Maladie de Hodgkin, variant du syndrome de Richter: étude anatomo-clinique à propos de la série française multicentrique du GOELAMS et caractérisation moléculaire de réarrangements du gène IgH sur la cellule isolée par microdissection laser

Anne-Elisabeth Marrie Mas

▶ **To cite this version:**

Anne-Elisabeth Marrie Mas. Maladie de Hodgkin, variant du syndrome de Richter: étude anatomo-clinique à propos de la série française multicentrique du GOELAMS et caractérisation moléculaire de réarrangements du gène IgH sur la cellule isolée par microdissection laser. Sciences du Vivant [q-bio]. 2003. hal-01734041

HAL Id: hal-01734041
https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734041

Submitted on 14 Mar 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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-theses-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

16361 0

UNIVERSITE HENRI POINCARE NANCY I FACULTE DE MEDECINE DE NANCY

2003 N° 35

SCD-UHP - NANCY 1 BIBLIOTHÈQUE * MÉDECINE *

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Anne-Elisabeth MARRIE épouse MAS

le 10 avril 2003

MALADIE DE HODGKIN
VARIANT DU SYNDROME DE RICHTER.

Etude anatomo-clinique à propos de la série française multicentrique du GOELAMS et caractérisation moléculaire de réarrangements du gène IgH sur cellule isolée par microdissection laser.

Examinateurs de la thèse :

M. F. PLENAT	Professeur	)	Président
M. P. LEDERLIN	Professeur	)	
M. J.M. VIGNAUD	Professeur	)	Juges
M. E. LABOUYRIE	Professeur	)	
M. P. FEUGIER	Docteur	)	

BIBLIOTHEQUE MEDECINE NANCY 1
D 007 212552 7

UNIVERSITE HENRI POINCARE NANCY I FACULTE DE MEDECINE DE NANCY

2003 N°

BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur en Médecine

Présentée et soutenue publiquement

dans le cadre du troisième cycle de Médecine Spécialisée

par

Anne-Elisabeth MARRIE épouse MAS

le 10 avril 2003

MALADIE DE HODGKIN
VARIANT DU SYNDROME DE RICHTER.

Etude anatomo-clinique à propos de la série française multicentrique du GOELAMS et caractérisation moléculaire de réarrangements du gène IgH sur cellule isolée par microdissection laser.

Examinateurs de la thèse :

M. F. PLENAT	Professeur	)	Président
M. P. LEDERLIN	Professeur	)	
M. J.M. VIGNAUD	Professeur	)	Juges
M. E. LABOUYRIE	Professeur	)	
M. P. FEUGIER	Docteur	)	

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Président de l'Université : Professeur Claude BURLET

BIBLIOTHÈQUE MÉDECINE

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Jacques ROLAND

Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Hervé VESPIGNANI

Assesseurs

du 1er Cycle :	**Mme le Docteur Chantal KOHLER**
du 2ème Cycle :	**Mr le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI**
du 3ème Cycle :	**Mr le Professeur Henry COUDANE**
de la Vie Facultaire :	**Mr le Professeur Bruno LEHEUP**

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX
Professeur Georges GRIGNON

PROFESSEURS HONORAIRES

Louis PIERQUIN – Etienne LEGAIT – Jean LOCHARD – René HERBEUVAL – Gabriel FAIVRE – Jean-Marie FOLIGUET
Guy RAUBER – Paul SADOUL – Raoul SENAULT – Roger BENICHOUX – Marcel RIBON
Jacques LACOSTE – Jean BEUREY – Jean SOMMELET – Pierre HARTEMANN – Emile de LAVERGNE
Augusta TREHEUX – Michel MANCIAUX – Paul GUILLEMIN – Pierre PAYSANT
Jean-Claude BURDIN – Claude CHARDOT – Jean-Bernard DUREUX – Jean DUHEILLE – Jean-Pierre GRILLIAT
Pierre LAMY – Jean-Marie GILGENKRANTZ – Simone GILGENKRANTZ
Pierre ALEXANDRE – Robert FRISCH – Michel PIERSON – Jacques ROBERT
Gérard DEBRY – Georges GRIGNON – Pierre TRIDON – Michel WAYOFF – François CHERRIER – Oliéro GUERCI
Gilbert PERCEBOIS – Claude PERRIN – Jean PREVOT – Pierre BERNADAC – Jean FLOQUET
Alain GAUCHER – Michel LAXENAIRE – Michel BOULANGE – Michel DUC – Claude HURIET – Pierre LANDES
Alain LARCAN – Gérard VAILLANT – Daniel ANTHOINE – Pierre GAUCHER – René-Jean ROYER
Hubert UFFHOLTZ – Jacques LECLERE – Francine NABET – Jacques BORRELLY
Michel RENARD – Jean-Pierre DESCHAMPS – Pierre NABET – Marie-Claire LAXENAIRE – Adrien DUPREZ – Paul VERT

==========

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42ème Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1ère sous-section : ***(Anatomie)***

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Gilles GROSDIDIER
Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

2ème sous-section : ***(Cytologie et histologie)***

Professeur Bernard FOLIGUET

3ème sous-section : ***(Anatomie et cytologie pathologiques)***

Professeur François PLENAT - Professeur Jean-Michel VIGNAUD – Professeur Eric LABOUYRIE

43ème Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1ère sous-section : ***(Biophysique et médecine nucléaire)***

Professeur Alain BERTRAND – Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE

2ème sous-section : ***(Radiologie et imagerie médicale)***

Professeur Jean-Claude HOEFFEL – Professeur Luc PICARD – Professeur Denis REGENT
Professeur Michel CLAUDON – Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM
Professeur Jacques FELBLINGER

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

1ère sous-section : *(Biochimie et biologie moléculaire)*

Professeur Jean-Pierre NICOLAS

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER

2ème sous-section : *(Physiologie)*

Professeur Jean-Pierre CRANCE – Professeur Jean-Pierre MALLIE

Professeur François MARCHAL – Professeur Philippe HAOUZI

3ème sous-section : *(Biologie cellulaire)*

Professeur Claude BURLET

4ème sous-section : *(Nutrition)*

Professeur Olivier ZIEGLER

BIBLIOTHÈQUE

45ème Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1ère sous-section : *(Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)*

Professeur Alain LE FAOU

2ème sous-section : *(Parasitologie et mycologie)*

Professeur Bernard FORTIER

3ème sous-section : *(Maladies infectieuses ; maladies tropicales)*

Professeur Philippe CANTON – Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46ème Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

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

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU

2ème sous-section : *(Médecine et santé au travail)*

Professeur Guy PETIET

3ème sous-section : *(Médecine légale et droit de la santé)*

Professeur Henry COUDANE

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

Professeur Bernard LEGRAS – Professeur François KOHLER

47ème Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1ère sous-section : *(Hématologie ; transfusion)*

Professeur Christian JANOT – Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Pierre LEDERLIN – Professeur Jean-François STOLTZ

2ème sous-section : *(Cancérologie ; radiothérapie)*

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Pierre BEY – Professeur Didier PEIFFERT

3ème sous-section : *(Immunologie)*

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

4ème sous-section : *(Génétique)*

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

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

1ère sous-section : *(Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)*

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Dan LONGROIS - Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES

2ème sous-section : *(Réanimation médicale)*

Professeur Henri LAMBERT – Professeur Alain GERARD

Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT – Professeur Bruno LÉVY

3ème sous-section : *(Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)*

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4ème sous-section : *(Thérapeutique)*

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

49ème Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP et RÉÉDUCATION

1ère sous-section : *(Neurologie)*

Professeur Michel WEBER – Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI
Professeur Xavier DUCROCQ

2ème sous-section : *(Neurochirurgie)*

Professeur Henri HEPNER – Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE
Professeur Thierry CIVIT

3ème sous-section : *(Psychiatrie d'adultes)*

Professeur Jean-Pierre KAHN

4ème sous-section : *(Pédopsychiatrie)*

Professeur Colette VIDAILHET – Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC

5ème sous-section : *(Médecine physique et de réadaptation)*

Professeur Jean-Marie ANDRE

50ème Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE

1ère sous-section : *(Rhumatologie)*

Professeur Jacques POUREL – Professeur Isabelle VALCKENAERE

2ème sous-section : *(Chirurgie orthopédique et traumatologique)*

Professeur Daniel SCHMITT – Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE – Professeur Daniel MOLE
Professeur Didier MAINARD

3ème sous-section : *(Dermato-vénéréologie)*

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD

4ème sous-section : *(Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique)*

Professeur François DAP

51ème Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE

1ère sous-section : *(Pneumologie)*

Professeur Jean-Marie POLU - Professeur Yves MARTINET
Professeur Jean-François CHABOT

2ème sous-section : *(Cardiologie)*

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL –
Professeur Christian de CHILLOU de CHURET

3ème sous-section : *(Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)*

Professeur Pierre MATHIEU – Professeur Jean-Pierre VILLEMOT
Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACE

4ème sous-section : *(Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)*

Professeur Gérard FIEVE

52ème Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1ère sous-section : *(Gastroentérologie ; hépatologie)*

Professeur Marc-André BIGARD
Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI

2ème sous-section : *(Chirurgie digestive)*

3ème sous-section : *(Néphrologie)*

Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN (Mme)

4ème sous-section : *(Urologie)*

Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT

53ème Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1ère sous-section : *(Médecine interne)*

Professeur Gilbert THIBAUT – Professeur Francis PENIN
Professeur Denise MONERET-VAUTRIN – Professeur Denis WAHL
Professeur Jean DE KORWIN KROKOWSKI – Professeur Pierre KAMINSKY
Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY

2ème sous-section : *(Chirurgie générale)*

Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER

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

1ère sous-section : *(Pédiatrie)*

Professeur Danièle SOMMELET – Professeur Michel VIDAILHET

Professeur Pierre MONIN – Professeur Jean-Michel HASCOET – Professeur Pascal CHASTAGNER

2ème sous-section : *(Chirurgie infantile)*

Professeur Michel SCHMITT – Professeur Gilles DAUTEL

3ème sous-section : *(Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)*

Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO

4ème sous-section : *(Endocrinologie et maladies métaboliques)*

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN

5ème sous-section : *(Biologie et médecine du développement et de la reproduction)*

Professeur Hubert GERARD

55ème Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1ère sous-section : *(Oto-rhino-laryngologie)*

Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

2ème sous-section : *(Ophtalmologie)*

Professeur Antoine RASPILLER – Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD

3ème sous-section : *(Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)*

Professeur Michel STRICKER – Professeur Jean-François CHASSAGNE

==========

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

27ème section : INFORMATIQUE

Professeur Jean-Pierre MUSSE

64ème Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeur Daniel BURNEL

==========

PROFESSEUR ASSOCIÉ

Épidémiologie, économie de la santé et prévention

Professeur Tan XIAODONG

==========

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42ème Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1ère sous-section : *(Anatomie)*

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Jean-Pascal FYAD

2ème sous-section : *(Cytologie et histologie)*

Docteur Edouard BARRAT – Docteur Jean-Claude GUEDENET

Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3ème sous-section : *(Anatomie et cytologie pathologiques)*

Docteur Yves GRIGNON – Docteur Béatrice MARIE

Docteur Laurent ANTUNES

43ème Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1ère sous-section : ***(Biophysique et médecine nucléaire)***

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

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

1ère sous-section : ***(Biochimie et biologie moléculaire)***

Docteur Xavier HERBEUVAL – Docteur Jean STRACZEK

Docteur Sophie FREMONT – Docteur Isabelle GASTIN – Dr Bernard NAMOUR

2ème sous-section : ***(Physiologie)***

Docteur Gérard ETHEVENOT – Docteur Nicole LEMAU de TALANCE – Christian BEYAERT

45ème Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1ère sous-section : ***(Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière)***

Docteur Francine MORY – Docteur Michèle WEBER – Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX – Docteur Alain LOZNIEWSKI – Docteur Véronique VENARD

2ème sous-section : ***(Parasitologie et mycologie)***

Docteur Marie-France BIAVA – Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU

46ème Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

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

Docteur Mickaël KRAMER – Docteur François ALLA

4ère sous-section : ***(Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication (type biologique)***

Docteur Pierre GILLOIS

47ème Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1ère sous-section : ***(Hématologie ; transfusion)***

Docteur Jean-Claude HUMBERT – Docteur François SCHOONEMAN

3ème sous-section : ***(Immunologie)***

Docteur Marie-Nathalie SARDA

4ème sous-section : ***(Génétique)***

Docteur Christophe PHILIPPE

48ème Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION. MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1ère sous-section : ***(Anesthésiologie et réanimation chirurgicale)***

Docteur Jacqueline HELMER – Docteur Gérard AUDIBERT

3ème sous-section : ***(Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique)***

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT

Docteur Damien LOEUILLE

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

5ème sous-section : ***(Biologie et médecine du développement et de la reproduction)***

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

==========

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

19ème section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Michèle BAUMANN

32ème section : CHIMIE ORGANIQUE, MINÉRALE, INDUSTRIELLE

Monsieur Jean-Claude RAFT

40ème section : SCIENCES DU MÉDICAMENT
Monsieur Jean-Yves JOUZEAU

60ème section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE
Monsieur Alain DURAND

64ème section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
Madame Marie-Odile PERRIN – Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

65ème section : BIOLOGIE CELLULAIRE
Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY – Madame Anne GERARD
Madame Ketsia HESS – Monsieur Pierre TANKOSIC – Monsieur Hervé MEMBRE

67ème section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE
Madame Nadine MUSSE

68ème section : BIOLOGIE DES ORGANISMES
Madame Tao XU-JIANG

==========

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS
Médecine Générale
Docteur Alain AUBREGE
Docteur Louis FRANCO

==========

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Georges GRIGNON – Professeur Michel PIERSON
Professeur Michel BOULANGE – Professeur Alain LARCAN – Professeur Michel DUC
Professeur Michel WAYOFF – Professeur Daniel ANTHOINE – Professeur Claude HURIET
Professeur Hubert UFFHOLTZ – Professeur René-Jean ROYER
Professeur Pierre GAUCHER – Professeur Claude CHARDOT – Professeur Adrien DUPREZ

==========

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Norman SHUMWAY (1972)
Université de Stanford, Californie (U.S.A)
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)
Université Catholique, Louvain (Belgique)
Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Professeur Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würtzburg (R.F.A)
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)

Remerciements

A notre Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur F. PLENAT

Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques (Option Biologie)

Vous nous avez fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Votre grande rigueur technique et la qualité de vos enseignements nous ont accompagnée durant notre Internat de Médecine.

