



HAL
open science

L'absence d'expression de PD-L1 par les cellules lymphomateuses et un nombre élevé de lymphocytes CD8+ au sein du microenvironnement tumoral sont corrélés à une meilleure survie globale

Antoine Max

► To cite this version:

Antoine Max. L'absence d'expression de PD-L1 par les cellules lymphomateuses et un nombre élevé de lymphocytes CD8+ au sein du microenvironnement tumoral sont corrélés à une meilleure survie globale. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01932241

HAL Id: hal-01932241

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932241>

Submitted on 23 Nov 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

2016

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement
dans le cadre du troisième cycle de Médecine Générale ou
Médecine Spécialisée

par

Antoine MAX

Le 20/09/2016

L'absence d'expression de PD-L1 par les cellules lymphomateuses et un nombre élevé de lymphocytes CD8+ au sein du microenvironnement tumoral sont corrélés à une meilleure survie globale dans les syndromes de Richter de variant lymphome B diffus à grandes cellules.

Membres du jury :

M. le Professeur Jean-Michel VIGNAUD.	Président
M. le Professeur Pierre FEUGIER.	Juge
M. le Professeur Guillaume GAUCHOTTE.	Juge
Mme le Docteur Claire BASTIEN.	Juge



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**



FACULTÉ DE MÉDECINE
NANCY

**Président de l'Université de Lorraine :
Professeur Pierre MUTZENHARDT**

**Doyen de la Faculté de Médecine
Professeur Marc BRAUN**

Vice-doyens

Pr Karine ANGIOI-DUPREZ, Vice-Doyen

Pr Marc DEBOUVERIE, Vice-Doyen

Assesseurs :

Premier cycle : Dr Guillaume GAUCHOTTE

Deuxième cycle : Pr Marie-Reine LOSSER

Troisième cycle : Pr Marc DEBOUVERIE

Innovations pédagogiques : Pr Bruno CHENUÉL

Formation à la recherche : Dr Nelly AGRINIER

Animation de la recherche clinique : Pr François ALLA

Affaires juridiques et Relations extérieures : Dr Frédérique CLAUDOT

Vie Facultaire et SIDES : Pr Laure JOLY

Relations Grande Région : Pr Thomas FUCHS-BUDER

Etudiant : M. Lucas SALVATI

Chargés de mission

Bureau de docimologie : Dr Guillaume VOGIN

Commission de prospective facultaire : Pr Pierre-Edouard BOLLAERT

Orthophonie : Pr Cécile PARIETTI-WINKLER

PACES : Dr Chantal KOHLER

Plan Campus : Pr Bruno LEHEUP

International : Pr Jacques HUBERT

=====
DOYENS HONORAIRES

Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER

Professeur Henry COUDANE

=====
PROFESSEURS HONORAIRES

Etienne ALIOT - Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Jean AUQUE - Gérard BARROCHE
Alain BERTRAND - Pierre BEY - Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL - Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY
Michel BOULANGE - Jean-Louis BOUTROY - Serge BRIANÇON - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL
Claude CHARDOT - Jean-François CHASSAGNE - François CHERRIER Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY
Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS - Jean DUHEILLE - Jean-Bernard DUREUX - Gilbert FAURE - Gérard FIEVE
Jean FLOQUET - Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Alain GERARD - Hubert GERARD
Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ - Gilles GROSDIDIER - Oliéro GUERCI - Philippe HARTEMANN
Gérard HUBERT - Claude HURIET Christian JANOT - Michèle KESSLER - François KOHLER - Jacques LACOSTE
Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Alain LE FAOU - Jacques LECLERE
Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Philippe MANGIN - Jean-Claude MARCHAL - Pierre MATHIEU
Michel MERLE - Pierre MONIN Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis PENIN - Gilbert PERCEBOIS
Claude PERRIN - Luc PICARD - François PLENAT - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL - Jean PREVOT - Francis RAPHAEL
Antoine RASPILLER - Denis REGENT - Michel RENARD - Jacques ROLAND - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT
Michel SCHWEITZER - Daniel SIBERTIN-BLANC - Claude SIMON - Danièle SOMMELET - Jean-François STOLTZ
Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Gérard VAILLANT - Paul VERT - Hervé VESPIGNANI - Colette VIDAILHET
Michel VIDAILHET - Jean-Pierre VILLEMOT - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Etienne ALIOT - Professeur Gérard BARROCHE - Professeur Pierre BEY - Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Alain GERARD - Professeure Michèle KESSLER – Professeur François KOHLER
Professeur Jacques LECLÈRE - Professeur Alain LE FAOU - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ
Professeure Simone GILGENKRANTZ – Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Philippe HARTEMANN
Professeur Alain LE FAOU - Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur François PLENAT
Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC - Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Paul VERT
Professeur Michel VIDAILHET

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Professeur Marc BRAUN – Professeure Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (Histologie, embryologie et cytogénétique)

Professeur Christo CHRISTOV– Professeur Bernard FOLIGUET

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Professeur Jean-Michel VIGNAUD – Professeur Guillaume GAUCHOTTE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Professeur René ANXIONNAT - Professeur Alain BLUM - Professeur Serge BRACARD - Professeur Michel CLAUDON

Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT - Professeur Jacques FELBLINGER

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Professeur Jean-Louis GUEANT - Professeur Bernard NAMOUR - Professeur Jean-Luc OLIVIER

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Professeur Christian BEYAERT - Professeur Bruno CHENUUEL - Professeur François MARCHAL

4^{ème} sous-section : (Nutrition)

Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT - Professeur Olivier ZIEGLER

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)

Professeur Alain LOZNIIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et Mycologie)

Professeure Marie MACHOUART

3^{ème} sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)

Professeur Thierry MAY - Professeure Céline PULCINI - Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)

Professeur François ALLA - Professeur Francis GUILLEMIN - Professeur Denis ZMIROU-NAVIER

3^{ème} sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)

Professeure Eliane ALBUISSON - Professeur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur Thierry CONROY - Professeur François GUILLEMIN - Professeur Didier PEIFFERT - Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT – Professeure Marie-Thérèse RUBIO

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX - Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie-réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Gérard AUDIBERT - Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Thomas FUCHS-BUDER
Professeure Marie-Reine LOSSER - Professeur Claude MEISTELMAN

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Sébastien GIBOT - Professeur Bruno LÉVY

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Pierre GILLET - Professeur Jean-Yves JOUZEAU - Professeur Patrick NETTER

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE - Professeur Patrick ROSSIGNOL - Professeur Faiez ZANNAD

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Marc DEBOUVERIE - Professeur Louis MAILLARD - Professeur Luc TAILLANDIER - Professeure Louise TYVAERT

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean AUQUE - Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS - Professeur Olivier KLEIN

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN - Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE - Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Laurent GALOIS - Professeur Didier MAINARD - Professeur Daniel MOLE - Professeur François SIRVEAUX

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Jean-François CHABOT - Professeur Ari CHAOUAT - Professeur Yves MARTINET

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Edoardo CAMENZIND - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET - Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Thierry FOLLIGUET - Professeur Juan-Pablo MAUREIRA

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Sergueï MALIKOV - Professeur Denis WAHL - Professeur Stéphane ZUILY

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI - Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeur Luc FRIMAT - Professeure Dominique HESTIN

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Pascal ESCHWEGE - Professeur Jacques HUBERT

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE, CHIRURGIE GÉNÉRALE ET MÉDECINE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie)

Professeur Athanase BENETOS - Professeur Jean-Dominique DE KORWIN - Professeure Gisèle KANNY

Professeure Christine PERRET-GUILLAUME - Professeur Roland JAUSSAUD - Professeure Laure JOLY

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Ahmet AYAV - Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD

3^{ème} sous-section : (Médecine générale)

Professeur Jean-Marc BOIVIN - Professeur Paolo DI PATRIZIO

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET - Professeur Jean-Michel HASCOET
Professeur Emmanuel RAFFO - Professeur Cyril SCHWEITZER

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Pierre JOURNEAU - Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Philippe JUDLIN - Professeur Olivier MOREL

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Bruno GUERCI - Professeur Marc KLEIN - Professeur Georges WERYHA

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Roger JANKOWSKI - Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

Professeure Karine ANGIOI - Professeur Jean-Paul BERROD - Professeur Jean-Luc GEORGE

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)

Professeure Muriel BRIX

=====
PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER

=====
PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur associé Sophie SIEGRIST

=====
MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON

2^{ème} sous-section : (Histologie, embryologie et cytogénétique)

Docteure Chantal KOHLER

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)

Docteur Damien MANDRY - Docteur Pedro TEIXEIRA

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA - Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN

Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteur Marc MERTEN - Docteur Abderrahim OUSSALAH

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteure Silvia DEMOULIN-ALEXIKOVA - Docteur Mathias POUSSEL

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)

Docteure Corentine ALAUZET - Docteure Hélène JEULIN - Docteure Véronique VENARD

2^{ème} sous-section : (Parasitologie et mycologie)

Docteure Anne DEBOURGOGNE

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (Epidémiologie, économie de la santé et prévention)

Docteure Nelly AGRINIER - Docteur Cédric BAUMANN - Docteure Frédérique CLAUDOT - Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE

2^{ème} sous-section (Médecine et Santé au Travail)

Docteure Isabelle THAON

3^{ème} sous-section (Médecine légale et droit de la santé)

Docteur Laurent MARTRILLE

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (Hématologie ; transfusion)

Docteure Aurore PERROT – Docteur Julien BROSEUS (stagiaire)

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Docteure Lina BOLOTINE – Docteur Guillaume VOGIN (stagiaire)

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Docteure Céline BONNET - Docteur Christophe PHILIPPE

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; Médecine d'urgence)

Docteur Antoine KIMMOUN

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Docteur Nicolas GAMBIER - Docteure Françoise LAPICQUE - Docteur Julien SCALA-BERTOLA

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; Médecine d'urgence ; addictologie)

Docteur Nicolas GIRERD

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Docteure Anne-Christine RAT

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénérologie)

Docteure Anne-Claire BURSZTEJN

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire)

Docteur Fabrice VANHUYSE

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Docteur Jean-Baptiste CHEVAUX

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE, CHIRURGIE GÉNÉRALE ET MÉDECINE GÉNÉRALE

3^{ème} sous-section : (Médecine générale)

Docteure Elisabeth STEYER

54^{ème} Section : DEVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

5^{ème} sous-section : (Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale)

Docteure Isabelle KOSCINSKI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-Rhino-Laryngologie)

Docteur Patrice GALLET

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES

Monsieur Vincent LHUILLIER

7^{ème} Section : SCIENCES DU LANGAGE : LINGUISTIQUE ET PHONETIQUE GÉNÉRALES

Madame Christine DA SILVA-GENEST

19^{ème} Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

60^{ème} Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL

Monsieur Alain DURAND

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS - Monsieur Nick RAMALANJAONA - Monsieur Pascal REBOUL

65^{ème} Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Madame Nathalie AUCHET - Madame Natalia DE ISLA-MARTINEZ - Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Céline HUSELSTEIN - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE - Monsieur Christophe NEMOS

66^{ème} Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

=====
MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteur Pascal BOUCHE – Docteur Olivier BOUCHY - Docteur Arnaud MASSON – Docteur Cédric BERBE
Docteur Jean-Michel MARTY

=====
DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)

Professeure Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIËTNAM)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)
Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)
Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

REMERCIEMENTS

A mon président de thèse,
Monsieur le Professeur Jean-Michel VIGNAUD.

Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de m'avoir accueilli dans votre service. Votre encadrement, votre savoir et l'ambiance chaleureuse qui règne dans votre service ont participé à mon épanouissement dans l'exercice de l'anatomopathologie. Merci de me faire confiance pour le clinicat.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Claire BASTIEN.

Merci d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail et de m'avoir guidé dans sa rédaction. Merci également pour ta disponibilité, ton soutien, ta gentillesse, tes conseils pertinents et le précieux savoir que tu as su transmettre à mon égard tout au long de mon internat.

A Monsieur le Professeur Pierre FEUGIER.

Merci d'avoir accepté de juger mon travail et de faire partie de mon jury de thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de mon respect et ma plus grande estime.

A Monsieur le Professeur Guillaume GAUCHOTTE.

Merci d'avoir accepté de juger mon travail et de faire partie de mon jury de thèse. C'est un réel plaisir d'avoir travaillé à tes côtés et de continuer à le faire à l'avenir. Merci pour ton soutien et ta disponibilité dans la réalisation et la correction de ce travail.

A tous les médecins qui ont contribué à ma formation et en particulier :

Madame le docteur Jacqueline CHAMPIGNEULLE, pour l'apprentissage rigoureux et la bienveillance dont vous faites preuve. Je suis heureux de pouvoir travailler à vos côtés.

Madame le docteur Béatrice MARIE, merci pour votre précieux enseignement lors de mes deux semestres à l'hôpital central.

Au docteur Charlène VIGOUROUX, merci pour ta bonne humeur, ta disponibilité et ton enseignement quotidien.

Madame le docteur Agnès LEROUX, merci pour votre enseignement lors de mon premier semestre en anatomopathologie.

Aux autres médecins de l'institut de cancérologie de Lorraine : Madame le docteur Catherine BARLIER, Monsieur le docteur Pascal GENIN, Mademoiselle le docteur Colette MIGEON, Monsieur le docteur Claude DEPARDIEU et à toute l'équipe technique et aux secrétaires de l'ICL.

A tous les médecins du centre de pathologie Emile Gallé : les docteurs LEROUX, BEUREY, KIRCHNER, OUNNOUGHENE, VINOT, HUSSON, HURIET, NODARI, HENNEQUIN et MONTAGNE pour votre accueil et votre enseignement lors de mon semestre passé dans votre laboratoire.

Mesdames et messieurs les secrétaires et techniciens des laboratoires d'Anatomopathologie des hôpitaux de Brabois et central. Merci pour votre collaboration à la bonne réalisation de ce travail et au quotidien.

L'ensemble du personnel de la plateforme de biologie moléculaire en particulier Madame Sylviane PIZZAGALI pour m'avoir aidé en biologie moléculaire.

A madame le Professeur Eliane ALBUISSON, pour son aide dans l'analyse statistique de ce travail.

A toute ma famille et en particulier :

A mes parents, pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix personnels et professionnels, et toujours avoir été là dans les moments difficiles et surtout dans les moments heureux.

A mon grand frère, pour ton soutien et ton amour depuis bientôt 30 ans, tous mes vœux de bonheur au futur papa.

A ma grande sœur pour ton amour et ton soutien infailible dans les moments tristes et surtout pour tous les bonheurs partagés.

A mes nièces, Lucie et Zia pour votre joie communicative et vos sourires qui m'ont toujours fait craquer.

A ma grand-mère Nénette pour sa gentillesse et son hospitalité pendant toutes ces années.

A mes grands-parents qui me manquent : Grand-père Henri, grand-mère Marilou et pépé Jeannot.

A ma tante Annie partie trop tôt.

A Amale, merci pour ton soutien sans faille, ta gentillesse et ton amour, merci d'accepter de devenir ma femme et de me couvrir de bonheur au quotidien.

A tous les autres...

Merci à mes amis,

JB, Manieu, Gourmi, Noreil, Stouf, d'avoir partagé ces moments depuis le lycée voire le collège, les soirées, les week-ends sportifs ou vidéos ludiques, les foots kamikazes, le japon, les roulettes mexicaines, les rodéos lampadaires, les Nouvel an et d'avoir toujours été là dans les moments importants.

Aux filles bien sûr, Servane, Charlène, Lise, Elise de nous avoir toujours supportés et d'avoir toujours partagé nos fous rires et nos vies et de continuer à le faire encore longtemps.

A Olivier, pour ton humour, ta joie et tous les moments souvent trop courts passés ensemble.

Aux belles rencontres de mon internat,

Mathieu, pour notre complicité et nos galères pendant ce semestre en pneumologie.

Dimitri, pour nos soirées cinéma hautement culturelles et ta sympathie.

Marion et Nico, pour ce super semestre en génétique, pour vos délires et votre bonne humeur.

A mes collègues d'anapath,

Hélène pour ta rigueur, ton enseignement et tes moments de folie, je suis heureux de travailler à tes côtés.

Jacques, Celso, Clémence, Stéphane et Mikael pour les semestres passés ensemble.

A ceux avec qui je n'ai pas eu la chance d'être en stage, Jean-Mathieu, Charlie (Docteur commerce), Céline, Catherine, Mathilde.

A toute l'équipe sportive du laboratoire de biologie-baby-billard.

A tous ceux que j'oublie.

A tous, je dédie cette thèse.

SERMENT

« **A**u moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque ».

Table des matières

INTRODUCTION.....	16
I. Lymphomes B diffus à grandes cellules.....	16
1. Clinique.....	16
2. Morphologie.....	17
3. Immunohistochimie.....	18
4. Facteurs pronostiques.....	18
II. Leucémie lymphoïde chronique.....	30
1. Epidemiologie:.....	30
2. Facteurs de risque :.....	30
3. Symptômes:.....	30
4. Diagnostic.....	31
5. Morphologie et immunohistochimie :.....	31
6. Facteurs pronostiques.....	32
III. Syndrome de Richter.....	34
1. Facteurs prédisposant à une transformation en Richter.....	34
2. Histologie :.....	35
3. Facteurs pronostiques dans le syndrome de Richter.....	36
OBJECTIFS DE L'ETUDE :.....	38
ARTICLE.....	39
TABLES AND FIGURES.....	56
CONCLUSION.....	66
I. Données significatives.....	66
II. Autres données.....	67
III. Limites et perspectives.....	70
BIBLIOGRAPHIE.....	71
ANNEXES.....	77

INTRODUCTION

Le terme de lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) a été introduit en 1995 dans la classification de REAL(1) (Revised European American Lymphoma classification) et conservé ensuite dans la classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) 2008(2). Ces hémopathies appartiennent aux Lymphomes Non Hodgkinien (LNH). L'étiologie des LBDGC n'est pas connue, ils surviennent habituellement « de novo » (primaire) ou dans le cadre d'une transformation (secondaire) d'un lymphome B indolent, de type LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique ou lymphome lymphocytaire), lymphome folliculaire, lymphome lympho-plasmocytaire ou lymphome de la zone marginale.

I. LYMPHOMES B DIFFUS À GRANDES CELLULES.

1. Clinique.

Le LBDGC NOS (Not Otherwise Specified) représente le LNH le plus fréquent chez l'adulte dans les populations occidentales avec une prévalence de 25 à 30% parmi les LNH(2) (3).

Il s'agit de lymphomes agressifs dont l'âge moyen de survenue est de 70 ans mais il touche également les enfants et les jeunes adultes. On note une prédominance masculine à l'exception du lymphome à grandes cellules B du médiastin.

Les patients présentent habituellement une masse tumorale ganglionnaire de croissance rapide, la localisation étant extra ganglionnaire dans 40% des cas (avec une atteinte préférentielle du tractus gastro-intestinal et cutanée mais toutes les localisations sont possibles).

Les signes généraux sont communs aux LNH de type B, correspondant aux

« Symptômes B » ou « symptômes systémiques » :

- Fièvre inexpliquée pendant plusieurs semaines.
- Sueurs nocturnes
- Perte de poids inexpliquée

Enfin il peut s'y associer des symptômes liés à la localisation :

- Thoracique : Toux, essoufflement
- Abdominale : Douleurs, nausées, vomissements, diarrhées, saignements +/- anémie, perte d'appétit.
- Cérébrale : Céphalées, épilepsie, troubles du comportement.
- Moelle hématopoïétique : Cytopénie, infections, saignements.
- Cutanés : Plaques rouges, squames.

2. Morphologie.

Le LBDGC NOS est caractérisé par une prolifération diffuse de cellules lymphoïdes de grandes tailles au sein d'un ganglion dont l'architecture est effacée totalement ou parfois partiellement. Elle s'accompagne parfois d'un stroma scléreux. La nécrose est fréquente.

