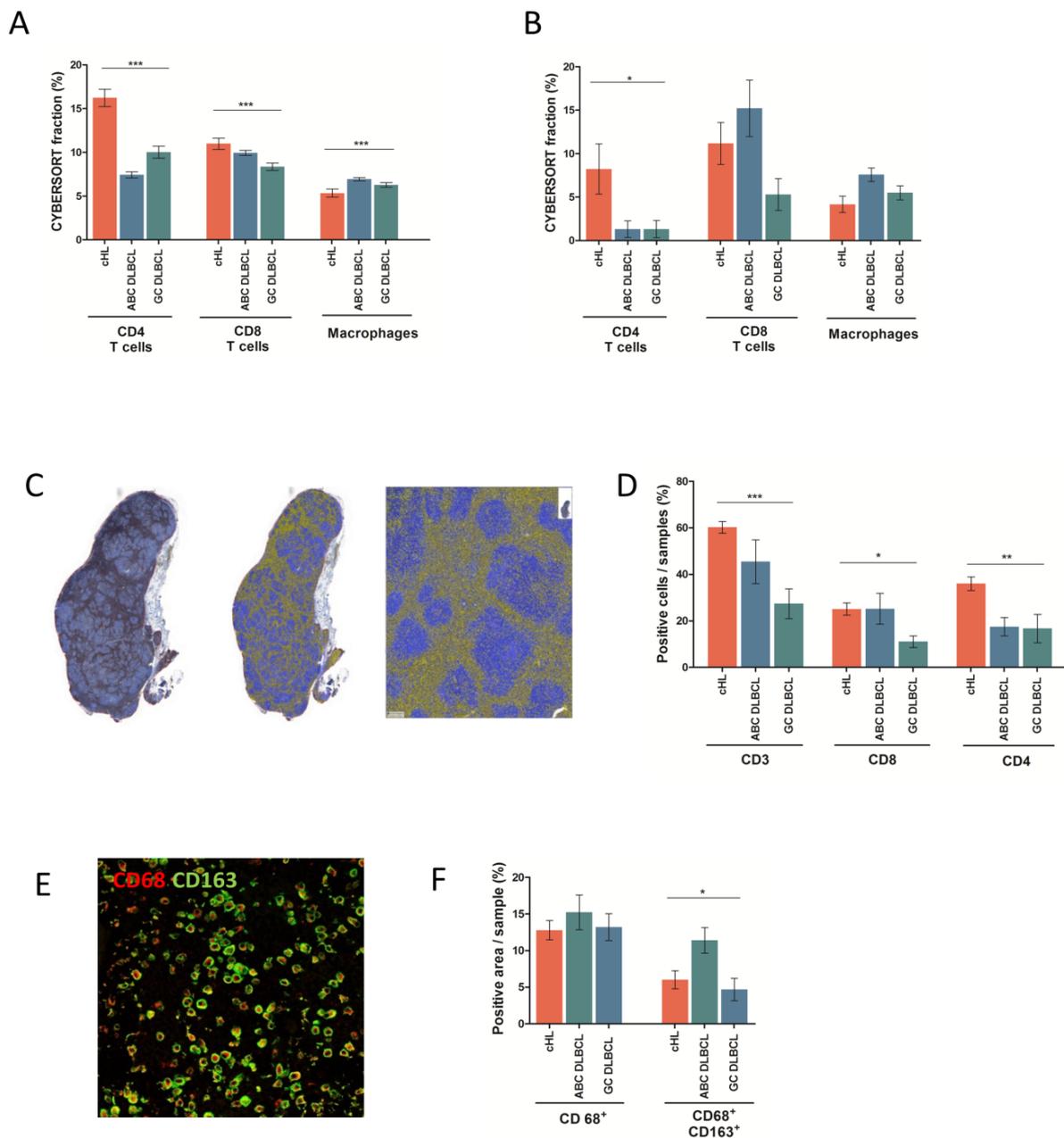


Figure 2. Immune subpopulation quantification based on microarrays data and immunohistochemical studies in classical Hodgkin lymphoma and in diffuse large B cell lymphoma. (A) T-cell and macrophage proportion (%) measured using the CIBERSORT deconvolution algorithm across cHL, ABC and GC DLBCL of public microarrays data ($n \approx 1000$) (Statistical analysis was performed with one way Anova test). (B) T-cell and macrophage proportion (%) measured using the CIBERSORT deconvolution algorithm in cHL, ABC and GC DLBCL microarrays data from our cohort ($n = 28$) (Statistical analysis was performed with one way Anova test). (C) Snapshot of automatic images analysis of CD3 staining using *Definiens, tissue studio* software. Example of IHC anti-CD3 on cHL lymph node (left panel; original magnification $\times 10$). Example of quantification of CD3⁺ cells (yellow) and CD3⁻ cells (blue) (middle panel; original magnification $\times 10$ and right panel; original magnification $\times 150$). (D) Scoring based on IHC analysis of CD3⁺ T cells, CD4⁺ T cells CD8⁺ T cells in cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL samples from our cohort ($n = 28$) (Statistical analysis was performed with one way Anova test). (E) Representative staining of CD68⁺ (red) and CD163⁺ (green) macrophages in cHL lymph node (original magnification $\times 200$) (Statistical analysis was performed with one way Anova test). (E) Scoring of fluorescence intensity of CD68 and CD163 staining in cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL samples from our cohort ($n = 28$) (Statistical analysis was performed with one way Anova test).

2.3. Distribution of inhibitory immune checkpoint in HL and DLBCL samples.

The above analyses indicated that despite distinct patterns of immune-infiltration, both cHL and ABC DLBCL upregulate the transcription of most IEGS genes, raising the question of which cells, malignant or microenvironmental, express these genes. Therefore, we investigated the protein expression and the cellular distribution of inhibitory immune checkpoints and their ligands in our cHL and DLBCL cohort. As shown in **Figure 3A and 4A**, the proportion of total PD-1⁺ cells was not significantly different between cHL and DLBCL with an average of 16% of PD-1⁺ cells. In contrast and in agreement with published data [5], the proportion of total cells expressing PD-L1 was higher in cHL (29% of total cells) and ABC (23% of total cells) than in GC DLBCL (13 % of total cells) ($p=0,06$) (**Figure 3B and 4C**). The proportion of total LAG-3⁺ cells was twice higher in cHL (6 % of total cells) than in ABC (3 % of total cells) and GC DLBCL (1% of total cells) ($p<0,0001$) (**Figure 3C and 4E**). The percentage of TIM-3⁺ cells was not significantly different between cHL and DLBCL, accounting for a median of 11%, 16% and 7% of cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL tumors, respectively ($p=0,5$) (**Figure 3 D and 4G**).

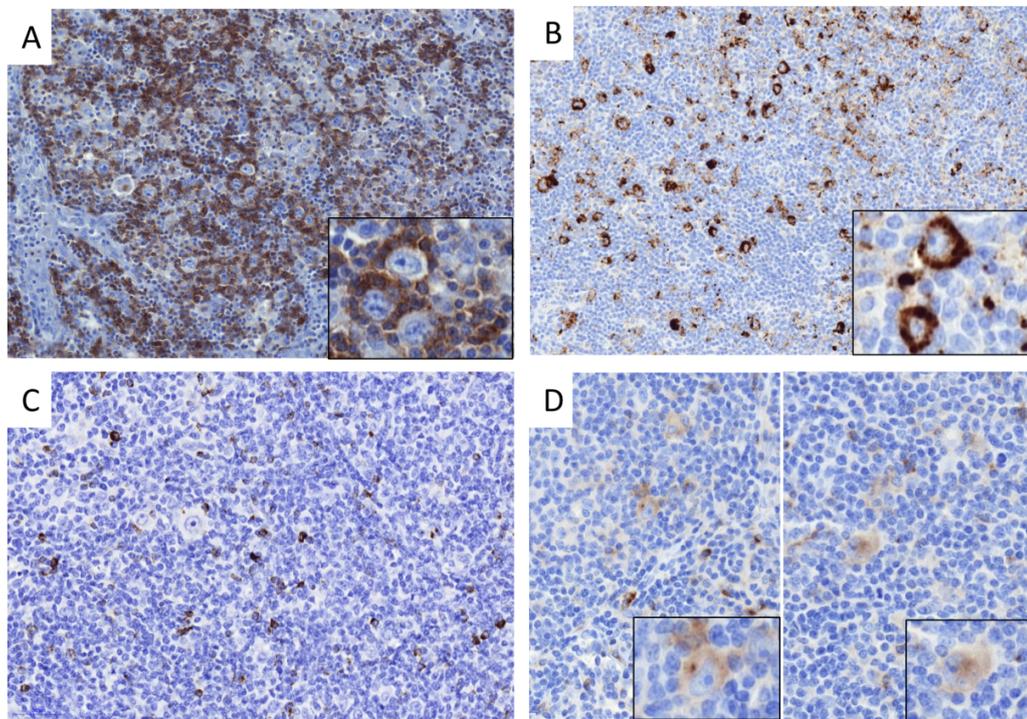


Figure 3: Immune checkpoint staining in classical Hodgkin lymphoma and in diffuse large B cell lymphoma. (A) Representative staining of PD-1 in cHL sample showing PD-1⁺ small lymphocytes around tumor cells (magnification x200, insert: x 400). (B) Representative staining of PD-L1 in cHL sample showing PD-L1⁺ immune cells and PD-L1⁺ HRS (magnification x 200, insert: x400). (C) Representative staining of LAG-3 in cHL sample showing LAG-3⁺ small lymphocytes (magnification x200). (D) Representative staining of TIM-3 in cHL sample showing TIM-3⁺ immune cells and TIM-3⁺ HRS (magnification x 200, insert: x400).

To determine specifically the cellular distribution of ICP expressions in lymphoma samples, we evaluated the staining of PD-1, PD-L1, LAG-3 and TIM-3 in the ME and in tumor cells with a cutoff value at 10% for ME cells and at 20% for tumor cells. As shown in **Figure 4B**, PD-1 was exclusively expressed by the ME cells in all lymphoma cases. In contrast, PD-L1 was expressed in both ME and tumor cells of cHL and ABC DLBCL, but only in the ME cells of GC DLBCL (**Figure 4D**). As expected, PD-L1 was more frequently expressed by tumor cells in cHL than in ABC DLBCL (86% and 22% of cases respectively, $p<0,0001$).

LAG-3 staining was observed exclusively in the ME cells of all cHL and DLBCL cases (**Figure 4F**). Finally, TIM-3 was expressed by both non tumor and tumor cells in 10% of cHL and 35 % of ABC DLBCL cases whereas TIM-3 was exclusively expressed in the ME of GC DLBCL and never detected in GC DLBCL tumor cells (**Figure 4H**). Taken together, these results showed that cHL and DLBCL overexpress most inhibitory ICPs in their ME and tumor cells. Of note, LAG-3 is significantly overexpressed in cHL but barely in DLBCL, while PD-L1 is overexpressed by cHL and ABC DLBCL, suggesting that these tumor cells are prone to modulate immune activation responses.

2.4. Clinical correlates of immune status

The prognostic value of ICPs expression in cHL and DLBCL were assessed by the Kaplan–Meier method and log-rank test such as to outline any association of LAG-3, PD-1/PD-L1 and TIM-3 expression with clinical follow-up information. Clinical outcome was available in 37/38 cHL and in 22/22 DLBCL patients. The patients were divided into high/low protein expression groups according to the cutoff value at 10% by using whole slide imaging. In univariate analysis, high TIM-3 expression in non-tumor component was associated with shortened progression-free survival (PFS) of cHL patients (hazard ratio 3.28, 95%CI 1.34–8.00, logrank p -value=0,006). This suggested that high expression of TIM-3 on tumor infiltrating cells was associated with poor prognosis in cHL (**Figure 5**). Moreover, global staining of TIM-3 quantified by automated analysis (including staining in HRS cells) was not significantly associated with shorter PFS ($p=0.16$). PD-1, PD-L1 or LAG-3 expressions alone were not associated either with shortened PFS of cHL patients ($p=0,5$; $p=0,7$; $p=0,6$ respectively). Even at the protein level, expression of each ICP taken alone was not correlated with the clinical outcome of DLBCL patients from our cohort, regardless of the cellular distribution of the IHC staining (not shown). However, in the 200 clinically annotated samples (out of the ~1000 DLBCL and cHL samples), the clinical outcome of DLBCL patients was strikingly different according to the 4 groups defined by IE stages. In this public cohort however, no clinical annotation was available for the cHL patients, which samples displayed only the stage 3 IE signature. In agreement with previous data (ref), the 5-years OS of DLBCL patients decreased from stage 2 (70%) to stage 3 (48%), stage 1 (44%) and stage 4 (38%) (Log Rank $p=0.0006$) (**Figure Supplementary 1**).