Veuillez trouver ici le témoignage de notre respect.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur P. LEDERLIN

Professeur de Médecine Interne

Vous nous avez fait l'honneur de juger ce travail.
La collaboration de votre service à l'Anatomie Pathologique est le témoin de l'intérêt que vous portez à notre spécialité.

Veuillez trouver, en ce travail, le témoignage de notre gratitude.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur J.M. VIGNAUD

Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques

Vous nous avez fait l'honneur de juger ce travail.
Durant notre Internat de Médecine, vous nous avez communiqué votre enthousiasme scientifique et nous avez enseigné une partie de vos grandes connaissances.

Veuillez trouvez, en ce travail, l'expression de notre sincère respect.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur E. LABOUYRIE

Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques

Vous nous avez fait l'honneur de nous confier ce travail.
Avec une constante bienveillance, vous nous avez guidée lors de sa réalisation et nous avez initiée à l'hématopathologie.

Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre admiration.

A notre Juge,

Monsieur le Docteur P. FEUGIER

Praticien Hospitalier de Médecine Interne

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse.
Vous avez largement participé à la réalisation de ce travail et nous avez prodigué, avec disponibilité, de précieux conseils lors de l'analyse clinique.

Nous vous prions de trouver, dans ce travail, l'expression de notre reconnaissance.

A Madame le Docteur Nathalie MONHOVEN,

Docteur ès Sciences

Vous avez amplement contribué à la réalisation de ce travail.
Vous nous avez transmis avec enthousiasme les connaissances nécessaires à sa réalisation pratique.

Nous vous prions de recevoir notre profonde reconnaissance.

Nous tenons tout particulièrement à remercier nos collègues cliniciens et pathologistes du groupe GOELAMS qui ont contribué à notre étude, et notamment :

Pr A Martin - Bobigny
Dr L Saout - Vannes
Dr Froment - Metz

Dr Michenet - Orléans
Dr L Martin - Dijon
Dr Tas - Rennes

Dr Patey - Reims

Pr Casassus - Bobigny
Dr Jardel - Vannes
Dr Christian – Metz
Dr Guichard - Metz
Dr Boulet - Orléans
Dr Guy - Dijon
Dr Dauriac - Rennes
Dr Gandhour - Rennes
Dr Blaise - Reims

Nous remercions tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

Mesdames Sylviane PIZZAGALLI et Corinne BONNET

pour leur gentillesse et leur précieuse aide à la réalisation technique de ce travail.

Madame le Docteur Maud OUNNOUGHENE-PIET et Mademoiselle le Docteur Virginie CAHN

pour leurs conseils avisés et leur bonne humeur.

Madame Claudine MAIRE

pour la relecture patiente de ce manuscrit.

Tous les membres des laboratoires d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU de Nancy (Professeur F. PLENAT et Professeur J.-M. VIGNAUD) et du Centre Alexis Vautrin (Docteur A. LEROUX).

Nos Collègues et Amis.

A nos maîtres successifs d'internat,

Monsieur le Docteur M. AUBERTEL
Monsieur le Docteur F. SZTERMER
Monsieur le Docteur I. KRAKOWSKI
Monsieur le Professeur A. DUPREZ
Monsieur le Professeur J.M. VIGNAUD
Monsieur le Professeur F. PLENAT
Monsieur le Professeur E. LABOUYRIE
Monsieur le Docteur R.M. PARACHE
Madame le Docteur A. LEROUX

A Sébastien,

mon mari, qui a rendu possible la réalisation de ce troisième cycle,

A Paul-Louis et Edouard,

nos deux premiers enfants, qui auront eu la patience d'attendre,

A Monsieur et Madame Gilles MARRIE, mes parents,
et Monsieur et Madame Roland MAS, mes beaux-parents,

pour leur soutien sans réserve,

A Madame Jean LECQ, ma grand-mère,
A Jean-Benoît,
A Benoît et Pauline,

pour leur affection,

A toute ma famille,

A tous mes amis,

Je dédie ce travail de thèse.

Serment

« Au moment d'être admise 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 et de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et moraux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état et 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.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue 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 déshonorée et méprisée si j'y manque »

Table des matières

Abréviations 27

Tableaux 28

Figures 29

Planches photographiques 30

Introduction 32

1 Rappels anatomo-cliniques 34

1.1 La leucémie lymphoïde chronique 34

1.1.1 Epidémiologie 34

1.1.2 Diagnostic 34

1.1.2.1 Hémogramme 34

1.1.2.2 Cytométrie de flux 35

1.1.2.3 Myélogramme 35

1.1.2.4 Autres analyses 36

1.1.3 Morphologie 36

1.1.3.1 Architecture 36

1.1.3.2 Cytologie 36

1.1.4 Immunophénotype sur prélèvements biopsiques 37

1.1.5 Génétique 37

1.1.6 Biologie moléculaire 37

1.1.7 Pronostic 38

1.1.8 Evolution 39

1.1.9 Thérapeutique 40

1.2 Maladie de Hodgkin 40

1.2.1 Généralités 40

1.2.2 Epidémiologie 41

1.2.3 Diagnostic 41

1.2.3.1 Circonstances de découverte 41

1.2.3.2 Bilan d'extension 42

1.2.4 Diagnostic histologique 43

1.2.4.1 Macroscopie 43

1.2.4.2 Architecture 44

1.2.4.3 Cytologie 44

1.2.4.3.1 Les cellules tumorales 44

1.2.4.3.2 Les cellules réactionnelles 45

1.2.4.4 Les quatre formes histopathologiques 45

1.2.4.5 Immunophénotype 48

1.2.5 Pronostic 51

1.2.6 Thérapeutique 52

1.2.7 Biologie de la MH 53

1.2.7.1 Etiopathogénie de la cellule de HRS 53

1.2.7.2 Rôle de l'EBV 62

1.2.7.3 Facteurs génétiques 63

1.3 La maladie de Hodgkin variant du syndrome de Richter 63

1.3.1 Considérations générales 63

1.3.2 Epidémiologie 63

1.3.3 Diagnostic 64

1.3.4 Morphologie 64

1.3.5 Immunophénotype 65

1.3.6 Détection du virus d'Epstein-Barr 65

1.3.7 Pronostic 66

1.3.8 Thérapeutique 66

2 Matériels et méthodes 68

2.1 Les patients 68

2.2 Méthodes diagnostiques 68

2.2.1 Etude histologique 69

2.2.2 Etude immunohistochimique 69

2.2.3 Technique d'hybridation *in situ* 71

2.2.4 Techniques de PCR, réalisées à partir d'ADN extrait de coupes tissulaires 72

2.2.4.1 Le recueil de l'ADN 75

2.2.4.2 La réaction de PCR CDR III 76

2.2.4.3 La réaction de PCR FR3A 77

2.2.4.4 Les contrôles 78

2.2.4.5 La visualisation des résultats 79

2.3 Mise au point d'une technique d'amplification génomique à partir de l'ADN d'une ou plusieurs cellules isolées obtenues par microdissection laser 79

2.3.1 Le matériel étudié sur le plan moléculaire 79

2.3.1.1 Notre série 79

2.3.1.2 Le cas témoin ayant permis les mises au point techniques 81

2.3.2 La préparation des échantillons 81

2.3.2.1 Marquage des populations cellulaires d'intérêt 82

2.3.2.2 Principe de fonctionnement de la microdissection laser 83

2.3.2.3 La microdissection des 4 échantillons de notre série 83

2.3.3 Mise en évidence des réarrangements du gène de l'IgH par PCR CDRIII et FR3A 84

2.3.3.1 L'étape de pré amplification de l'ADN total 84

2.3.3.2 Contrôle de la qualité de l'ADN après microdissection 85

2.3.3.3 Sensibilité des techniques de PCR CDRIII et FR3A 86

2.3.3.4 L'optimisation de la technique de PCR pour l'étude des échantillons obtenus par microdissection laser 87

2.3.3.4.1 Les amorces CDRIII et FR3A 87

2.3.3.4.2 Les enzymes *Taq* polymérase 87

2.3.3.4.3 La concentration en MgCl2 88

2.3.3.4.4 Contrôle de la technique 89

3 Résultats 91

3.1 Les patients 91

3.2 Caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques 96

3.2.1 Observations morphologiques 96

3.2.2 Le profil immunohistochimique de la composante hodgkinienne 101

3.3 Détection EBV 104

3.4 Biologie moléculaire 105

3.4.1 Les résultats des mises au point techniques 105

3.4.1.1 Vérification de la qualité de l'ADN après microdissection laser 105

3.4.1.2 La sensibilité de la PCR CDRIII et FR3A 106

3.4.1.3 Les amorces CDRIII et FR3A 108

3.4.1.4 Les enzymes *Taq* polymérases 108

3.4.1.5 La concentration en $MgCl_2$ 108

3.4.2 La technique de PCR retenue pour l'étude des cellules isolées par microdissection laser 109

3.4.3 Les résultats sur tissu congelé (4 cas) 110

3.4.4 Les résultats des contrôles 113

4 Discussion 115

Conclusion 131

Références bibliographiques 133

Annexes 156

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
Cellule HRS	Cellule de Hodgkin et Reed-Sternberg
EBV	Virus d'Epstein-Barr
GOELAMS	Groupe Ouest Est d'étude des Leucémies et autres Maladies du Sang
HIS	Hybridation In Situ
IgH	Chaîne lourde des Immunoglobulines
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
MH	Maladie / Lymphome de Hodgkin
PCR	Polymerase Chain Reaction – Réaction de Polymérisation en chaîne
PEP	Primer Extension Preamplification – Préamplification

Tableaux

		Page
Tableau n° 1	Score de Matutes	35
Tableau n° 2	Classification pronostique selon Rai	38
Tableau n° 3	Classification pronostique selon Binet	38
Tableau n° 4	Extension clinique selon la classification d'Ann Arbor	43
Tableau n° 5	Anticorps utilisés dans notre étude et conditions techniques	70
Tableau n° 6	Histoire clinique des 9 patients	95
Tableau n° 7	Données morphologiques	99
Tableau n° 8	Données immunohistochimiques des cellules HRS	101
Tableau n° 9	Détection du virus d'Epstein-Barr dans les cellules HRS	104
Tableau n°10	Rendement des amplifications par PCR, réalisées sur nos 4 cas	110

Figures

		Page
Figure n° 1	Schéma concernant l'immunophénotype tronqué de la cellule de Hodgkin et Reed-Sternberg [d'après Schwering (97)]	59
Figure n° 2	Représentation schématique du gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines	74
Figure n° 3	Position schématique des amorces utilisées pour l'étude des réarrangements du gène de l'IgH (CDRIII et FR3A)	74

Planches photographiques

		Page
Planche n° 1	Maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter : morphologie	100
Planche n° 2	Maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter : immunophénotype	103
Planche n° 3	Technique de PEP-PCR pour la détection des gènes IgH CDRIII et FR3A sur cellule isolée par microdissection laser : lymphome non hodgkinien de type B splénique de la zone marginale témoin	107
Planche n° 4	Technique de PEP-PCR pour la détection des gènes IgH CDRIII et FR3A sur cellule isolée par microdissection laser dans la MH – variant du syndrome de Richter	112

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC), syndrome lymphoprolifératif indolent, le plus souvent de phénotype B, peut se transformer dans 3 % à 10 % des cas selon les séries, en lymphome non hodgkinien à grandes cellules plus agressif (syndrome de Richter). La survenue d'un lymphome de Hodgkin chez un patient atteint de LLC ou «maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter» est plus rare, observée dans moins de 1 % des cas. Ce risque représente cependant 8 fois le risque de la population normale. Depuis 1989, seuls 44 cas bien documentés sur le plan immunohistochimique ont été publiés dans la littérature anglo-saxonne. Dans ce contexte, en l'absence d'étude statistique comparative, le pronostic de la maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter, serait identique à celui de la maladie de Hodgkin classique survenant dans une population de même âge. Sur le plan morphologique, la maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter est une lésion hétérogène ; la composante hodgkinienne peut être constituée de cellules de «Hodgkin et Reed-Sternberg» (HRS) isolées et mêlées dans des proportions variables selon le cas à la composante lymphocytique ou de type LLC, ou de granulomes hodgkiniens typiques. Des formes de passage entre ces différents aspects ont été décrits chez un même patient. Enfin, à ce jour, les données de la littérature concernant la filiation entre les lymphocytes néoplasiques préexistants (LLC) et les cellules HRS apparues secondairement sont contradictoires. S'agit-il d'un seul et même lymphome ou de 2 néoplasmes lymphoïdes différents ?