Trois variantes histologiques majeures(4) et quelques variantes plus rares sont classiquement décrites. (Figure 1) Cependant la distinction entre ces formes n'est pas toujours reproductible.

Variantes majeures :

- La forme centroblastique est la plus fréquente, se définissant par une population lymphomateuse à majorité de centroblastes, cellules de taille moyenne à grande, arrondies, à noyau vésiculeux présentant 2 à 4 nucléoles. Le cytoplasme est de faible abondance basophile ou amphophile. La tumeur peut être monomorphe (composée de plus de 90 % de centroblastes) ou le plus souvent polymorphe (moins de 90 % de centroblastes mêlés à des immunoblastes). Rarement, les cellules présentent des noyaux multilobés pouvant rendre le diagnostic difficile notamment dans les formes extra ganglionnaires (osseuses ou médiastinales).
- La forme immunoblastique est définie par la présence de plus de 90 % d'immunoblastes lymphomateux, cellules de grande taille présentant un noyau volumineux avec un nucléole central bien visible. Le cytoplasme est plus abondant et basophile. La distinction avec un plasmocytome peut être difficile.
- La forme anaplasique(5) est constituée de cellules lymphomateuses de grandes tailles arrondies ou polygonales présentant un pléomorphisme important, avec des formes multinucléées ou multilobées pouvant rappeler les cellules de Reed-Sternberg.

Variantes plus rares :

- Formes à cellules en bagues à chatons, micro villeuse, myxoïde, à pseudo-rosettes, à cellules fusiformes, à cellules claires.

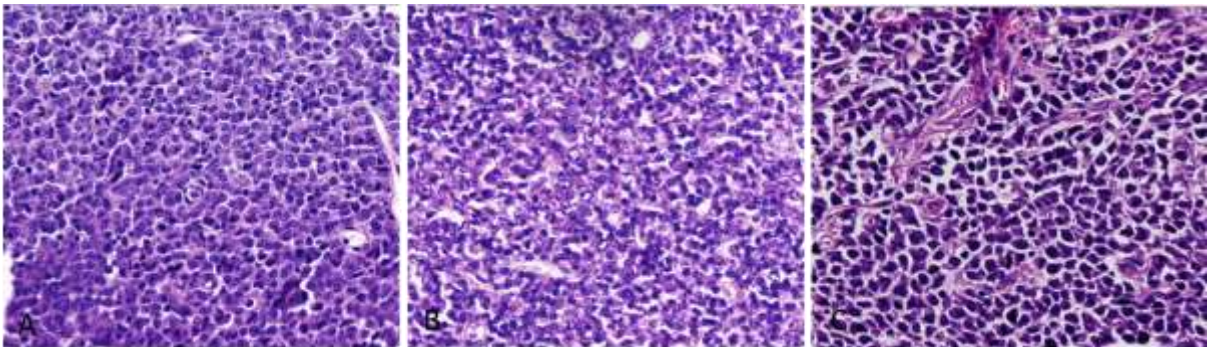


Figure 1. Trois variantes principales de LBDGC (HES x 40) : A. Variante immunoblastique ; B. Variante centroblastique ; C. Variante anaplasique.

3. Immunohistochimie

Le diagnostic histopathologique est confirmé par l'étude immunohistochimique. Les cellules lymphomateuses expriment les antigènes des lymphocytes B: CD 19 (Cluster de Différenciation), CD 20, CD22, CD79a, PAX5 (Pair Box protein 5) ainsi que les immunoglobulines de surfaces IgM, IgG, et plus rarement IgA(2).

Une expression de CD 10 est retrouvée dans 40% des cas, CD5 dans 10% des cas.

BCL 6 (B-cell lymphoma 6 protein) est exprimé dans 60 à 90% des cas, BCL2 (B-cell lymphoma 2 protein) dans 50%.

IRF4/Mum1 (Multiple Myeloma oncogen 1) dans 35 à 65% des cas.

De nouveaux anticorps ont été utilisés ces dernières années, permettant de mieux classer ces lymphomes ou à visée pronostique :

MYC (rabbit monoclonal antibody Y69).

FOXP1 (Forkhead box protein P1)

GCET1 (germinal center B cell-expressed transcript-1)

LM02 (LIM domain only 2)

BCL10 (B-cell lymphoma 10 protein)

CXCR2 (C-X-C motif receptor 2)

PD-1 (programmed death 1)

Nous décrivons l'intérêt de ces différents anticorps dans les chapitres suivants.

4. Facteurs pronostiques.

Le LBDGC est un lymphome agressif qui présente une issue fatale lorsqu'il n'est pas traité avec une mortalité proche de 100% à 2 ans.

En 1975, l'arrivée de la chimiothérapie CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, et Prednisone) a permis d'offrir une survie sans récurrence prolongée dans 40 à 50% des cas.

A la fin des années 90, l'emploi du Rituximab en association (R-CHOP) a permis d'augmenter encore la survie sans récurrence de 20%(6) (7) (8).

i. Clinique

Le score IPI(9) (International Prognostic Index) (tableau 3 et figure 2) est actuellement l'un des facteurs pronostiques les plus puissants. Il permet de classer les patients selon 4 classes :

Risque faible, intermédiaire faible, intermédiaire élevé et élevé de pronostic défavorable.

Il dépend de plusieurs facteurs : le taux de lactate déshydrogénase (LDH), l'âge, le Performans Status (PS) (tableau 1), le stade d'Ann Arbor(9) (tableau 2), et le nombre de sites extra-nodaux atteints. Pour certains lymphomes et notamment les LBDGC, la problématique du traitement par R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, et prednisone) a conduit à réaliser un score plus adapté intitulé R-IPI(10) (revised International Prognostic Index) qui individualise seulement 3 niveaux de risque : Très favorable, favorable et pauvre (tableau 3 et figure 2).

Score	Activité
0	Capable d'une activité identique à celle précédant la maladie, sans aucune restriction
1	Activité physique diminuée mais ambulatoire et capable de mener un travail
2	Ambulatoire et capable de prendre soin de soi, incapable de travailler. Alité moins de 50 % de son temps
3	Capable de seulement quelques soins personnels. Alité ou en chaise plus de 50 % du temps
4	Incapable de prendre soin de lui-même, alité ou en chaise en permanence

Tableau 1. Performans status (PS)

Stade I	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire. IE : Atteinte localisée d'un seul territoire extra ganglionnaire.
Stade II	Atteinte de deux ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme. IIE : Atteinte Extra ganglionnaire unique avec une ou plusieurs aires ganglionnaires du même côté du diaphragme.
Stade III	Atteinte ganglionnaire des deux côtés du diaphragme. IIIS : Avec atteinte splénique. IIIE : Avec atteinte extra ganglionnaire localisée.
Stade IV	Atteinte viscérale (foie, poumon, moelle, os) avec au moins une atteinte ganglionnaire, ou atteinte médullaire.

Tableau 2. Classification d'Ann Arbor

Index général	Paramètres
1	Age > 60 ans
1	PS 2-4
1	Stade Ann Arbor III-IV
1	LDH élevées
1	Plus d'un site extra ganglionnaire atteint

Nombre de facteurs de risques	Groupe de risque Score traditionnel (IPI)	Nombre de facteurs de risques	Groupe de risque score modifié (R-IPI)
0-1	Faible	0	Très favorable
2	Intermédiaire faible	1, 2	Favorable
3	Intermédiaire élevé		
4-5	Élevé	3, 4, 5	Pauvre

Tableau 3. Scores IPI et R-IPI

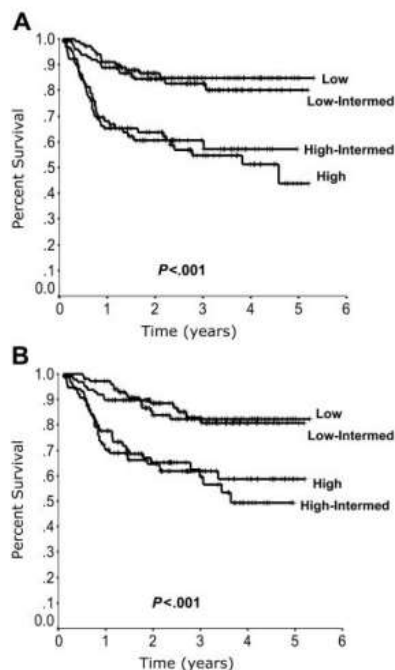


Figure 2. Outcome according to the standard International Prognostic Index (IPI). Progression-free survival (A) and overall survival (B) according to the standard IPI.

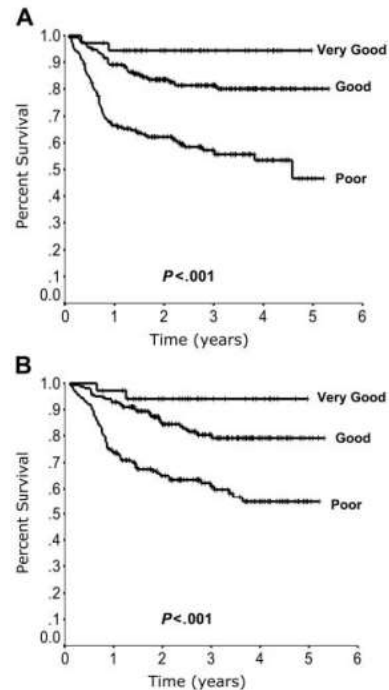


Figure 4. Outcome according to the revised International Prognostic Index (R-IPI). Progression-free survival (A) and overall survival (B) according to the R-IPI.

Figure 2. Courbes de survies des patients atteints d'un LBDGC de novo en fonction des scores IPI et R-IPI(10).

Certaines études ont montré que le sous-type centroblastique semble de meilleur pronostic que la variante immunoblastique(11), cependant les critères de distinction entre les deux entités sont sujets à une grande variabilité inter-observateur et d'autres études n'ont pas permis de reproduire ces résultats.

Le micro environnement c'est-à-dire la population cellulaire accompagnant la prolifération tumorale semble avoir un impact pronostic. Le faible pourcentage de lymphocytes T CD8+ (<6%) et la présence de plus de 15% de lymphocytes T cytotoxiques granzyme B positifs sont corrélés à des lymphomes plus agressifs(12).

ii. Cytogénétique

a. Proto-oncogènes

L'étude des oncogènes C-MYC, BCL2 et BCL6 a été réalisée par de nombreuses équipes(13). La translocation du gène C-MYC constitue un facteur de mauvais pronostic admis. Cependant une étude récente sur 51 cas de lymphomes B diffus réarrangés pour MYC a démontré que ce réarrangement était de mauvais pronostic uniquement avec le gène de la chaîne lourde des immunoglobulines comme partenaire(14).

L'impact des translocations BCL2 et BCL6 reste discuté.

Certains lymphomes, appelés lymphomes « double hit » ou « triple hit » présentent une translocation double ou triple impliquant les gènes MYC BCL2 et BCL6. Ces lymphomes présentent un comportement plus agressif que les autres LBDGC (figure 3).

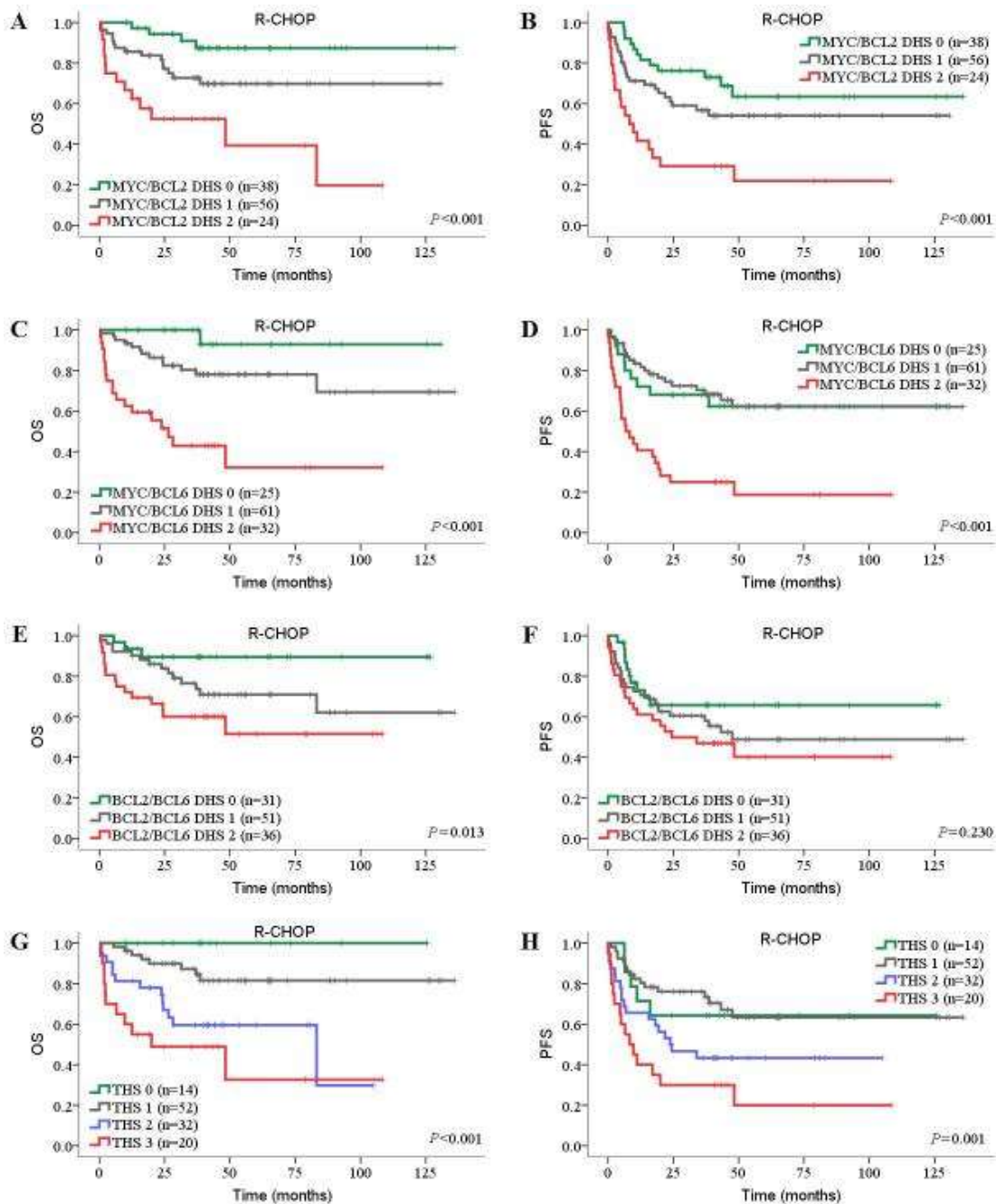


Figure 3. Courbes de survie en fonction des translocations des gènes Myc/BCL2/BCL6 (13)

b. Sous-classification moléculaire des LBDGC.

Grâce aux récents progrès des études du profil d'expression génique, 3 sous-groupes ont été décrits parmi les LBDGC(15) : le premier constitue le groupe GC (Germinal Center) (45-50%) provenant de cellules du centre germinatif, le deuxième nommé ABC (Activated B Cell) et un troisième, correspondant à des profils non semblables aux deux premiers.

Le type ABC et les types 3 sont regroupés sous le terme « non-GC ».

La morphologie de ces sous-groupes est identique malgré la présence d'anomalies cytogénétiques différentes.

La translocation BCL2 (14,18), l'amplification de c-rel (proto-oncogène jouant dans la prolifération cellulaire via la voie NF kappa B) et les gains chromosomiques 1q, 2p, 7q, 12q12 sont plus fréquents dans le sous-type GC alors que la translocation BCL6 et les gains chromosomiques de 3q, 18q21 et les pertes chromosomiques de 6q21 sont fréquemment individualisés dans le sous-type non-GC.

Le sous-type GC est de meilleur pronostic que le sous-type non GC et ce indépendamment du score IPI (figure 4).

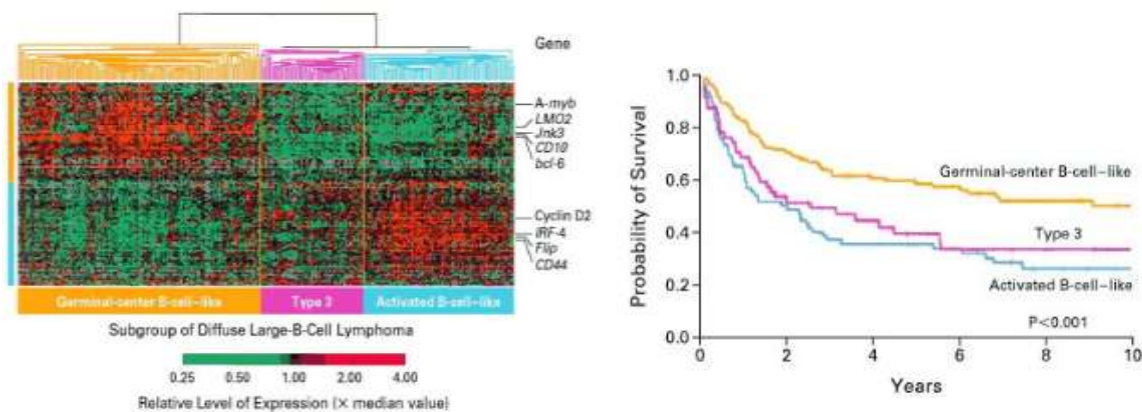


Figure 4. Profil génétique des 3 sous-groupes et courbes de survies. (16)

Cependant certaines études ont montré qu'à l'intérieur de chaque sous-groupe il existait une hétérogénéité de survie des patients. Celle-ci est fortement corrélée à la mise en évidence d'autres profils moléculaires (Figure 5), ainsi Rosenwald et al. utilisent l'association de 4 signatures génétiques et de BMP6 (Bone Morphogenetic Proteins) (16) : GCB (pronostic favorable), MHC (major histocompatibility complex) class II (favorable), lymph node (favorable), prolifération (défavorable) et BMP6 (défavorable).

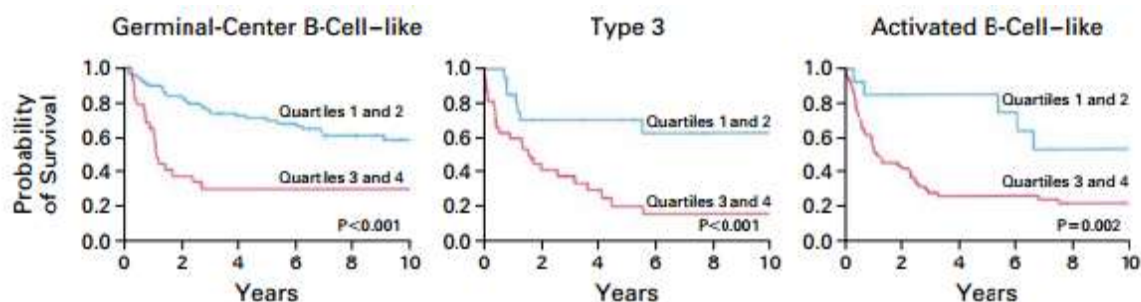


Figure 5. Analyse de survie des 3 sous-groupes, stratification par quartile selon les 4 signatures génétiques et BMP6(16).

c. Délétion de CDKN2A (cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A)

CDKN2A est un gène codant pour deux protéines(17) p16 et p14 de type « suppresseur de tumeur ».

En 2010 Fabrice Jardin et al. ont réalisé une étude en PCR assay des gènes P53, CDKN2A, CDKN1B, BCL2, MYC, REL, et RB1(18).

La délétion de CDKN2A (retrouvée dans 35 % des cas) apparaît comme un facteur péjoratif avec une survie diminuée dans le groupe de patients présentant cette altération.

d. Perte de P53 :

P53 est une protéine liée à la régulation du cycle cellulaire ayant un rôle dans l'apoptose et la réparation des anomalies de l'ADN lors de la mitose.