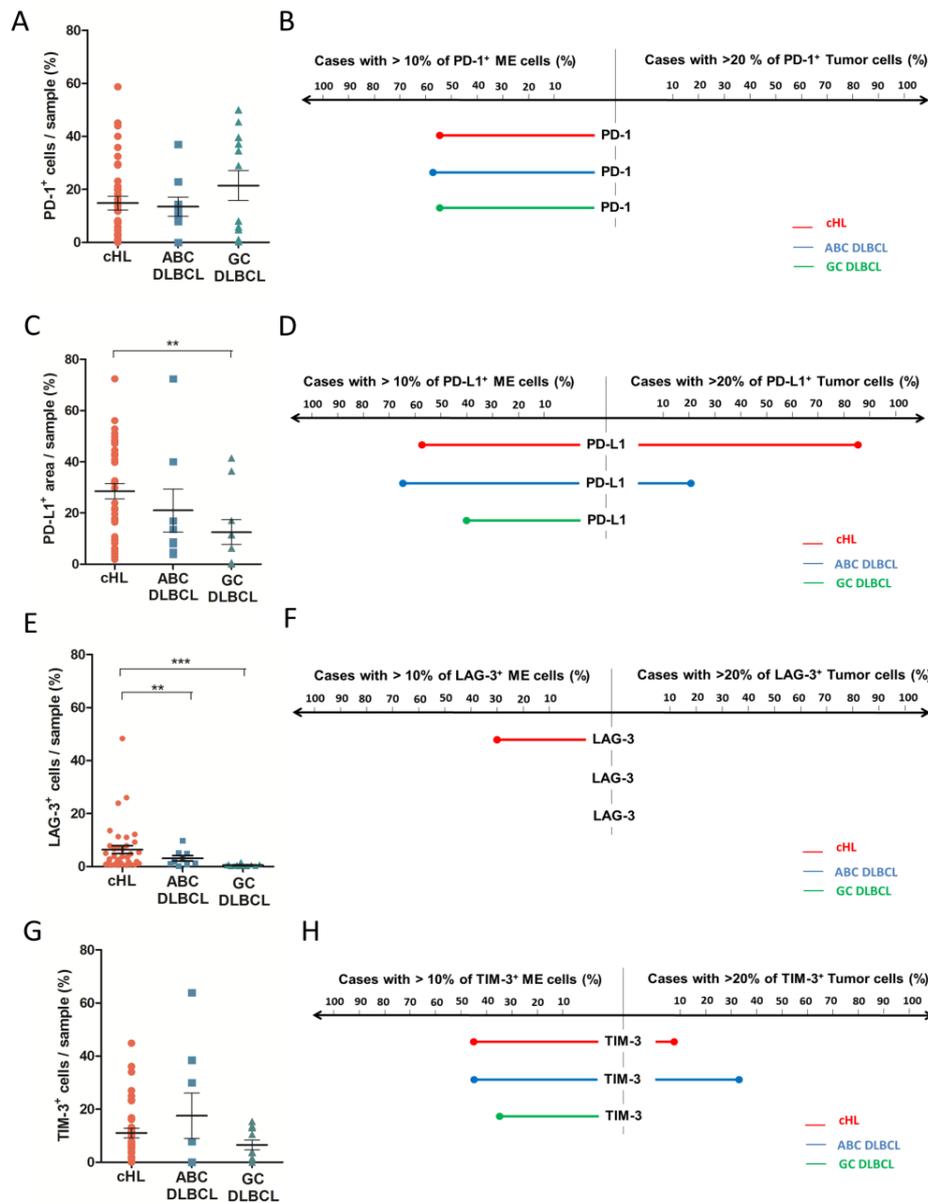


Figure 4: Quantification and cellular distribution of immune checkpoint expression in classical Hodgkin lymphoma and in diffuse large B cell lymphoma from our cohort, by immunohistochemical studies (A) Scoring of total PD-1+ cells/sample in cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL samples based on automated analysis. (B) Cellular distribution of PD-1 staining between tumor compartment (at right) and micro-environment compartment (at left) for cHL (red), ABC DLBCL (blue) and GC DLBCL (green) with cut-off at >10% of ME immune cells and at >20% of tumor cells. (C) Quantification of total PD-L1+ area/sample (% of area positive) in cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL samples based on automated analysis. (D) Cellular distribution of PD-L1 staining between tumor compartment (at right) and micro-environment compartment (at left) for cHL (red), ABC DLBCL (blue) and GC DLBCL (green) with cut-off at > 10% of ME immune cells and at >20% of tumor cells. (E) Quantification of total LAG-3+ cells/sample (% of cells positive) in cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL samples based on automated analysis. (F) Cellular distribution of LAG-3 staining between tumor compartment (at right) and micro-environment compartment (at left) for cHL (red), ABC DLBCL (blue) and GC DLBCL (green) with cut-off at > 10% of ME immune cells and at >20% of tumor cells. (G) Quantification of total TIM-3+ cells/sample (% of cells positive) in cHL, ABC DLBCL and GC DLBCL samples based on automated analysis. (H) Cellular distribution of TIM-3 staining between tumor compartment (at right) and micro-environment compartment (at left) for cHL (red), ABC DLBCL (blue) and GC DLBCL (green) with cut-off at > 10% of ME immune cells and at >20% of tumor cells.

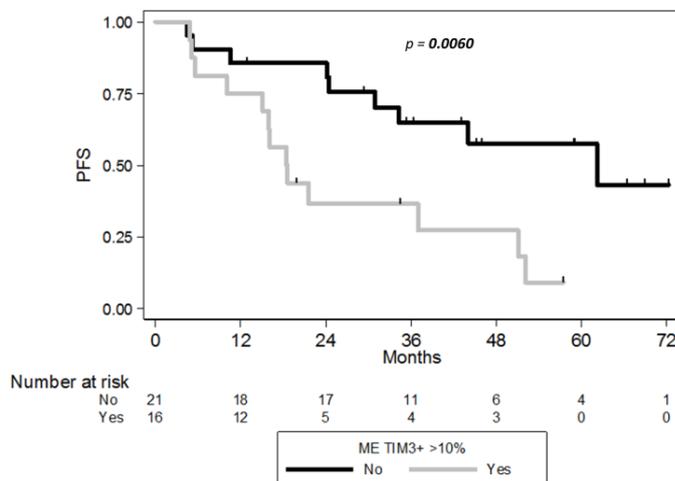


Figure 5: Progression Free Survival (PFS) curves according to the percentage of TIM-3+ ME cells of cHL patients (n=37), with cutoff of 10% of ME immune cells positive (p=0.006).

3. Discussion

Given the impressive therapeutic response to PD-1 antibodies recently reported in HL [7,8], overview of IE pathways and characterization of immune cells distribution in HL is helpful to understanding the process of immune restoration and thus predict the immune therapy strategy responses. This study combining transcriptome analysis and multi-parametric IHC has revealed that ABC DLBCL, GC DLBCL and cHL tumors display distinct immune escape strategies, notably through up-regulation of several immune checkpoints by tumor cells and infiltrating immune cells. cHL and ABC DLBCL are characterized by a high expression of immune escape genes and an overexpression ICPs by both tumor cells and ME cells indicating that such lymphoma subtypes are prone to modulate immune response. As previously published, the overexpression of PD-L1 observed in cHL and ABC DLBCL, is associated with an adverse prognosis in HL and DLBCL patients [9,12,15], suggesting that PD-1/PD-L1 axis plays a key role in IE strategies of these lymphomas. However, response rates to blockade of the PD-1/PD-L1 axis in relapsed/refractory DLBCL patients are not as high as in HL [23,24]. This suggests that blocking PD-1/PD-L1 could suffice to restore anti-tumor immune response in HL while not in DLBCL patients. The different response rates to PD-1 antibodies in these lymphomas could be related to a distinct capacity of effector T cells to lyse tumor cell upon immune therapy. The high level of T cell activation gene expression in cHL observed in this study implies that these tumors contain a pre-existing pool of tumor-specific T cells, which could able to reinvigorate immune responses upon immunotherapy. In certain solid tumors such as melanoma PD-1 blockade has effectively been linked to CD8+ cytotoxic T cell re-activation [26,27]. However, the frequent antigen losses and alterations of the HLA class I antigen presentation on HRS cells suggests that in cHL, PD-1 blockade might also involve a non-CD8 T cell-mediated mechanism [28,29]. The potential role of CD4+ T cells in immune responses to HL has been suggested by the physical proximity of PD-L1+ HRS cells to PD1+ CD4+ cells [13]. Likewise, the association between MHC II expression and the predictive response to anti-PD-1 therapy support further the key role of CD4 T cells [30]. In line with these data, the present study shows a different composition of immune cells infiltrating tumors in cHL and DLBCL. Notably, cHL display a higher abundance of CD4+ TILs than DLBCL, consistent with literature [31–33] and supporting further the critical role of CD4+ T cells in anti-tumor immunity in HL and as target for immunotherapy. In contrast to a previous study [22] assessing CD163 gene expression in HL and DLBCL regardless of subtypes, here both CIBERSORT and IHC analysis evidenced the lower infiltrate of CD68+CD163+ macrophages in cHL than ABC DLBCL. The discrepancy could rely on distinct means to characterize the monocyte/macrophage subpopulations [34] in both studies, but also on the different macrophage abundance in tumors from ABC and GC

DLBCL subtypes, not partitioned in the earlier report. Further investigations with methods allowing more precise cell characterization, such as CyTOF panel and multiplexed imaging, will be necessary to evaluate monocyte/macrophages in HL immune responses.

Nevertheless, the different composition of tumor-infiltrating immune cells in HL, ABC DLBCL and GC DLBCL might account for the differential impact of ICP blockade in these patients. Alternatively, the different responses to PD-1 antibodies in DLBCL and HL patients could also be related to additional IE mechanisms such as the expression of other ICPs. This study showed that LAG-3 is more expressed in cHL samples than in DLBCL regardless of subtype. Although the exact mechanism of action is still unknown, LAG-3 is a negative regulator in CD4 and CD8 T cell expansion, frequently co-expressed with PD-1 [35,36] in TILs. Hence the combination of LAG-3 and PD-1 blockade increases the anticancer activity of TILs [36]. Furthermore, the expression of TIM-3 was also observed in TILs in cancer including lymphoma [14,37–41] and its interaction with Galectin ligands inhibits T-cell function [42,43]. The efficacy of TIM-3 blockade in preclinical murine models of melanoma positions TIM-3 as a target suitable for cancer immunotherapy [44]. In contrast to LAG-3, cHL and DLBCL exhibit the same level of TIM-3 protein, while both cHL and ABC DLBCL tumor cells express TIM-3. In several solid cancers, TIM-3 expression by TILs is associated with worst prognosis [37–41]. Likewise here, the TIM-3 staining on immune cells from cHL was associated with worst prognosis. These results could help to identify HL patients who might benefit of ICP blockade, either alone or in association. Unfortunately, we did not find any correlation between the clinical outcome and the expression of ICPs in DLBCL patients probably due to the limited cohort studied. However here, consistent with previous study [25], both IE and T cell activation gene enrichment in transcriptomes delineate four IE stages associated with overall survival in DLBCL patients. Interestingly, cHL clustering at the advanced stage of immune escape unveils that cHL are not immune deserts but rather highly immunogenic tumors, accounting for their high rates of therapeutic responses to PD-1-blockade, notably when compared to DLBCL.

In conclusion, this study highlights an advanced stage of immune evasion occurring in all HL tumors, which accounts for the success of anti-PD-1 blockade in this disease. Thus, bioinformatics and transcriptomic data constitute essential tools to characterize the immune status of tumors from lymphoma patients and determine those most eligible to ICPs strategies, prior to use these tools for immune-monitoring during future clinical ICPs trial.

4. Materials and Methods

- **Patients**

The study cohort consisted of primo-diagnosis of cHL ($n = 38$) and DLBCL ($n = 22$) patients who were diagnosed in the Department of Hematology, IUCT France and in the Department of Hematology, Lyon between 2006 and 2015 according to the WHO classification. Of note, all DLBCL patients were enrolled in the AMARE program [45]. All clinical data were available for 37/38 cHL patients and 22/22 DLBCL patients and are described in **Table Supplementary 1**.