Dans la première partie de ce travail, à partir de 9 observations issues de la cohorte multicentrique française du groupe GOELAMS, nous avons réalisé une étude anatomoclinique. Dans la deuxième partie, à partir des 4 cas pour lesquels nous disposions de tissu congelé, nous avons réalisé une analyse moléculaire des réarrangements des séquences variables du gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH CDRIII et FR3A), sur échantillons uni- et paucicellulaires obtenus par microdissection laser, afin de caractériser les deux populations néoplasiques au sein de chaque lésion.

Première partie :

Rappels anatomo-cliniques

1 Rappels anatomo-cliniques

1.1 La leucémie lymphoïde chronique

La LLC est une hémopathie lymphoïde chronique définie comme l'accumulation, dans le sang périphérique et la moelle osseuse, de petits lymphocytes B d'aspect mature et d'origine monoclonale, qui présentent un phénotype caractéristique (108).

1.1.1 Epidémiologie

La leucémie lymphoïde chronique est la plus fréquente des leucémies dans les pays occidentaux. Elle est rare avant 40 ans et sa fréquence augmente avec l'âge. Les 2/3 des patients ont plus de 60 ans. L'âge médian de survenue est de 64 ans (108). La maladie touche plus volontiers les hommes que les femmes, avec un sexe ratio de 2/1.

1.1.2 Diagnostic

Chez un patient sur 3, les anomalies sont uniquement biologiques. Elles sont découvertes lors d'un hémogramme pratiqué à titre systématique chez un patient asymptomatique. Dans les autres cas, un syndrome tumoral peut être présent : il consiste soit en des adénopathies superficielles (7 cas sur 10), soit en une splénomégalie ou une hépatomégalie (5 à 10 % des cas). Rarement, la découverte de la maladie fait suite à la survenue d'une complication infectieuse ou auto-immune.
Le diagnostic repose sur les examens biologiques.

1.1.2.1 Hémogramme

L'hémogramme, indispensable au diagnostic, montre une lymphocytose supérieure à $4x10^9$/L ou $5x10^9$/L, faite de petits lymphocytes d'aspect très proche des lymphocytes normaux. Les autres lignées sont normales ou altérées. Une anémie inférieure à 10 g/dL d'hémoglobine ou une thrombopénie inférieure à $100x10^9$/L ont une valeur pronostique péjorative.

1.1.2.2 Cytométrie de flux

L'examen immunophénotypique en cytométrie de flux permet de confirmer le diagnostic et de définir le score de Matutes.

Tableau n° 1 : Score de Matutes

Présence de faible taux d'immunoglobulines de membrane	1 point
Expression de la molécule CD5	1 point
Expression de la molécule CD23	1 point
Expression faible, ou inexistante de la molécule CD79a	1 point
Absence d'expression de l'antigène FMC7	1 point

Un score de 4 ou 5 affirme le diagnostic de LLC

Il montre l'existence de cellules B (CD19, CD20), monoclonales, exprimant de faibles taux d'immunoglobulines de membrane et d'antigène CD79a, co-exprimant les antigènes CD5 et CD23 et n'exprimant pas l'antigène FMC7. Il permet également de préciser le phénotype des cellules tumorales concernant des antigènes récemment identifiés comme ayant une valeur pronostique. En effet, l'expression de l'antigène CD38, notamment par une partie de la population du clone tumoral, serait corrélée à la présence de mutations de la chaîne lourde des immunoglobulines et serait de pronostic péjoratif (33).

1.1.2.3 Myélogramme

Le myélogramme était classiquement indispensable au diagnostic, montrant une infiltration de plus de 30 % de la moelle osseuse par des cellules lymphocytaires d'aspect mature. Cependant, en raison de l'immunophénotypage, il n'est plus nécessaire aujourd'hui de réaliser un myélogramme.

La biopsie médullaire n'est effectuée que dans le cadre de protocoles. Elle peut néanmoins préciser le degré de fibrose, l'extension et l'infiltration de la moelle osseuse.

1.1.2.4 Autres analyses

Un bilan biologique systématique comprend une électrophorèse des protides plasmatiques à la recherche d'une hypo- ou agammaglobulinémie, un test de Coombs direct à la recherche d'une anémie hémolytique auto-immune, un ionogramme sanguin avec évaluation de la fonction rénale et un bilan hépatique afin de compléter le bilan pré thérapeutique.

1.1.3 Morphologie

La biopsie ganglionnaire initiale n'a pas d'utilité si le diagnostic clinique, cytologique et immunophénotypique ne fait pas de doute. Cependant, si une biopsie de ganglion lymphatique ou de moelle osseuse, ou une splénectomie est réalisée, devant un tableau d'hémopathie non identifiée avec adénopathies, le diagnostic peut être évoqué.

1.1.3.1 Architecture

Au niveau des ganglions ou de la rate, on observe un effacement de l'architecture de l'organe par une prolifération pseudo-follicullaire, régulière, composée de zones pâles disposées sur un fond sombre constitué de petites cellules (8, 66). Dans la rate, l'atteinte de la pulpe blanche prédomine.
Au niveau de la biopsie médullaire, on apprécie l'infiltration par les lymphocytes néoplasiques. Quatre types histologiques sont définis selon l'architecture de l'infiltration : nodulaire, interstitiel modéré, mixte ou diffus, qui seront corrélés au pronostic (92).

1.1.3.2 Cytologie

Les cellules les plus nombreuses sont des petits lymphocytes, à peine plus grands que des lymphocytes normaux. Ils possèdent une chromatine mottée et un noyau rond. Les mitoses sont rares.

Les pseudofollicules renferment d'autres cellules, toujours associées aux lymphocytes néoplasiques : les prolymphocytes et les paraimmunoblastes. Les prolymphocytes sont de taille moyenne et possèdent une chromatine homogène et un petit nucléole. Les para-

immunoblastes sont de taille moyenne à grande, possèdent un noyau rond ou ovale à chromatine homogène et un nucléole éosinophile central. Leur cytoplasme est pâle et basophile.

1.1.4 Immunophénotype sur prélèvements biopsiques

Les cellules tumorales ont un phénotype B [CD20/L26 (expression faible), CD79a] et co-expriment la plupart des antigènes de surface associés aux cellules B : CD5, CD23, CD43. Elles présentent des immunoglobulines de surface IgD ou IgM. Elles n'expriment pas les antigènes CD10 et cycline D1.
Certaines LLC sont CD23 négatives ou faiblement positives ; il est alors utile d'étudier conjointement l'expression des antigènes cycline D1 et CD23 pour différencier la LLC d'un lymphome du manteau.

1.1.5 Génétique

Environ 8 patients sur 10 présentent des anomalies du caryotype des cellules tumorales lors de l'analyse chromosomique par FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization). Une trisomie 12 est rapportée dans 12 % des cas (72, 24) et une délétion en 13q14 dans 1 cas sur 2 (24, 23). On observe aussi dans une moindre mesure des délétions en 11q22-23 (25), 6q21 (23) ou 17p13 (22). La protéine p53 est exprimée dans 10 % des cas (17).

1.1.6 Biologie moléculaire

Il existe des réarrangements des gènes des chaînes légère et lourde des immunoglobulines. Cinquante à 60 % des cellules de la LLC hébergent des mutations somatiques au niveau du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines, ce qui est conforme à leur origine B des centres post-germinatifs (18, 35, 84).

1.1.7 Pronostic

L'évolution de la LLC a longtemps été considérée comme imprévisible. En 1975, Rai a publié une classification pronostique en 5 stades. Elle est basée sur des critères biologiques et cliniques (91).

Tableau n° 2 : Classification pronostique selon Rai

STADE	DEFINITION
Stade 0	Hyper lymphocytose supérieure à $10x10^9$/L Infiltration médullaire osseuse supérieure à 30 %
Stade I	Stade 0 + Adénopathies augmentées de volume
Stade II	Stade I + Hépatosplénomégalie
Stade III	Stade II + Anémie inférieure à 10 g/dL
Stade IV	Stade III + Thrombopénie inférieure à 100 000/mL

En 1981, Binet a proposé une classification en 3 stades ; celle-ci est celle préférentiellement utilisée en France et en Europe et est plus simple d'utilisation (10).

Tableau n° 3 : Classification pronostique selon Binet

Stade	Définition
Stade A	LLC avec atteinte de moins de trois aires ganglionnaires Absence d'anémie (Hb > 10 g/dL) Absence de thrombopénie (plaquettes > 100 000 / mL)
Stade B	Toutes les autres situations
Stade C	LLC avec atteinte de plus de trois aires ganglionnaires **ou** Anémie inférieure à 10g/dL d'hémoglobine **ou** Thrombopénie inférieure à 100 000 plaquettes par mL

Selon Montserrat *et al.*, l'évolution clinique est indolente pour les malades qui sont au stade A et qui présentent les critères suivants : une lymphocytose inférieure à $30x10^9$/L, un temps de doublement de la lymphocytose supérieur à 12 mois, un taux d'hémoglobine supérieur à 13g/dL et une absence d'infiltration tumorale diffuse de la biopsie ostéo-médullaire (78), ces critères définissant le stade A' qui correspond à 80 % des patients. Le stade A'' caractérise les patients qui présentent au moins un des critères précédents.

La classification du National Cancer Institute de 1996 considère les facteurs suivants comme de mauvais pronostic : hors d'un épisode infectieux, une fièvre supérieure à 38°C, un amaigrissement de plus de 10 % du poids en 6 mois, une fatigue extrême, des sueurs nocturnes, une insuffisance médullaire, une anémie hémolytique auto-immune, une splénomégalie avec débord costal supérieur à 6 cm, des adénopathies superficielles de taille supérieure à 10 cm ou une augmentation rapide de la lymphocytose sanguine.

L'importance des prolymphocytes, entre 10 et 55 %, définit également un mauvais pronostic (73).

Les anomalies caryotypiques, présentes dans 50 à 80 % des cas, ont une valeur pronostique importante : la délétion 11q22-23, les mutations ou les délétions de la protéine p53 et la trisomie 12 sont des facteurs péjoratifs. Enfin, la présence de mutations somatiques dans les gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines est de meilleur pronostic que les formes de LLC à cellules naïves, non mutées (18). De plus, selon certains auteurs, le taux de mutations des chaînes lourdes des immunoglobulines serait corrélé à l'expression de l'antigène CD38 par les cellules tumorales (33).

1.1.8 Evolution

Même chez les patients asymptomatiques, la masse tumorale a tendance à augmenter et à s'étendre progressivement. La survie médiane actuelle est de 95 mois pour les patients au stade A (75). Les complications les plus fréquentes sont infectieuses et auto-immunes (anémie hémolytique auto-immune, avec test de Coombs direct positif, principalement). On observe également, dans 3 à 10 % des cas selon les séries, la survenue de néoplasies secondaires : le syndrome de Richter est défini par la survenue d'un lymphome de haut grade de malignité

(94, 109). Il s'agit principalement de lymphomes B à grandes cellules (3 %) et exceptionnellement de MH. L'incidence du lymphome de Hodgkin est estimée à 0,5 % par an chez les patients atteints de LLC. Un patient atteint de LLC a 8 fois plus de risques qu'un homme normal de développer un lymphome de Hodgkin (109).

1.1.9 Thérapeutique

La LLC reste une maladie incurable. Il existe, à l'heure actuelle, un consensus pour, en première intention, ne pas administrer de chimiothérapie cytotoxique aux patients au stade A. Les patients aux stades B ou C doivent, en revanche, être traités. Les chimiothérapies de type mini-CHOP ou analogues des purines (Fludarabine) sont supérieures au Chlorambucil, en termes de réponse, mais n'ont pas d'intérêt en termes de survie. Le Chlorambucil, de par sa faible toxicité, peut être prescrit en première intention, notamment chez les sujets âgés, pour obtenir un contrôle de la maladie. La stratégie dépend ensuite de l'âge du patient et du choix d'une éventuelle intensification thérapeutique. Cette dernière, suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, peut être envisagée chez les patients les plus jeunes, dans le cadre d'essais prospectifs. La chimiothérapie est, bien sûr, toujours associée au traitement des complications.

1.2 Maladie de Hodgkin

1.2.1 Généralités

La maladie de Hodgkin a initialement été décrite par Thomas Hodgkin (1798-1866). Il a, par la suite, été démontré qu'il s'agissait d'un lymphome. Ces dernières années, la confrontation de l'ensemble des données cliniques, morphologiques, immunohistochimiques, de biologie moléculaire et de cytogénétique, a conduit à une modification du concept de lymphome de Hodgkin.