L'étude de F.Jardin et al. souligne également la délétion de p53 comme un facteur péjoratif dans les LBDGC mais apparait en proportion plus faible (8% des patients).

iii. Immunohistochimie

a. Algorithmes

La subdivision des LBDGC en 2 sous-types GC et non GC a conduit à la recherche d'algorithmes utilisant des anticorps en immunohistochimie permettant de se rapprocher de l'analyse en biologie moléculaire.

L'algorithme de Hans est le plus fréquemment utilisé(19), il repose sur l'expression protéique de CD10, BCL6 et MUM1 au sein des cellules lymphomateuses.

Différentes études plus récentes ont permis de développer de nouveaux algorithmes plus ou moins concordants avec le profilage génétique. Ils reposent sur de nouveaux marqueurs tels que FOXP1, GCET1 et LM02.

Les plus remarquables sont les algorithmes de Choi(20) et de Tally(21), ce dernier présentant le taux de concordance avec le profil moléculaire le plus élevé dans plusieurs études (93%) (Figure 6 et tableau 4).

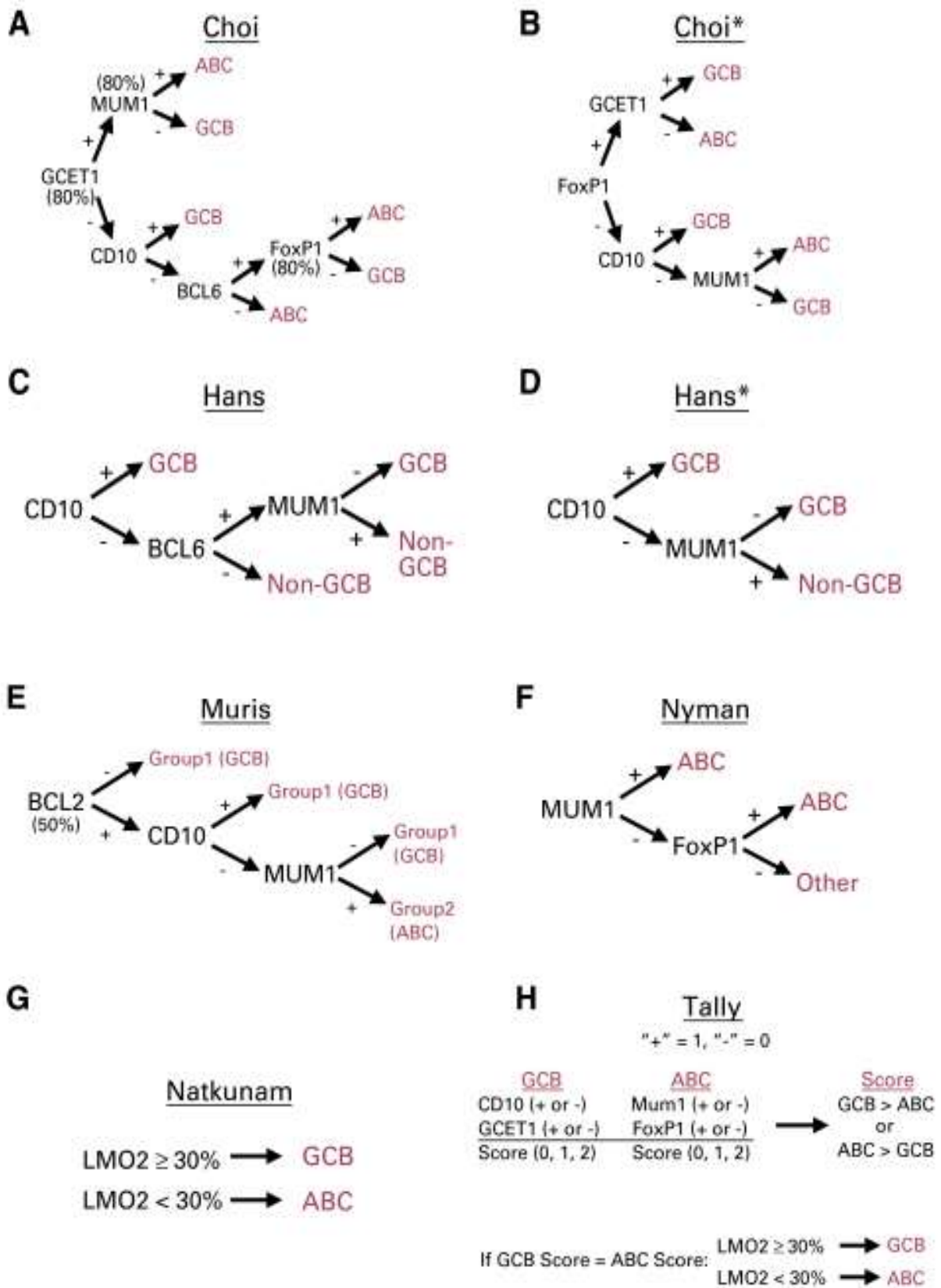


Figure 6. 6 exemples d'algorithmes testés lors de l'étude de Meyer et al(21) permettant de classer en immunohistochimie les LBDGC en sous-type GC et sous type non-GC.

Table 2. Results for Each Algorithm Adjusted for IPI											
Algorithm and IPT	No.	Conc (%)	Sens (%)	Spec (%)	PPV (%)	NPV (%)	Survival (n)	EFS		OS	
								HR	95% CI	HR	95% CI
Choi											
GCB	83	87	85	89	89	85	78	2.5	1.5 to 4.3	2.4	1.3 to 4.4
ABC	86						86				
Choi*											
GCB	83	87	85	89	89	85	84	2.3	1.4 to 3.9	1.9	1.1 to 3.4
ABC	87						81				
Hans											
GCB	79	86	82	90	90	82	75	2.5	1.5 to 4.3	2.2	1.2 to 4.0
ABC	90						89				
Hans*											
GCB	93	87	90	83	85	88	91	2.3	1.4 to 3.9	2.0	1.1 to 4.5
ABC	78						75				
Muris											
GCB	122	77	99	54	69	98	125	3.4	2.0 to 5.8	3.2	1.8 to 5.6
ABC	45						38				
Nyman											
GCB	62	81	67	95	94	73	62	1.7	1.0 to 3.0	1.6	0.9 to 2.9
ABC	108						105				
Natkunam											
GCB	84	74	74	74	76	73	85	2.2	1.3 to 3.6	1.9	1.1 to 3.5
ABC	86						84				
Tally											
GCB	76	93	86	99	99	87	69	2.5	1.4 to 4.4	2.2	1.2 to 4.1
ABC	94						87				

Tableau 4. Taux de concordance des algorithmes avec la biologie moléculaire dans cette même étude (21).

b. BCL2

L'expression immunohistochimique de BCL2 est un facteur de mauvais pronostic qui semble corrélé à une mauvaise réponse à la chimiothérapie, en particulier lors d'une co-expression de BCL2 et Myc(22) (23)-(24).

c. CD5

L'expression de CD5 est un facteur de mauvais pronostic corrélé avec un IPI élevé et un stade avancé de la maladie(25).

d. MYC

Une expression élevée de la protéine MYC (cut off estimé à 40% des cellules lymphomateuses) est corrélée avec un mauvais pronostic indépendamment du fait du réarrangement du locus MYC. En 2015 une étude a montré qu'un algorithme MA (MYC aberrations) basé uniquement sur l'expression de MYC en utilisant l'immunohistochimie et la FISH donnait des résultats supérieurs aux autres algorithmes(26)-(27). (Figure 7)

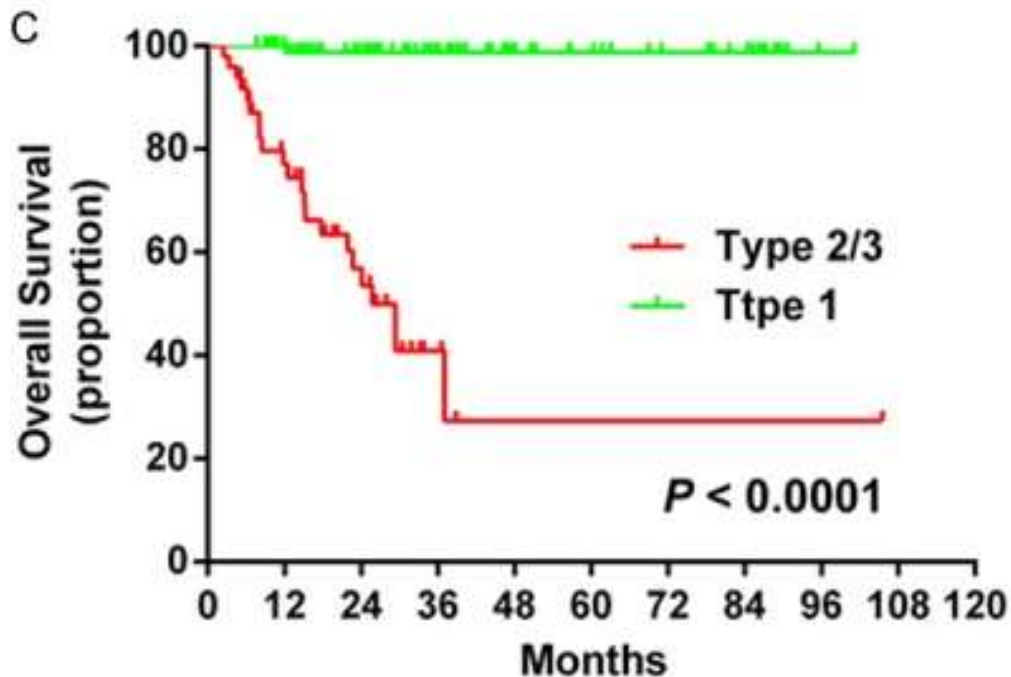


Figure 7. Courbe de survie de l'algorithme : comparaison du type 1 : absence d'expression de MYC en immunohistochimie ou de réarrangement en FISH vs types 2/3 : expression protéique de MYC et/ou réarrangement en FISH(25).

e. Ki67

Un indice de prolifération élevé (>70%) est associé à un pronostic défavorable et a une mortalité précoce(28).

f. Cycline-D2

Cycline D2 est associée aux lymphomes CD5+ et représente donc un facteur de mauvais pronostic(29).

g. EBV

L'infection par EBV (Epstein-Barr virus) se retrouve dans environ 10% des cas chez les patients âgés immunocompétents, ils représentent aujourd'hui une catégorie à part(30).

Chez tous les patients confondus immunocompétents l'association LBDGC et EBV est plus rare (moins de 10% des cas).

Cependant la plupart des lymphomes de novo survenant chez les patients immunodéprimés sont « EBV-positifs ».

h. P53

Une récente étude a montré qu'une hyper-expression de p53 au sein des cellules lymphomateuses était corrélée à une survie plus courte(28).

i. Densité micro vasculaire et CD 34 :

Une étude récente a permis de corréler la vascularisation au sein de la tumeur au pronostic(31). Le comptage de vaisseaux est réalisé par un pathologiste sur une surface donnée à fort grossissement au microscope. L'anticorps anti CD34 permet de marquer les cellules endothéliales et ainsi mieux visualiser chaque vaisseau. Les cas dépassant le seuil de 42 vaisseaux pour 0,36 mm² sont de plus mauvais pronostic.

j. PD1 :

PD1 (programme death 1) est une protéine encodée par le gène PDCD1 située sur le chromosome 2, il s'agit d'une des plus importantes protéines co-inhibitrice de la reconnaissance tumorale par les lymphocytes T.

PD1 et ses ligands PDL-1 et PDL-2 sont fréquemment surexprimés dans de nombreuses tumeurs.

De rares cas de LBDGC NOS présentent une positivité pour PD-L1, ce phénotype est uniquement retrouvé dans les sous-types ABC(32).

Certaines études ont démontré que le taux de PDL-1 plasmatique était corrélé à un pronostic péjoratif, de plus les investigateurs mettent en évidence une décroissance du taux plasmatique de PDL-1 chez les sujets présentant une rémission complète(32).

Certains sous types de LBDGC présentent une expression importante de PDL-1 : Lymphome B diffus primitif du médiastin, lymphome riche en T et en histiocytes, LBDGC liée à l'EBV, LBDGC lié à HHV8, lymphome plasmablastique, LBDGC primitif testiculaire et primitif du système nerveux central.

Une récente étude japonaise a démontré que l'expression de PD-L1 était corrélée à un pronostic défavorable(33).

iv. Micro ARN

Les Micro ARN (MiARN) sont des ARN courts non codant de 20 à 24 nucléotides qui contrôlent l'expression des gènes au niveau post transcriptionnel. Ce contrôle se fait habituellement par des phénomènes d'inhibition de la traduction de ces MiARN ou de dégradation directe des MiARN. Dans de nombreux cancers, ils jouent le rôle d'oncogènes ou au contraire de suppresseurs de tumeurs selon le type de cellules et l'environnement.

De nombreuses études ont permis d'utiliser ces MiARN afin de déterminer les sous-groupes de LBDGC GC et ABC(34).

LBDGC ABC:

miR-155, miR-21, miR-221, miR-222, miR-146a, miR-363, miR-518a, miR-146b-5p, miR-500, miR-574-3p, miR-574-5p, miR-144, miR-451, miR-17, miR-19b, miR-20a, miR-29a miR-92a, miR-106a, miR-720, miR-1260, miR-1280, miR-132, miR-340, miR-301, miR-30d, miR-442b, miR-190, miR-194, miR-660, miR-213, miR-186.

LBDGC GC:

miR-421a, miR-331, miR-151, miR-28, miR-454-3p, miR-620, miR-616, miR-199b, miR-569, miR-653, miR-138, miR-520h, miR-129, miR-181a, miR-590, miR-324.

II. LEUCÉMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE.

1. Epidémiologie:

La leucémie lymphoïde chronique B (LLC B ou lymphome lymphocytaire) représente la leucémie chronique la plus fréquente affectant l'adulte dans les pays développés, elle représente en effet 25% à 30% de toutes les leucémies. L'incidence aux Etats-Unis est de 3,5 pour 100 000(35).

On note une prédominance masculine avec un sex ratio de 2/1, l'âge médian est de 65 ans avec une augmentation dans les dernières décades, 5 à 10% des cas sont découverts avant 55 ans(36).

La distinction entre leucémie lymphoïde chronique (LLC) et lymphome lymphocytaire (LL) repose sur la distribution et la présence de cellules circulantes. Une atteinte extramédullaire avec un taux faible de blastes circulants ($<5.10^9$ blastes par litres) définissent le LL. (Tableau 5).

2. Facteurs de risque :

Les facteurs environnementaux semblent avoir un intérêt limité dans les LLC, seul l'agent orange (utilisé par l'armée américaine pendant la guerre du Vietnam) a été reconnu comme associé à un risque accru de développement de la LLC(37).

Des facteurs génétiques ont en revanche été mis en évidence(38) notamment dans des formes dites familiales de LLC, il existe effectivement dans 5 à 10 % des cas des prédispositions familiales (présence de loci communs) avec un risque accru de 2 à 7 fois plus important de développer une LLC que dans la population générale. Ce sont souvent des patients plus jeunes(39) (40).

3. Symptômes:

Asymptomatique dans près de 70% des cas, la LLC est souvent diagnostiquée de manière fortuite lors d'un bilan sanguin de routine.

Des signes cliniques d'anémie secondaire sont parfois retrouvés, des infections à répétition liées à l'immunodépression, un purpura thrombopénique.

En cas d'atteinte extramédullaire, les patients peuvent présenter des adénopathies ainsi qu'une splénomégalie.

Dans les cas de LLC survenant chez des patients plus jeunes (avant 55ans), il est observé plus fréquemment des signes généraux : asthénie et organomégalie.

En cas de transformation en lymphome agressif, les symptômes sont similaires aux symptômes B classiques des LBDGC de novo.

4. Diagnostic.

Le diagnostic de LLC repose sur la présence d'une lymphocytose mature inexpliquée depuis plus de 3 mois. Le seuil de 5.10^9 /L a été retenu, une atteinte médullaire est présente mais l'analyse histologique de la biopsie ostéomédullaire n'est pas nécessaire pour retenir le diagnostic. En cas de lymphocytose inférieure au seuil, la réalisation du profil immunophénotypique peut aider au diagnostic : Score de Matutes >3(41).

Critères diagnostics de LLC et LL													
Leucémie lymphoïde chronique (LLC)	Lymphocytose > 5.10^9 /L pendant au moins 3 mois.												
	Marqueurs	<table border="1"> <thead> <tr> <th>1 point</th> <th>0 point</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Smlg</td> <td>Moyenne/forte expression</td> </tr> <tr> <td>CD5</td> <td>Négatif</td> </tr> <tr> <td>CD23</td> <td>Négatif</td> </tr> <tr> <td>FMC7</td> <td>Positif</td> </tr> <tr> <td>CD22</td> <td>Moyenne/forte expression</td> </tr> </tbody> </table>	1 point	0 point	Smlg	Moyenne/forte expression	CD5	Négatif	CD23	Négatif	FMC7	Positif	CD22
1 point	0 point												
Smlg	Moyenne/forte expression												
CD5	Négatif												
CD23	Négatif												
FMC7	Positif												
CD22	Moyenne/forte expression												
Lymphome lymphocytaire (LL)	Prédominance des atteintes extra-médullaires												
	Histopathologie : Infiltrat diffus de petits lymphocytes associés à des centres de prolifération.												
	Immunohistochimie : Cellules B monoclonales de phénotype identique à la LLC.												

Tableau 5. Critères diagnostics de LLC et LL.

5. Morphologie et immunohistochimie :

Au sein des ganglions atteints par la LLC, on observe un effacement de l'architecture accompagné d'un aspect pseudofolliculaire avec des zones claires constituées de centres de proliférations contenant des cellules de grandes tailles sur un fond plus sombre constitué de petites cellules(42).

L'infiltrat lymphomateux est représenté par des petites cellules à chromatine condensée, à noyaux arrondis parfois nucléolés, le cytoplasme est peu abondant.

Au sein des centres de prolifération, les cellules sont de tailles variables, formant un « continuum » de cellules petites, moyennes et grandes. On retrouve des polylphocytes de petites et moyennes tailles (légèrement plus gros que les lymphocytes et dont la morphologie est proche de ces derniers) tandis que les paraimmunoblastes sont de grandes cellules présentant un cytoplasme basophile plus abondant avec des noyaux ovalaires nucléolés(43).

Au sein de la moelle osseuse, l'aspect morphologique à faible grossissement est celui d'un infiltrat nodulaire ou diffus en situation non paratrabéculaire de cellules ayant les mêmes caractères morphologiques que précédemment.

Sur le plan immunohistochimique : Les cellules lymphomateuses expriment les marqueurs pan B : CD19, CD20, CD79a, avec cependant une expression faible de CD20. IgM et IgD sont également faiblement exprimées.

Elles sont également CD5 et CD23 positives (44). Absence d'expression de CD10.

Cycline D1 est habituellement négative sauf dans certains centres de prolifération au sein desquels SOX11 reste négatif.

L'indice de prolifération Ki67 est habituellement faible en dehors des centres de prolifération(45).

6. Facteurs pronostiques.

a. Cliniques

Les classifications de Rai(46) et Binet(47) (tableau 6) sont utilisées à la place de la classification de Ann Arbor :

Grade	Définition	Survie moyenne
Classification de Rai(46)		
0 (Risque faible)	Lymphocytose isolée	11,5 ans
I (Risque intermédiaire)	Lymphocytose et adénopathies	11 ans
II (Risque intermédiaire)	Lymphocytose sanguine et médullaire avec splénomégalie et/ou hépatomégalie	7,8 ans
III (Haut risque)	Lymphocytose et anémie (Hémoglobine < 11g/dL ou hématocrite <33%)	5,3 ans
IV (Haut risque)	Lymphocytose et thrombocytopenie (<100 000/ mm ³)	7 ans
Classification de Binet(47)		
A	Atteinte de moins de 3 aires ganglionnaires.	11,5 ans
B	Atteinte de plus de 3 aires ganglionnaires.	8,6 ans
C	Anémie (<10g/dL) Et/ou thrombocytopenie (<100 000/ mm ³)	7ans

Tableau 6. Classifications de Rai et Binet

b. Cytogénétique.