- **Microarrays analysis**

The public GEO repository [46] for gene expression profiles of cHL and DLBCL obtained with the Affymetrix HG U133 plus 2.0 microarray and downloaded 12 datasets (GSE10524, GSE10846, GSE11318, GSE12195, GSE12453, GSE17189, GSE17920, GSE2109, GSE31312, GSE34171, GSE3526, GSE7307). These data sets were checked for compatibility, and whenever appropriate, these were assembled, RMA-normalized and collapsed to ~20,000 HUGO protein-encoding genes as previously described [25], yielding a meta-series of ($n=1106$) transcriptomes from lymphoma and healthy sample controls. These encompassed cHL ($n=142$), DLBCL ($n=908$), as well as normal samples of lymph node ($n=11$) and ($n=45$) purified B cell controls. We also download gene sets from Gene Ontology [47]; KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), the Molecular Signatures Data base (MSigDB 3.0) [48]. The SING14 gene set was modified from [49] and is provided (**Table Supplementary 2**). Each transcriptome was processed for robust statistical analysis and single sample gene set enrichment analysis were computed for various gene sets such as T cell activation (MSigDB) and the immune escape-defining IECS33 gene set as previously described [5,25]. The list

of IEGS33 genes is described in **Table Supplementary 3**. The leukocyte composition of the cHL and DLBCL tumors was deconvoluted from their microarrays by the CIBERSORT algorithm as already depicted [50] with modifications [25].

Frozen samples of cHL ($n = 8$) and DLBCL ($n = 20$) from our institution were available and used for transcriptomic study. Frozen sections were cut from each of the cryopreserved samples and examined for adequacy of the materials before other studies. Total mRNA was extracted by RNA Mini Kit (QIAGEN). cDNA were prepared from 500 pg RNA per sample and hybridized on GeneChip Human Gene ST 2.0 Affymetrix microarrays (Affymetrix UK Ltd.), by the Lyon University genomic facility ProfileXpert-LCMT (Lyon, France) according to the manufacturer's protocol. Data were deposited on NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are available as GSE120124 dataset. Raw data were RMA-normalized and collapsed to unique protein-encoding genes (using the HUGO nomenclature). Then, the single sample gene set enrichment analysis for IEGS33 and T cell activation gene sets and leukocyte composition by the CIBERSORT was performed as previously described (Methods above).

- **Immunohistochemistry**

For IHC studies, the 8 cHL samples with 30 additional cHL samples and the 20 DLBCL samples with 2 additional DLBCL samples were used for immunostaining. Four μm -thick sections of the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cHL and DLBCL lymph node whole tissues were stained with hematoxylin and eosin (HE, Sakura TissueTek, Sakura). Immunohistochemical stains for CD3 (2GV6; prediluted; Roche), CD4 (SP35; prediluted; Roche), CD8 (SP57; prediluted; Roche), PD-1 (NAT 105; prediluted; Roche), PD-L1 (SP162; prediluted; Roche), LAG-3 (polyclonal; 1:500; Novus Biologicals) and TIM-3 (polyclonal; 1:50; R&D) were realized according to the manufacturer recommendation using Ventana Benchmark XT immunostainer (Ventana, Tucson, AZ). The IHC slides were digitalized using Panoramic 250 Flash II digital microscopes (3DHISTECH, Hungary). IHC staining was evaluated both manual scoring and automated method using an image analysis software (Tissue studio, Definiens, Munich, Germany) with substantial intra-class correlation coefficient (**Table Supplementary 4**).

To assess cell-of-origin (COO) groups of DLBCL cases by IHC, tissue were stained for CD10 (56C6; 1:100; Novocastra-Leica microsystems), BCL6 (PG-B6p; 1:30; Dako), IRF4/MUM1 (MUM1p; 1:25; Dako) and have been classified using Hans algorithm [51]. Comparisons were made with COO assignment of DLBCL using the original GEP methods and published algorithm [52] (**Figure Supplementary 2**).

- **Immunofluorescence**

Samples were pre-treated by microwave incubation in pH 9 (Dako Traget retrieval). Samples were then permeabilized with 0.1% saponin (in PBS 3% BSA/HEPES, 10% human serum), and stained ON at 4°C with the following two-primary antibodies: CD68 (PGM1; 1:100; Dako) and CD163 (10D6; 1:100; Novocastra). Primary Abs were then targeted by goat anti-mouse isotype specific Ab labelled with Alexa 488 and Alexa 594 for 2 hours at RT. The samples were mounted in Fluorescence Mounting Medium® (DAKO) and examined using a Zeiss LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Germany). For each pair of antibodies used, standardized conditions for pinhole size, gain and offset (brightness and contrast), were used for image capture. Images were analyzed using *ImageJ* software and quantification of stain was calculated as area of fluorescence on total tissue area for each sample.

- **Statistical analyses**

Comparisons of lymphoma subtypes concerning genes and proteins expression were carried out using Student's t-test or Mann-Whitney test (two tailed, unpaired) according to normal or not distribution of values respectively. One way Anova test was also used to compare lymphomas groups for cellular abundance. P-values <0.05 were considered statistically significant (* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Progression free survival was defined as the time from the initiation of treatment to progression or death from any cause and patients without an event were censored at the date of the last follow-up. Univariable survival analyses were conducted using the log rank test and Cox proportional hazards regression model. PFS rate were estimated by the Kaplan-Meier method with 95% confidence intervals (CI). Each cases were classified as high or low expression based on percentage of total cells, micro-environment cells or tumor cells expressing each markers with cut off based on median expression and literature data (10% for ME cells and 20% for tumor cells).

The intra class correlation coefficients were measured using two-way mixed-effects model-Absolute agreement. Tests were two-sided and p-values <0.05 were considered significant. Statistical analyses were conducted using Stata®, version 13.

5. Conclusions

In conclusion, this study highlights an advanced stage of immune evasion occurring in all HL tumors, which accounts for the success of anti-PD-1 blockade in this disease. Thus, bioinformatics and transcriptomic data constitute essential tools to characterize the immune status of tumors from lymphoma patients and determine those most eligible to ICPs strategies, prior to use these tools for immune-monitoring during future clinical ICPs trial.

Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible. Future research directions may also be highlighted.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Overall survival (OS) curves according to the four stages of IE of DLBCL patients from public microarrays data (n=200) (log rank $p=0,0006$), Figure S2: Classification of DLBCL subtypes based on Hans algorithm [51] and on GEP [52] in our private cohort, Table S1: Table of clinical characteristics of patients from our private cohort, Table S2: SING14 matrix use for CIBERSORT deconvolution, Table S3: List of “IEGS33” immune escape gene set, Table S4 :Intra-class correlation coefficient between manual scoring and automated scoring for IHC: CD3, CD8, CD4, PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3.

Author Contributions: SP, JJF and CL collected and analyzed data and wrote paper. SP, MT, JJF, CB and CL performed experiment. EM provided expert statistical analysis. CF provided expertise for automated image analyses. CR, ATG, NA, PB and GL provided patient sample and clinical information. CL and JJF designed the research. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This work was supported in part by institutional grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université Toulouse III: Paul Sabatier, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer (TOUCAN) (contract ANR11-LABX), the Programme Hospitalo-Universitaire en Cancérologie CAPTOR (contract ANR11-PHUC0001) and with financial support from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences & Health) within the framework of the Cancer Plan.

Acknowledgments: We thank Laurence Jalabert, Audray Benest, Charley Lagarde, Julien Granel, Arielle Estival and Jessica Sabatié for immunohistochemistry and François-Xavier Frenois for whole slide imaging (Imag'IN Platform, IUCT Toulouse, France). We thank Lyon University genomic facility ProfileXpert-LCMT' members for their contribution to this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dunn, G. P.; Bruce, A. T.; Ikeda, H.; Old, L. J.; Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 991–998, doi:10.1038/ni1102-991.
2. Kim, R.; Emi, M.; Tanabe, K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **2007**, *121*, 1–14, doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.

3. Gajewski, T. F.; Schreiber, H.; Fu, Y.-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1014–1022, doi:10.1038/ni.2703.
4. Leach, D. R.; Krummel, M. F.; Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **1996**, *271*, 1734–1736.
5. Laurent, C.; Charmpi, K.; Gravelle, P.; Tosolini, M.; Franchet, C.; Ysebaert, L.; Brousset, P.; Bidaut, A.; Ycart, B.; Fournié, J.-J. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, e1026530, doi:10.1080/2162402X.2015.1026530.
6. Swaika, A.; Hammond, W. A.; Joseph, R. W. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy. *Mol. Immunol.* **2015**, *67*, 4–17, doi:10.1016/j.molimm.2015.02.009.
7. Ansell, S. M.; Lesokhin, A. M.; Borrello, I.; Halwani, A.; Scott, E. C.; Gutierrez, M.; Schuster, S. J.; Millenson, M. M.; Cattray, D.; Freeman, G. J.; Rodig, S. J.; Chapuy, B.; Ligon, A. H.; Zhu, L.; Grosso, J. F.; Kim, S. Y.; Timmerman, J. M.; Shipp, M. A.; Armand, P. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 311–319, doi:10.1056/NEJMoa1411087.
8. Younes, A.; Santoro, A.; Shipp, M.; Zinzani, P. L.; Timmerman, J. M.; Ansell, S.; Armand, P.; Fanale, M.; Ratanatharathorn, V.; Kuruvilla, J.; Cohen, J. B.; Collins, G.; Savage, K. J.; Trneny, M.; Kato, K.; Farsaci, B.; Parker, S. M.; Rodig, S.; Roemer, M. G. M.; Ligon, A. H.; Engert, A. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, multicohort, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1283–1294, doi:10.1016/S1470-2045(16)30167-X.
9. Kiyasu, J.; Miyoshi, H.; Hirata, A.; Arakawa, F.; Ichikawa, A.; Niino, D.; Sugita, Y.; Yufu, Y.; Choi, I.; Abe, Y.; Uike, N.; Nagafuji, K.; Okamura, T.; Akashi, K.; Takayanagi, R.; Shiratsuchi, M.; Ohshima, K. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **2015**, *126*, 2193–2201, doi:10.1182/blood-2015-02-629600.
10. Muenst, S.; Hoeller, S.; Willi, N.; Dirnhofera, S.; Tzankov, A. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. *Dis. Markers* **2010**, *29*, 47–53, doi:10.3233/DMA-2010-0725.
11. Georgiou, K.; Chen, L.; Berglund, M.; Ren, W.; de Miranda, N. F. C. C.; Lisboa, S.; Fangazio, M.; Zhu, S.; Hou, Y.; Wu, K.; Fang, W.; Wang, X.; Meng, B.; Zhang, L.; Zeng, Y.; Bhagat, G.; Nordenskjöld, M.; Sundström, C.; Enblad, G.; Dalla-Favera, R.; Zhang, H.; Teixeira, M. R.; Pasqualucci, L.; Peng, R.; Pan-Hammarström, Q. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **2016**, *127*, 3026–3034, doi:10.1182/blood-2015-12-686550.
12. Roemer, M. G. M.; Advani, R. H.; Ligon, A. H.; Natkunam, Y.; Redd, R. A.; Homer, H.; Connelly, C. F.; Sun, H. H.; Daadi, S. E.; Freeman, G. J.; Armand, P.; Chapuy, B.; de Jong, D.; Hoppe, R. T.; Neuberg, D. S.; Rodig, S. J.; Shipp, M. A. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2690–2697, doi:10.1200/JCO.2016.66.4482.
13. Carey, C. D.; Gusenleitner, D.; Lipschitz, M.; Roemer, M. G. M.; Stack, E. C.; Gjini, E.; Hu, X.; Redd, R.; Freeman, G. J.; Neuberg, D.; Hodi, F. S.; Liu, X. S.; Shipp, M. A.; Rodig, S. J. Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood* **2017**, *130*, 2420–2430, doi:10.1182/blood-2017-03-770719.
14. Gravelle, P.; Do, C.; Franchet, C.; Mueller, S.; Oberic, L.; Ysebaert, L.; Larocca, L. M.; Hohaus, S.; Calmels, M.-N.; Frenois, F.-X.; Kridel, R.; Gascoyne, R. D.; Laurent, G.; Brousset, P.;