La classification de Lukes-Rye définissait quatre sous-types histologiques : le type 1, à prédominance lymphocytaire, qui existait sous deux formes, nodulaire ou diffuse, le type 2 ou

scléro-nodulaire, le type 3 ou à cellularité mixte et le type 4 ou à déplétion lymphoïde. Actuellement, à travers les nouvelles classifications de la REAL 1994 et de l'OMS 2001, on distingue d'une part la «vraie» maladie de Hodgkin classique, subdivisée en 4 formes histopathologiques, scléro-nodulaire, à cellularité mixte, «riche en lymphocytes», «avec déplétion lymphocytaire» et d'autre part l'ancienne forme «à prédominance lymphocytaire» nodulaire ou paragranulome de Poppema-Lennert, considéré actuellement comme un lymphome malin non hodgkinien de phénotype B. C'est la forme classique qui est développée ici.

1.2.2 Epidémiologie

En Europe, l'incidence de la MH varie entre 2 et 5 cas pour 100 000 habitants par an chez l'homme et entre 1 et 2 cas cas pour 100 000 habitants par an chez la femme (16). Elle se caractérise par une distribution bimodale et marque un pic entre 20 et 30 ans et un pic chez le sujet âgé (47). La MH est plus fréquente chez l'homme que chez la femme (rapport H/F entre 1,5 et 2).

1.2.3 Diagnostic

1.2.3.1 Circonstances de découverte

La MH est révélée, neuf fois sur dix, par l'existence d'adénopathies : dans 80 % des cas, une adénopathie périphérique est palpable et chez 10 % des patients, une localisation tumorale médiastinale est découverte lors d'une radiographie de thorax systématique ou à l'occasion de signes de compression (toux, dyspnée, douleur). Le plus souvent, les ganglions cervicaux sont atteints (75 % des cas). Dans 10 à 20 % des cas, la maladie est révélée par des signes généraux : fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement, prurit.

1.2.3.2 Bilan d'extension

Un bilan précisant les territoires ganglionnaires et/ou viscéraux envahis, le volume tumoral ainsi que le retentissement général de la maladie est une étape essentielle pour définir le pronostic et la stratégie thérapeutique.

Le bilan biologique recherche des signes d'évolutivité de la maladie : augmentation de la vitesse de sédimentation, hyperfibrinémie, hyper-α2-globulinémie, polynucléose neutrophile, diminution du fer sérique, hyperplaquettose, hyperéosinophilie, anémie, lymphopénie, augmentation des LDH.

Les données de l'imagerie sont déterminantes, en particulier la tomodensitométrie cervico-thoraco-abdomino-pelvienne, qui évalue la masse médiastinale.

La biopsie médullaire doit être systématique en présence de signes cliniques d'évolutivité, d'une forme disséminée ou d'un déficit immunitaire. Des localisations médullaires sont détectées dans environ 20 % des cas (39).

Le bilan aboutit à l'établissement d'un stade de la maladie selon la classification d'Ann Arbor, modifiée par Cotswold. Cette classification a été basée initialement sur une évaluation chirurgicale de l'abdomen, en stades dits «anatomiques», et a été, pendant plus de 20 ans, le principal élément de décision stratégique thérapeutique. La classification a été modifiée en 1989 et n'est plus basée que sur une évaluation clinique de la maladie (67).

Tableau n° 4 : Extension clinique selon la classification d'Ann Arbor

Stade	Définition
Stade I	Atteinte d'une seule aire ganglionnaire ou d'une structure lymphoïde (rate, thymus, anneau de Waldeyer)
Stade $II_{(n)}$	Atteinte de deux aires ganglionnaires (II) ou plus [$II_{(n)}$], du même côté du diaphragme
Stade III	Atteinte des deux côtés du diaphragme
Stade III_1	Avec ou sans atteinte splénique, cœliaque, du hile pulmonaire ou du système porte
Stade III_2	Avec atteinte des ganglions para-aortiques iliaques ou mésentériques
Stade IV	Atteinte de sites extra-ganglionnaires ou du foie ou de la moelle osseuse

A : absence de signes généraux

B : présence de fièvre, sueurs nocturnes, ou amaigrissement

Une analyse du bilan d'extension portant sur 14 000 patients a montré la répartition suivante (39) :

- Stade I : 21 %
- Stade II : 42,5 %
- Stade III : 23,5 %
- Stade IV : 13 %

1.2.4 Diagnostic histologique

Le diagnostic de MH repose sur la mise en évidence de cellules HRS ou de variants au sein d'un environnement cellulaire particulier.

1.2.4.1 Macroscopie

Le diagnostic de maladie de Hodgkin exige toujours une biopsie-exérèse ganglionnaire, complète, non fragmentée, portant sur un ganglion pathologique suffisamment volumineux,

adressé dans le délai le plus court au laboratoire. A la coupe, le ganglion est chair de poisson. Dans la forme scléronodulaire, on peut noter un aspect discrètement nodulaire.

1.2.4.2 Architecture

L'architecture ganglionnaire est effacée par une prolifération de grandes cellules mono ou multinucléées, disposées au sein d'un stroma inflammatoire hétérogène non néoplasique.

1.2.4.3 Cytologie

Par définition, les lymphomes hodgkiniens se caractérisent par la présence de cellules néoplasiques dites «de Hodgkin» ou «de Reed-Sternberg» ou de leurs variantes, associées à un contingent majoritaire de cellules réactionnelles et plus ou moins une fibrose. Les cellules tumorales sont habituellement peu nombreuses et représentent de 0,1 à 10 % selon les cas des cellules observées dans les ganglions hodgkiniens. Ces cellules sont fortement évocatrices mais ne sont pas spécifiques et peuvent se rencontrer au cours de lésions bénignes : viroses (mononucléose infectieuse), parasitoses (toxoplasmose), prises médicamenteuses (anti-épileptiques), ou de lymphomes non hodgkiniens. Dans ces cas, c'est l'étude de l'environnement et du phénotype des cellules sternbergoïdes qui assurent le diagnostic.

1.2.4.3.1 Les cellules tumorales

- Les cellules de Reed-Sternberg

Elles sont indispensables pour porter le diagnostic de maladie de Hodgkin. Les cellules de Reed-Sternberg sont de grande taille ; elles possèdent un cytoplasme abondant légèrement basophile et contiennent au moins deux noyaux ou deux lobes nucléaires. La membrane nucléaire est proéminente, par accolement de la chromatine qui est par ailleurs assez grossière et irrégulièrement repartie. Le noyau renferme un nucléole éosinophile proéminent dans chaque lobe nucléaire. Certaines cellules de Reed-Sternberg, engagées dans un processus d'apoptose, apparaissent «momifiées», avec un noyau condensé et rétracté.

- Les cellules de Hodgkin

Le variant mononucléaire des cellules de Reed-Sternberg est appelé cellule de Hodgkin. Elles possèdent les mêmes caractéristiques nucléaires et cytoplasmiques que les cellules de Reed-Sternberg.

- Variantes de la cellule HRS

Les cellules lacunaires s'observent surtout dans la maladie de Hodgkin de type scléro-nodulaire. Elles sont ainsi dénommées en raison de le fréquente rétraction de leur cytoplasme qui réalise un espace entre elles et les cellules environnantes. Elles se distinguent des cellules de Reed-Sternberg par leur cytoplasme abondant et pâle et leur noyau mono ou polylobé renfermant des nucléoles de plus petite taille. Ces cellules ont tendance à se grouper en amas.

Les cellules tumorales très atypiques sont parfois qualifiées d'anaplasiques. Elles constituent la population prédominante de certaines formes de maladies de Hodgkin riches en cellules tumorales.

1.2.4.3.2 Les cellules réactionnelles

Selon les cas, il s'agit de lymphocytes, de plasmocytes, de polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles, d'histiocytes ou de fibroblastes. Seules les formes «à déplétion lymphocytaire» ou certains sous-types riches en cellules tumorales des formes scléro-nodulaires comportent plus de cellules tumorales que de cellules réactionnelles.

1.2.4.4 Les quatre formes histopathologiques

- La forme riche en lymphocytes

Entité provisoire dans la classification de la REAL, elle a été validée dans la classification de l'OMS 2000 puis de l'OMS 2001. Elle correspond à 5 % des patients et atteint surtout

l'adolescent et l'adulte jeune avec une prépondérance féminine. L'atteinte médiastinale est fréquente.

Le ganglion lymphatique est toujours massivement envahi avec effacement sur un mode diffus de son architecture normale. La lésion est définie par la présence de cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg entourée d'une population réactionnelle presque exclusivement constituée de lymphocytes, surtout de phénotype T. Quelques histiocytes peuvent être présents mais les polynucléaires et les plasmocytes sont pratiquement absents. Dans ce contexte, leur recherche peut être longue et fastidieuse, imposant la réalisation de coupes sériées. Le fond est riche en petits lymphocytes dont la membrane plasmique est porteuse d'immunoglobulines de type M et de type D (IgM et IgD). Les polynucléaires neutrophiles et les polynucléaires éosinophiles sont absents. Les cellules HRS se trouvent dans la zone du manteau.

- La forme scléro-nodulaire

Elle atteint surtout l'adolescent et l'adulte jeune avec une prépondérance féminine. L'atteinte médiastinale est fréquente.

La plus fréquente, elle compte pour 30 à 70 % des maladies de Hodgkin. Elle est définie par la présence de cellules néoplasiques de type essentiellement lacunaire et une fibrose développée depuis une capsule épaissie et qui, dans les cas typiques, délimite des nodules cellulaires. Au sein de ces nodules, on note des cellules lacunaires en abondance variable d'un cas à l'autre. Les cellules tumorales ont tendance à se regrouper et à se disposer au contact de nombreuses cellules folliculaires dendritiques. Dans la majorité des cas cependant, elles sont peu nombreuses et entourées d'éléments inflammatoires qui comportent, en proportion variable, des lymphocytes, des plasmocytes, des polynucléaires, des histiocytes et des fibroblastes. Souvent la population réactionnelle est riche en polynucléaires éosinophiles.

- La forme à cellularité mixte

Elle atteint plutôt l'adulte, avec une prédominance masculine et touche surtout des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV). Il s'agit souvent de lésions disséminées de stade clinique élevé au moment du diagnostic. Elle représente 30 à 50 % des cas de maladie de Hodgkin.

L'architecture ganglionnaire est le plus souvent diffusément modifiée par la présence de plages de cellules polymorphes. On note aisément d'assez nombreuses cellules de Reed-Sternberg disposées au sein d'une population réactionnelle associant lymphocytes (T4>T8), plasmocytes, polynucléaires neutrophiles et éosinophiles et histiocytes épithélioïdes. Les cellules épithélioïdes peuvent être très abondantes et masquer les cellules tumorales. Il n'existe pas de fibrose.

L'infection par le virus d'Epstein-Barr (EBV) est fréquente (60 %).

- La forme à déplétion lymphocytaire

Rare (elle représente moins de 5 % des MH), elle concerne surtout la personne âgée ou immunodéprimée.

Deux formes sont individualisées : la forme fibrosante diffuse présente une destruction importante de l'architecture ganglionnaire par une fibrose collagène extensive et paucicellulaire, ne renfermant que de rares cellules néoplasiques et de rares cellules réactionnelles et la forme avec déplétion lymphoïde riche en cellules tumorales comporte de nombreuses cellules tumorales associées à quelques cellules inflammatoires. Il s'agit de proliférations souvent pléiomorphes où dominent les cellules très atypiques de grande taille, avec un nombre variable d'éléments ayant des attributs cytonucléaires des cellules de Reed-Sternberg. On note parfois des zones fibreuses ou de la nécrose.

1.2.4.5 Immunophénotype

Les cellules de Hodgkin et les cellules de Reed-Sternberg expriment de nombreux antigènes. Aucun d'entre eux, pris isolément, n'est spécifique de la maladie de Hodgkin, mais certains sont très utiles au diagnostic, réalisant un profil immunophénotypique spécifique ou très évocateur, selon les cas.

- L'antigène CD30

Le plus connu est probablement l'antigène Ki-1/CD30. Cet antigène est souvent associé à d'autres marqueurs dits «d'activation» car ils apparaissent sur des cellules lymphoïdes activées. En revanche, les cellules monocytaires et macrophagiques n'expriment habituellement pas le CD30. L'antigène CD30 est un récepteur transmembranaire de la famille du récepteur du TNF (Tumor Necrosis Factor) et du NGF (Nerve Growth Factor), molécules qui jouent un rôle important dans la différenciation et la prolifération des lymphocytes. Le ligand de CD30, le CD30L, est une cytokine qui présente des homologies avec le TNF et qui a de nombreux effets sur des lignées lymphocytaires CD30+. Ceci suggère le rôle autocrine de l'interaction CD30-CD30L dans la pathogénie des lymphomes anaplasiques et de la maladie de Hodgkin et ouvre des perspectives pour une immunothérapie spécifique anti-CD30. L'antigène CD30 est aisément détectable actuellement grâce à l'anticorps BerH-2 qui reconnaît un épitope de CD30 résistant à la fixation, ce qui rend son usage incontournable pour le diagnostic de routine. Les cellules néoplasiques expriment presque toujours (89 % des cas) l'antigène d'activation CD30/BerH2 sous la forme d'un marquage membranaire et/ou golgien.