Dans la LLC, les translocations chromosomiques sont rares et aucune mutation oncogénique spécifique n'a été identifiée. Les aberrations caryotypiques couramment diagnostiquées sont principalement :

- La délétion 13q14 (50 % des cas) dont les cibles sont les microARNs miR16-1 et miR15a est associée à un bon pronostic(48) (49).
- La trisomie 12 (environ 15-20 % des cas), son statut pronostique reste controversé(50) (51).
- La délétion 11q22-q23 (environ 18 % des cas), séquence contenant le gène ATM (Ataxia Telangiectasia, Mutated), composant de la réponse aux dommages de l'ADN. Cette délétion est associée à une maladie présentant une progression rapide, des adénopathies extensives et une mortalité plus élevée.
- La délétion 17p13 (environ 7 % des cas), région porteuse du gène codant pour p53 (protéine suppresseur de tumeurs). Cette délétion est corrélée à une résistance à la Fludarabine(52).

Les délétions 17p et 11q sont deux facteurs de mauvais pronostic impactant la survie de façon indépendante du stade de la maladie.

c. Biologie moléculaire et phénotype.

L'étude du statut mutationnel du BCR « B-cell receptor » des Immunoglobulines (Igs) a permis de définir deux groupes de LLC de types(53) :

- Igs mutées (Ig-M) de bon pronostic
- Igs non mutées (Ig-NM) de pronostic péjoratif avec une médiane de survie raccourcie.

La recherche de l'expression de la protéine « zeta-chain associated protein kinase » (Zap-70), protéine de la signalisation du « T-Cell Receptor » (TCR), est corrélée avec l'absence de mutation au niveau du BCR avec cependant une discordance dans environ 20% des cas(54).

L'expression de l'ectoenzyme CD38 à la surface des cellules est associée à un mauvais pronostic lorsqu'elle est présente sur plus de 30% des cellules leucémiques(55).

Les marqueurs sériques LDH, β 2-microglobuline, CD23 soluble, thymidine kinase ainsi que le temps de doublement des lymphocytes représentent également des marqueurs pronostics(2).

III. SYNDROME DE RICHTER

La survenue d'un lymphome agressif peut compliquer l'évolution de la LLC dans 3 à 10% des cas(56), ce phénomène est dénommé Syndrome de Richter (SR). Dans 90% des cas il s'agit d'un LBDGC(57) (survenant dans 2 à 8 % des cas) et plus rarement le lymphome de Hodgkin classique(58) (<1 % des cas).

Dans le cas des LBDGC du SR, la médiane de survie est de 1an(59)

1. Facteurs prédisposant à une transformation en Richter.

On retrouve dans ces différents facteurs prédisposant la plupart des facteurs de mauvais pronostic de la LLC évoqués précédemment(60).

- Les patients présentant de volumineuses adénopathies multiples ont 10 fois plus de risques de développer un SR.
- Adénopathie supérieure à 3cm.
- Mutation de NOTCH1. (Risque accru de développer un SR : 45% contre 4% chez les sujets non porteurs de la mutation)
- Réarrangement de IGHV4-39 (immunoglobuline heavy chain variable gene)
- Expression de CD38 >30%(61).
- Phénotype BCR stéréotypé appartenant au sous ensemble 8 (80% de risques à 10 ans de développer un RS).
- Longueur des télomères inférieure à 5000 paires de bases.
- Score de RAI III-IV
- Absence de délétion 13q14.
- Activation de c-myc.
- Expression de ZAP 70.
- Infection à EBV : Pas de preuve formelle de la relation de causalité entre l'infection et le développement de la maladie, l'infection est plus fréquente dans les transformations en Hodgkin.

Actuellement, il n'y a pas de preuve formelle de l'impact du traitement par purine seule ou associée au rituximab ou cyclophosphamide dans la transformation en Richter(62).

2. Histologie :

La suspicion clinique de Syndrome de Richter est confirmée par l'examen histopathologique. Le tissu ganglionnaire ou extra ganglionnaire est infiltré par une prolifération lymphomateuse à grandes cellules de phénotype B similaire à celle des LBDGC de novo avec un fond de LLC surajouté. Le diagnostic peut être difficile en cas de matériel insuffisant entre une véritable transformation et un centre de prolifération. (Figure 10)
En immunohistochimie, 80% des Richters présentent un phénotype non GC(63).

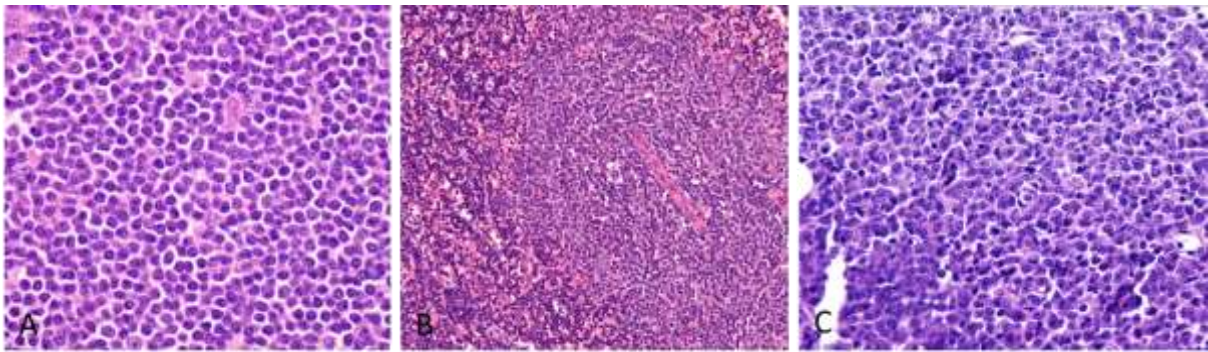


Figure 10. (HES x 40) A. LLC dans un ganglion ; B. Centre de prolifération ; C. variant LBDGC du syndrome de Richter

3. Facteurs pronostiques dans le syndrome de Richter

a. Le score Richter :

En 2006, une des plus grandes études(64) réalisées sur le syndrome de Richter a permis d'établir un score pronostique dépendant de 5 facteurs (figure 8) :

- Performans status > 1
- LDH élevées (> 1.5 fois la normale)
- Plaquettes < $100 \times 10^9/L$
- Taille de la tumeur > 5 cm
- Nombre de cures de chimiothérapie > 1

Chacun de ces items valent un point, les patients sont ensuite répartis selon leurs facteurs de risques :

- Faible : score 0-1
- Faible-intermédiaire : score 2
- Elevé-intermédiaire : score 3
- Elevé : score 4-5

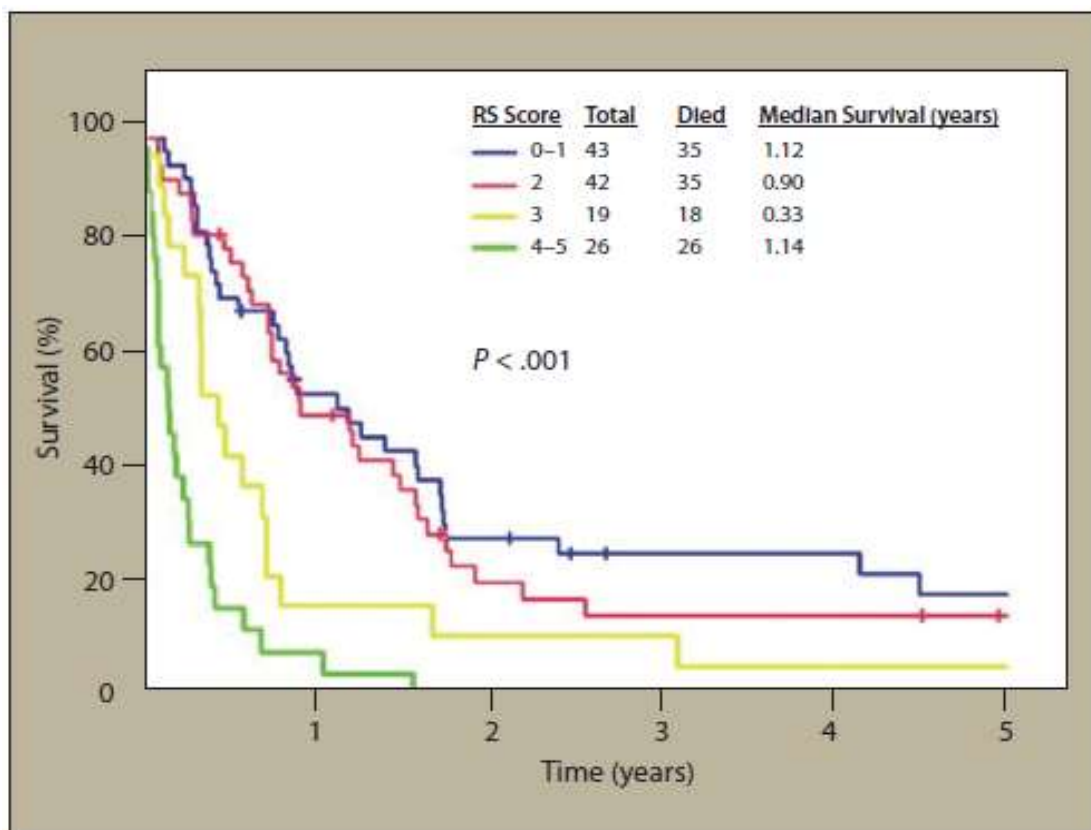


Figure 8. Analyse de survie en fonction du score de Richter (64).

b. La relation clonale entre LLC et lymphome secondaire :

Le facteur de risque le plus important semble être la relation de clonalité du gène IGHV entre le LBDGC transformé et la LLC sous-jacente. En effet les LBDGC qui n'ont pas de lien de clonalité avec la LLC présentent une médiane de survie similaire au LBDGC de novo (62 mois) tandis que les LBDGC présentant une clonalité commune avec la LLC ont un pronostic défavorable avec une médiane de survie de 8 à 14 mois(65). Ainsi deux théories de développement de Richter sont décrites (figure 9) : De façon linéaire à partir de la LLC ou directement d'un précurseur commun.

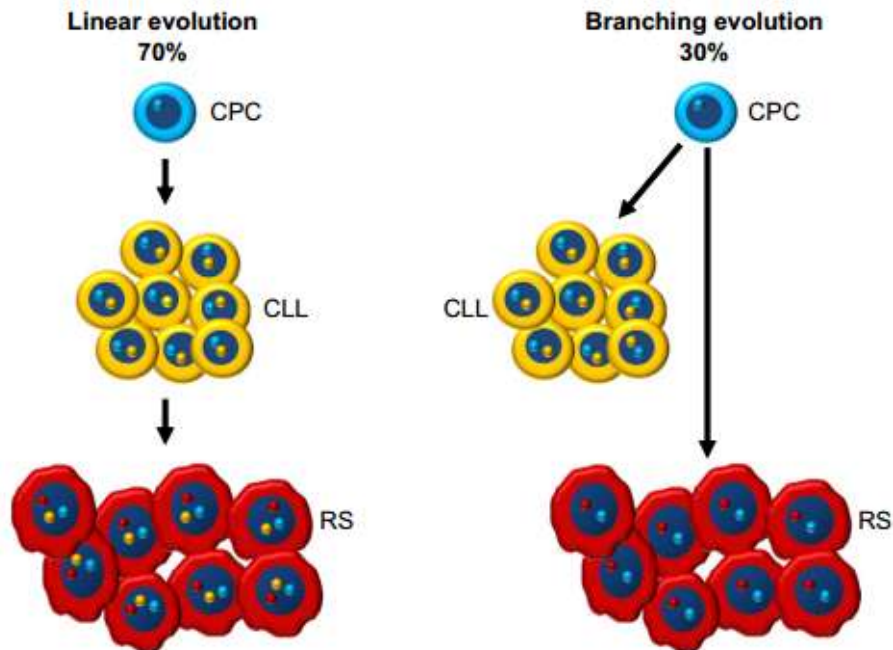


Figure 9. Modes d'évolution du RS : linéaire et à partir du précurseur commun.

c. Mutation de CMYC :

Retrouvée dans 40% des cas de Richter reliés de façon clonale avec la LLC

d. Mutation P53 :

Alors que la mutation de P53 ne semble pas être un facteur prédictif de transformation en Richter au moment du diagnostic de LLC, elle représente un facteur péjoratif au sein des patients présentant un SR.

En effet dans la même étude Rossi et al. mettent en évidence une différence de survie de 17 mois entre les patients mutés et non mutés(65).

Ils établissent ainsi un score pronostique dépendant de la réponse au traitement en fonction du performans status et de l'acquisition de mutation p53.

OBJECTIFS DE L'ETUDE :

L'objectif de ce travail était d'évaluer différents biomarqueurs histologiques, immunohistochimiques et en FISH afin d'estimer leur éventuel impact pronostique dans les variants LBDGC des syndromes de Richter en comparaison avec un groupe contrôle de LBDGC de novo pour lequel ces facteurs étaient reconnus.

26 patients atteints de SR de type DLBCL diagnostiqué au CHRU de Nancy ont été inclus ainsi qu'un groupe contrôle comportant 46 patients diagnostiqués pour un LBDGC de novo.

Nous nous sommes intéressés à de nombreux marqueurs :

Histopathologiques :

- Variantes histologiques
- Nécrose tumorale

Immunohistochimiques :

- Sous type GC et non GC selon l'algorithme de Hans
- Cellules du microenvironnement : Taux de polymorphonucléaires (PMN) (CD15), taux de macrophages (CD68 KP1), taux de lymphocytes CD8+
- Densité micro-vasculaire (CD34)
- Expression de PD-L1 par les cellules tumorales
- Marqueurs immunohistochimiques de prolifération : Ki67, MCM6.
- Expression de Myc et P53.

Moléculaire :

- Réarrangements MYC, BCL2 et BCL6 en FISH
- Recherche du transcrit EBV au sein des cellules lymphomateuses avec la sonde EBER en SISH.
- Etude de la relation clonale par PCR.

Dans l'article nous nous sommes focalisés sur les marqueurs micro-environnementaux : Taux de lymphocytes CD8+, taux de macrophages associés à la tumeur (MAT), densité micro-vasculaire, taux de PMN et sur l'expression de PD-L1 et P53 par les cellules lymphomateuses.

Les résultats concernant les autres variables sont discutés succinctement dans la conclusion après l'article.

ARTICLE

Absence of PD-L1 expression in lymphoma cells and a high number of CD8+ lymphocytes in tumor micro-environment are correlated with a better overall survival in DLBCL variant of Richter syndrome.

Antoine Max¹, Hélène Busby Venner¹, Jean-Michel Vignaud^{1 3 4}, Pierre Feugier^{4 2}, Eliane Albuissou⁵, Guillaume Gauchotte^{3 4}, Claire Bastien¹.

¹Department of Pathology, Hôpital Brabois CHRU, Vandoeuvre-lès-Nancy, France;

² Department of Hematology, CHRU, Vandoeuvre-lès- Nancy, France.

³Department of Pathology, CHRU, Nancy, France.

⁴INSERM U954 – NGERE, Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès- Nancy.

⁵Laboratory of Biostatistic, CHRU, Vandoeuvre-lès-Nancy, Nancy, France.

Corresponding author:

Dr Claire BASTIEN

Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

Hôpital de Brabois, CHRU de Nancy

5, rue du Morvan

54 500 VANDOEUVRE LES NANCY

France

E-mail : cl.bastien@chru-nancy.fr

Tel: +33 3 83 15 39 35

Fax: +33 3 83 15 38 74

Running Title: Micro-environment in Richter syndrome.

Key words: Micro-environment, CD8, TAM, PDL1, Richter syndrome, diffuse large B-cell lymphoma.

Abstract

Introduction: Richter syndrome (RS) represents the development of an aggressive lymphoma, most commonly a diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL variant of RS) after a chronic lymphocytic leukemia (CLL). To date, only few prognostic markers have been described in RS, and little is known about the specificities of RS, comparing to de novo DLBCL. The aim of this study was to evaluate the prognostic value of several markers in a series of RS, in comparison with de novo DLBCL, focusing on tumor micro-environment and immune response.

Patients and method: We retrospectively analyzed samples from 26 patients with newly diagnosed RS and 46 patients with de novo DLBCL and investigated different clinico-pathological variables especially micro-environment (necrosis, microvessel density, lymphocytes count, tumor associated macrophages (TAM) count, polymorphonuclear neutrophils count) and some immunohistochemical (PD-L1, CD5, MCM6, Myc, P53) or in situ hybridization (BCL2, BCL6) markers, basing on a tissue micro-array assay.

Results: A lack of PD-L1 expression (DLBCL variant of RS: $p = 0.018$; de novo DLBCL: $p=0.014$; logrank) and a high number of CD8 positive lymphocytes (DLBCL variant of RS: $p = 0.049$; de novo DLBCL: $p=0.026$; logrank) were significantly correlated with a better overall survival (OS). Additionally, in RS the use of Rituximab during CLL was a significant prognostic marker ($p=0.028$; logrank). In de novo DLBCL, but not in RS, a high number of TAM (CD68+) was associated with a better OS ($p=0.028$; logrank).

Conclusion: The study of micro-environment in RS showed that a low expression of PD-L1 and a high number of CD8+ lymphocytes are markers of better prognosis. Further studies are needed to determine whether these markers could be able to predict the efficiency of immunotherapy.

Introduction

Richter syndrome (RS) is the transformation of a chronic lymphocytic leukemia (CLL) or lymphocytic lymphoma in an aggressive lymphoma¹. In most of case patients with RS develop large B cell lymphoma non other specified (called the DLBCL variant of RS)². This transformation occurs in 2 to 7% of cases².

The confirmation of transformation is based on pathology analysis. It's clinically suspected as the patient develops rapid deterioration and rapid growth of lymph nodes.

Some studies have shown several risk factor for the development of RS such as: molecular characteristics of leukemia clone³, BCR (B cell receptor) mutation, ZAP 70 expression, light chain immunoglobulin rearrangement, Myc activation or CD38 expression⁴.

Evolution is in most of cases rapidly unfavorable with about 1 year⁵ median survival, but recent studies have shown disparities between patients. Nevertheless, prognostic biomarkers for patients with RS are missing.

A clinic-biological score : RS score (based on Lactate deshydrogenase (LDH), platelet count, Performans Status (PS), Tumor size, number of prior cure in CLL) was developed, allowing to discriminate patients in 4 groups from low to high risk⁵. In addition to the RS score clinic-biological factors, overall survival (OS) post transformation may also be predicted by the p53 status⁶.

The clonal relationship of IgVH gene between DLBCL and CLL might also be an important factor⁶⁷ but it is not used in current practice.

Moreover, the molecular pathogenesis of transformed CLL differs from those of de novo DLBCL⁸. The role of the stromal cells in tumors, namely the micro-environment was shown to be particularly important, especially in lymphomas. The balance between pro and anti-tumoral factors produced by T-cell and monocytes regulates the growth of tumor. Different studies have shown the prognostic value of absolute monocytes count⁹, lymphocytes count¹⁰ and their absolute ratio in de novo DLBCL. Furthermore, Programmed death ligand 1 (PD-L1) is a recent marker that regulates the cellular immune response and serves as a targetable immune checkpoint molecule in tumor¹¹. To our knowledge, the prognostic value of the micro-environment and PD-L1 has not

yet been studied in DLBCL variant of RS tissue samples.

In this study, using a well annotated cohort of patients with treatment information and follow up we sought to investigate the clinical and pathological features of DLBCL variant of RS cases. We analyze the composition of stromal immune cells in micro environment and the level of expression of PD-L1 in tumor cells. A series of de novo DLBCL was used as control group.