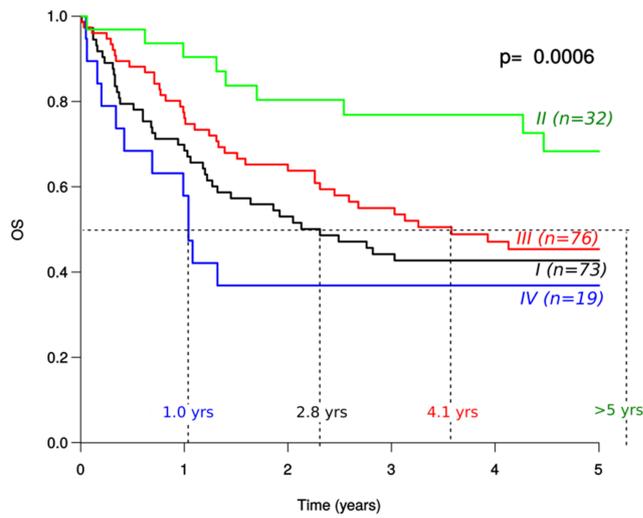
- Valitutti, S.; Laurent, C. Impaired functional responses in follicular lymphoma CD8+TIM-3+ T lymphocytes following TCR engagement. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1224044, doi:10.1080/2162402X.2016.1224044.
15. Hollander, P.; Kamper, P.; Smedby, K. E.; Enblad, G.; Ludvigsen, M.; Mortensen, J.; Amini, R.-M.; Hamilton-Dutoit, S.; d'Amore, F.; Molin, D.; Glimelius, I. High proportions of PD-1+ and PD-L1+ leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. *Blood Adv.* **2017**, *1*, 1427–1439, doi:10.1182/bloodadvances.2017006346.
 16. Green, M. R.; Monti, S.; Rodig, S. J.; Juszczynski, P.; Currie, T.; O'Donnell, E.; Chapuy, B.; Takeyama, K.; Neuberg, D.; Golub, T. R.; Kutok, J. L.; Shipp, M. A. 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*, 3268–3277, doi:10.1182/blood-2010-05-282780.
 17. Gravelle, P.; Burrioni, B.; Péricart, S.; Rossi, C.; Bezombes, C.; Tosolini, M.; Damotte, D.; Brousset, P.; Fournié, J.-J.; Laurent, C. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget* **2017**, *8*, 44960–44975, doi:10.18632/oncotarget.16680.
 18. Gupta, M.; Han, J. J.; Stenson, M.; Maurer, M.; Wellik, L.; Hu, G.; Ziesmer, S.; Dogan, A.; Witzig, T. E. Elevated serum IL-10 levels in diffuse large B-cell lymphoma: a mechanism of aberrant JAK2 activation. *Blood* **2012**, *119*, 2844–2853, doi:10.1182/blood-2011-10-388538.
 19. Van Roosbroeck, K.; Ferreira, J. F.; Tousseyn, T.; van der Krogt, J.-A.; Michaux, L.; Pienkowska-Grela, B.; Theate, I.; De Paepe, P.; Dierickx, D.; Doyen, C.; Put, N.; Cools, J.; Vandenberghe, P.; Wlodarska, I. Genomic alterations of the JAK2 and PDL loci occur in a broad spectrum of lymphoid malignancies. *Genes. Chromosomes Cancer* **2016**, *55*, 428–441, doi:10.1002/gcc.22345.
 20. Twa, D. D. W.; Chan, F. C.; Ben-Neriah, S.; Woolcock, B. W.; Mottok, A.; Tan, K. L.; Slack, G. W.; Gunawardana, J.; Lim, R. S.; McPherson, A. W.; Kridel, R.; Telenius, A.; Scott, D. W.; Savage, K. J.; Shah, S. P.; Gascoyne, R. D.; Steidl, C. Genomic rearrangements involving programmed death ligands are recurrent in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* **2014**, *123*, 2062–2065, doi:10.1182/blood-2013-10-535443.
 21. Green, M. R.; Rodig, S.; Juszczynski, P.; Ouyang, J.; Sinha, P.; O'Donnell, E.; Neuberg, D.; Shipp, M. A. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2012**, *18*, 1611–1618, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1942.
 22. Vari, F.; Arpon, D.; Keane, C.; Hertzberg, M. S.; Talaulikar, D.; Jain, S.; Cui, Q.; Han, E.; Tobin, J.; Bird, R.; Cross, D.; Hernandez, A.; Gould, C.; Birch, S.; Gandhi, M. K. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* **2018**, *131*, 1809–1819, doi:10.1182/blood-2017-07-796342.
 23. Armand, P.; Nagler, A.; Weller, E. A.; Devine, S. M.; Avigan, D. E.; Chen, Y.-B.; Kaminski, M. S.; Holland, H. K.; Winter, J. N.; Mason, J. R.; Fay, J. W.; Rizzieri, D. A.; Hosing, C. M.; Ball, E. D.; Uberti, J. P.; Lazarus, H. M.; Mapara, M. Y.; Gregory, S. A.; Timmerman, J. M.; Andorsky, D.; Or, R.; Waller, E. K.; Rotem-Yehudar, R.; Gordon, L. I. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell

- transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 4199–4206, doi:10.1200/JCO.2012.48.3685.
24. Lesokhin, A. M.; Ansell, S. M.; Armand, P.; Scott, E. C.; Halwani, A.; Gutierrez, M.; Millenson, M. M.; Cohen, A. D.; Schuster, S. J.; Lebovic, D.; Dhodapkar, M.; Avigan, D.; Chapuy, B.; Ligon, A. H.; Freeman, G. J.; Rodig, S. J.; Cattray, D.; Zhu, L.; Grosso, J. F.; Bradley Garelik, M. B.; Shipp, M. A.; Borrello, I.; Timmerman, J. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2698–2704, doi:10.1200/JCO.2015.65.9789.
25. Tosolini, M.; Algans, C.; Pont, F.; Ycart, B.; Fournié, J.-J. Large-scale microarray profiling reveals four stages of immune escape in non-Hodgkin lymphomas. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1188246, doi:10.1080/2162402X.2016.1188246.
26. Daud, A. I.; Loo, K.; Pauli, M. L.; Sanchez-Rodriguez, R.; Sandoval, P. M.; Taravati, K.; Tsai, K.; Nosrati, A.; Nardo, L.; Alvarado, M. D.; Algazi, A. P.; Pampaloni, M. H.; Lobach, I. V.; Hwang, J.; Pierce, R. H.; Gratz, I. K.; Krummel, M. F.; Rosenblum, M. D. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 3447–3452, doi:10.1172/JCI87324.
27. Curran, M. A.; Montalvo, W.; Yagita, H.; Allison, J. P. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 4275–4280, doi:10.1073/pnas.0915174107.
28. Challa-Malladi, M.; Lieu, Y. K.; Califano, O.; Holmes, A. B.; Bhagat, G.; Murty, V. V.; Dominguez-Sola, D.; Pasqualucci, L.; Dalla-Favera, R. 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*, 728–740, doi:10.1016/j.ccr.2011.11.006.
29. Reichel, J.; Chadburn, A.; Rubinstein, P. G.; Giulino-Roth, L.; Tam, W.; Liu, Y.; Gaiolla, R.; Eng, K.; Brody, J.; Inghirami, G.; Carlo-Stella, C.; Santoro, A.; Rahal, D.; Totonchy, J.; Elemento, O.; Cesarman, E.; Roshal, M. Flow sorting and exome sequencing reveal the oncogenome of primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood* **2015**, *125*, 1061–1072, doi:10.1182/blood-2014-11-610436.
30. Roemer, M. G. M.; Redd, R. A.; Cader, F. Z.; Pak, C. J.; Abdelrahman, S.; Ouyang, J.; Sasse, S.; Younes, A.; Fanale, M.; Santoro, A.; Zinzani, P. L.; Timmerman, J.; Collins, G. P.; Ramchandren, R.; Cohen, J. B.; De Boer, J. P.; Kuruvilla, J.; Savage, K. J.; Trneny, M.; Ansell, S.; Kato, K.; Farsaci, B.; Sumbul, A.; Armand, P.; Neuberg, D. S.; Pinkus, G. S.; Ligon, A. H.; Rodig, S. J.; Shipp, M. A. Major Histocompatibility Complex Class II and Programmed Death Ligand 1 Expression Predict Outcome After Programmed Death 1 Blockade in Classic Hodgkin Lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 942–950, doi:10.1200/JCO.2017.77.3994.
31. Cader, F. Z.; Schackmann, R. C. J.; Hu, X.; Wienand, K.; Redd, R.; Chapuy, B.; Ouyang, J.; Paul, N.; Gjini, E.; Lipschitz, M.; Armand, P.; Wu, D.; Fromm, J. R.; Neuberg, D.; Liu, X. S.; Rodig, S. J.; Shipp, M. A. Mass cytometry of Hodgkin lymphoma reveals a CD4+ regulatory T-cell-rich and exhausted T-effector microenvironment. *Blood* **2018**, *132*, 825–836, doi:10.1182/blood-2018-04-843714.

32. Greaves, P.; Clear, A.; Owen, A.; Iqbal, S.; Lee, A.; Matthews, J.; Wilson, A.; Calaminici, M.; Gribben, J. G. Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. *Blood* **2013**, *122*, 2856–2863, doi:10.1182/blood-2013-06-508044.
33. Di Gaetano, R.; Gasparetto, V.; Padoan, A.; Callegari, B.; Candiotti, L.; Sanzari, M. C.; Scapinello, A.; Tagariello, G. Flow cytometry CD4(+)CD26(-)CD38(+) lymphocyte subset in the microenvironment of Hodgkin lymphoma-affected lymph nodes. *Ann. Hematol.* **2014**, *93*, 1319–1326, doi:10.1007/s00277-014-2044-x.
34. Yang, M.; McKay, D.; Pollard, J. W.; Lewis, C. E. Diverse Functions of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* **2018**, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1367.
35. Workman, C. J.; Dugger, K. J.; Vignali, D. A. A. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2002**, *169*, 5392–5395.
36. Woo, S.-R.; Turnis, M. E.; Goldberg, M. V.; Bankoti, J.; Selby, M.; Nirschl, C. J.; Bettini, M. L.; Gravano, D. M.; Vogel, P.; Liu, C. L.; Tansombatvisit, S.; Grosso, J. F.; Netto, G.; Smeltzer, M. P.; Chaux, A.; Utz, P. J.; Workman, C. J.; Pardoll, D. M.; Korman, A. J.; Drake, C. G.; Vignali, D. A. A. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 917–927, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.
37. Yuan, J.; Jiang, B.; Zhao, H.; Huang, Q. Prognostic implication of TIM-3 in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma* **2013**, doi:10.4149/neo_2014_006.
38. Zhou, E.; Huang, Q.; Wang, J.; Fang, C.; Yang, L.; Zhu, M.; Chen, J.; Chen, L.; Dong, M. Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 8018–8027.
39. Piao, Y.-R.; Piao, L.-Z.; Zhu, L.-H.; Jin, Z.-H.; Dong, X.-Z. Prognostic value of T cell immunoglobulin mucin-3 in prostate cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **2013**, *14*, 3897–3901.
40. Yang, M.; Yu, Q.; Liu, J.; Fu, W.; Cao, Y.; Yu, L.; Shao, S.; Wang, X.; Niu, H.; Wang, Y. T-cell immunoglobulin mucin-3 expression in bladder urothelial carcinoma: Clinicopathologic correlations and association with survival. *J. Surg. Oncol.* **2015**, *112*, 430–435, doi:10.1002/jso.24012.
41. Jiang, J.; Jin, M.-S.; Kong, F.; Cao, D.; Ma, H.-X.; Jia, Z.; Wang, Y.-P.; Suo, J.; Cao, X. Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PLoS One* **2013**, *8*, e81799, doi:10.1371/journal.pone.0081799.
42. Sánchez-Fueyo, A.; Tian, J.; Picarella, D.; Domenig, C.; Zheng, X. X.; Sabatos, C. A.; Manlongat, N.; Bender, O.; Kamradt, T.; Kuchroo, V. K.; Gutiérrez-Ramos, J.-C.; Coyle, A. J.; Strom, T. B. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* **2003**, *4*, 1093–1101, doi:10.1038/ni987.
43. Wherry, E. J.; Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 486–499, doi:10.1038/nri3862.
44. Ngiow, S. F.; von Scheidt, B.; Akiba, H.; Yagita, H.; Teng, M. W. L.; Smyth, M. J. Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN- γ -mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 3540–3551, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0096.