- L'antigène CD15

Le marqueur le plus utile au diagnostic est la molécule CD15/ LeuM-1, retrouvée dans 80 % des cas environ. L'anticorps LeuM-1 (CD15) reconnaît un antigène dénommé «haptène X» ou antigène «Lewis X». Cet antigène, rattaché aux granules secondaires, est impliqué dans l'adhésion des polynucléaires neutrophiles aux cellules endothéliales ainsi que dans la phagocytose et l'activité bactéricide. Il est exprimé dans les tissus embryonnaires, dans les

leucocytes matures (neutrophiles et éosinophiles) et les cellules histiomonocytaires. Il s'agit d'un marquage cytoplasmique granuleux mais on peut parfois observer un signal membranaire. Considéré longtemps comme spécifique des cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg, il est également exprimé dans quelques cas de lymphomes B notamment ceux qui simulent une maladie de Hodgkin et dans 67 % des lymphomes T pléiomorphes (T périphériques non spécifiés). Néanmoins, une réaction positive pour le LeuM-1 (CD15) associée à une réaction négative pour le CD45 (leucocyte commun) et d'autres marqueurs de la lignée B ou T, plaident pour le diagnostic de maladie de Hodgkin.

- Les antigènes de différenciation B ou T

Les cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg peuvent aussi exprimer des antigènes pan-B ou pan-T lymphocytaires, mais les résultats rapportés sont variables et dépendent des anticorps et techniques immunohistochimiques utilisés et des critères de positivité. Isaacson, dans une série de 63 cas de maladies de Hodgkin et sur matériel fixé (46), utilisant une technique immunohistochimique de routine, a retrouvé l'expression des antigènes pan B : CD20/L26 dans 49 % des cas, CD79a dans 48 % des cas, isolément ou ensemble dans 60 % des cas alors que l'antigène pan T CD3 n'était pas retrouvé. Pour Delsol, les cellules tumorales expriment l'antigène pan B CD20/L26 dans environ 30 % des cas, mais contrairement aux lymphomes B habituels, il s'agit toujours d'une positivité hétérogène, certaines cellules étant très positives, d'autres faiblement marquées ou négatives (20).

Les antigènes pan-T et notamment anti-CD3 ne sont que très rarement positifs, intéressant moins de 10 % des maladies de Hodgkin. Il s'agit cependant d'un immunomarquage souvent difficile à détecter du fait de la présence de lymphocytes T réactionnels entourant les cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg (rosettes T). En fait, les marqueurs T n'ont pas de réelle utilité dans le diagnostic, à l'exception cependant de l'antigène CD43, qui n'est pas présent sur les cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg alors qu'il est fréquemment exprimé dans le lymphome anaplasique.

- Certains antigènes de régulation de la transcription des immunoglobulines : Oct-1, Oct-2, BOB.1

Les cellules HRS ne produisent pas d'immunoglobulines fonctionnelles (53, 58). Les études récentes en hybridation *in situ* et sur cellules isolées n'ont pas permis de mettre en évidence de transcrits d'immunoglobulines (71, 104) et ont démontré, dans des lignées cellulaires de cellules HRS, l'absence d'expression (ou la très faible expression liée à une activité non spécifique des cellules B) du facteur Oct-2, en l'absence d'expression du co-activateur BOB.1 (64, 93). Oct-1, Oct-2 et BOB.1 ne sont pas restreints aux cellules B mais y sont exprimés à des taux plus élevés que dans les autres types cellulaires. Pour Saez, le facteur Oct-2 est exprimé préférentiellement dans les cellules B et le facteur Oct-1 est ubiquitaire (95).

Sur une série de 32 cas de MH classique, Stein a démontré l'absence d'expression du facteur Oct-2 dans 87,5 % des cas et une expression très faible au niveau de quelques cellules seulement dans 9,4 % des cas, et l'absence d'expression du co-activateur BOB.1 dans 75 % des cas et une très faible expression dans 25 % des cas (102).

L'expression de Oct-2 est significativement plus élevée dans les lymphomes dérivés des cellules du centre germinatif. Dans la MH, l'expression existe, mais l'est à des niveaux plus bas que dans les autres lymphomes B (95).

- Les autres antigènes (20)

D'autres antigènes sont rarement exprimés par les cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg et ont, de ce fait, un intérêt dans le diagnostic différentiel.

Ainsi, l'antigène EMA (antigène épithélial membranaire) est rarement exprimé par les cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg (moins de 5 % des cas) alors qu'il est noté dans la majorité des lymphomes anaplasiques à grandes cellules.

De même, les antigènes de groupes sanguins H et Y reconnus par l'anticorps BNH9 sont notés dans moins de 5 % des maladies de Hodgkin et plus de 80 % des lymphomes anaplasiques à grandes cellules.

L'absence d'expression de l'antigène panleucocytaire (CD45) est quasi la règle et apparaît caractéristique de ces cellules. Mais il est difficile à évaluer dans la maladie de Hodgkin du fait de l'intense positivité des cellules lymphoïdes environnant les cellules tumorales.

Récemment, un nouveau marqueur des cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg a été proposé, l'antigène «fascine», aisément détecté sur tissus fixés. Il s'agit d'une protéine liée aux filaments d'actine intra-cytoplasmique, fortement exprimée dans certaines cellules histiomonocytaires comme les cellules folliculaires dendritiques des zones B et les cellules réticulaires inter-digitées des zones T.

Le proto-oncogène *bcl-6* est essentiel à la maturation dans le centre germinatif et à l'acquisition par mutations somatiques, pour les immunoglobulines, d'une affinité antigénique. Des translocations ou des mutations intéressant l'extrémité 5' non codante du gène ont été rapportées et suspectées de participer à la genèse de lymphomes malins non hodgkiniens (15). Dans le tissu normal, l'antigène Bcl-6 est exprimé au niveau des cellules B, excepté les cellules B immatures et les plasmocytes. Seul un cas de MH sur deux possède des cellules HRS exprimant l'antigène Bcl-6 (32).

On note l'absence d'expression constante de l'antigène CD68 (KP1), de l'antigène ALK ou de la PS100.

1.2.5 Pronostic

L'établissement du stade clinique et du stade pathologique permet de déterminer l'attitude thérapeutique. Avant l'utilisation des thérapies modernes, la survie était fortement corrélée au type histologique. Aujourd'hui, l'extension clinique, représentée par la classification de Ann Arbor, est le facteur pronostique majeur (48).

Dans les stades cliniques I et II, les facteurs défavorables pour la survie sans rechute et la survie sont bien établis et comprennent le sexe masculin, l'âge, l'atteinte de plus de 3 aires ganglionnaires, l'augmentation de la vitesse de sédimentation, l'atteinte médiastinale volumineuse.

Dans les stades III et IV, les facteurs défavorables sont encore discutés même si, dans une étude regroupant 5141 patients atteints d'une MH à un stade avancé, Hasenclever *et al.* ont recensé sept facteurs prédictifs indépendants (35bis) : l'hypoalbuminémie sous 40 g/L, l'anémie sous 10,5 g/dL, le sexe masculin, l'âge supérieur à 45 ans, le stade IV selon Ann Arbor, l'hyperleucocytose supérieure à 15 000 / mL et la lymphopénie sous 600 / mL.

Dans tous les stades, la qualité de réponse après 3 ou 4 cycles de chimiothérapie est un facteur pronostique important pour la survie.

Plusieurs cytokines et formes solubles d'antigènes détectés dans le sérum des patients pourraient également constituer un reflet de la masse tumorale ; il s'agit du récepteur soluble de l'interleukine 2 (CD25), les antigènes solubles CD30 et CD8 et de l'interleukine 8.

1.2.6 Thérapeutique

Les moyens thérapeutiques dont on dispose pour traiter les patients atteints de MH sont la radiothérapie et la chimiothérapie utilisée à doses conventionnelles ou en traitement intensif suivi d'une autogreffe de moelle hématopoïétique. Une meilleure compréhension du mode d'extension de la maladie et l'amélioration des techniques d'irradiation, avec l'utilisation des photons de haute énergie, ont permis d'augmenter le taux de guérison.

De nombreux protocoles de polychimiothérapie ont été utilisés. Le choix du protocole en 2003 est guidé par la nécessité de réduire la toxicité. Les principales associations sont les protocoles MOPP (chlorméthine, vincristine, procarbazine, prednisone), ABVD (doxorubicine, bléomycine, vinblastine, dacarbazine) et MOPP/ABV hybride qui associe les molécules des deux précédents. Le protocole ABVD apparaît désormais comme la polychimiothérapie de référence dans la MH.

1.2.7 Biologie de la MH

Si l'origine de la cellule de HRS a récemment été déterminée, les mécanismes de la lymphomagénèse de la MH restent incertains. En effet, seules les études les plus récentes sur la pathogénie des cellules tumorales ont permis d'individualiser des mécanismes physiopathologiques potentiels, d'abord par des approches méthodologiques ciblées, puis dernièrement grâce aux techniques puissantes de «micro-arrays» permettant l'étude simultanée de plusieurs centaines ou milliers de gènes à partir d'un même prélèvement (31, 59, 97).

1.2.7.1 Etiopathogénie de la cellule de HRS

1.2.7.1.1 L'origine lymphoïde B et rarement T !

Les cellules HRS représentent le contingent tumoral malin de la maladie de Hodgkin. Cependant, contrairement à la richesse en cellules tumorales de la plupart des lymphomes, les cellules de HRS sont très minoritaires au sein d'une population de cellules réactionnelles majoritaire (le granulome hodgkinien) et ne représentent, en moyenne, qu'environ 1 % de la population cellulaire dans la MH (53).

Jusqu'en 1995, son origine est restée obscure, en raison de la difficulté à obtenir des lignées cellulaires de cellules HRS, d'isoler, à partir de fragments tissulaires, la cellule tumorale afin de pouvoir l'analyser indépendamment de son environnement et d'un phénotype inhabituel qui ne permet pas de la rattacher à une seule lignée hématologique connue. Des théories ont proposé successivement une origine histiocytaire (52, 55), particulièrement à partir de la cellule folliculaire dendritique (42), voire granulocytaire (101), lymphocytaire B et/ou T. En effet, les cellules HRS expriment différents marqueurs spécifiques d'autres lignées, tels GATA-3 et granzyme B des lignées T/NK (59), CD15 de la lignée myélomonocytaire, TARC et fascine des cellules folliculaires dendritiques (43, 85, 88, 112). Enfin leur morphotype et leur immunophénotype pourraient être liés, non pas à un type cellulaire donné, mais plutôt à l'expression de différents gènes communs (59).

Depuis 1995, grâce aux techniques de microdissection tissulaire autorisant la découpe, l'extraction de leur microenvironnement et la récupération de cellules isolées, il a été clairement démontré que la maladie de Hodgkin, dans ses variantes «paragranulome à prédominance lymphocytaire», puis «classique» correspond à un néoplasme lymphoïde, dans la mesure où les cellules tumorales présentent un réarrangement monoclonal du gène codant pour le récepteur à l'antigène des lymphocytes. Ainsi la maladie de Hodgkin «paragranulome à prédominance lymphocytaire» est un lymphome B alors que la maladie de Hodgkin «classique» correspond dans 98 % des cas à un lymphome B (44, 53, 71) et dans 2 % des cas environ, à un lymphome T (80, 98).

1.2.7.1.2 La contre-partie normale : la cellule du centre germinatif et rarement une cellule T périphérique !

L'analyse du réarrangement des gènes des immunoglobulines (IgH), sur lignées de cellules de Hodgkin et, après microdissection, sur prélèvements tissulaires de maladie de Hodgkin, par la technique de PCR suivie du séquençage des produits d'amplification, a montré la présence de nombreuses mutations somatiques, indiquant que les cellules HRS sont issues de cellules du centre germinatif ou de leur descendance (53, 71). Par ailleurs les cellules HRS issues de lignées cellulaires et de maladies de Hodgkin présentent un taux élevé de mutations somatiques du gène *bcl-6*, gène impliqué dans la formation des centres germinatifs et particulièrement dans la maturation par mutations somatiques de gènes codant pour des immunoglobulines de haute affinité pour l'antigène (98). De manière surprenante, il apparaît que les cellules HRS issues de lignées cellulaires diffèrent largement par leur phénotype et leur génotype (proches de celui des lignées lymphoblastoïdes et des cellules «post-centre germinatif» ou «activées») de leurs homologues tissulaires (59). Elles correspondraient à un type particulier de centroblaste «pré-plasmocytaire». Ces cellules présentent une hyper-expression des transcrits Syndecan-1 et MUM-1, une hypo-expression des transcrits CD20, CD19, CD22, Blk et EBF, à l'instar des plasmocytes, alors que l'hypo-expression des gènes BCMA et Oct-2 associée à la persistance de l'expression du gène Pax-5 est incompatible avec une différenciation terminale B plasmocytaire (59, 97). Elles partagent cependant un profil génique commun associant les gènes fascine, TARC, RANK et TIMP-1 (59).