Methods

It is a retrospective and comparative study between a group of patients with DLBCL variant of RS and a control group of de novo DLBCL.

Patients selection

Tissue samples from 26 patients diagnosed with DLBCL variant of RS between 2002 and 2015 in Nancy University Hospital (CHU) were retrospectively retrieved from the archived of the department of pathology. The number of patients with de novo DLBCL to include was calculated at 50 for 2/1 ratio (Student for linear factor, alpha 5% and Chi2 for binary factor, alpha 5%). 4 cases were excluded because of inadequate/insufficient materials. All clinical and biological data were collected in patients' records from the Department of Hematology of the Nancy University Hospital. Richter score was calculated according to Tsimberidou and al⁵. We also related the details of treatment given for both groups, including the use of rituximab. For DLBCL variant of RS group, we also registered the prior therapeutic used during the CLL phase.

Pathology and TMA analyses:

All the histologic initial diagnostic of DLBCL variant RS and de novo DLBCL were confirmed by two pathologists experienced in hematopathology, in double blind on archival HES stained slides according to the 2008 WHO classification¹².

We included formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) sample of biopsies and surgical resection for all patients. For the purpose of the study, the samples were prepared with tissue micro-array (TMA).

At first we characterized histological sub-type (immunoblastic variant, centroblastic variant, anaplastic variant and mixt subtype).

Immunohistochemical analysis:

TMA specimens were cut into 5µm sections and mounted on glass slides. Immunohistochemical staining was performed by means of an automated staining system according to standard protocols (autostainer Homnis DAKO).

Processed slides were analyzed by two pathologists, blinded to patient outcomes.

Differences in scoring were adjudicated.

To analyzed the cellular composition of micro-environment as well as the micro-vessel density, we used the following antibodies (antibody clones and dilutions are listed in table 1): polymorphonuclear neutrophils (PMN) (CD15), microvessel density (CD34), Tumor associated macrophages (TAM) (CD68) and CD8-positives lymphocytes (CD8).

In addition, the following antibodies were already used during the diagnostic process as CD3, CD5, CD20 CD79a, BCL2 BCL6 Mum1, CD10, Ki67.

The cases were sub-classified as GC and non-GC phenotypes using the Hans algorithm^{13 14 15}.

We also analyzed PD-L1 and P53. (P53 was interpreted as positive if 30% or more of the tumors cells were stained).

For PDL-1 evaluation, we measured the percentage of tumor stained cells as well as the staining intensity scored as follow: 0: no signal, 1: weak signal, 2: moderate signal, 3: strong signal. A cut-off of 5 % of stained tumor cells was required as well as a staining of 2 or 3 intensity¹⁶.

For CD15, CD68 and CD8, stained cells count was performed on 1 mm², for CD34, 0.36mm².

Molecular biology

PCR analysis was made to analyze clonal relationship between CLL and RS using the Biomed 2 protocol¹⁷.

Statistical analysis

The date of RS diagnosis and de novo DLBCL diagnosis was defined as the date of the diagnostic biopsy. Overall survival was measured from this date to date of death. Survival analysis were done using the Kaplan-Meier method and the logrank test. Univariate and multivariate survival analyses were performed using the Cox regression model.

χ^2 test was used to analyze categorical variables. Correlation test were done using Mann and Whitney test and Rho of Spearman.

All statistical tests were 2-sided and probability values <0.05 were regarded as significant.

The analysis was performed using IBM SPSS and XLstats softwares.

Results

A total of 72 patients were included in this study: 26 DLBCL variant RS and 46 de novo DLBCL.

Clinical features of DLBCL variant RS and de novo DLBCL

Clinical data are reported in Table 2.

In DLBCL variant of RS group, 3 patients were females (11.5%), 23 were males (88.5%). The median age at diagnosis was 65 years (range 55-89 years) and 81% were 60 years or over at diagnosis. Median delay between CLL and RS was 7 years (range 0 years, when CLL was discovered

at Richter diagnostic, to 15 years). Lymphoma was nodal in 85% of cases and extra-nodal in 15%. Median OS from the time of RS diagnostic was 9 months with a mean at 25 months. Median number of chemotherapy for CLL was 1.8. Thirteen patients were treated with Fludarabine/Endoxan, 9 with chloraminophen, 4 with CHOP, 2 with BENDA, 3 with Campath, 1 with ABVD. Seven patients received Rituximab for the treatment of CLL. After the transformation in high grade lymphoma, 14 patients received rituximab, 11 patients received R-CHOP therapies and 2 patients received no chemotherapy. Five patients received 1 line of treatment, 9 patients 2 lines, 2 patients 3 lines, 2 patients 4 lines.

In de novo DLBCL group, 18 patients were females (39%), 28 (61%) were males. The median age at diagnosis was 69 years (range 26-92 years) and 69.5 % were 60 years or over at diagnosis. Lymphoma was nodal in 50% of cases, significantly lower than in RS ($p=0.004$). 42 patients received rituximab (91%), 34 patients (74%) received R-CHOP therapies and 2 patients received no chemotherapy; 25 patients (54.3%) received 1 line of treatment, 8 patients (17.4%) 2 lines, 7 patients (15.2%) 3 lines, 4 patients (8.7%) 4 lines.

Clinical outcomes were available for 71 patients. Median survival in DLBCL variant of RS group was 9 months, significantly shorter than in de novo DLBCL group: 54 months ($p=0.014$; logrank). (Figure 2).

Univariate analysis are resumed on table 4. In both group, clinical scores are the most important prognostic factors: in de novo DLBCL, IPI >1 remained correlated with inferior OS (HR = 4.44; 95% CI: 1.49-13.25; $p= 0.007$), and Richter score > 1 in DLBCL variant of RS (HR = 13.9; 95% CI: 1.79 – 108.2; $p=0.012$). In DLBCL variant of RS group, the use of rituximab for CLL treatment was correlated with a worse prognostic ((HR = 2.76; 95% CI: 1.06-7.2; $p=0.038$; Cox) and ($p=0.028$; logrank)).

Diagnostic pathological parameters: (Table 3.)

All RS cases were classified as DLBCL. CD20 was expressed in all cases (26/26), CD5 in 12/23 (52%) and BCL6 in 7/12 (58%). Histologic subtypes were as follows: 10 centroblastic lymphomas (38.5%), 6 immunoblastic (23.1%), 3 anaplastic (11.5%) and 7 mixt types (26.9%). RS were classified according to Hans algorithm into GC and ABC subtypes: 14 were ABC subtypes and 4 GC; 8 couldn't reliably be classified due to inadequate/insufficient samples and lack of initial immunodetection for MUM1.

In de novo DLBCL group, CD20 was expressed in 46/46 of cases (100%), CD5 in only 1/38 case (2.6%), (significantly less frequent than in RS ($p < 0.0001$)) and BCL6 in 21/42 (50%). Concerning the histologic subtypes, 12 were centroblastic lymphomas (26.1%), 5 immunoblastic (10.9%), 5 anaplastic (10.9%), 21 mix types (46.5%). According to Hans algorithm: 27 cases (58.7%) presented ABC subtypes and 10 GC (21.7%); 9 cases couldn't be classified.

Microenvironment

In DLBCL variant of RS, the median PMN count was 8/mm², ranging from 0 to 107/mm². The median TAM count was 153/mm², ranging from 32 to 431. The median CD8 count was 319/mm², ranging from 40 to 1003/mm². The median microvessel density count was 34/0.36mm², ranging from 10 to 83/0.36mm².

In de novo DLBCL, the median PMN count was 17.2/mm², with a range from 0 to 124. The median TAM count was 243.5/mm² with a range from 27 to 480. The median CD8 count was 360/mm² range from 22 to 1013/mm². The median microvessel density count was 23/0.36mm² with a range from 9 to 80/mm² (Figure 1).

No significant differences between RS and de novo DLBCL was found.

High CD8 lymphocyte absolute count was correlated with better prognosis in both groups: The most discriminative cut-off value of CD8 positive cells selected by the ROC analysis was 369/mm² (Se75%; SP=80%) in DLBCL variant of RS (p=0.049; logrank) and 411/mm² (Se=78%; Sp=61%) in de novo DLBCL group (p=0.026; logrank) (Figure 3).

High TAM (CD68) count was correlated with a better prognosis only in de novo DLBCL p=0.011 in de novo DLBCL group versus p=0.33 in DLBCL variant of RS (logrank). The discriminative cut-off value of TAM (CD68) positive cells determined by the ROC analysis was 247/mm² (Se = 67%; SP = 59%) (Figure 4).

In both groups, no significant correlation with OS was found when regarding the following variables: PMN (CD15) count (DLBCL variant of RS: p=0.34; de novo DLBCL: p=0.61), microvessel density (DLBCL variant of RS: p=0.12; de novo DLBCL: p=0.194) and p53 (DLBCL variant of RS p=0.36; de novo DLBCL; p=0.77).

PD-L1 expression was observed in 5/19 (26%) DLBCL variant of RS and 7/27 (26%) in de novo DLBCL. PD-L1 expression was correlated with a lower OS in DLBCL variant of RS (p=0.018; logrank) as well as in de novo DLBCL (p=0.014; logrank). (Figure 5).

Molecular biology:

The PCR analysis was performed for 5 cases. Clonal relationship between CLL and RS was observed in all cases with OS ranging from 1 to 60 months.

Multivariate Cox regression analysis was made of both groups, among the most significant parameters in univariate analysis. The only significant prognostic factors were the clinico-biological scores: Richter score in DLBCL variant of RS (p=0.02) and Adjusted Age International Prognostic Index in de novo DLBCL (p=0.03).

Discussion:

As previously described, the majority of DLBCL RS variant was centroblastic type and most of the cases was non GC type according to the Hans Algorithm¹³. The OS was significantly shorter in DLBCL variant of RS group (9 months versus 54 months), these results are in line with published data.

It has been developed in a couple of independent studies^{5 18}. We found similar results: Richter score in RS and age adjusted IPI score¹⁹ in DLBCL are the most significant indicators of survival in univariate (respectively $p=0.012$ and $p=0.007$) and multivariate analysis (respectively $p=0.02$ and $p=0.03$). It should be evident that these score could be determined by clinicians for every patient at the time of diagnostic.

There is currently no evidence that a specific type of prior therapies could influence the risk of developing a RS²⁰. Actually the different studies indicated similar rates of RS development among patients who received fludarabine, alkylating agent-based, chlorambucil, anti-cd52 alone or in association. Interestingly, our study showed an unfavorable impact of the use of rituximab during CLL on OS after Richter transformation ($p=0.028$; log Rank). Meanwhile patients who received a rituximab-based treatments during CLL had probably a most aggressive evolution of CLL like accelerated CLL²¹ or yet undiagnosed Richter transformation. Prior studies have shown an increase risk to develop Richter transformation after use of Rituximab, particularly with association of alemtuzumab²², but these studies did not focused on OS after RS occurrence.

The most important prognosis factor for the DLBCL variant of RS is the relationship between the CLL and the DLBCL clones. Actually, studies demonstrate that the majority of DLBCL variant RS is clonally related to the indolent CLL (80%). Other cases are considered as de novo DLBCL and not true transformation and share similar OS. Unfortunately, in our series, PCR analysis was only performed for 5 cases due to unavailable CLL blood or tissue samples. The clonal relationship between CLL and RS was observed in all cases with OS ranging from 1 to 60 months.

Immune checkpoint blockade strategies constituted new therapeutic option in many pathologies as melanoma²³ and pulmonary²⁴ as well as in hematologic malignancies²⁵.

In our study, PDL1 expression was correlated with a significantly shorter survival in DLBCL variant of RS: $p=0.018$ and de novo DLBCL: $p=0.014$ (log Rank). Our results were consistent with a recent study analyzing 1557 cases of de novo DLBCL demonstrated poor prognostic impact of immunohistochemical PD-L1 expression on OS²⁶. To our knowledge, previous studies did not investigate possible relationship between PD-L1 expression and OS in RS. Further studies are needed to confirm these results in larger series.

Programmed death 1 (PD-1) is a cell surface protein receptor of T lymphocytes that inhibit immune system through its ligand PD-L1 and PD-L2 which are expressed by tumor cells, macrophages and dendritic cells. By complex mechanisms involving PI3kinase pathway, phosphatase and tensin homolog PTEN, and Interferon alpha, PD-L1 plays a role in the inhibition of TCR. It also inhibits B cell receptor by the way of spleen tyrosine kinase (Syk). Only few cases of DLBCL NOS are positive for PD-L1, and expression was reported to be restricted to ABC DLBCL^{27 28}. One theory is that PD-L1 is secreted by stromal cells due to a secretion of cytokine in response of inflammation¹¹. In a recent study, investigators observed that high plasma level of PD-L1 (greater than 1.52 ng/ml) is a marker of poor prognostic. Moreover, they have shown that PD-L1 plasma level is almost undetectable after patient achieved complete remission²⁹. Even if expression of PD-1 and PD-L1 seems to be interesting indicators of better response rates response in solid cancers, no definitive predictive markers have been chosen due to variability of micro-environment. More-over patients without PD-L1 expression can still have clinical significant responses to anti PD-1. The efficacy of anti PD-1 seems to vary among different types of lymphomas but bring interesting hope for patients including those who have been heavily treated³⁰.

CD8 and TAM density in the micro-environment were significantly correlated with OS in our study. A high number of CD8 was significantly associated with a better prognosis in DLBCL variant of RS ($p=0.049$; log Rank) as well as in de novo DLBCL ($p=0.026$; log Rank). Several studies from 2008 to

2015, have demonstrated that absolute lymphocyte count¹⁰, monocytes count³¹ and absolute lymphocyte count / absolute monocytes⁹ count prognostic score were important prognostic factors in DLBCL. More specifically, a low lymphocyte count correlated to poor prognosis. Some of these data are obtained from CMF and others from tissues samples in de novo DLBCL but none of them focused on RS to our knowledge. CD8 is a co receptor of T-cell receptor which improves antigen recognition³². During tumor development, the host immune system and the developing tumor are interacting, tumor cells selected a variable clone which is not recognized by the host. This results in tumor escape from immune-mediated destruction³³.

High TAM count was correlated with a longer survival only in DLBCL group (p=0.011; log Rank). There were apparent discrepancies in the literature relative to the relation of TAM count and OS. Some studies have shown that high TAM count was significantly correlated with poor OS in de novo DLBCL³⁴. In a literature review in 2015, Robert Kridel and al. tried to understand the role of CD68 in micro-environment in de novo DLBCL³⁴ : impact of CD68 count seems to be correlated to the treatment and if a high cd68 is a factor of poor prognosis, it become a factor of better prognosis when patients received rituximab based treatments, which is the case of the majority of patients (91%) with de novo DLBCL in our work. Further studies are necessary to understand the role of anti-CD20 in the modulation of micro-environment.

TAM count in CLL was described in a 2016 study²⁵ as positively correlated with PDL1 expression we set the same result in our work with peritumoral macrophages, in de novo DLBCL.

There are two types of TAM : TAM M2³⁵ is shown to inhibit anti-tumor immune response and TAM 1 is shown to mediate resistance in tumors . A therapeutic against these macrophages could have good results³⁶.

In addition, there is an association between a high count of reactive cells and some genetic signature: “lymph node” and “MHC class II” known as correlated with a better prognosis³⁷.

Vascularization in lymphoma was poorly studied. In a recent study, Jelcic and al. used CD34 in order to evaluate microvessel density (MVD) in DLBCL. A high MVD was correlated with a primary

resistant disease, poorer event free survival and OS⁹. In another study, Cardesa-Salzmann et al., also using CD34 antibody, have shown similar results, independently of the IPI in patients treated with rituximab³⁸. Recently, Gomez-Gelvez JC and al. established a micro-environment score using FOXP3, CD68, and CD34 to predict clinical issue in de novo DLBCL³⁹.

In our study, we did not find any correlation between microvessel density and OS, in both groups ($p>0.05$).

Analysis of P53 disruption is also a point that could not be referred in our work. Meanwhile, we have decided to evaluate the impact of P53 expression in immunochemistry, but we did not find any significant results.

There are limitations to this work: The small size of archived biopsy in DLBCL variant of RS limiting the investigations, the small number of cases evaluated for clonal correlation between CLL and RS and finally, the heterogeneity of prior therapeutics during CLL.

Another study with an homogeneous group, testing in the LLC France group could resolve this problem.

A multicentric prospective study must be design to confirm these results.

In conclusion, we showed that absence of PD-L1 expression and a high number of CD8+ lymphocytes in tumor micro-environment were correlated with a better overall survival in Richter syndrome. These markers can be easily evaluated by immunohistochemistry in tissue samples. Further studies are needed to confirm these results in larger series, and to determine whether these markers could help to predict the efficiency of immunotherapy.

Acknowledgments

The authors thank the entire team of the Department of Pathology for technical support and Mrs Jacqueline Zevnick for reviewing the manuscript.

Authorship

A.M and C.B designed the study, collected clinical data, analyzed and interpreted data, performed statistical analysis, and drafted the manuscript. PF collected the data and drafted the manuscript. E.A contributed to statistical analysis. GG and JMV contributed to data interpretation and drafting the manuscript.

Disclosure/conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Lortholary, P. *et al.* [CHRONIC LYMPHOID LEUKEMIA SECONDARILY ASSOCIATED WITH A MALIGNANT RETICULOPATHY: RICHTER'S SYNDROME]. *Nouv. Rev. Fr. Hématologie* **4**, 621–644 (1964).
2. Molica, S. A systematic review on Richter syndrome: what is the published evidence? *Leuk. Lymphoma* **51**, 415–421 (2010).
3. Rossi, D. & Gaidano, G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol. Oncol.* **27**, 1–10 (2009).
4. Aydin, S. *et al.* CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood* **111**, 5646–5653 (2008).
5. Tsimberidou, A.-M. *et al.* Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 2343–2351 (2006).
6. Rossi, D. *et al.* The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood* **117**, 3391–3401 (2011).
7. Timár, B. *et al.* Relationship between the mutational status of VH genes and pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma in Richter's syndrome. *Leukemia* **18**, 326–330 (2004).
8. Rossi, D. XIII. Molecular pathogenesis of transformed lymphomas. *Hematol. Oncol.* **33 Suppl 1**, 70–74 (2015).
9. Jelacic, J. *et al.* The Role of Lymphocyte to Monocyte Ratio, Microvessel Density and HiGH CD44 Tumor Cell Expression in Non Hodgkin Lymphomas. *Pathol. Oncol. Res. POR* **22**, 567–577 (2016).
10. Oki, Y. *et al.* Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic marker in patients with diffuse large B-cell lymphoma and suggests patients' survival benefit from rituximab. *Eur. J. Haematol.* **81**, 448–453 (2008).
11. Wölfle, S. J. *et al.* PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur. J. Immunol.* **41**, 413–424 (2011).
12. Campo, E. *et al.* The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* **117**, 5019–5032 (2011).
13. Hans, C. P. *et al.* Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* **103**, 275–282 (2004).

14. Rosenwald, A. *et al.* The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1937–1947 (2002).
15. Lu, T.-X. *et al.* Immunohistochemical algorithm alone is not enough for predicting the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 275–286 (2015).
16. Xing, W. *et al.* PD-L1 expression in EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic features and prognostic implications. *Oncotarget* (2016). doi:10.18632/oncotarget.11045
17. Van Dongen, J. J. M. *et al.* Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* **17**, 2257–2317 (2003).
18. Tadmor, T. *et al.* Richter's transformation to diffuse large B-cell lymphoma: a retrospective study reporting clinical data, outcome, and the benefit of adding rituximab to chemotherapy, from the Israeli CLL Study Group. *Am. J. Hematol.* **89**, E218–222 (2014).
19. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N. Engl. J. Med.* **329**, 987–994 (1993).
20. Solh, M. *et al.* The impact of initial fludarabine therapy on transformation to Richter syndrome or prolymphocytic leukemia in patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of an intergroup trial (CALGB 9011). *Leuk. Lymphoma* **54**, 252–254 (2013).
21. Giné, E. *et al.* Expanded and highly active proliferation centers identify a histological subtype of chronic lymphocytic leukemia („accelerated" chronic lymphocytic leukemia) with aggressive clinical behavior. *Haematologica* **95**, 1526–1533 (2010).
22. Benjamini, O. *et al.* Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia who received frontline fludarabine, cyclophosphamide and rituximab therapy: distribution and clinical outcomes. *Leuk. Lymphoma* **56**, 1643–1650 (2015).
23. Hamid, O. *et al.* Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N. Engl. J. Med.* **369**, 134–144 (2013).
24. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366**, 2443–2454 (2012).
25. Ansell, S. M. *et al.* PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 311–319 (2015).
26. Kiyasu, J. *et al.* Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **126**, 2193–2201 (2015).