45. Compaci, G.; Rueter, M.; Lamy, S.; Oberic, L.; Recher, C.; Lapeyre-Mestre, M.; Laurent, G.; Despas, F. Ambulatory Medical Assistance - After Cancer (AMA-AC): A model for an early trajectory survivorship survey of lymphoma patients treated with anthracycline-based chemotherapy. *BMC Cancer* **2015**, *15*, doi:10.1186/s12885-015-1815-7.
46. Edgar, R.; Domrachev, M.; Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 207–210.
47. Harris, M. A.; Clark, J.; Ireland, A.; Lomax, J.; Ashburner, M.; Foulger, R.; Eilbeck, K.; Lewis, S.; Marshall, B.; Mungall, C.; Richter, J.; Rubin, G. M.; Blake, J. A.; Bult, C.; Dolan, M.; Drabkin, H.; Eppig, J. T.; Hill, D. P.; Ni, L.; Ringwald, M.; Balakrishnan, R.; Cherry, J. M.; Christie, K. R.; Costanzo, M. C.; Dwight, S. S.; Engel, S.; Fisk, D. G.; Hirschman, J. E.; Hong, E. L.; Nash, R. S.; Sethuraman, A.; Theesfeld, C. L.; Botstein, D.; Dolinski, K.; Feierbach, B.; Berardini, T.; Mundodi, S.; Rhee, S. Y.; Apweiler, R.; Barrell, D.; Camon, E.; Dimmer, E.; Lee, V.; Chisholm, R.; Gaudet, P.; Kibbe, W.; Kishore, R.; Schwarz, E. M.; Sternberg, P.; Gwinn, M.; Hannick, L.; Wortman, J.; Berriman, M.; Wood, V.; de la Cruz, N.; Tonellato, P.; Jaiswal, P.; Seigfried, T.; White, R.; Gene Ontology Consortium The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, D258-261, doi:10.1093/nar/gkh036.
48. Liberzon, A.; Subramanian, A.; Pinchback, R.; Thorvaldsdóttir, H.; Tamayo, P.; Mesirov, J. P. Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2011**, *27*, 1739–1740, doi:10.1093/bioinformatics/btr260.
49. Tosolini, M.; Pont, F.; Poupot, M.; Vergez, F.; Nicolau-Travers, M.-L.; Vermijlen, D.; Sarry, J.-E.; Dieli, F.; Fournié, J.-J. Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1284723, doi:10.1080/2162402X.2017.1284723.
50. Gentles, A. J.; Newman, A. M.; Liu, C. L.; Bratman, S. V.; Feng, W.; Kim, D.; Nair, V. S.; Xu, Y.; Khuong, A.; Hoang, C. D.; Diehn, M.; West, R. B.; Plevritis, S. K.; Alizadeh, A. A. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 938–945, doi:10.1038/nm.3909.
51. Hans, C. P.; Weisenburger, D. D.; Greiner, T. C.; Gascoyne, R. D.; Delabie, J.; Ott, G.; Müller-Hermelink, H. K.; Campo, E.; Braziel, R. M.; Jaffe, E. S.; Pan, Z.; Farinha, P.; Smith, L. M.; Falini, B.; Banham, A. H.; Rosenwald, A.; Staudt, L. M.; Connors, J. M.; Armitage, J. O.; Chan, W. C. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **2004**, *103*, 275–282, doi:10.1182/blood-2003-05-1545.
52. Alizadeh, A. A.; Eisen, M. B.; Davis, R. E.; Ma, C.; Lossos, I. S.; Rosenwald, A.; Boldrick, J. C.; Sabet, H.; Tran, T.; Yu, X.; Powell, J. I.; Yang, L.; Marti, G. E.; Moore, T.; Hudson, J.; Lu, L.; Lewis, D. B.; Tibshirani, R.; Sherlock, G.; Chan, W. C.; Greiner, T. C.; Weisenburger, D. D.; Armitage, J. O.; Warnke, R.; Levy, R.; Wilson, W.; Grever, M. R.; Byrd, J. C.; Botstein, D.; Brown, P. O.; Staudt, L. M. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **2000**, *403*, 503–511, doi:10.1038/35000501.

Supplemental data



Supplementary Figure 1: Overall survival (OS) curves according to the four stages of IE of DLBCL patients from public microarrays data (n=200) (log rank $p=0,0006$)

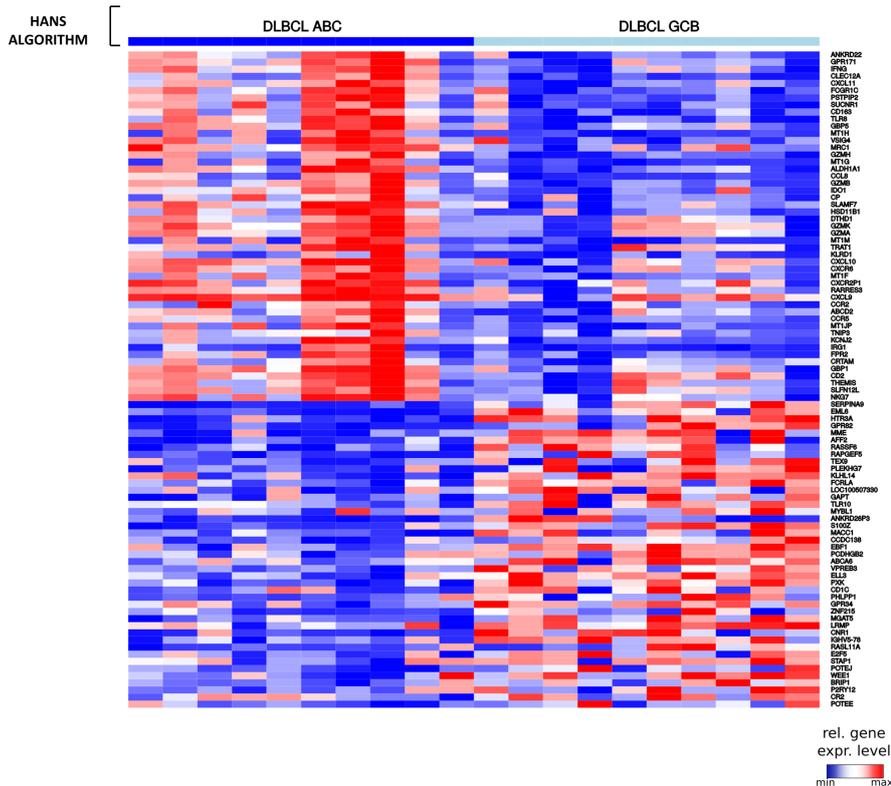


Figure supplementary 2: Concordance between Hans algorithm [51] based on immunohistochemical finding and molecular classification based on GEP [52] in lymphoma cohort of our institution.

HODGKIN LYMPHOMA PATIENTS (n=37)		2-years survival [IC95%]		Median progression free survival time (months) [IC95%]		log rank p value	
Median age, y		30 (17-82)					
≤ 30		19 (51.4%)	50.75% [26.58;70.67]	24.4[15.1; 52.1]		p = 0.2018	
> 30		18 (48.6%)	77.78% [51.10;91.02]	62.2[24.1;NR]			
Sex							
Male		23 (62.2%)	69.57% [46.56;84.17]	51.1[18.6;NR]		p = 0.2059	
Female		14 (37.8%)	55.00% [25.78;76.82]	24.1[10.5;NR]			
Stage							
I-II		6 (16.2%)	50.00% [11.09;80.37]	15.1[4.5;NR]		p = 0.1456	
III-IV		31 (83.8%)	66.93% [47.19;80.68]	44.0[21.6;NR]			
IPS							
Low risk (0-2)		8 (27.6%)	60.00% [19.55;85.23]	34.3[5.6; NR]		p = 0.3092	
High risk (>=3)		21 (72.4%)	71.43% [47.15;86.02]	52.1[18.6;NR]			
Missing		8					
Histologic subtype							
Nodular sclerosis		27 (73.0%)	-	-		-	
Mixed cellular		7 (18.9%)	-	-		-	
Lymphocyte rich		1 (2.7%)	-	-		-	
Lymphocyte depleted		1 (2.7%)	-	-		-	
NA		1 (2.7%)	-	-		-	
EBV							
EBV+		6 (16.7%)	-	-		-	
EBV-		30 (83.3%)	-	-		-	
Missing		1					
Treatment							
ABVD		24 (64.9%)	65.79% [43.03;81.23]	37.0[18.5;NR]		NC	
BEACOPP		12 (32.4%)	66.67% [33.70;85.97]	51.1[5.3;NR]			
NA		1 (2.63%)	NR				
TIM-3 ME staining							
>10%		21 (56.8%)	85.71% [61.97;95.16]	62.2[30.9;NR]		p= 0.0060	
≤10%		16 (43.2%)	36.46% [14.34;59.21]	18.5[10.0; 51.1]			
DLBCL PATIENTS (n=22)		2-years survival [IC95%]		Median progression free survival time (months) [IC95%]		log rank p value	
Median age, y		59 (25-79)					
≤ 60		12 (54.5%)	91.67% [53.90;98.78]	-		-	
> 60		10 (45.5%)	70.00% [32.87;89.19]	-		-	
Sex							
Male		10 (45.5%)	80.00% [40.87;94.59]	-		-	
Female		12 (54.5%)	83.33% [48.17;95.55]	-		-	
Stage							
I-II		6 (27.3%)	66.67% [19.46;90.44]	-		-	
III-IV		16 (72.7%)	87.50% [58.60;96.72]	-		-	
IPI							
Low/ Intermediate risk (<3)		20 (90.9%)	85.00% [60.38;94.90]	-		-	
High risk (≥3)		2 (9.1%)	50.00% [0.60;91.04]	-		-	
Histologic/molecular subtype							
GC		12 (54.5%)	-	-		-	
ABC		10 (45.5%)	-	-		-	
Treatment							
R-COPADEM		1 (4.5%)	100.00% NC	-		-	
R-CHOP		21 (95.5%)	80.95% [56.89;92.39]	-		-	
TIM-3 ME staining							
>10%		13 (61.9%)	84.62% [51.22;95.91]	-		-	
≤10%		8 (38.1%)	75.00% [31.48;93.09]	-		-	
NA		1					

Table Supplementary 1: Table of clinical characteristics of patients from our private cohort.

Table supplementary 2: matrix of "SING14" used for deconvolution (excel file).

GENE ID	protein, alias name
CCL2	Chemokine (CC motif) ligand 2, MCP1
CCL22	Chemokine (CC motif) ligand 22
CD163	CD163
CD274	Programmed cell death 1 ligand 1
CD86	CTLA4 ligand, B7.2
CSF1	"Colony stimulating factor 1 (macrophage), MCSF1"
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CD152
FOXP3	Forkhead box P3
GDF15	Growth differentiation factor 15
HAVCR2	TIM3
HGF	Hepatocyte growth factor
ICOS	CD278, Inducible T-cell co-stimulator
IDO1	Indoleamine 2,3 dioxygenase 1
IDO2	Indoleamine 2,3 dioxygenase 2
IL10	Interleukin 10
IL23A	Interleukin 23
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer, CD130
JAK2	Janus kinase 2
KIR2DL1	CD158A, NK cell inhibitory receptor p58
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3, CD223
LAIR1	Leukocyte-associated Ig-like receptor 1
LGALS1	Galectin 1
LGALS3	Galectin 3
MCL1	Myeloid cell leukemia 1, BCL2-related
MRC1	Mannose receptor C type 1, CD206
MSR1	Macrophage scavenger receptor 1, CD204
PDCD1	PD-1, programmed cell death 1, CD279
PDCD1LG2	CD273, PD-L2, PD-1L2, butyrophilin B7DC,
PVR	Polyovirus receptor, CD155
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
TIGIT	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

Table supplementary 3: List of "IEGS33" immune escape gene set

IHC	ICC	[95% CI]
CD3	0.75	[0.52 ; 0.87]
CD8	0.81	[0.61 ; 0.90]
CD4	0.86	[0.75 ; 0.92]
PD-1	0.70	[0.49 ; 0.84]
PD-L1	0.87	[0.68 ; 0.94]
TIM3	0.72	[0.52 ; 0.85]
LAG3	0.89	[0.74 ; 0.95]

Table supplementary 4: Intra-class correlation coefficient between manual scoring and automated scoring for IHC: CD3, CD8, CD4, PD-1, PD-L1, TIM-3 and LAG-3.