Dans 2 % des cas environ, à partir de données immunohistochimiques et moléculaires obtenues à propos de 3 cas, la maladie de Hodgkin correspond à un lymphome T, dont la contre-partie normale est le lymphocyte T périphérique, «post-thymique», mature (80, 98).

1.2.7.1.3 La cellule de HRS B présente un gène IgH fonctionnel mais non transcrit

Le gène réarrangé des immunoglobulines (IgH, Igκ) n'est pas transcrit et les études sur lignées cellulaires de MH, L428 et KM-H2 d'une part, et sur cellules HRS isolées par microdissection d'autre part, ont montré que la cellule HRS est incapable de produire des ARNs codant pour les immunoglobulines (49, 53, 58).

Dans un premier temps, l'absence de transcription du gène IgH a été rattachée à la présence de codons stop accompagnant les mutations somatiques au sein de la séquence variable (IgH V) du gène réarrangé (49). Par la suite, comme dans plusieurs études (37, 65, 102, 104), Marafioti *et al.* ont démontré l'absence de transcription du gène, c'est à dire l'absence d'ARN codant des IgH ou des chaînes légères κ, par hybridation *in situ* puis par RT-PCR sur cellule isolée par microdissection (71). Même dans les cas où la capacité codante des gènes des immunoglobulines est intacte (75 % des cas), l'absence de transcrits des immunoglobulines suggère l'implication de gènes «promoteurs» ou «enhancers» de la transcription, ou encore l'intervention de séquences introniques en 3', de type hs 1, 2, plutôt que l'intervention exclusive d'évènements moléculaires au sein des séquences variable du gène IgH (40).

1.2.7.1.4 Oct-2 et de son co-activateur BOB.1/OBF1

Dans la maladie de Hodgkin classique, contrairement à la variante «paragranulome à prédominance lymphocytaire» et aux lymphomes non hodgkiniens B, les mécanismes à l'origine de l'absence de transcription des gènes des immunoglobulines pourraient correspondre soit à l'absence d'expression, soit à l'hyporégulation, du promoteur Oct-2 du gène des immunoglobulines et de son co-activateur BOB.1/OBF1 (40, 93, 102). Les protéines Oct-1 et Oct-2 sont des facteurs de transcription de la famille POU qui se lient au site octamérique ATGCAAAT des gènes des immunoglobulines. Ce site, retrouvé au niveau des gènes codant pour les immunoglobulines, apparaît nécessaire à leur fonctionnement et à leur

expression. Afin de développer un activité maximale, ces facteurs se lient à plusieurs co-activateurs, dont l'un, BOB.1/OBF.1, a été cloné (68).

Stein *et al.* ont démontré que l'activité du promoteur est restaurée par la transfection des gènes BOB.1 et Oct-2 dans les cellules HRS de lignées L428 et KM-H2 (101). En effet, après la transfection du gène BOB.1 ou dans une moindre mesure du gène Oct-2, la synthèse des immunoglobulines est rétablie. Après la transfection simultanée des deux gènes, on observe une synthèse très augmentée des immunoglobulines.

De plus, Theil *et al.*, sur un modèle identique, restreignent la capacité de restauration de la transcription du gène IgH au seul gène BOB.1/OBF1 (104). En effet, dans leur expérience, la transfection du seul gène BOB.1 restitue son activité au promoteur du gène des immunoglobulines, alors que celle du seul gène Oct-2 est sans effet. Les auteurs évoquent la compensation possible du gène Oct-2 par l'ubiquitaire gène Oct-1, alors que l'absence du gène BOB.1 ne peut être remplacée.

Enfin, l'expression des protéines Oct-2, BOB.1 et Oct-1, n'apparaît pas liée au niveau de transcription de leur gène respectif. En effet, la protéine Oct-2 est détectée par Western blot et immunohistochimie alors que le gène est hyporégulé (93, 95) ; ainsi que les protéines Oct-1 et BOB.1/OBF1 sont détectées par immunohistochimie dans la maladie de Hodgkin «classique», notamment dans les variantes scléro-nodulaire et «à cellularité mixte» (95), ceci probablement en raison d'une demi-vie de la protéine assez longue ou de la labilité des ARNs. En effet, Saéz *et al.*, dans leur étude immunohistochimique à la recherche des antigènes Oct-1, Oct-2 et BOB.1 sur plusieurs types de MH, retrouvent une expression, souvent faible, des protéines Oct-2 et BOB.1 par les cellules HRS dans 17 cas sur 24, quel que soit le sous-type histologique, et une expression faible de la protéine Oct-1 au niveau de 23 cas sur 24 (95).

1.2.7.1.5 Les autres protéines régulatrices

A ce jour, il apparaît très nettement que l'hyporégulation des gènes Oct-2 et BOB.1/OBF1 est insuffisante à elle seule pour empêcher la transcription des immunoglobulines (40). Le contrôle de la transcription du gène IgH impliquerait l'hypo-expression d'un ou plusieurs co-

facteurs, correspondant à des gènes codant pour des facteurs de transcription, «enhancers» plutôt que promoteurs, tels que PU.1, Pax-5, E47 et EBF (40).

La protéine PU.1 est un facteur de transcription de la famille Ets, essentiel à la différenciation des cellules B. Elle régule notamment les gènes IgH, chaîne J, Igκ et Igλ. L'absence d'expression par les cellules HRS de cette protéine PU.1 a été démontrée en technique immunohistochimique (51, 106) et en Western Blot (51). Des expériences de transfection de la protéine PU.1 dans des cultures de cellules HRS ont montré la restauration de l'activité codante du gène des immunoglobulines (51). Les études immunohistochimiques à l'aide d'anticorps monoclonal anti-PU.1 montrent une expression nucléaire modérée dans les lymphocytes B, en particulier ceux de la zone du manteau, et les histiocytes, en l'absence totale d'expression par les cellules HRS (107).

Le gène Pax-5 code pour la protéine BSAP (B-cell specific activator protein), un facteur de transcription «clé», spécifique à la lignée des cellules B, impliqué dans la mise en place et dans le maintien de l'identité B. Son expression est détectée à tous les stades de développement de la cellule B, excepté au stade terminal plasmocytaire. Il est nécessaire à la différenciation de la cellule B au delà du stade pro-B (81) et régule positivement l'expression membranaire des protéines CD19 et CD79a. Pax-5 joue un rôle important dans le réarrangement V(D)J, dans la mesure où les cellules pro-B déficientes en Pax-5 présentent une réduction de 50 fois environ du taux de réarrangement V(D)J alors que les mutations de Pax-5 seraient responsables d'un arrêt précoce du développement pro-B et entraîneraient une perte complète de la transcription du gène CD19 et une diminution significative de celle des gènes N-myc et mb-1 au cours de la lymphopoïèse précoce (79).

En immunohistochimie, la protéine Pax-5 est retrouvée, de manière intense et constante, en position intra-nucléaire, dans tous les lymphomes non hodgkiniens B lymphoblastiques, B périphériques à l'exception du myélome multiple et des plasmocytomes, dans 97 % à 36 % des MH «classiques» selon les séries (57, 107) mais le plus souvent faiblement et de façon hétérogène au sein de la tumeur. Hertel *et al.* ont également noté la diminution ou l'absence d'expression, selon les cas, de la protéine Pax-5 dans 78 % des cas de maladie de Hodgkin «classique» (14 cas sur 18) en immunohistochimie, seuls 4 cas présentant une expression nette dans plus de la moitié des cellules tumorales (40). En revanche, Pax-5 n'est pas exprimé dans les lymphomes T, lymphoblastiques et périphériques (107).

Dans la maladie de Hodgkin «classique», l'expression atténuée de Pax-5 apparaît associée à une diminution significative des transcrits Pax-5 (8 fois moindre) dans les lignées L428 et KM H2, complète dans les lignées L540 et HD MyZ, par la technique de «RNAse protection» (40), ainsi qu'à la baisse d'expression de nombreux gènes dépendant de Pax-5 tels CD19, CD21, CD22, CD72 et CD79a (97).

Sur le plan moléculaire, la t(9 ;14) (p13 ;q32), impliquant les gènes IgH et PAX-5 est détectée dans 1-2 % des lymphomes non hodgkiniens, de type LLC lymphoplasmocytoïde et lymphome lymphoplasmocytaire (79). Elle entraîne la dérégulation positive de Pax-5. D'autres auteurs ont observé une expression quasi complète du facteur de transcription Pax-5 par les cellules HRS à partir de lignées cellulaires (97), et n'ont pas retrouvé de mutations au niveau du gène lors de l'analyse de sa séquence, ce qui ne permet donc pas d'incriminer Pax-5 comme seul mécanisme pathogénique de la perte du phénotype B dans les cellules HRS.

1.2.7.1.6 La cellule de HRS présente un immunophénotype B atténué ou absent

L'absence ou l'hyporégulation des gènes promoteurs et «enhancers» de la transcription des gènes codant pour les récepteurs à l'antigène (Oct-2, BOB.1, PU.1 et Pax-5), expliquerait le profil immunophénotypique B absent ou tronqué, de la cellule de HRS pour les antigènes CD19, CD20, CD79a. Schwering *et al.* ont montré par les techniques de SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) et par la technique de «puces ADN», sur lignées cellulaires L428, KM112 et LI236, la baisse de l'expression de 45 gènes parmi lesquels de nombreux participent à la différenciation lymphoïde B (97).

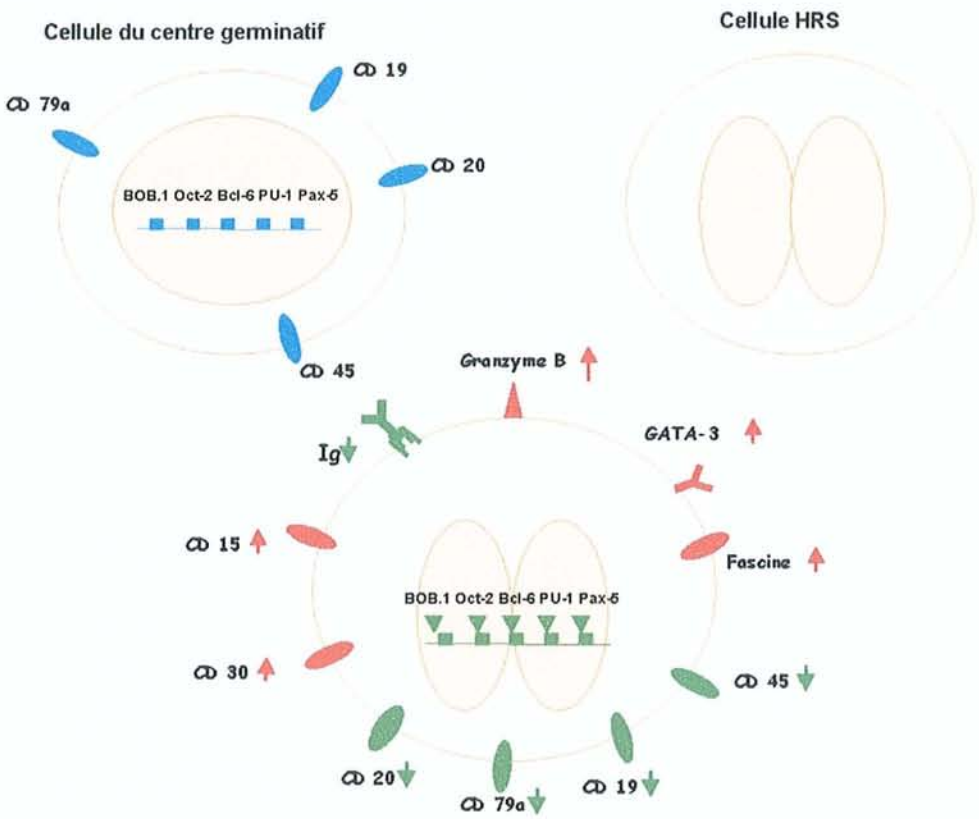


Figure n°1 : Schéma concernant l'immunophénotype tronqué de la cellule de Hodgkin et Reed-Sternberg [d'après Schwering (97)]

1.2.7.1.7 Tentative d'explication des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie de Hodgkin

Contrairement aux cellules HRS, les cellules B normales des centres germinatifs qui ont perdu la capacité d'exprimer des immunoglobulines sont rapidement engagées dans un processus de mort par apoptose (62). Le mécanisme protégeant les cellules HRS de l'apoptose n'est pas encore élucidé ; plusieurs phénomènes entrent probablement en jeu. L'un d'entre eux pourrait correspondre à l'activation du gène *bcl-2*, dont les transcrits sont massivement détectés au niveau des cellules HRS (36). Kanzler *et al.* suggèrent le rôle transformant de l'infection par l'EBV (54) car le profil de latence de type II exprimé par les cellules HRS correspond notamment à l'expression de la protéine LMP-1, protéine capable d'induire l'expression de la protéine *bcl-2* et conférant des propriétés d'immortalité aux cellules transfectées (38).

Le récepteur CD40, fortement exprimé dans les cellules de HRS, jouerait un rôle critique dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose (41, 77).