27. Menter, T., Bodmer-Haecki, A., Dirnhofer, S. & Tzankov, A. Evaluation of the diagnostic and prognostic value of PDL1 expression in Hodgkin and B-cell lymphomas. *Hum. Pathol.* **54**, 17–24 (2016).
28. Chen, B. J. *et al.* PD-L1 Expression is Characteristic of a Subset of Aggressive B-Cell Lymphomas and Virus-Associated Malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 3462–3473 (2013).
29. Rossille, D. *et al.* High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia* **28**, 2367–2375 (2014).
30. Xia, Y., Jeffrey Medeiros, L. & Young, K. H. Signaling pathway and dysregulation of PD1 and its ligands in lymphoid malignancies. *Biochim. Biophys. Acta* **1865**, 58–71 (2016).
31. Marcheselli, L. *et al.* Prognostic roles of absolute monocyte and absolute lymphocyte counts in patients with advanced-stage follicular lymphoma in the rituximab era: an analysis from the FOLL05 trial of the Fondazione Italiana Linfomi. *Br. J. Haematol.* **169**, 544–551 (2015).
32. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708–712 (1999).
33. Reiser, J. & Banerjee, A. Effector, Memory, and Dysfunctional CD8+ T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *J. Immunol. Res.* **2016**, (2016).
34. Wada, N. *et al.* Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology* **60**, 313–319 (2012).
35. Marchesi, F. *et al.* High density of CD68+/CD163+ tumour-associated macrophages (M2-TAM) at diagnosis is significantly correlated to unfavorable prognostic factors and to poor clinical outcomes in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* **33**, 110–112 (2015).
36. Mantovani, A., Sica, A. & Locati, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* **37**, 14–16 (2007).
37. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511 (2000).
38. Cardesa-Salzmann, T. M. *et al.* High microvessel density determines a poor outcome in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus chemotherapy. *Haematologica* **96**, 996–1001 (2011).
39. Gomez-Gelvez, J. C., Salama, M. E., Perkins, S. L., Leavitt, M. & Inamdhar, K. V. Prognostic Impact of Tumor Microenvironment in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Uniformly Treated With R-CHOP Chemotherapy. *Am. J. Clin. Pathol.* **145**, 514–523 (2016).

TABLES AND FIGURES.

Table 1. List of antibodies and clones used in the study.

Table 2. Clinical characteristics.

Table 3. Pathological characteristics.

Table 4. Variables associated with overall survival by univariate analysis.

Figure 1. Monocyte (CD68), CD8 + lymphocytes count and PD-L1 expression in RS and DLBCL. Representative image of low (a) and high (b) CD8 density in RS tissue samples. (original magnification x 400). Low (c) and high (d) number of monocytes (CD68) in two samples of de novo DLBCL (original magnification x 400). No expression (e) and high expression (f) of PD-L1 in two samples of RS.

Figure 2. Kaplan Meier estimates of overall survival in DLBCL variant of Richter vs. de novo DLBCL ($p=0.014$; logrank).

Figure 3. Kaplan Meier estimates of overall survival according to CD8 count in micro-environment: (A) In DLBCL variant of RS group ($p=0.049$; logrank). (B) In de novo DLBCL group, ($p=0.026$; logrank).

Figure 4. Kaplan Meier estimates of overall survival according to TAM count in micro-environment: (A) in DLBCL variant of RS. ($p =0.168$; logrank) and de novo DLBCL (B) ($p=0.011$; logrank).

Figure 5. Kaplan Meier estimates of overall survival according to PD-L1 expression: in RS (A) ($p=0.018$; logrank) and de novo DLBCL (B) ($p=0.014$; logrank).

Table1. List of antibodies and clones used in the study.

Antibody	Source	Dilution	Clone
PDL1	Santa Cruz	1/800	28.8
CD8	DAKO	provider	C8/144B
P53	DAKO	provider	DO-7
CD34	DAKO	provider	QBEND 10
Mum1	DAKO	provider	MUM1p
CD15	DAKO	provider	Carb3
CD68	DAKO	provider	KP1

Table 2. Clinical characteristics. (Ps indicates Performans status ; Hb, Hemoglobin; IPI, international Prognostic Index ; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone; ABVD, Doxorubicin, bleomycin, vinblastin, dacarbazine ; RESHAP, Rituximab, etoposide, methylprednisolone, cytarabine, cisplatin ; RDHAP, Rituximab, dexamethasone, high-dose cytarabine, cisplatin ; *p-value<0.05, Khi²)

	RS	De novo DLBCL	P-value
Characteristic	n/N (%)	n/N (%)	
Age ≥ 60y	21/26 (81)	32/46 (69.5)	0.30
Male	23/26 (88.5)	28/46 (60.9)	0.013
PS > 1	9/22 (41)	14/45 (31)	0.43
Tumor size >5 cm	15/23 (65)	25/45 (56)	0.44
LDH > 1.5 ULN	17/20 (85)	23/45 (51)	0.01*
Platelet < 100 x 10⁹/L	11/23 (42)		
HB < 10 g/dL	6/26 (48)		
Site of development			
Nodal	22/26 (85)	23/46 (50)	0.004*
Extra-nodal	4/26 (15)	23/46 (50)	
RS Score / IPI Score			
0 – 1 points	6/22 (27)	17/41 (41)	
2 points	4/22 (18)	13/41 (32)	
3 points	6/22 (27)	8/41 (19)	
4-5 points	6/22 (27)	3/41 (7)	
CLL Treatments:			
Fludarabin/Endoxan	13/26 (50)		
Cholraminophene	9/26 (35)		
CHOP	4/26 (15)		
Bendamustin	2/26 (8)		
Alemtuzumab	3/26 (11.5)		
ABVD	1/26 (4)		
Rituximab	7/26 (27)		
Prior CLL > 1	12/24 (50)		
RS / De novo DLBCL treatments			
RCHOP	11/26 (42)	34/46 (74)	0.008*
RESHAP/RDHAP	12/26 (46)	7/46 (15)	0.004*
Other	9/26 (35)	16/46 (35)	
Ifosfamide	0/26 (0)	7/46 (15)	0.036*
Rituximab-based	14/26 (54)	42/46 (91)	0.0002

Table 3. Pathological characteristics (anap indicates anaplastic; CB, centroblastic; IB, immunoblastic; mixt, mixt-type, , ABC, activated b cell, GC, germinal cell; PMN, polymorphonuclear neutrophils; TAM : tumor associated macrophages; Sd standard deviation; *p<0.05, Khi², Mann and whitney).

Characteristic	RS		De novo DLBCL		p-value
	n/N (%)	Median +/- Sd	n/N (%)	Median +/- Sd	
Morphologic:					
Type					
Anap	3/26 (11.5)		5/46 (11)		0.93
CB	10/26 (38.5)		12/46 (26)		0.27
IB	6/26 (23.1)		5/46 (11)		0.17
Mixt	7/26 (26.9)		21/46 (46.5)		0.12
Others	0/26 (0)		3/46 (6.5)		
Sub type					
ABC	14/26 (31)		27/46 (58.7)		0.69
GC	4/26 (54)		10/46 (21.7)		0.513
Unknown	8/26 (31)		9/46 (19.6)		
Microvessel density (CD34)	N = 22	34 +/- 21.1	N = 37	38.1 +/- 21	0.547
PMN (CD15)	N = 24	8 +/-30	N = 45	17.2 +/- 23	0.791
TAM (CD68)	N = 20	153 +/- 89.6	N = 38	243.5 +/- 110	0.066
CD8 lymphocytes	N = 25	319 +/- 244	N = 36	360 +/- 237.5	0.230
Other immunochemistry					
BCL2	21/23 (91)		37/45 (82)		0.32
BCL6	7/12 (58)		21/42 (50)		0.610
CD5	12/23 (52)		1/38 (2.6)		<0.0001 *
PDL1	5/19		7/27		0.135

Table 4. Variables associated with overall survival by univariate analysis. (Cox model; LCI indicates lower confidence interval; UCI, upper confidence interval; SD: standard deviation; p* $<$ 0.05).

Variable	RS						De novo DLBCL					
	SD	Khi ²	p-value	Hazard ratio	LCI	UCI	SD	Khi ²	p-value	Hazard ratio	LCI	UCI
PD-L1	0.615	4.594	0.032*	3.733	1.119	12.447	0.583	7.097	0.008*	4.728	1.508	14.828
CD8	0.001	4.045	0.044*	0.998	0.996	1.000	0.001	4.446	0.035*	0.998	0.995	0.999
TAM (CD68)	0.002	0.936	0.333	0.998	0.993	1.002	0.002	3.991	0.046*	0.996	0.992	0.999
PMN (CD15)	0.007	0.901	0.343	1.007	0.993	1.021	0.010	0.265	0.606	0.995	0.975	1.015
Microvessel density (CD34)	0.016	2.374	0.123	0.976	0.946	1.007	0.015	1.689	0.194	1.020	0.990	1.050
IPI >1 / Richter score >1	1.046	6.335	0.012*	13.919	1.791	108.189	0.557	7.162	0.007*	4.443	1.491	13.246
Rituximab in CLL	0.489	4.317	0.038*	2.763	1.059	7.209						60

Figure 1. Monocyte, cd8 lymphocytes count and PD-L1 expression in RS and de novo DLBCL.

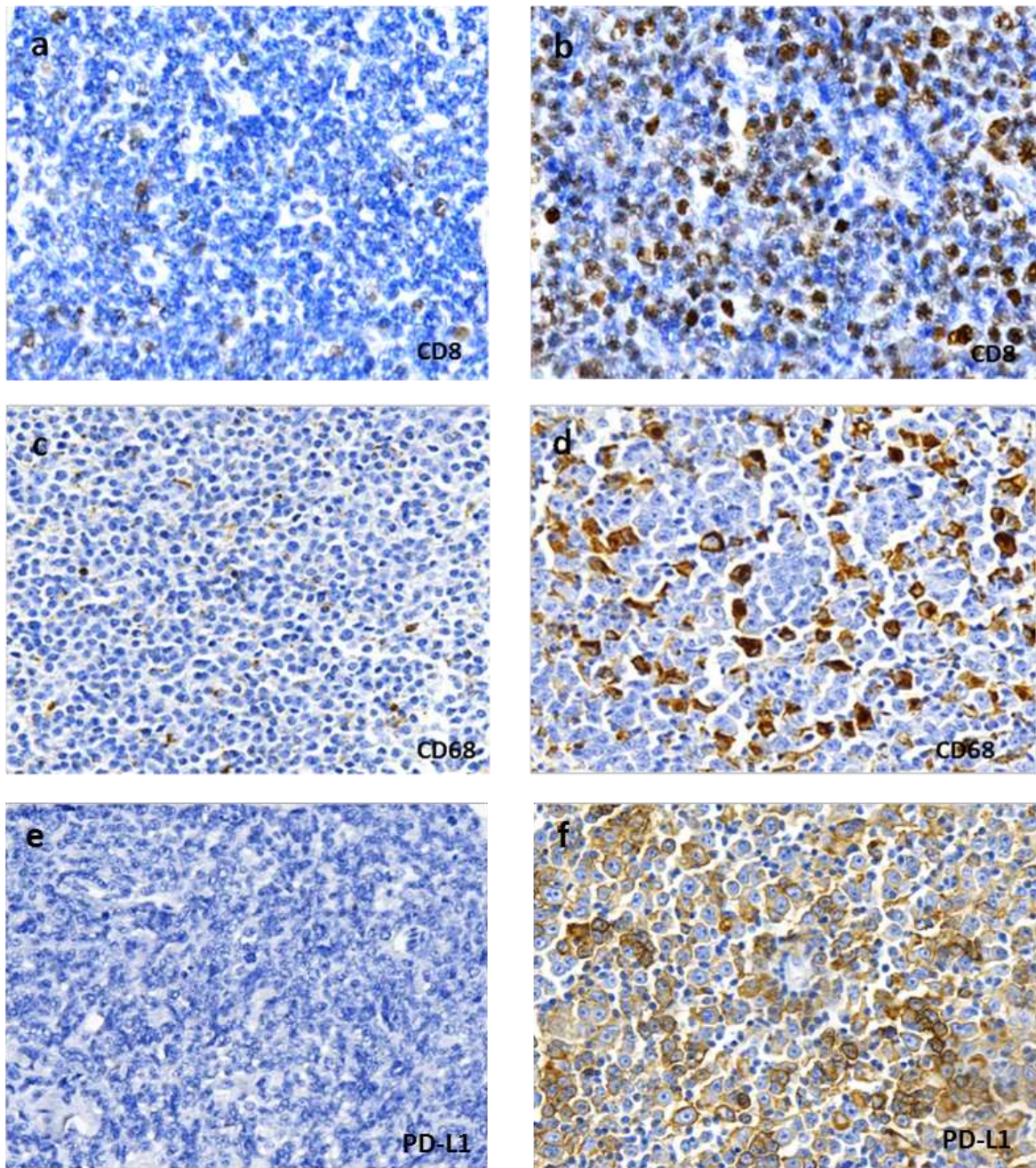


Figure 2. Kaplan Meier estimates of survival in RS versus de novo DLBCL.

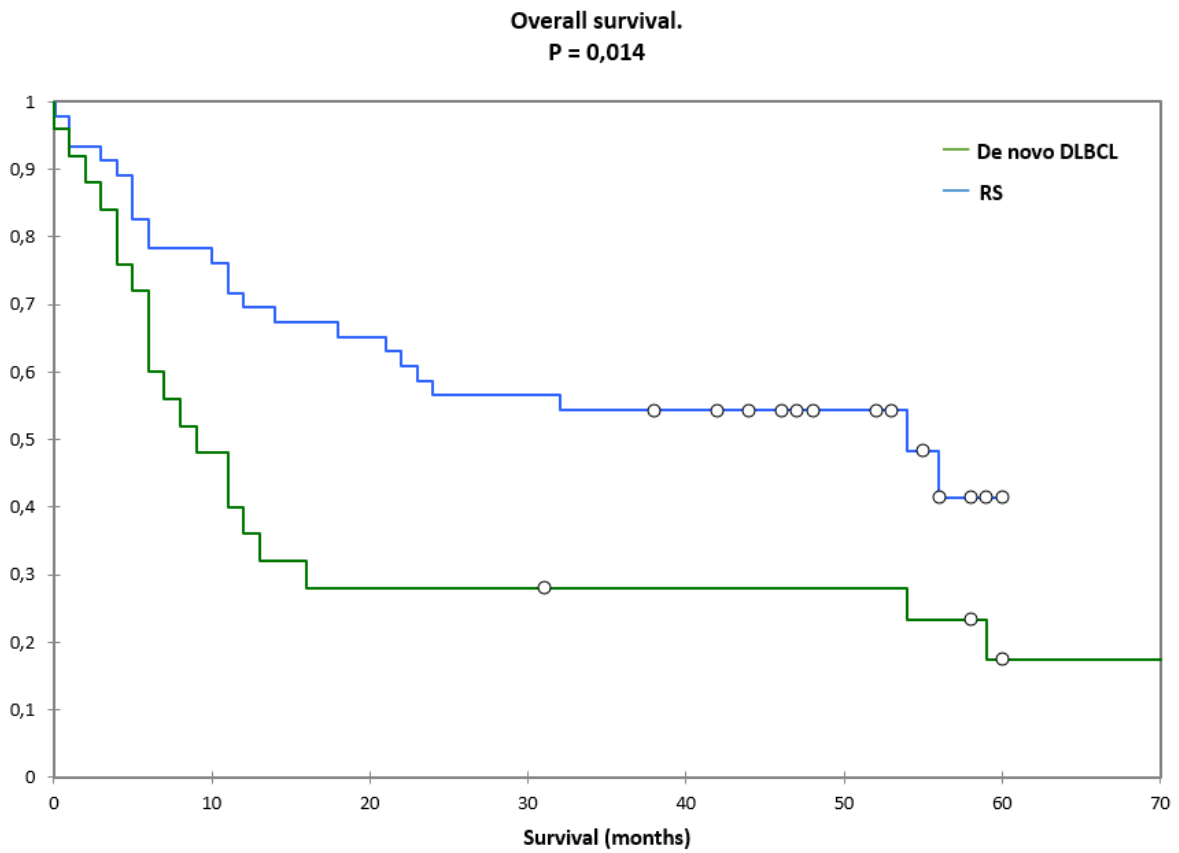


Figure 3. Kaplan Meier estimates of survival in RS and de novo DLBCL according to CD8 count.

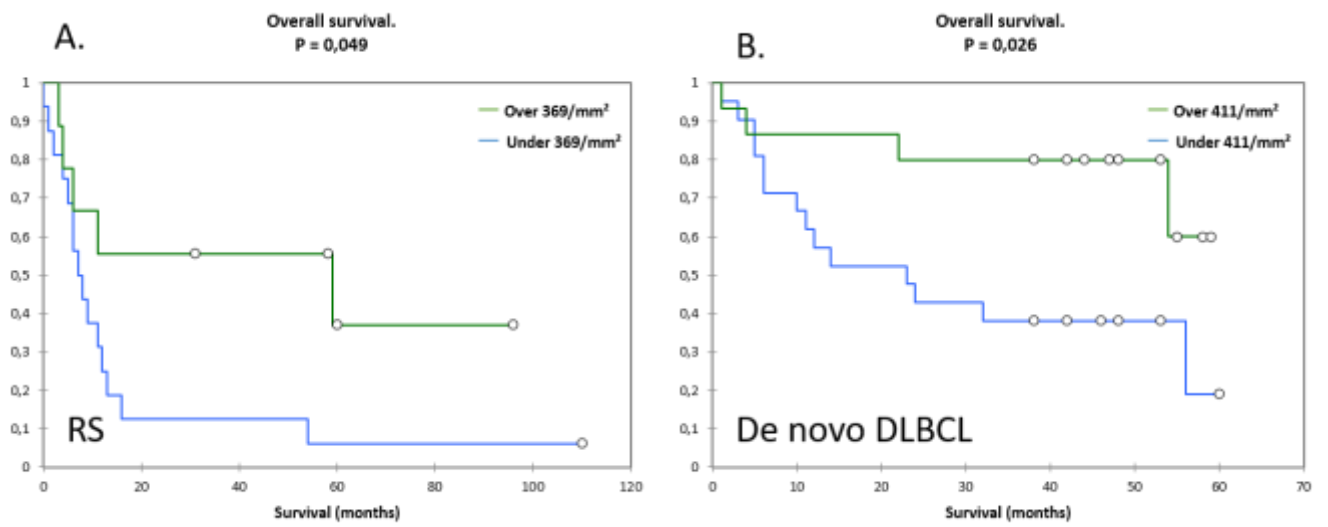


Figure 4. Kaplan Meier estimates of survival in RS and de novo DLBCL according to TAMS count.