CONCLUSION et DISCUSSION

Dans cette étude, l'utilisation d'analyses transcriptomiques couplées à des études immunohistochimiques, a permis de mettre en évidence des stratégies d'IE distinctes entre les LH, LBDGC ABC et LBDGC GC notamment à travers la surexpression de différentes molécules dont des points de contrôle immunitaire inhibiteurs (PCIs). Ainsi les LH présentent un haut score moléculaire d'IE « IEGS33 » comparativement aux LBDGC, ce qui traduit une forte amplitude des phénomènes d'IE dans les LH. Néanmoins, les LBDGC ABC présentent également un score « IEGS33 » plus élevé que les LBDGC GC. Ces données ont été en partie confirmées dans notre cohorte et suggèrent que les LH et LBDGC ABC seraient plus enclins à moduler la réponse immunitaire anti-tumorale que les LBDGC GC. Cependant les études transcriptomiques ne permettent pas de savoir quelles cellules (tumorales ou du micro-environnement) expriment ces molécules impliquées dans l'IE et notamment les PCIs. Ainsi, la réalisation d'études immunohistochimiques a permis non seulement de confirmer la surexpression protéique de certains PCIs mais surtout de préciser leurs distributions cellulaires au sein du ganglion lymphomateux. De plus, l'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image automatisée a permis d'interpréter des résultats objectifs et reproductibles. Parmi les PCIs étudiés, les LH et les LBDGC ABC montrent, en accord avec les données de la littérature^{45,102,107,109,113}, une plus forte expression de PD-L1 que les LBDGC GC. Par ailleurs, cette surexpression concerne à la fois les cellules du MET et les cellules tumorales, avec une expression plus fréquente dans les cellules HRS que dans les cellules tumorales du LBDGC ABC, liée notamment à l'existence d'anomalies moléculaires du locus PD-L1 plus fréquentes dans le LH que dans le LBDGC.^{108,112,113} En parallèle, la surexpression de PD-L1 a été rapportée comme associée à un mauvais pronostic dans les LH comme dans les LBDGC^{102,109,113}, suggérant un rôle clé de l'axe PD-1/PD-L1 dans l'IE de ces lymphomes. Cependant, les taux de réponses aux anticorps bloquant l'axe PD-1/PD-L1 sont plus élevés chez les patients atteints de LH que chez les patients atteints de LBDGC.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Ces observations suggèrent que la levée d'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 par les bloqueurs de PCIs (i.e. Nivolumab) est suffisante pour restaurer une réponse immunitaire anti-tumorale efficace dans les LH comparativement aux LBDGC. Cette hypothèse est confortée par nos résultats montrant un plus haut score moléculaire d'activation lymphocytaire T dans les LH comparativement aux LBDGC, illustrant la pré-existence de LT anti-tumoraux activés dans les LH plus enclins à générer

une réponse anti-tumorale efficace sous immunothérapie. Dans certains cancers solides comme le mélanome, l'efficacité thérapeutique du blocage de l'axe PD-1/PD-L1 a été associée à l'activation des LT CD8⁺.^{153,154} Cependant dans les LH, il est fréquemment observé des altérations de la présentation antigénique par les cellules HRS et notamment des altérations d'expression du CMH I via la perte d'expression de la β 2-microglobuline^{94,95}, suggérant que l'efficacité des anti-PD-1/PD-L1 ne dépend pas exclusivement des LT CD8⁺. Dans notre étude, nous montrons que les LH et les LBDGC ont un microenvironnement distinct avec notamment une plus forte densité de LT CD4⁺ dans les LH par rapport aux LBDGC suggérant un rôle clé des LT CD4⁺ dans la réponse immunitaire anti-tumorale des LH. Cette hypothèse est également illustrée par l'étude de Carey et al, montrant une proximité physique/topographique entre les cellules HRS PD-L1⁺ et les LT CD4⁺ PD-1⁺ suggérant une interaction cellulaire directe entre LT CD4⁺ et cellules HRS.⁴⁵ D'autre part, Roemer et al, ont montré que l'expression du CMH de classe II (en lien avec l'activité des LT CD4⁺) était un facteur prédictif de réponse aux anti-PD-1 dans le LH.¹⁵⁵ En dehors des LT CD4⁺, nous avons également observé une plus forte densité de TAMs CD68⁺ CD163⁺ dans les LBDGC ABC comparativement aux LH à la fois sur les analyses moléculaires (déconvolution profonde) et sur les études en immunofluorescence (CD68/CD163). Ces résultats divergent de l'étude de Vari et al, ayant montré une plus forte expression transcriptomique de *CD163* dans les LH que dans les LBDGC (sous types GC et ABC confondus).⁴⁶ Ceci pourrait être expliqué par la difficulté de phénotyper les différentes sous populations de macrophages (tant sur le plan moléculaire et protéique) mais également lié au fait que nous avons étudié la densité de TAMs en séparant les 2 sous types de LBDGC contrairement à l'étude de Vari et al. Ce résultat illustre par ailleurs la différence d'abondance en TAMs entre LBDGC ABC et GC et l'importance de distinguer les 2 sous types lors de l'étude du MET.

Ainsi nous envisageons de poursuivre la caractérisation de l'infiltrat macrophagique présent dans les LH et les LBDGC à l'aide notamment d'immunomarquages multipléxés, afin de préciser le rôle des macrophages dans les LH. Au total, la différence de composition en cellules immunitaires du MET pourrait au moins en partie expliquer les différences de réponses aux anti-PD-1 entre les sous types de lymphome.

Un autre mécanisme de résistance aux traitements anti-PD-1 pourrait être l'expression simultanée d'autres PCIs. Ces autres PCIs sont relativement peu étudiés dans les lymphomes. Pour explorer cette hypothèse, nous avons étudié la co-expression

de plusieurs PCIs dans les tissus de LH et LBDGC. Ainsi, LAG-3 est plus fortement exprimé dans le MET des LH que dans le ME des LBDGC. Même si le mécanisme d'action exacte de LAG-3 reste inconnu, il a été montré qu'il agit comme un régulateur négatif de l'expansion des LT CD4⁺ et CD8⁺ et qu'il est fréquemment co-exprimé avec PD-1 par les TILs.^{141,142} De plus, il a été montré que le blocage de LAG-3 potentialise le blocage de PD-1 pour restaurer l'activité des LT effecteurs.¹⁴² Des anti-LAG-3 sont d'ailleurs en cours d'essais thérapeutiques dans divers cancers dont les lymphomes (NCT02061761). De la même manière l'expression de TIM-3 est fréquemment observée dans divers cancers dont le lymphome folliculaire.^{120,135-140} L'expression de TIM-3 est associée à une inhibition de la fonction lymphocytaire T et est considérée actuellement comme un puissant marqueur d'exhaustion lymphocytaire.^{118,119} De plus, la récente démonstration de l'efficacité thérapeutique du blocage de TIM-3 *in vitro* et *in vivo* dans des modèles murins de mélanome positionne TIM-3 comme cible potentielle en immunothérapie anti-cancéreuse¹⁵⁶, avec actuellement des essais thérapeutiques en cours.¹²⁰ Dans cette étude, nous avons comparé pour la première fois l'expression de TIM-3 dans les LH et LBDGC et observé que TIM-3 est exprimé à la fois par les cellules tumorales et par les cellules du MET dans les LH et LBDGC ABC, alors qu'il n'est exprimé que par les cellules du MET dans le LBDGC GC. L'expression de TIM-3 par les cellules tumorales pourrait moduler directement la réponse immune anti-tumorale en exerçant des fonctions immunosuppressives par exemple *via* sa liaison à HMGB1, peptide transportant des acides nucléiques « signal de danger » indispensable à l'activation et à la maturation des DCs. Ainsi la séquestration de HMGB1 par les cellules tumorales pourrait limiter l'activation des DCs et *in fine* l'activation de l'immunité anti-tumorale spécifique.¹²⁹ De plus, malgré une expression globale de TIM-3 similaire dans les LH et LBDGC, la forte expression de TIM-3 dans le MET des LH est associée à une baisse significative de la PFS en analyse univariée. Bien que ces résultats méritent d'être confirmés sur des cohortes plus larges, ils rejoignent les données de la littérature qui rapportent que l'expression de TIM-3 est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers solides^{120,135-139} et dans le lymphome folliculaire.¹⁴⁰ Malheureusement, nous n'avons pas pu établir d'étude de survie dans notre cohorte de LBDGC, du fait du faible effectif de patients et d'évènements. Cependant, dans une large cohorte publique, en couplant le score d'enrichissement en gènes impliqués dans l'IE et le score en gènes impliqués dans l'activation lymphocytaire pour chaque échantillon, nous retrouvons quatre stades

rappelant le concept de *l'immunoediting*, comme précédemment décrit.¹⁵² Ces quatre stades sont associés à des survies globales significativement différentes dans les LBDGC (les LBDGC avec peu d'activation lymphocytaire étant de moins bon pronostic). De manière intéressante, dans ce modèle, la plus part des échantillons de LH (97%) sont situés dans le stade 3 correspondant alors à des tumeurs immunogéniques caractérisées par un fort score d'IE et un fort score d'activation lymphocytaire T. Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que ce modèle permettrait de prédire la sensibilité aux bloqueurs de PCIs avec comme meilleures candidates aux bloqueurs des PCIs les tumeurs situées dans le stade 3.

En conclusion, cette étude met en évidence, pour la première fois, l'existence de plusieurs mécanismes d'IE concomitant, en combinant des données moléculaires et immunohistochimiques, dans les LH et les LBDGC. Etant donné la complexité des voies d'IE avec la co-expression simultanée de plusieurs molécules impliquées dans l'IE et le dynamisme temporel certain, l'utilisation des scores moléculaires « IEGS33 » et « T cell activation », en tant qu'approche globale, pourrait représenter un outil intéressant pour identifier les patients potentiellement répondeurs aux inhibiteurs des PCIs.

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de Médecine Toulouse - Purpan



Didier CARRIÉ

Professeur Laurence LAMANT
Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques
INSTITUT UNIVERSITAIRE DU CANCER
Avenue Irène Joliot-Curie
31059 TOULOUSE CEDEX 9
Tél. 05 31 15 61 97

BIBIOGRAPHIE

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016;127:2375–2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569.
2. Turpin A, Michot J-M, Kempf E, et al. [Hodgkin lymphoma: Current and future therapeutic strategies]. *Bull. Cancer (Paris)* 2018;105:81–98. doi:10.1016/j.bulcan.2017.11.008.
3. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N. Engl. J. Med.* 1998;339:1506–1514. doi:10.1056/NEJM199811193392104.
4. Eghbali H, Raemaekers J, Carde P, et al. The EORTC strategy in the treatment of Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Haematol. Suppl.* 2005:135–140.
5. Moskowitz CH, Nademanee A, Masszi T, et al. Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond. Engl.* 2015;385:1853–1862. doi:10.1016/S0140-6736(15)60165-9.
6. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. Hodgkin's disease: clonal Ig gene rearrangements in Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995;764:523–524.
7. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, et al. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994;91:10962–10966.
8. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 2006;25:6680–6684. doi:10.1038/sj.onc.1209954.
9. Kato M, Sanada M, Kato I, et al. Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 2009;459:712–716. doi:10.1038/nature07969.
10. Schmitz R, Hansmann M-L, Bohle V, et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 2009;206:981–989. doi:10.1084/jem.20090528.
11. Steidl C, Telenius A, Shah SP, et al. Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood* 2010;116:418–427. doi:10.1182/blood-2009-12-257345.
12. Weniger MA, Küppers R. NF-κB deregulation in Hodgkin lymphoma. *Semin. Cancer Biol.* 2016;39:32–39. doi:10.1016/j.semcancer.2016.05.001.
13. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, et al. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J. Exp. Med.* 2002;196:605–617.
14. Gunawardana J, Chan FC, Telenius A, et al. Recurrent somatic mutations of PTPN1 in primary mediastinal B cell lymphoma and Hodgkin lymphoma. *Nat. Genet.* 2014;46:329–335. doi:10.1038/ng.2900.
15. Thomas RK, Kallenborn A, Wickenhauser C, et al. Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Am. J. Pathol.* 2002;160:1521–1528. doi:10.1016/S0002-9440(10)62578-3.
16. Kashkar H, Haefs C, Shin H, et al. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J. Exp. Med.* 2003;198:341–347. doi:10.1084/jem.20021279.
17. Brousset P, Schlaifer D, Meggetto F, et al. Persistence of the same viral strain in early and late relapses of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease. *Blood* 1994;84:2447–2451.
18. Kilger E, Kieser A, Baumann M, et al. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J.* 1998;17:1700–1709. doi:10.1093/emboj/17.6.1700.
19. Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, et al. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 1998;9:405–411.
20. Fisher RI, Gaynor ER, Dahlberg S, et al. Comparison of a standard regimen (CHOP) with three intensive chemotherapy regimens for advanced non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1993;328:1002–1006. doi:10.1056/NEJM199304083281404.
21. Coiffier B, Lepage E, Briere J, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:235–242. doi:10.1056/NEJMoa011795.
22. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, et al. Long-term outcome of patients in the LNH-98.5 trial, the first randomized study comparing rituximab-CHOP to standard CHOP chemotherapy in DLBCL patients: a study by the Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2010;116:2040–2045. doi:10.1182/blood-2010-03-276246.