La protéine c-FLIP inhibe l'apoptose médiée par Fas en empêchant le recrutement de la caspase 8 par le DISC (Death-Inducing Signaling Complex), l'activation de la chaîne des caspases et le clivage de l'ADN. c-FLIP joue ainsi un rôle clé dans la survie des cellules du centre germinatif. La protéine c-FLIP est exprimée de manière constitutionnelle par les cellules HRS et pourrait correspondre à un mécanisme majeur de la résistance à l'apoptose médiée par la voie CD95/fas dans la maladie de Hodgkin. Thomas *et al.* ont montré *in vivo* par immunohistochimie la présence de c-FLIP dans 18 cas sur 19 de MH et *in vitro* sur 2 lignées de cellules HRS, L1236 et L428, respectivement EBV- et EBV+, par techniques de Western blot et de RT-PCR, l'hyper expression de c-FLIP (105).

Des études récentes suggèrent que NF-κB, constitutionnellement activé dans les cellules HRS, pourrait agir comme facteur de survie (2, 5, 7, 34). En effet, *in vitro* sur lignées cellulaires de cellules HRS NF-κB+ et de cellules de lymphome anaplasique NF-κB-, CD30+, l'obtention d'une apoptose médiée par CD30 a été observée dans la seule lignée anaplasique, mais pas dans la lignée HRS, soulignant le rôle de l'expression constitutive de l'expression de NF-κB dans la résistance à l'apoptose des cellules de HRS (74). Par ailleurs, des expériences d'inactivation *in vitro* du gène NF-κB ont permis de restaurer la sensibilité à l'apoptose des

cellules HRS (1). NF-κB induit par ailleurs la secrétion de Jagged-1 ligand de Notch 1 (5). L'activation anormale du facteur NF-κB pourrait résulter de mutations survenant chez des inhibiteurs de la famille IκB (27) ou d'une activation aberrante de l'enzyme IκB-kinase (56).

L'activité de NF-κB est également régulée par le signal Notch 1, qui est un récepteur transmembranaire impliqué dans de nombreuses «décisions» concernant le destin cellulaire et interagissant notamment dans le processus de différenciation et d'apoptose des cellules hématopoiétiques. Notch-1 bloque le développement B et entraîne une augmentation du nombre des lymphocytes T dans la moelle osseuse de souris transgéniques hyperexprimant ce gène (97). Notch-1 est surexprimé dans les cellules HRS (50) et apparaît constitutionnellement activé dans les cellules HRS et dans les lignées cellulaires de MH (89, 113). Notch-1, fortement exprimé dans des lignées cellulaires issues de MH et de lymphomes anaplasiques, pourrait être activé sur un mode autocrine et/ou paracrine par son ligand Jagged 1, induisant ainsi la prolifération cellulaire et inhibant l'apoptose *in vitro* (50).

Enfin, la perte ou l'hypo-expression de l'identité lymphoïde B des cellules HRS, ainsi que la perte de la machinerie transductionelle, pourraient expliquer leur survie et l'échappement à la mort cellulaire programmée, en l'absence de récepteur des cellules B «fonctionnel», traduisant ainsi une anomalie majeure dans le maintien de la différenciation lymphoïde B due à un nouveau mécanisme physiopathogénique, encore inconnu ! (97).

Les techniques d'isolement des cellules néoplasiques par microdissection combinées ou non aux techniques de puces ADN ont permis récemment l'identification de nombreux gènes, candidats potentiels à la physiopathologie de la cellule de HRS. Kuppers *et al.* ont rapporté l'implication de 4 gènes (fascine, ARC, RANK et TIMP-1) dans la physiopathologie de la cellule de HRS et ont identifié 23 gènes comme «nouveaux» candidats à la lymphomagénèse de la MH, parmi lesquels 20 apparaissent surexprimés (59). Garcia *et al.* ont identifié par puces tissulaires, à partir de 288 prélèvements de MH, 29 gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose, de nombreuses altérations de différentes voies et points de contrôle du cycle cellulaire, notamment au niveau des transitions «G1/S» et «G2/M» (31). Il s'agit de l'hyper-expression des protéines cycline E, CDK2, CDK6, STAT3, Hdm2, *Bcl-2*, BclXL, survivine et NF-κB, STAT1 et RB. Ils ont également observé une augmentation de la fraction

proliférante et Hdm2, p53, p21, Rb, survivine, cycline A, B1, D3 et E, CDK2, CDK6, SKP2, BclXL, STAT1 et 3.

1.2.7.2 Rôle de l'EBV

L'implication possible du virus d'Epstein-Barr dans le développement de la MH repose sur plusieurs éléments : les études séro-épidémiologiques, les études de biologie moléculaire mettant en évidence l'intégration intracellulaire du génome viral (117).

La prévalence de l'infection par l'EBV des cellules HRS varie selon le type histopathologique et des facteurs épidémiologiques. La fréquence la plus élevée est retrouvée dans le type «à cellularité mixte» (75 %) et la moins élevée dans le type «scléro-nodulaire» (10 à 40 %). Dans les pays en voie de développement et chez les patients infectés par le VIH, la prévalence est beaucoup plus élevée et avoisine les 100 %.

Le sérotype du virus présent au diagnostic est retrouvé lors des rechutes (14).

Les principaux travaux concernant la détection du virus EBV dans la maladie de Hodgkin et les liens rattachant l'EBV et cette lésion sont ceux de l'équipe toulousaine de Delsol et Brousset (14). Leur travail a mis en relief l'implication de l'EBV dans la maladie de Hodgkin. La mise en évidence du virus EBV est un outil diagnostique important. Ces résultats sont confirmés par l'étude immunohistochimique qui montre que la protéine membranaire de latence LMP-1, d'origine virale, est électivement localisée aux cellules de Reed-Sternberg et de Hodgkin.

Dans la maladie de Hodgkin, contrairement aux lymphoprolifération lymphoïdes atypiques liées à l'EBV, le profil de latence est intermédiaire, de type II : EBNA 1 +, EBNA 2 à 6 -, LMP1 +, EBER +. L'absence d'EBNA 2 permet, dans les cas difficiles, de conforter le diagnostic de maladie de Hodgkin, et d'éliminer une lymphoprolifération bénigne de type MNI (ou le profil de latence est de type III : EBNA 1/2/3/4/5/6 +, LMP-1 +, EBER +).

Les examens sérologiques mettent en évidence un profil banal en rapport avec une infection ancienne. La réponse au traitement et les taux de rechute entre les cas de maladies de Hodgkin EBV + et EBV - sont comparables.

Le mécanisme d'action du virus EBV n'est toujours pas élucidé. Il pourrait s'agir de l'induction de NF-κB secondaire à l'expression des protéines EBV LMP-1 et LMP-2a (50). A partir d'arguments épidémiologiques et d'études moléculaires, une étude récente rapporte l'absence d'argument pour un phénomène de «hit-and-run» pour expliquer le rôle du virus dans les cas de MH non associés à l'EBV et où aucune trace de génome viral tronqué n'est détectée (30).

1.2.7.3 Facteurs génétiques

Les études cytogénétiques conventionnelles et en FISH montrent communément des anomalies complexes (aneuploïdies, hypertétraploïdies) mais aucune anomalie spécifique ou récurente n'a été détectée (60, 96).

1.3 La maladie de Hodgkin variant du syndrome de Richter

1.3.1 Considérations générales

Le syndrome de Richter correspond à la survenue d'un lymphome chez un patient atteint d'une LLC. Dès 1928, et après la description princeps de Richter, des cas de MH survenant chez des patients atteints de LLC ont été rapportés par Watson (115) et McCartney (69).

1.3.2 Epidémiologie

Le syndrome de Richter a une fréquence globale estimée à 3 à 10 % des cas selon les séries (28, 109). La survenue d'un lymphome de Hodgkin chez un patient atteint de LLC est plus rare. En effet, Fayad *et al.*, à partir du registre du MD Anderson Cancer Center (Texas, USA) sur une population de 1374 patients souffrant de LLC et recensés entre 1972 et 1992, ont estimé l'incidence de la maladie de Hodgkin à moins de 1 % des cas (28). Pescarmona a observé, entre 1984 et 1996, un taux de 0,4 % de MH survenant chez 1011 patients porteurs d'une LLC dans l'institution La Sapienza, à Rome (75). Selon Travis *et al.*, la survenue d'une

MH est huit fois plus fréquente chez les patients atteints de LLC que dans la population générale (109). Au total, depuis 1990, 44 cas bien documentés sur le plan immunohistochimique de maladie de Hodgkin et survenant chez des patients atteints de LLC ou de lymphome lymphocytique ont été publiés dans la littérature anglo-saxonne. Les patients sont âgés en moyenne de 67 ans au moment du diagnostic de maladie de Hodgkin (34 à 94 ans). L'intervalle entre le diagnostic de la LLC et celui du lymphome de Hodgkin est compris entre 0 et 180 mois (moyenne de 76 mois).

1.3.3 Diagnostic

Les signes cliniques sont identiques à ceux du syndrome de Richter. La survenue d'un lymphome de haut grade est habituellement révélée cliniquement par une croissance rapide, souvent importante, des adénopathies ; une fièvre, un amaigrissement, une hépato-splénomégalie ou une altération rapide de l'état général peuvent également être à l'origine du diagnostic (13). La modification des ganglions représente 89 % des circonstances de diagnostic. Dans un cas sur cinq, une splénomégalie est observée et les patients présentent, dans 5 %, des cas, une fièvre ou une altération de l'état général. Le diagnostic repose sur l'examen anatomopathologique d'une biopsie réalisée habituellement sur une adénopathie palpable.

Lors du diagnostic de MH, la majorité des patients est à un stade avancé de la maladie : en reprenant les cas rapportés dans la littérature ces dernières années (13, 28, 76, 116), 89 % des patients sont à un stade III ou IV selon la classification d'Ann Arbor contre seulement 11 % à un stade I ou II.

1.3.4 Morphologie

Le tableau histologique habituel du lymphome de Hodgkin-variant du syndrome de Richter est celui d'un lymphome composite. Un lymphome composite est défini par la présence de 2 variétés histologiques distinctes de lymphomes, retrouvées dans un même site anatomique, ici la MH et la composante tumorale de la LLC.

Dans les séries de Brecher (8 cas), Weisenberg (6 cas) et Fayad (7 cas), la composante hodgkinienne est à cellularité mixte dans 62 % des cas, de type scléronodulaire dans 33 % des cas et plus rarement à déplétion lymphoïde, dans 5 % des cas (13, 28, 116). Les plages tumorales remplacent ou sont mêlées à la composante lymphocytique correspondant à la LLC préexistante. Dans environ un tiers des cas, les cellules HRS sont disposées au sein d'un granulome hodgkinien typique et le diagnostic revient à celui d'une MH dans la population générale. Dans un plus faible nombre de cas (6 %), elles sont présentes à la fois au sein d'un granulome et dans des plages de lymphocytes tumoraux correspondant à la LLC. En revanche, dans 64 % des cas, la présence de grandes cellules sternbergoïdes, isolées et dispersées dans un lymphome lymphocytique ou une LLC, sans granulome hodgkinien, est d'interprétation plus difficile : s'agit-il d'une maladie de Hodgkin compliquant la LLC ou encore, à ce stade, d'une LLC simple avec quelques cellules de type Reed-Sternberg ?

1.3.5 Immunophénotype

Comme dans la maladie de Hodgkin habituelle, les cellules de Reed-Sternberg co-expriment les antigènes CD15/LeuM-1 et CD30/BerH2 : les taux d'expression, respectivement de 86 % et 76 % sont comparables à ceux observés dans la MH survenant dans la population générale. L'expression des antigènes CD20/L26 et CD79a est variable, d'une cellule à l'autre et le taux d'expression de l'antigène CD20 est de 32 %.

1.3.6 Détection du virus d'Epstein-Barr

Les cellules HRS peuvent être infectées de façon latente par le virus EBV. Sur une série de 13 cas, en 1992, Momose *et al.* ont réalisé une étude en hybridation *in situ* à la recherche des ARN de l'EBV ; leurs résultats (12 cas sur 13) sont nettement supérieurs à ceux observés dans la MH de la population générale où le taux d'infection est aux alentours de 40 à 50 % (76). De plus, l'étude immunohistochimique révèle l'expression de la protéine virale de latence LMP-1 par les cellules HRS. En regroupant les 18 cas documentés et récents de la littérature (28, 54, 76), on retrouve un taux d'infection de 83 %, ce qui est également supérieur à ceux observés dans la MH de la population générale.

1.3.7 Pronostic

Chez les patients atteints d'une LLC, la survie médiane de ceux présentant un syndrome de Richter est significativement plus courte que celle des patients présentant une transformation prolymphocytoïde, respectivement 4 à 5 mois contre 2 ans (82). Cependant, le pronostic de la maladie de Hodgkin-variant du syndrome de Richter serait moins sombre que celui des lymphomes non hodgkinien B à grandes cellules survenant sur LLC, ce qui justifie son individualisation. En effet, dès les années 1990, Brecher *et al.* ont établi une probabilité de survie de 50 % à 1 an en utilisant la méthode de Kaplan Meier appliquée à une série de 8 cas (13) et l'ont comparée à celle habituellement observée dans le syndrome de Richter, c'est-à-dire 2,5 à 4 mois selon les séries.