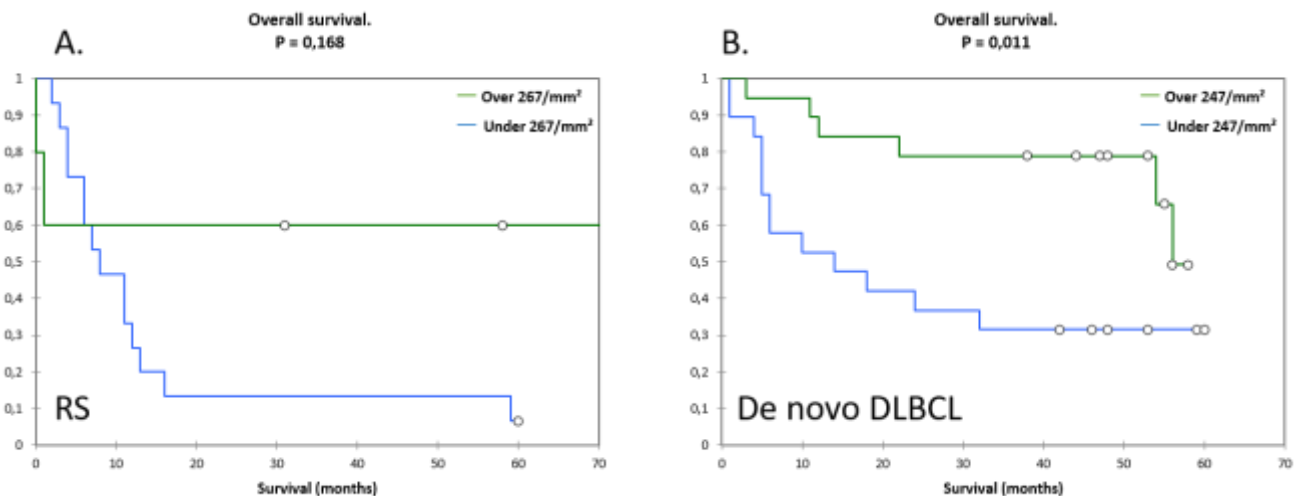
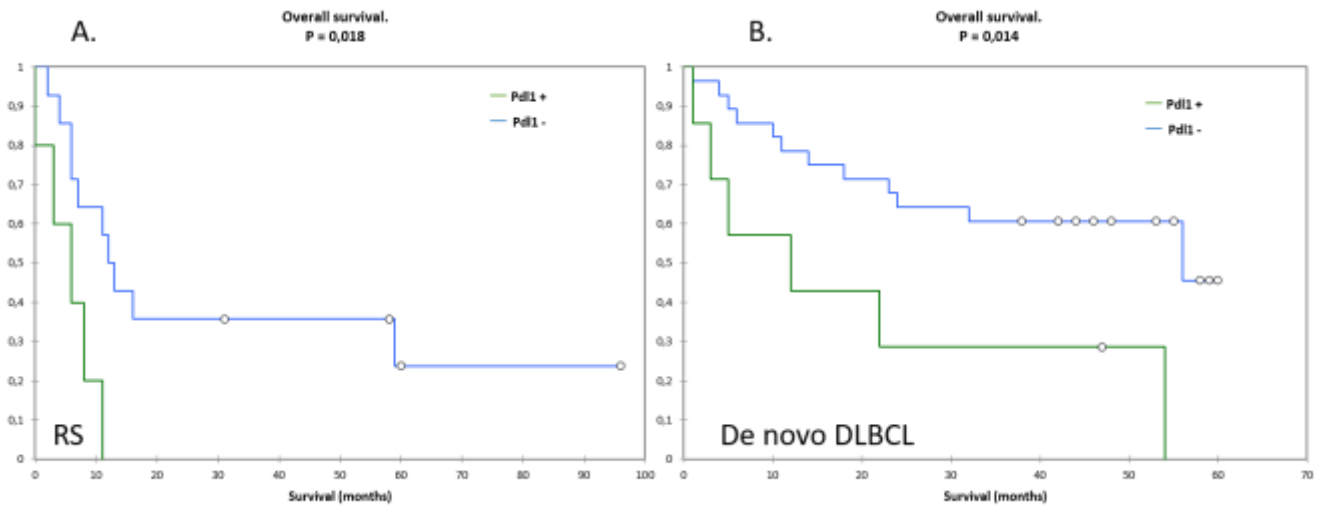


Figure 5. Kaplan Meier estimates of survival in RS and de novo DLBCL according to PD-L1.



CONCLUSION

Le variant DLBCL du syndrome de Richter est une maladie très rare et de pronostic sombre pour lequel les thérapeutiques actuelles sont peu efficaces.

I. DONNÉES SIGNIFICATIVES.

Le taux de lymphocytes T CD8, le taux de macrophages associés à la tumeur et l'expression de PD-L1 sont reconnus comme des facteurs pronostiques dans les lymphomes B diffus à grandes cellules de novo mais aucune étude comparable n'a été réalisée dans les LBDGC secondaires à une LLC.

Au cours de notre travail, nous avons confirmé l'importance du microenvironnement dans le variant LBDGC du syndrome de Richter. Ce travail a permis notamment de montrer que le taux de lymphocytes CD8 positifs au sein de la tumeur était corrélé à la survie dans les syndromes de Richter et les LBDGC de novo. Le taux de MAT (macrophages associés à la tumeur) était également significativement lié au pronostic dans les LBDGC de novo avec une tendance dans les SR de type LBDGC.

Les facteurs pronostiques les plus importants restent les scores pronostiques pour chaque groupe. Le score IPI pour les LBDGC de novo et le score de Richter pour les SR de type LBDGC. Ce score a pu être calculé pour chaque patient.

Comme cela a déjà été démontré dans différents lymphomes, notamment les lymphomes plasmablastiques et les LBDGC de novo, l'expression de PD-L1 au sein des cellules tumorales dans les SR de type LBDGC était corrélée à la survie.

PD-1 et ses ligands PD-L1 PD-L2 sont des facteurs de régulation de la réponse immune dans de nombreux cancers. Il s'agit d'une protéine inhibant la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T CD8+ et elle est donc fortement liée au microenvironnement tumoral. Le développement de thérapies ciblées avec des anticorps anti PD-1 a prouvé son efficacité dans de nombreux cancers.

Les facteurs pronostiques les plus importants restent les scores pronostiques pour chaque groupe. Le score IPI pour les LBDGC de novo et le score de Richter pour les SE. Ces scores ont pu être calculés pour chaque patient.

II. AUTRES DONNÉES.

Plusieurs autres marqueurs ont été testés dans notre étude, sans résultats probants, non développés dans l'article :

Le pourcentage de nécrose n'était pas corrélé à la survie dans les deux groupes ont évalué la valeur pronostique de la nécrose tumorale en imagerie au sein des ganglions lymphatiques de DLBCL. La présence de nécrose était un facteur de mauvais pronostic en termes de survie sans progression et de survie globale. Nous n'avons pas trouvé de résultats significatifs sur le plan histologique, cependant la majorité des prélèvements étant des biopsies, le taux de nécrose du prélèvement n'est pas représentatif du volume ganglionnaire nécrosé.

- Les lymphomes dit double ou triple hit sont de moins bon pronostic que les LBDGC sans réarrangements. L'étude en FISH des translocations Bcl2 et Bcl6 n'a permis d'identifier que quelques cas positifs (figure 11) :

- BCL2 break : 2/12 dans les RS ; 2/19 dans les LBDGC de novo.
- BCL6 break : 2/12 dans les RS ; 4/16 dans les LBDGC de novo.

Ces éléments étaient parfois significativement corrélés à la survie mais le nombre de cas analysés était trop faible dû à un manque de matériel utilisable (épuisement des blocs ou problèmes techniques liés à la fixation), la recherche des translocations de MYC n'a pas pu apporter de résultats exploitables.

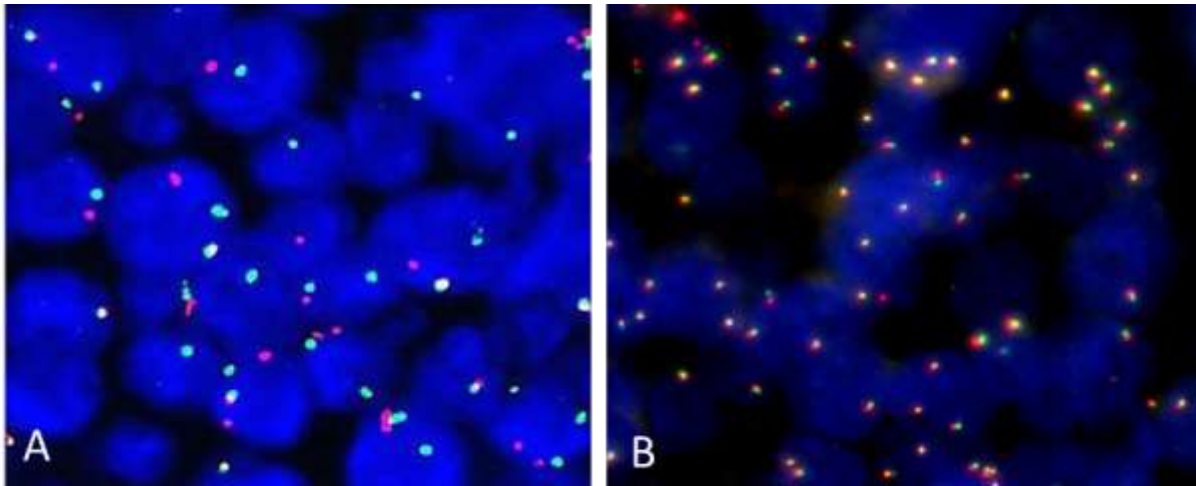


Figure 11. (Immersion x100) FISH BCL2 : A. Séparation du signal témoignant d'une translocation de BCL2 ; B. Absence de translocation.

- Concernant l'expression protéique de C-MYC : Un h-score élevé était corrélé à une survie inférieure dans les LBDGC de novo ($p=0,03$; HR = 1,009, 95% CI : 1,001-1,019) (figure 12), mais pas dans le groupe SR ($p=0,652$). Nous avons déjà discuté dans l'introduction de l'intérêt de MYC, il n'y a pas de corrélation entre l'expression de la protéine en immunohistochimie et un réarrangement du gène (translocation en FISH). Les résultats sont concordants avec ceux de la littérature.

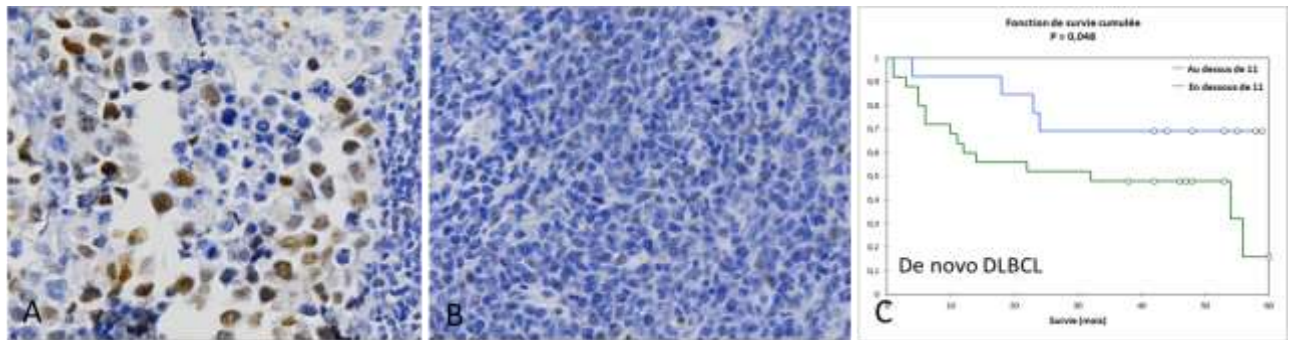


Figure 12. Expression de Myc dans les LBDGC de novo. A. H-score élevé ; B. Absence d'expression ; C. Courbe de survie. (IHC. Grossissement x40)

- Les marqueurs de prolifération Ki67 (SR : $p=0,47$; LBDGC de novo : $p= 0,3$; Cox) et MCM6 (RS : $p=0,66$; LBDGC de novo : $p= 0,54$; Cox) (figure 13) n'étaient pas corrélés à la survie. Même si ce sont des marqueurs parfois utilisés pour grader certains cancers solides, ils sont peu utilisés en pathologie lymphomateuse en dehors de l'usage diagnostique. Une étude portant sur de plus nombreux cas serait tout de même nécessaire afin d'éliminer leurs intérêts pronostiques.

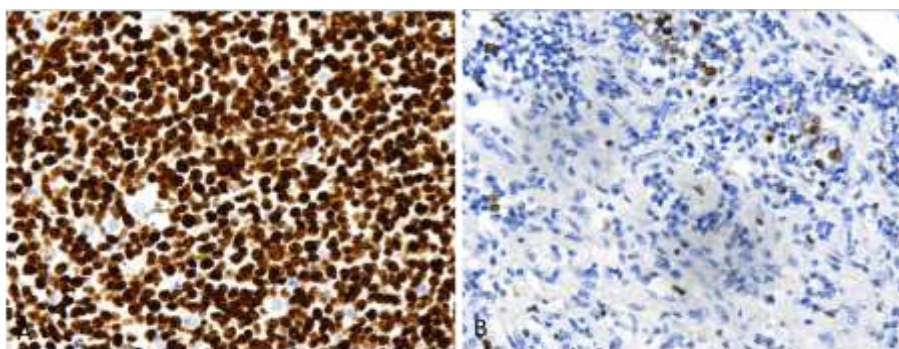


Figure 13. Exemple de 2 patients porteurs d'un SR ayant présenté une survie inférieure à 7 mois avec des profils d'expression de MCM6 opposés. A. MCM6 = 98% ; B. MCM6 = 25%.

- L'expression de CD5 était plus fréquente dans les SR que dans les LBDGC de novo, ce qui est peut-être expliqué par la particularité physiologique du SR : Les cellules de la LLC précurseurs de la transformation exprimant elle mêmes CD5. L'analyse de Kaplan-Meier met en évidence une différence non significative ($p=0,059$), on peut penser qu'une étude plus large permettrait de démontrer la significativité de ce résultat (Figure 14).

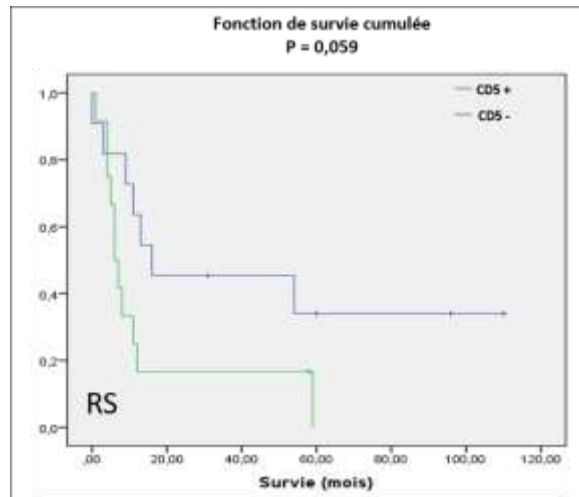


Figure 14. Courbe de survie dans les SR de type LBDGC en fonction de l'expression de CD5.

L'analyse de la relation clonale entre la LLC et le syndrome de Richter n'a pu être réalisée que tardivement et seulement 5 cas ont pu être analysés par manque de matériel (la plupart des diagnostics de LLC ne reposant pas sur une analyse anatomopathologique, nous ne disposons pas de matériel avant la transformation en Richter). Nous avons utilisé le protocole Biomed 2(66) pour l'étude du réarrangement des gènes des immunoglobulines (figure 15). L'ensemble des 5 cas présentait un lien de clonalité Richter/LLC. Cependant la survie était très variable (1mois à 60 mois).

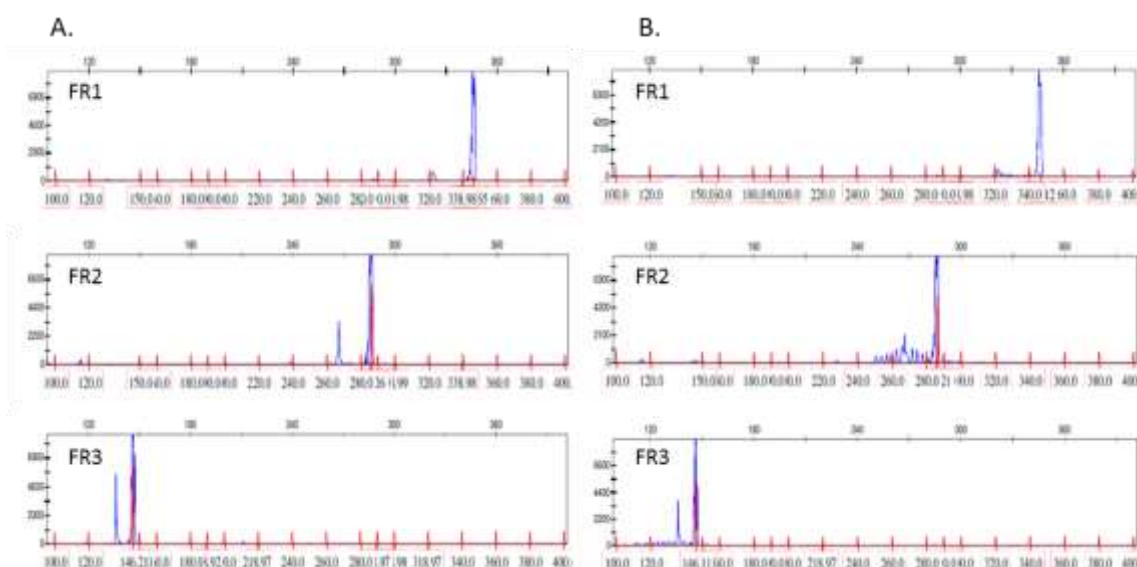


Figure 15. Analyse de la relation clonale chez un même patient entre la LLC (A.) et après la transformation en Richter (B.), les clones sont identiques en FR1, FR2 et FR3.

III. LIMITES ET PERSPECTIVES.

Il s'agit d'une étude rétrospective sur un nombre de cas limité. Les patients présentant un SR inclus dans cette étude n'ont pas tous bénéficié du même type de thérapeutique lors de la prise en charge initiale de leur LLC. Une étude sur des patients inclus dans un protocole thérapeutique permettrait d'homogénéiser la population.

La prise de rituximab était corrélée à une moins bonne survie globale, ce résultat n'a jamais été évoqué dans d'autres travaux à notre connaissance et une étude de plus grande puissance serait nécessaire afin de le conforter.

Le statut mutationnel de P53 et la relation clonale, facteurs pronostiques reconnus dans les RS de type LBDGC n'étaient pas connus pour la majorité des patients et n'ont pu être recherchés faute de matériel disponible.

En analyse multivariée, l'absence de significativité du taux de CD8, TAM et l'expression de PD-L1 sont probablement liés à un manque de puissance. Une étude d'un plus grand nombre de cas semble intéressante.

Les traitements anti PD-1 ont été utilisés dans quelques travaux. Une étude comparant le microenvironnement, l'expression de PD-L1 et la réponse thérapeutique au traitement serait intéressante et permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'interaction sur le plan immun et de définir éventuellement des groupes de patients pouvant bénéficier d'une prise en charge thérapeutique adaptée au statut pathologique.