23. Fu K, Weisenburger DD, Choi WWL, et al. Addition of rituximab to standard chemotherapy improves the survival of both the germinal center B-cell-like and non-germinal center B-cell-like subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2008;26:4587–4594. doi:10.1200/JCO.2007.15.9277.
24. Roschewski M, Staudt LM, Wilson WH. Diffuse large B-cell lymphoma-treatment approaches in the molecular era. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2014;11:12–23. doi:10.1038/nrclinonc.2013.197.
25. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503–511. doi:10.1038/35000501.
26. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2002;346:1937–1947. doi:10.1056/NEJMoa012914.
27. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;103:275–282. doi:10.1182/blood-2003-05-1545.
28. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, et al. BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 2012;26:1383–1390. doi:10.1038/leu.2011.378.
29. Pfeifer M, Grau M, Lenze D, et al. PTEN loss defines a PI3K/AKT pathway-dependent germinal center subtype of diffuse large B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110:12420–12425. doi:10.1073/pnas.1305656110.
30. Lenz G, Wright GW, Emre NCT, et al. Molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma arise by distinct genetic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008;105:13520–13525. doi:10.1073/pnas.0804295105.
31. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 2010;42:181–185. doi:10.1038/ng.518.
32. Lenz G, Davis RE, Ngo VN, et al. Oncogenic CARD11 mutations in human diffuse large B cell lymphoma. *Science* 2008;319:1676–1679. doi:10.1126/science.1153629.
33. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, et al. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2010;463:88–92. doi:10.1038/nature08638.
34. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 2011;470:115–119. doi:10.1038/nature09671.
35. Compagno M, Lim WK, Grunn A, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 2009;459:717–721. doi:10.1038/nature07968.
36. Lenz G, Wright G, Dave SS, et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:2313–2323. doi:10.1056/NEJMoa0802885.
37. Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N. Engl. J. Med.* 2004;351:2159–2169. doi:10.1056/NEJMoa041869.
38. Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2010;362:875–885. doi:10.1056/NEJMoa0905680.
39. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
40. Kumar D, Xu ML. Microenvironment Cell Contribution to Lymphoma Immunity. *Front. Oncol.* 2018;8:288. doi:10.3389/fonc.2018.00288.
41. Nicholas NS, Apollonio B, Ramsay AG. Tumor microenvironment (TME)-driven immune suppression in B cell malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* 2016;1863:471–482. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.11.003.
42. Tarte K. Role of the microenvironment across histological subtypes of NHL. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 2017;2017:610–617. doi:10.1182/asheducation-2017.1.610.
43. Lee MJ, Park SY, Ko JH, et al. Mesenchymal stromal cells promote B-cell lymphoma in lacrimal glands by inducing immunosuppressive microenvironment. *Oncotarget* 2017;8:66281–66292. doi:10.18632/oncotarget.19971.
44. Komohara Y, Jinushi M, Takeya M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Sci.* 2014;105:1–8. doi:10.1111/cas.12314.
45. Carey CD, Gusenleitner D, Lipschitz M, et al. Topological analysis reveals a PD-L1-associated microenvironmental niche for Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphoma. *Blood* 2017;130:2420–2430. doi:10.1182/blood-2017-03-770719.
46. Vari F, Arpon D, Keane C, et al. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* 2018;131:1809–

1819. doi:10.1182/blood-2017-07-796342.
47. Yang M, McKay D, Pollard JW, et al. Diverse Functions of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res.* 2018. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1367.
48. Nam SJ, Go H, Paik JH, et al. An increase of M2 macrophages predicts poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone. *Leuk. Lymphoma* 2014;55:2466–2476. doi:10.3109/10428194.2013.879713.
49. Riihijärvi S, Fiskvik I, Taskinen M, et al. Prognostic influence of macrophages in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a correlative study from a Nordic phase II trial. *Haematologica* 2015;100:238–245. doi:10.3324/haematol.2014.113472.
50. Kridel R, Steidl C, Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 2015;100:143–145. doi:10.3324/haematol.2015.124008.
51. Wang J, Gao K, Lei W, et al. Lymphocyte-to-monocyte ratio is associated with prognosis of diffuse large B-cell lymphoma: correlation with CD163 positive M2 type tumor-associated macrophages, not PD-1 positive tumor-infiltrating lymphocytes. *Oncotarget* 2017;8:5414–5425. doi:10.18632/oncotarget.14289.
52. Panico L, Ronconi F, Lepore M, et al. Prognostic role of tumor-associated macrophages and angiogenesis in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 2013;54:2418–2425. doi:10.3109/10428194.2013.778405.
53. Guo B, Cen H, Tan X, et al. Meta-analysis of the prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in adult classical Hodgkin lymphoma. *BMC Med.* 2016;14:159. doi:10.1186/s12916-016-0711-6.
54. Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, et al. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2012;23:736–742. doi:10.1093/annonc/mdr157.
55. Azzaoui I, Uhel F, Rossille D, et al. T-cell defect in diffuse large B-cell lymphomas involves expansion of myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 2016;128:1081–1092. doi:10.1182/blood-2015-08-662783.
56. Romano A, Parrinello NL, Vetro C, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin Lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. *Br. J. Haematol.* 2015;168:689–700. doi:10.1111/bjh.13198.
57. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2011;117:872–881. doi:10.1182/blood-2010-05-283820.
58. Wilcox RA, Feldman AL, Wada DA, et al. B7-H1 (PD-L1, CD274) suppresses host immunity in T-cell lymphoproliferative disorders. *Blood* 2009;114:2149–2158. doi:10.1182/blood-2009-04-216671.
59. Lwin T, Lin J, Choi YS, et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. *Blood* 2010;116:5228–5236. doi:10.1182/blood-2010-03-275925.
60. Harris MA, Clark J, Ireland A, et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:D258-261. doi:10.1093/nar/gkh036.
61. Schirmacher V, Schild HJ, Gückel B, et al. Tumour-specific CTL response requiring interactions of four different cell types and recognition of MHC class I and class II restricted tumour antigens. *Immunol. Cell Biol.* 1993;71 (Pt 4):311–326. doi:10.1038/icb.1993.36.
62. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó M-T, et al. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2006;24:5350–5357. doi:10.1200/JCO.2006.06.4766.
63. Wahlin BE, Sander B, Christensson B, et al. CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2007;13:388–397. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1734.
64. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:523–532. doi:10.1038/nri2343.
65. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2005;11:1467–1473. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1869.
66. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006;108:2957–2964. doi:10.1182/blood-2006-04-018218.
67. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, et al. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007;128:958–965. doi:10.1309/NB3947K383DJ0LQ2.
68. Nakayama S, Yokote T, Akioka T, et al. Infiltration of effector regulatory T cells predicts poor

- prognosis of diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *Blood Adv.* 2017;1:486–493. doi:10.1182/bloodadvances.2016000885.
69. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, et al. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2008;93:193–200. doi:10.3324/haematol.11702.
 70. Yang Z-Z, Novak AJ, Stenson MJ, et al. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006;107:3639–3646. doi:10.1182/blood-2005-08-3376.
 71. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2010;10:490–500. doi:10.1038/nri2785.
 72. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet Lond. Engl.* 2000;356:1795–1799. doi:10.1016/S0140-6736(00)03231-1.
 73. Chiu J, Ernst DM, Keating A. Acquired Natural Killer Cell Dysfunction in the Tumor Microenvironment of Classic Hodgkin Lymphoma. *Front. Immunol.* 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.00267.
 74. Gattringer G, Greil R, Radaszkiewicz T, et al. In situ quantification of T-cell subsets, NK-like cells and macrophages in Hodgkin's disease: quantity and quality of infiltration density depends on histopathological subtypes. *Blut* 1986;53:49–58.
 75. Plattel WJ, van den Berg A, Visser L, et al. Plasma thymus and activation-regulated chemokine as an early response marker in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2012;97:410–415. doi:10.3324/haematol.2011.053199.
 76. Buri C, Körner M, Schärli P, et al. CC chemokines and the receptors CCR3 and CCR5 are differentially expressed in the nonneoplastic leukocytic infiltrates of Hodgkin disease. *Blood* 2001;97:1543–1548.
 77. Liu F, Zhang Y, Wu Z-Q, et al. Analysis of CCL5 expression in classical Hodgkin's lymphoma L428 cell line. *Mol. Med. Rep.* 2011;4:837–841. doi:10.3892/mmr.2011.515.
 78. Jundt F, Anagnostopoulos I, Bommert K, et al. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood* 1999;94:2065–2071.
 79. Vardhana S, Younes A. The immune microenvironment in Hodgkin lymphoma: T cells, B cells, and immune checkpoints. *Haematologica* 2016;101:794–802. doi:10.3324/haematol.2015.132761.
 80. Aldinucci D, Lorenzon D, Cattaruzza L, et al. Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int. J. Cancer* 2008;122:769–776. doi:10.1002/ijc.23119.
 81. Upadhyay R, Hammerich L, Peng P, et al. Lymphoma: immune evasion strategies. *Cancers* 2015;7:736–762. doi:10.3390/cancers7020736.
 82. Yang Z-Z, Grote DM, Ziesmer SC, et al. Soluble and membrane-bound TGF- β -mediated regulation of intratumoral T cell differentiation and function in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PLoS One* 2013;8:e59456. doi:10.1371/journal.pone.0059456.
 83. Woods AN, Wilson AL, Srivivisan N, et al. Differential Expression of Homing Receptor Ligands on Tumor-Associated Vasculature that Control CD8 Effector T-cell Entry. *Cancer Immunol. Res.* 2017;5:1062–1073. doi:10.1158/2326-6066.CIR-17-0190.
 84. Duletić-Načinović A, Gačić V, Valković T, et al. Concurrent Elevations of VEGF, Osteopontin and MCP-1 Serum Levels Are Independent Predictors of Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Acta Haematol.* 2016;136:52–61. doi:10.1159/000444624.
 85. Jiang L, Sun JH, Quan L-N, et al. Abnormal vascular endothelial growth factor protein expression may be correlated with poor prognosis in diffuse large B-cell lymphoma: A meta-analysis. *J. Cancer Res. Ther.* 2016;12:605–611. doi:10.4103/0973-1482.146086.
 86. Koh YW, Park C, Yoon DH, et al. Prognostic significance of COX-2 expression and correlation with Bcl-2 and VEGF expression, microvessel density, and clinical variables in classical Hodgkin lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2013;37:1242–1251. doi:10.1097/PAS.0b013e31828b6ad3.
 87. Yoon K-A, Kim MK, Eom H-S, et al. Adverse prognostic impact of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 2017;58:2677–2682. doi:10.1080/10428194.2017.1300893.
 88. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors. The first theories. *Oncotarget* 2017;8:7175–7180. doi:10.18632/oncotarget.12739.
 89. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 1970;13:1–27.
 90. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, et al. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS

- compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* 2007;370:59–67. doi:10.1016/S0140-6736(07)61050-2.
91. MacKie RM, Reid R, Junor B. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:567–568. doi:10.1056/NEJM200302063480620.
 92. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 2002;3:991–998. doi:10.1038/ni1102-991.
 93. Riemersma SA, Jordanova ES, Schop RF, et al. Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of HLA class II genes in B-cell lymphomas arising in immune-privileged sites. *Blood* 2000;96:3569–3577.
 94. 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;20:728–740. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.006.
 95. 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;125:1061–1072. doi:10.1182/blood-2014-11-610436.
 96. Diepstra A, Poppema S, Boot M, et al. HLA-G protein expression as a potential immune escape mechanism in classical Hodgkin's lymphoma. *Tissue Antigens* 2008;71:219–226. doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01005.x.
 97. Diepstra A, van Imhoff GW, Karim-Kos HE, et al. HLA class II expression by Hodgkin Reed-Sternberg cells is an independent prognostic factor in classical Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2007;25:3101–3108. doi:10.1200/JCO.2006.10.0917.
 98. Roberts RA, Wright G, Rosenwald AR, et al. Loss of major histocompatibility class II gene and protein expression in primary mediastinal large B-cell lymphoma is highly coordinated and related to poor patient survival. *Blood* 2006;108:311–318. doi:10.1182/blood-2005-11-4742.
 99. Frisan T, Levitsky V, Masucci MG. Variations in proteasome subunit composition and enzymatic activity in B-lymphoma lines and normal B cells. *Int. J. Cancer* 2000;88:881–888.
 100. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010;363:711–723. doi:10.1056/NEJMoa1003466.
 101. Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 2005;25:9543–9553. doi:10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005.
 102. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2015;126:2193–2201. doi:10.1182/blood-2015-02-629600.
 103. Laurent C, Charmpi K, Gravelle P, et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology* 2015;4:e1026530. doi:10.1080/2162402X.2015.1026530.
 104. Muenst S, Hoeller S, Willi N, et al. Diagnostic and prognostic utility of PD-1 in B cell lymphomas. *Dis. Markers* 2010;29:47–53. doi:10.3233/DMA-2010-0725.
 105. Tonino SH, van de Berg PJ, Yong SL, et al. Expansion of effector T cells associated with decreased PD-1 expression in patients with indolent B cell lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2012;53:1785–1794. doi:10.3109/10428194.2012.673224.
 106. Xerri L, Chetaille B, Serriari N, et al. Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Hum. Pathol.* 2008;39:1050–1058. doi:10.1016/j.humpath.2007.11.012.
 107. Gravelle P, Burroni B, Péricart S, et al. Mechanisms of PD-1/PD-L1 expression and prognostic relevance in non-Hodgkin lymphoma: a summary of immunohistochemical studies. *Oncotarget* 2017;8:44960–44975. doi:10.18632/oncotarget.16680.
 108. Georgiou K, Chen L, Berglund M, et al. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2016;127:3026–3034. doi:10.1182/blood-2015-12-686550.
 109. Hollander P, Kamper P, Smedby KE, et al. High proportions of PD-1+ and PD-L1+ leukocytes in classical Hodgkin lymphoma microenvironment are associated with inferior outcome. *Blood Adv.* 2017;1:1427–1439. doi:10.1182/bloodadvances.2017006346.
 110. Menter T, Bodmer-HaECKi A, DirnhofeR S, et al. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. *Hum. Pathol.* 2016;54:17–24. doi:10.1016/j.humpath.2016.03.005.
 111. Yamamoto W, Nakamura N, Tomita N, et al. Clinicopathological analysis of mediastinal large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma of the mediastinum. *Leuk. Lymphoma* 2013;54:967–972. doi:10.3109/10428194.2012.733881.
 112. Green MR, Monti S, Rodig SJ, et al. 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;116:3268–3277. doi:10.1182/blood-2010-05-282780.
113. Roemer MGM, Advani RH, Ligon AH, et al. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2016;34:2690–2697. doi:10.1200/JCO.2016.66.4482.
114. Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 2002;415:536–541. doi:10.1038/415536a.
115. Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* 2003;4:1093–1101. doi:10.1038/ni987.
116. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 2015;15:486–499. doi:10.1038/nri3862.
117. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, et al. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J. Exp. Med.* 2010;207:2175–2186. doi:10.1084/jem.20100637.
118. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, et al. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* 2010;207:2187–2194. doi:10.1084/jem.20100643.
119. Jin H-T, Anderson AC, Tan WG, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:14733–14738. doi:10.1073/pnas.1009731107.
120. Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol. Rev.* 2017;276:97–111. doi:10.1111/imr.12520.
121. Gautron A-S, Dominguez-Villar M, de Marcken M, et al. Enhanced suppressor function of TIM-3+ FoxP3+ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2014;44:2703–2711. doi:10.1002/eji.201344392.
122. Wiener Z, Kohalmi B, Pocza P, et al. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127:906–914. doi:10.1038/sj.jid.5700616.
123. Shang Y, Li Z, Li H, et al. TIM-3 expression in human osteosarcoma: Correlation with the expression of epithelial-mesenchymal transition-specific biomarkers. *Oncol. Lett.* 2013;6:490–494. doi:10.3892/ol.2013.1410.
124. Komohara Y, Morita T, Annan DA, et al. The Coordinated Actions of TIM-3 on Cancer and Myeloid Cells in the Regulation of Tumorigenicity and Clinical Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Immunol. Res.* 2015;3:999–1007. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0156.
125. Jan M, Chao MP, Cha AC, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011;108:5009–5014. doi:10.1073/pnas.1100551108.
126. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7:708–717. doi:10.1016/j.stem.2010.11.014.
127. Cao Y, Zhou X, Huang X, et al. Tim-3 expression in cervical cancer promotes tumor metastasis. *PLoS One* 2013;8:e53834. doi:10.1371/journal.pone.0053834.
128. Kang C-W, Dutta A, Chang L-Y, et al. Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3+CD8+ T cells in colon cancer. *Sci. Rep.* 2015;5:15659. doi:10.1038/srep15659.
129. Chiba S, Baghdadi M, Akiba H, et al. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat. Immunol.* 2012;13:832–842. doi:10.1038/ni.2376.
130. Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 2007;318:1141–1143. doi:10.1126/science.1148536.
131. Lee J, Su EW, Zhu C, et al. Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* 2011;31:3963–3974. doi:10.1128/MCB.05297-11.
132. Lee MJ, Woo M-Y, Chwae Y-J, et al. Down-regulation of interleukin-2 production by CD4(+) T cells expressing TIM-3 through suppression of NFAT dephosphorylation and AP-1 transcription. *Immunobiology* 2012;217:986–995. doi:10.1016/j.imbio.2012.01.012.
133. Clayton KL, Haaland MS, Douglas-Vail MB, et al. T cell Ig and mucin domain-containing protein 3 is recruited to the immune synapse, disrupts stable synapse formation, and associates with receptor phosphatases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2014;192:782–791. doi:10.4049/jimmunol.1302663.
134. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 2005;6:1245–1252. doi:10.1038/ni1271.

135. Yuan J, Jiang B, Zhao H, et al. Prognostic implication of TIM-3 in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma* 2013. doi:10.4149/neo_2014_006.
136. Zhou E, Huang Q, Wang J, et al. Up-regulation of Tim-3 is associated with poor prognosis of patients with colon cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8:8018–8027.
137. Piao Y-R, Piao L-Z, Zhu L-H, et al. Prognostic value of T cell immunoglobulin mucin-3 in prostate cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* 2013;14:3897–3901.
138. Yang M, Yu Q, Liu J, et al. T-cell immunoglobulin mucin-3 expression in bladder urothelial carcinoma: Clinicopathologic correlations and association with survival. *J. Surg. Oncol.* 2015;112:430–435. doi:10.1002/jso.24012.
139. Jiang J, Jin M-S, Kong F, et al. Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PLoS One* 2013;8:e81799. doi:10.1371/journal.pone.0081799.
140. Gravelle P, Do C, Franchet C, et al. Impaired functional responses in follicular lymphoma CD8+TIM-3+ T lymphocytes following TCR engagement. *Oncoimmunology* 2016;5:e1224044. doi:10.1080/2162402X.2016.1224044.
141. Workman CJ, Dugger KJ, Vignali DAA. Cutting edge: molecular analysis of the negative regulatory function of lymphocyte activation gene-3. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2002;169:5392–5395.
142. Woo S-R, Turnis ME, Goldberg MV, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* 2012;72:917–927. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.
143. Liang B, Workman C, Lee J, et al. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2008;180:5916–5926.
144. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2015;33:1974–1982. doi:10.1200/JCO.2014.59.4358.
145. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2015;372:311–319. doi:10.1056/NEJMoa1411087.
146. Younes A, Santoro A, Shipp M, et al. Nivolumab for classical Hodgkin's lymphoma after failure of both autologous stem-cell transplantation and brentuximab vedotin: a multicentre, single-arm phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17:1283–1294. doi:10.1016/S1470-2045(16)30167-X.
147. Armand P, Nagler A, Weller EA, et al. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2013;31:4199–4206. doi:10.1200/JCO.2012.48.3685.
148. Lesokhin AM, Ansell SM, Armand P, et al. Nivolumab in Patients With Relapsed or Refractory Hematologic Malignancy: Preliminary Results of a Phase Ib Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2016;34:2698–2704. doi:10.1200/JCO.2015.65.9789.
149. Witkowska M, Smolewski P. Immune Checkpoint Inhibitors to Treat Malignant Lymphomas. *J. Immunol. Res.* 2018;2018:1982423. doi:10.1155/2018/1982423.
150. Ansell SM, Hurvitz SA, Koenig PA, et al. Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2009;15:6446–6453. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1339.
151. Laurent C, Charmpi K, Gravelle P, et al. Several immune escape patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Oncoimmunology* 2015;4:e1026530. doi:10.1080/2162402X.2015.1026530.
152. Tosolini M, Algans C, Pont F, et al. Large-scale microarray profiling reveals four stages of immune escape in non-Hodgkin lymphomas. *Oncoimmunology* 2016;5:e1188246. doi:10.1080/2162402X.2016.1188246.
153. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, et al. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010;107:4275–4280. doi:10.1073/pnas.0915174107.
154. Daud AI, Loo K, Pauli ML, et al. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J. Clin. Invest.* 2016;126:3447–3452. doi:10.1172/JCI87324.
155. Roemer MGM, Redd RA, Cader FZ, et al. Major Histocompatibility Complex Class II and Programmed Death Ligand 1 Expression Predict Outcome After Programmed Death 1 Blockade in Classic Hodgkin Lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2018;36:942–950. doi:10.1200/JCO.2017.77.3994.
156. Ngiow SF, von Scheidt B, Akiba H, et al. Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN- γ -mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *Cancer Res.* 2011;71:3540–3551. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0096.

**ETUDE DE L'IMMUNO-ÉCHAPPEMENT DANS LE LYMPHOME DE HODGKIN ET LE LYMPHOME B DIFFUS A GRANDES CELLULES :
Approches bio-informatiques, moléculaires et immunohistochimiques.**

RESUME EN FRANÇAIS :

Les traitements anti-PD-1 ont récemment montré des résultats prometteurs dans le lymphome de Hodgkin (LH) réfractaire et dans certains lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC). Dans l'objectif de développer de nouveaux bio-marqueurs prédictifs de la réponse thérapeutique, nous avons récemment développé un score transcriptionnel pour évaluer l'amplitude de l'immuno-échappement (IE) dans les lymphomes non-hodgkiniens. Dans ce travail, nous avons utilisé cette méthode pour étudier l'IE dans le LH. Ainsi à partir d'une méta-analyse de plus de 1000 transcriptomes nous avons observé que les LH sont caractérisés par un stade d'IE avancé avec un enrichissement de gènes impliqués à la fois dans l'IE et dans l'activation lymphocytaire. De plus, la quantification des populations immunitaires par déconvolution profonde sur les données transcriptomiques et par étude immunohistochimique sur tissus a mis en évidence une différence d'infiltration immunitaire entre les lymphomes. Les LH et LBDGC non-germinal center (non-GC) partagent une forte infiltration en LT CD8⁺ comparativement aux LBDGC GC. Par ailleurs, les LH sont enrichis en LT CD4⁺ et appauvris en macrophages CD163⁺ comparativement aux LBDGC non-GC. Enfin, les LH expriment plus fréquemment PD-L1 et LAG-3. Au total, cette étude a mis en évidence un profil d'IE et d'infiltration immunitaire spécifique dans le LH en accord avec l'efficacité des traitements bloqueurs des points de contrôle immunitaire.

TITRE EN ANGLAIS: A specific pattern of immune escape pathways in Hodgkin lymphoma

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : lymphome, immuno-échappement, lymphome de Hodgkin, immune-checkpoints, TIM-3, datamining.

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :
Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directeur de thèse : Pr Camille LAURENT