Une étude prospective avec conservation d'un prélèvement sanguin ou histologique au stade de LLC (en sélectionnant préalablement des patients ayant des facteurs de risque de développer un Syndrome de Richter) ainsi que d'un bloc de tissu dédié à la recherche pour ces mêmes patients au stade de transformation pourrait permettre d'approfondir ces résultats.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Isaacson PG. The revised European-American lymphoma (REAL) classification. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 1995;7(6):347–8.
2. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 2011 May 12;117(19):5019–32.
3. Le Guyader-Peyrou S, Belot A, Maynadié M, Binder-Foucard F, Remontet L, Troussard X, et al. Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 2016 Apr;64(2):103–12.
4. Engelhard M, Brittinger G, Huhn D, Gerhartz HH, Meusers P, Siegert W, et al. Subclassification of diffuse large B-cell lymphomas according to the Kiel classification: distinction of centroblastic and immunoblastic lymphomas is a significant prognostic risk factor. *Blood*. 1997 Apr 1;89(7):2291–7.
5. Haralambieva E, Pulford KA, Lamant L, Pileri S, Roncador G, Gatter KC, et al. Anaplastic large-cell lymphomas of B-cell phenotype are anaplastic lymphoma kinase (ALK) negative and belong to the spectrum of diffuse large B-cell lymphomas. *Br J Haematol*. 2000 Jun;109(3):584–91.
6. Cunningham D, Hawkes EA, Jack A, Qian W, Smith P, Mouncey P, et al. Rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in patients with newly diagnosed diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma: a phase 3 comparison of dose intensification with 14-day versus 21-day cycles. *Lancet*. 2013 May 25;381(9880):1817–26.
7. Coiffier B, Thieblemont C, Van Den Neste E, Lepeu G, Plantier I, Castaigne S, 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'Études des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2010 Sep 23;116(12):2040–5.
8. Coiffier B. State-of-the-art therapeutics: diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 10;23(26):6387–93.
9. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1971 Nov;31(11):1860–1.
10. Sehn LH, Berry B, Chhanabhai M, Fitzgerald C, Gill K, Hoskins P, et al. The revised International Prognostic Index (R-IPI) is a better predictor of outcome than the standard IPI for patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1857–61.

11. Baars JW, de Jong D, Willemse EM, Gras L, Dalesio O, v Heerde P, et al. Diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphomas: the clinical relevance of histological subclassification. *Br J Cancer*. 1999 Apr;79(11-12):1770–6.
12. Xu Y, Kroft SH, McKenna RW, Aquino DB. Prognostic significance of tumour-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study. *Br J Haematol*. 2001 Mar;112(4):945–9.
13. Yan L-X, Liu Y-H, Luo D-L, Zhang F, Cheng Y, Luo X-L, et al. MYC expression in concert with BCL2 and BCL6 expression predicts outcome in Chinese patients with diffuse large B-cell lymphoma, not otherwise specified. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e104068.
14. Copie-Bergman C, Cuillière-Dartigues P, Baia M, Briere J, Delarue R, Canioni D, et al. MYC-IG rearrangements are negative predictors of survival in DLBCL patients treated with immunochemotherapy: a GELA/LYSA study. *Blood*. 2015 Nov 26;126(22):2466–74.
15. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000 Feb 3;403(6769):503–11.
16. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002 Jun 20;346(25):1937–47.
17. Guney S, Jardin F, Bertrand P, Mareschal S, Parmentier F, Picquenot J-M, et al. Several mechanisms lead to the inactivation of the CDKN2A (P16), P14ARF, or CDKN2B (P15) genes in the GCB and ABC molecular DLBCL subtypes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Sep;51(9):858–67.
18. Jardin F, Jais J-P, Molina T-J, Parmentier F, Picquenot J-M, Ruminy P, et al. Diffuse large B-cell lymphomas with CDKN2A deletion have a distinct gene expression signature and a poor prognosis under R-CHOP treatment: a GELA study. *Blood*. 2010 Aug 19;116(7):1092–104.
19. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood*. 2004 Jan 1;103(1):275–82.
20. Choi WWL, Weisenburger DD, Greiner TC, Piris MA, Banham AH, Delabie J, et al. A new immunostain algorithm classifies diffuse large B-cell lymphoma into molecular subtypes with high accuracy. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1;15(17):5494–502.
21. Meyer PN, Fu K, Greiner TC, Smith LM, Delabie J, Gascoyne RD, et al. Immunohistochemical methods for predicting cell of origin and survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab. *J Clin Oncol*. 2011 Jan 10;29(2):200–7.

22. Takahashi H, Miura K, Nakagawa M, Sugitani M, Amano Y, Kurita D, et al. Negative impact of concurrent overexpression of MYC and BCL2 in patients with advanced diffuse large B-cell lymphoma treated with dose-intensified immunochemotherapy. *Leuk Lymphoma*. 2016 Apr 13;1–7.
23. Johnson NA, Slack GW, Savage KJ, Connors JM, Ben-Neriah S, Rogic S, et al. Concurrent expression of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *J Clin Oncol*. 2012 Oct 1;30(28):3452–9.
24. Wang J, Zhou M, Xu J-Y, Chen B, Ouyang J. Combination of BCL-2 and MYC protein expression improves high-risk stratification in diffuse large B-cell lymphoma. *Onco Targets Ther*. 2015;8:2645–50.
25. Jain P, Fayad LE, Rosenwald A, Young KH, O'Brien S. Recent advances in de novo CD5+ diffuse large B cell lymphoma. *Am J Hematol*. 2013 Sep;88(9):798–802.
26. Xu-Monette ZY, Dabaja BS, Wang X, Tu M, Manyam GC, Tzankov A, et al. Clinical features, tumor biology, and prognosis associated with MYC rearrangement and Myc overexpression in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with rituximab-CHOP. *Mod Pathol*. 2015 Dec;28(12):1555–73.
27. Lu T-X, Gong Q-X, Wang L, Fan L, Zhang X-Y, Chen Y-Y, et al. Immunohistochemical algorithm alone is not enough for predicting the outcome of patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(1):275–86.
28. Abdulla M, Laszlo S, Triumf J, Hedström G, Berglund M, Enblad G, et al. A population-based study of cellular markers in R-CHOP treated diffuse large B-cell lymphoma patients. *Acta Oncol*. 2016 Aug 23;1–6.
29. Igawa T, Sato Y, Takata K, Iwaki N, Tanaka T, Asano N, et al. De novo CD5-positive diffuse large B-cell lymphomas show high specificity for cyclin D2 expression. *Diagn Pathol*. 2013;8:81.
30. Dojcinov SD, Venkataraman G, Pittaluga S, Wlodarska I, Schragger JA, Raffeld M, et al. Age-related EBV-associated lymphoproliferative disorders in the Western population: a spectrum of reactive lymphoid hyperplasia and lymphoma. *Blood*. 2011 May 5;117(18):4726–35.
31. Jelacic J, Balint MT, Jovanovic MP, Boricic N, Micev M, Stojsic J, et al. The Role of Lymphocyte to Monocyte Ratio, Microvessel Density and HiGH CD44 Tumor Cell Expression in Non Hodgkin Lymphomas. *Pathol Oncol Res*. 2016 Jul;22(3):567–77.
32. Xia Y, Jeffrey Medeiros L, Young KH. Signaling pathway and dysregulation of PD1 and its ligands in lymphoid malignancies. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jan;1865(1):58–71.
33. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, 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 Nov 5;126(19):2193–201.

34. Jørgensen LK, Poulsen MØ, Laursen MB, Marques SC, Johnsen HE, Bøgsted M, et al. MicroRNAs as novel biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma--a systematic review. *Dan Med J*. 2015 May;62(5).
35. SEER Cancer Statistics Review 1975-2001 - Previous Version - SEER Cancer Statistics [Internet]. [cited 2016 Aug 31]. Available from: http://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2001/
36. Delgado J, Villamor N. Chronic lymphocytic leukemia in young individuals revisited. *Haematologica*. 2014 Jan;99(1):4–5.
37. Marwick C. Link found between Agent Orange and chronic lymphocytic leukaemia. *BMJ*. 2003 Feb 1;326(7383):242.
38. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010 Jan;10(1):37–50.
39. Goldin LR, Slager SL, Caporaso NE. Familial Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2010 Jul;17(4):350–5.
40. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5446–56.
41. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Garcia Marco J, Houlihan A, Que TH, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994 Oct;8(10):1640–5.
42. Carbone A, Pinto A, Gloghini A, Volpe R, Zagonel V. B-zone small lymphocytic lymphoma: a morphologic, immunophenotypic, and clinical study with comparison to “well-differentiated” lymphocytic disorders. *Hum Pathol*. 1992 Apr;23(4):438–48.
43. Dick FR, Maca RD. The lymph node in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1978 Jan;41(1):283–92.
44. Pangalis GA, Angelopoulou MK, Vassilakopoulos TP, Siakantaris MP, Kittas C. B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, and lymphoplasmacytic lymphoma, including Waldenström’s macroglobulinemia: a clinical, morphologic, and biologic spectrum of similar disorders. *Semin Hematol*. 1999 Apr;36(2):104–14.
45. Schmid C, Isaacson PG. Proliferation centres in B-cell malignant lymphoma, lymphocytic (B-CLL): an immunophenotypic study. *Histopathology*. 1994 May;24(5):445–51.
46. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975 Aug;46(2):219–34.
47. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981 Jul 1;48(1):198–206.

48. Panayiotidis P, Kotsi P. Genetics of small lymphocyte disorders. *Semin Hematol*. 1999 Apr;36(2):171–7.
49. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2005 Oct 27;353(17):1793–801.
50. Kwong YL, Pang J, Ching LM, Liu HW, Liang RH, Chan LC. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. An interphase cytogenetic study by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994 Feb;72(2):83–5.
51. Mertens D, Stilgenbauer S. Prognostic and predictive factors in patients with chronic lymphocytic leukemia: relevant in the era of novel treatment approaches? *J Clin Oncol*. 2014 Mar 20;32(9):869–72.
52. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997 Apr 1;89(7):2516–22.
53. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1177–84.
54. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 2003 Jun 15;101(12):4944–51.
55. Dürig J, Naschar M, Schmücker U, Renzing-Köhler K, Hölter T, Hüttmann A, et al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. 2002 Jan;16(1):30–5.
56. Molica S. A systematic review on Richter syndrome: what is the published evidence? *Leuk Lymphoma*. 2010 Mar;51(3):415–21.
57. Lortholary P, Boiron M, Ripault P, Levy JP, Manus A, Bernard J. [CHRONIC LYMPHOID LEUKEMIA SECONDARILY ASSOCIATED WITH A MALIGNANT RETICULOPATHY: RICHTER'S SYNDROME]. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1964 Oct;4:621–44.
58. Tsimberidou A-M, O'Brien S, Kantarjian HM, Koller C, Hagemeister FB, Fayad L, et al. Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia: the M. D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer*. 2006 Sep 15;107(6):1294–302.
59. Nitin J. New Developments in Richter Syndrome [Internet]. [cited 2016 Aug 31]. Available from: <http://www.hematologyandoncology.net/index.php/archives/april-2015/new-developments-in-richter-syndrome/>
60. Rossi D, Gaidano G. Richter syndrome: molecular insights and clinical perspectives. *Hematol Oncol*. 2009 Mar;27(1):1–10.

61. Aydin S, Rossi D, Bergui L, D'Arena G, Ferrero E, Bonello L, et al. CD38 gene polymorphism and chronic lymphocytic leukemia: a role in transformation to Richter syndrome? *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5646–53.
62. Solh M, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Appelbaum FR, Tallman MS, et al. The impact of initial fludarabine therapy on transformation to Richter syndrome or prolymphocytic leukemia in patients with chronic lymphocytic leukemia: analysis of an intergroup trial (CALGB 9011). *Leuk Lymphoma*. 2013 Feb;54(2):252–4.
63. Jain P, O'Brien S. Richter's transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2012 Dec;26(12):1146–52.
64. Tsimberidou A-M, O'Brien S, Khouri I, Giles FJ, Kantarjian HM, Champlin R, et al. Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation. *J Clin Oncol*. 2006 May 20;24(15):2343–51.
65. Rossi D, Spina V, Deambrogi C, Rasi S, Laurenti L, Stamatopoulos K, et al. The genetics of Richter syndrome reveals disease heterogeneity and predicts survival after transformation. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3391–401.
66. Van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans P a. S, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 Dec;17(12):2257–317.

ANNEXES.

Annexe 1 : réalisation des blocs de Tissue Micro Array

La technique de Tissue micro array (TMA) est une méthode permettant de disposer sur un seul bloc de paraffine plusieurs échantillons tumoraux. Elle a notamment été utilisée dans certaines études portant sur les cancers de prostate et du sein. Elle n'est pour le moment réalisée que dans le domaine de la recherche.

Dans notre étude nous l'avons choisie pour son caractère peu coûteux et les avantages suivants : - préservation partielle du bloc d'origine, - analyse simultanée d'un grand nombre de cas, - uniformité des techniques de FISH et en immunohistochimie, - gain de temps et diminution des coûts des techniques.

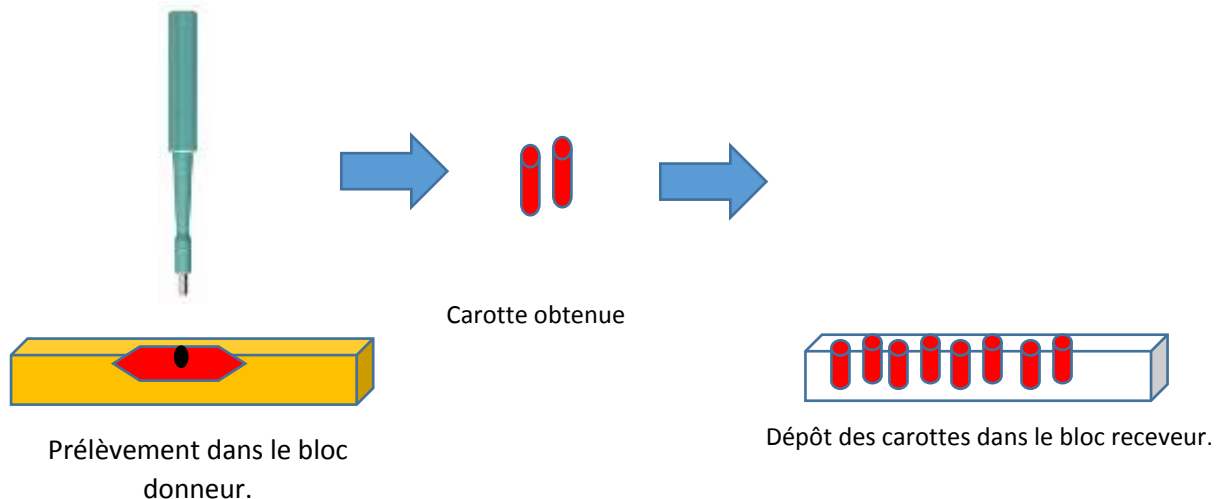
Initialement, nous avons sélectionné une zone d'intérêt sur la lame HES d'archive de chaque prélèvement que nous avons reporté sur le bloc initial.

A l'aide d'un punch à biopsie de 3mm de diamètre (figure 1), nous avons prélevé un échantillon au sein de chaque bloc de paraffine.



Figure 1 : Punch Kai 3mm, D3 MEDICAL®

La carotte biopsique obtenue était ensuite déposée dans un bloc receveur préalablement rempli avec de la paraffine liquide à 70°C. Chaque bloc receveur était alors complété jusqu'à un total de 8 à 9 biopsies. Enfin la paraffine était refroidie afin de solidifier le nouveau bloc.



Bloc final, afin de repérer l'ordre des biopsies un fragment de thyroïde était déposé au début de la première ligne.



Annexe 2 : protocole des techniques manuelles d'Hybridation In situ en Fluorescence

FISH :

Références des sondes break apart :

- MYC FISH DNA probe, split signal: X20 DAKO Y5410 Lot 20029630
- Bcl2 FISH DNA probe, split signal: X21 DAKO Y5407 Lot 20031599
- Bcl6 FISH DNA probe, split signal: X22 DAKO Y5408 Lot 20025135

Référence du kit Pour hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur des coupes de tissus fixées au formol et incluses en paraffine : DAKO Histology FISH Accessory Kit ref K579911 Lot 20029075.

Jour 1					Jour 2		
Etape 1 Deparaffinage	Etape 2 Pré traitement	Etape 3 Digestion	Etape 4 Déshydratation	Etape 5 Dénaturation Hybridation	Etape 6 Post Hybridation	Etape 7 Déshydratation	Etape 8 Montage
Automate GEMINI	Solution de pré traitement	Essuyer autour de l'image.	Ethanol 70 % 2 min	Ajouter 10 µL de sonde	Monter le bain marie à 65°C	Ethanol 70 % 2 min	Déposer 15 µL de DAPI
Wash Buffer 2min	Refroidir les lames 15 min	Déposer 5 - 8 gouttes de pepsine	Ethanol 85 % 2 min	Couvrir d'une lamelle et seller.	Retirer la lamelle	Ethanol 85% 2 min	Couvrir d'une lamelle
	Wash buffer 2 x 3 min	Incuber : 37°C 4 min Eliminer la pepsine Wash buffer 2x 3 min	Ethanol 96 % 2 min	Hybridation	Stringent WASH 2min	Ethanol 96 % 2 min	Placer au réfrigérateur à l'abri de la lumière.
			Sécher à l'air libre 15 min		Stringent WASH 10 min 65°C	Sécher à l'air libre 15 min	Lire après 15 min.
					Wash buffer 2 x 3 min		

Les lames de FISH ont été lues sur un microscope Zeiss Ax10.

Le compte a été effectué sur 100 noyaux de cellules lymphomateuses.

Un seuil de 10% de translocation a été retenu comme significatif.

VU

NANCY, le **25 août 2016**

Le Président de Thèse

Professeur Jean-Michel VIGNAUD

NANCY, le **31 août 2016**

Pour le Doyen de la Faculté de Médecine

Le Vice-Doyen,

Professeur Marc DEBOUVERIE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE/ 9178

NANCY, le **2 septembre 2016**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE,

Pierre MUTZENHARDT

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le syndrome de Richter (SR) représente la transformation en lymphome agressif, le plus fréquemment un lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) à partir d'une leucémie lymphoïde chronique (LLC). A ce jour, peu de marqueurs pronostiques ont été décrits dans les syndromes de Richter et peu de données sont disponibles sur les spécificités des SR par rapport aux LBDGC de novo. Le but de cette étude est d'évaluer l'intérêt pronostique de plusieurs marqueurs dans une série de SR de type LBDGC en comparaison à des LBDGC de novo en se focalisant sur le microenvironnement et la réponse immune.

Méthode : Nous avons analysé rétrospectivement des échantillons de 26 patients diagnostiqués SR de type LBDGC avec 46 patients diagnostiqués pour des LBDGC de novo et nous avons étudié différents critères clinico-histologiques en particulier autour du microenvironnement (vascularisation, taux de lymphocytes, taux de monocytes, taux de polynucléaires neutrophiles) et immunohistochimiques (PD-L1, CD5, P53) à travers une technique de tissu micro-array.

Résultats : L'absence d'expression de PD-L1 (SR de type LBDGC : $p = 0,018$; LBDGC de novo : $p=0,014$; log Rank) et un taux élevé de lymphocyte CD8+ (SR de type LBDGC : $p = 0.049$; LBDGC de novo : $p=0.026$; log Rank) étaient corrélés à une meilleure survie globale. De plus au sein des SR, l'administration de rituximab au cours de la LLC était un facteur de mauvais pronostic. Au sein des LBDGC de novo, un taux élevé de monocytes (CD68+) était associé à une meilleure survie ($p=0.011$; log Rank).

Conclusion : Cette étude du microenvironnement dans les SR de type LBDGC a permis de démontrer que l'absence d'expression de PD-L1 et un taux élevé de lymphocytes CD8+ sont des marqueurs de bon pronostic en analyse univariée. Des études complémentaires menées sur une population plus vaste sont nécessaires afin de déterminer si ces marqueurs peuvent être capables de prédire la réponse thérapeutique à un traitement par immunothérapie.

TITRE EN ANGLAIS

Absence of PD-L1 expression in lymphoma cells and a high number of CD8+ lymphocytes in tumor micro-environment are correlated with a better overall survival in DBBCL variant of Richter syndrome.

THÈSE : MÉDECINE GÉNÉRALE ou MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2016

MOTS CLES :

Microenvironnement, PDL1, CD8, macrophages, syndrome de Richter, lymphome B diffus à grandes cellules.

INTITULÉ ET ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