En regroupant les cas bien documentés de la littérature récente (13, 28, 76, 116), on note que le décès survient en moyenne au bout de 14 mois (2 à 60 mois) après le diagnostic de MH et que les patients vivants lors de l'étude ont un recul de 45 mois (7 à 96 mois) après le diagnostic.
Par contre, le pronostic de la maladie de Hodgkin-variant du syndrome de Richter, par rapport à la maladie de Hodgkin "classique" survenant dans une population de même âge et de même stade clinique, serait identique. Mais à ce jour, il n'existe pas d'étude statistique comparative à ce sujet.

1.3.8 Thérapeutique

Dans la littérature, le traitement consiste presque toujours en une chimiothérapie, de même type que celle utilisée dans la maladie de Hodgkin survenant hors du contexte de la LLC ; une radiothérapie peut être associée, ou réalisée seule en cas d'atteinte localisée (13, 28). Les principaux protocoles de chimiothérapie utilisés sont les associations COPP, MOPP, ABVD, CHOP et leurs variants.

Deuxième partie :

Matériel et méthodes

2 Matériels et méthodes

2.1 Les patients

Les observations étudiées dans notre série provenaient de divers services d'Anatomie Pathologique participant au GOELAMS (Groupe Ouest Est d'étude des Leucémies et Autres Maladies du Sang). Initialement, 12 cas ont été inclus dans l'étude. Après vérification des dossiers cliniques des patients, la cohorte a été réévaluée. Neuf patients étaient effectivement porteurs d'une leucémie lymphoïde chronique avant la survenue de la MH et ont été inclus dans l'étude anatomoclinique.

Le cas n°1 provenait du CHU d'Avicenne (Bobigny), le cas n°2 provenait du CH Bretagne Atlantique de Vannes, les cas n°3 et 8 provenaient du Laboratoire d'Anatomie Pathologique du Docteur Froment (Metz). Le cas n°4 provenait du CHU de Dijon et le cas n°5 provenait du Laboratoire d'Anatomie Pathologique du Docteur Tas (Rennes). Deux cas (cas n°6 et 7) provenaient du Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU de Nancy (Hôpital d'Adultes de Brabois). Enfin, le cas n°9 provenait du CHU de Reims.

Les cas retenus comportaient du matériel fixé dans du formol à 10 % (v/v) tamponné pH 7,4 ou du liquide de Bouin alcoolique et parfois du matériel congelé à -80°C. Les diagnostics anatomo-pathologiques de MH ont été confirmés par une deuxième lecture et par une étude immunohistochimique complémentaire.

2.2 Méthodes diagnostiques

Les prélèvements analysés correspondaient à des biopsies-exérèses d'adénopathies (5 ganglions cervicaux ou digastriques, 2 ganglions axillaires, 2 ganglions sus-claviculaires, 1 ganglion médiastinal, 1 ganglion inguinal) et la biopsie chirurgicale d'une fosse nasale.

Les 2 prélèvements nancéens ont été acheminés stérilement et dans un délai d'un quart d'heure au Laboratoire. Toutes les manipulations ont été effectuées de façon stérile. Les

ganglions ont été coupés selon leur plus grand axe. Un fragment, prélevé dans une partie tumorale non nécrotique, a été placé dans un cryotube, puis plongé dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. La conservation du matériel congelé était assurée dans des congélateurs à -80°C. L'autre partie du ganglion a été fixée dans du formol à 10 % (v/v) dilué dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Si la quantité de matériel le permettait, un fragment a également été fixé dans du liquide de Bouin alcoolique.

En ce qui concerne les 9 autres observations étudiées, le matériel a été fixé par le formol (9 blocs) ou dans le liquide de Bouin alcoolique (6 blocs) et, dans certains cas, congelé (6 échantillons). Les délais et modes de fixation pouvaient être variables selon les prélèvements, ce qui est habituel dans une étude rétrospective.

2.2.1 Etude histologique

Après une fixation formolique, les prélèvements ont été inclus dans la paraffine dans un automate de type VIP (Tissue-Tek). Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées et montées sur des lames ordinaires à l'eau albumineuse ou des lames Superfrost® à l'eau distillée, selon le cas. Après séchage à l'étuve à +37°C pendant deux heures, les coupes ont été déparaffinées dans trois bains successifs de toluène, hydratées par passage dans des bains d'éthanol de concentration décroissante, puis dans de l'eau courante.

Les lames, quelle que soit la provenance des blocs, ont été colorées de la même façon : une coloration par l'Hématoxyline-Eosine-Safran et une coloration de Giemsa différenciée ont été réalisées. L'imprégnation argentique de la réticuline a été effectuée suivant la méthode de Gordon-Sweet.

2.2.2 Etude immunohistochimique

Afin de préciser le phénotype des cellules tumorales, pour chacun des cas étudiés, une technique immunohistochimique a été réalisée exclusivement sur des tissus fixés en formol et inclus en paraffine. Les coupes de 5 µm d'épaisseur ont été montées sur lames Superfrost®

(lames traitées à l'aminoéthyltriethoxysilane), déparaffinées selon les techniques habituelles, réhydratées et stockées dans un tampon PBS-Tween pH 7,6.

Une inversion de la fixation formolique par hydrolyse catalysée par la chaleur a été réalisé au four à micro-ondes ou au bain-Marie selon l'anticorps. Les lames, placées dans un porte-lame puis immergées dans une solution de tampon, ont été portées à la température de +98°C ou +99°C pendant une heure. Les lames ont ensuite été plongées dans de l'eau courante pour les refroidir et un cerclage des coupes par un trait de crayon hydrophobe a été réalisé afin de limiter l'écoulement des solutions d'incubation hors de la coupe.

Les rinçages ont été réalisés à la pissette avec la solution de tampon PBS-Tween.

Les lames ont été incubées avec les anticorps primaires, préalablement dilués aux concentrations indiquées dans le tableau suivant dans une solution diluante, pendant 15 heures, en chambre humide, à 4°C et à l'abri de la lumière.

Tableau n° 5 : Anticorps utilisés dans notre étude et conditions techniques

Anticorps primaire	Clone	Monoclonal (M) /polyclonal (P)	Dilution	Référence du produit	Prétraitement
CD3	F7.2.38	M	1/150	Dako M 7254	MO
CD5	4C7	M	1/300	NovoCastra CD5-4C7	MO
CD15	80H5	M	1/20	Immunotech 1921	MO
CD20	L26	M	1/2500	Dako M 0755	MO
CD23	MHM6	M	1/200	Dako M 0763	MO
CD30	Ber-H2	M	1/40	Dako M 0751	MO
CD79a	11E3	M	1/250	NovoCastra CD79a-225	MO
Oct-2	C-20	P	1/1000	Santa Cruz Biotechnology SC-233	MO
Pax-5	24	M	1/40	BD Biosciences	MO
Bcl-6	PG-B6p	M	1/30	Dako M 7211	BM
LMP1	CS 1-4	M	1/600	Dako M 0897	MO
EBNA2	PE2	M	1/80	Dako M 7004	MO

MO : four à micro-ondes à puissance variable (MicroMed T/T, Microm, Francheville, France), +98°C, 1 heure, EDTA 10 mM pH 8,0

BM : bain-marie, +99°C, 1 heure, tampon Dako pH 9,9

Après rinçage, les coupes ont été recouvertes, pendant une heure en chambre humide, d'une solution d'anticorps secondaire biotinylé dilué au 1/200ème dans du tampon PBS-Tween [anticorps caprins anti-IgG de souris (Dako réf E433, Trappes, France) pour les anticorps monoclonaux et anticorps caprin anti-IgG de lapin (Dako réf E432) pour l'anticorps anti-sérum].

Après un nouveau rinçage, l'activité peroxydasique endogène a été inhibée par une incubation des coupes de 15 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 6 % (v/v) dans de l'eau déminéralisée. Après un rinçage de 2 minutes, les coupes ont été incubées une heure à température ambiante dans une solution de streptavidine conjuguée à la peroxydase (Dako, réf P397), préalablement diluée au 1/200ème dans du tampon PBS-Tween. Après rinçage, l'activité peroxydasique a été révélée par la technique du NovaRED, en utilisant un kit de coloration (Vector, réf SK-4800, Biovalley, Marne-la-vallée, France).

Les coupes ont été contre-colorées à l'Hématéine de Harris, diluée au ½, pendant 20 secondes puis rincées à l'eau courante et bleuies dans du tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. Après déshydration dans l'éthanol et passage dans le toluène, les lames ont été montées à l'Eukitt.

2.2.3 Technique d'hybridation *in situ*

Le virus d'Epstein-Barr a été recherché par étude en hybridation *in situ*, à l'aide de sondes complémentaires des ARNm EBER selon les techniques usuelles.

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes de 5 µm d'épaisseur ont été soumises à l'action de la protéinase K (Sigma France, 15 U/mg) diluée au 1/1000ème pendant 10 minutes au bain-marie à +37°C. Après rinçage, les coupes ont été hybridées avec la sonde EBER conjuguée à la fluorescéine dans une chambre d'hybridation (Hybaid, Thermo Labosystems, Cergy-Pontoise, France) pendant 1 heure 30, à +55°C. Un rinçage de 10 minutes, à +55°C, dans une solution de chlorure de sodium (NaCl 150 mM) a été réalisé, puis les lames ont été déposées dans du tampon TBST. La détection de la fluorescéine a été assurée par l'incubation de la coupe dans une solution d'anticorps anti-fluorescéine dilué au 1/2000ème dans du tampon TBST, pendant 30 minutes. Deux rinçages successifs dans du tampon TBST puis dans du tampon pH 9,4 ont été effectués et la révélation a été réalisée par la technique de Mc Gadey

dite du « NBT BCIP » (Roche, Meylan, France), à l'obscurité et à température ambiante. La durée de révélation, suivie au microscope, variait de 45 minutes à 1 heure. Après deux rinçages dans du tampon pH 9,4 et dans l'eau distillée, une contre coloration a été réalisée au Rouge Nucléaire (RAL, Bordeaux, France) et les coupes ont été recouvertes d'une lamelle montée à l'aide d'une solution d'alcool polyvinylique (Sigma, PM 40 000).

2.2.4 Techniques de PCR, réalisées à partir d'ADN extrait de coupes tissulaires

Cette technique, largement utilisée dans l'étude des lymphomes, a ici été appliquée à l'ADN tissulaire total de nos échantillons. Le matériel a été obtenu à partir de fragments congelés dans les cas où l'on disposait de suffisamment de tissu, ou obtenu par grattage d'anciennes lames histologiques dans les situations où le matériel congelé n'existait pas ou était épuisé.

Rappels sur le principe d'étude des réarrangements de la chaîne lourde des immunoglobulines

Les phénomènes de réarrangement (ou recombinaison) génique caractérisent les cellules lymphoïdes à l'état physiologique (99). Ils permettent aux lymphocytes de disposer d'une très grande diversité de récepteurs antigéniques (de l'ordre de 10^8). Chaque lymphocyte exprime ainsi un unique récepteur capable de reconnaître spécifiquement un antigène. Pour ce qui concerne les lymphocytes B, les recombinaisons sont liées à l'organisation particulière des gènes codant pour les immunoglobulines. Ces gènes sont constitués de segments V codant pour des régions variables, des segments D de diversité (uniquement pour la chaîne lourde des immunoglobulines), des segments J de jonction et des segments C codant pour des régions constantes. Ces segments subissent, au cours de la différenciation des cellules lymphoïdes B, des recombinaisons VDJ aboutissant à des gènes fonctionnels.

A la diversité des recombinaisons VDJ s'associe une diversité jonctionnelle liée à des séquences aléatoires N disposées aux jonctions VD et DJ. Au total, chaque région réarrangée V(N)D(N)J est spécifique d'un lymphocyte et permet la synthèse d'une immunoglobuline spécifique.

Ces recombinaisons se font dans un ordre chronologique précis. Elles surviennent précocement dans la différenciation lymphoïde et sont transmises à la descendance cellulaire. En théorie, dans un lymphome, un seul réarrangement est constaté dans toutes les cellules tumorales descendant d'une même cellule «mère». Le profil est donc clonal (monoclonal). A l'opposé, un infiltrat lymphoïde réactionnel non tumoral est polyclonal, du fait de la diversité des lymphocytes représentés.

L'intérêt d'étudier la clonalité lymphocytaire dans le diagnostic des lymphomes est double : cette analyse est utilisable en routine et facilement reproductible. La majorité des lymphomes B comporte un réarrangement du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines, situé sur le chromosome 14. Ainsi, la plupart des protocoles de PCR utilisés pour le diagnostic de clonalité des lymphoprolifération B utilise des amorces consensus des régions variables et jonctionnelles (JH) du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines : CDRIII, FR3/JH, FR2/JH, FR1/JH (63), et des techniques de PCR simple ou semi nichée (26), associant 2 protocoles successifs d'amplification encadrant la même zone et destinés à amplifier plus spécifiquement une séquence d'ADN précise.

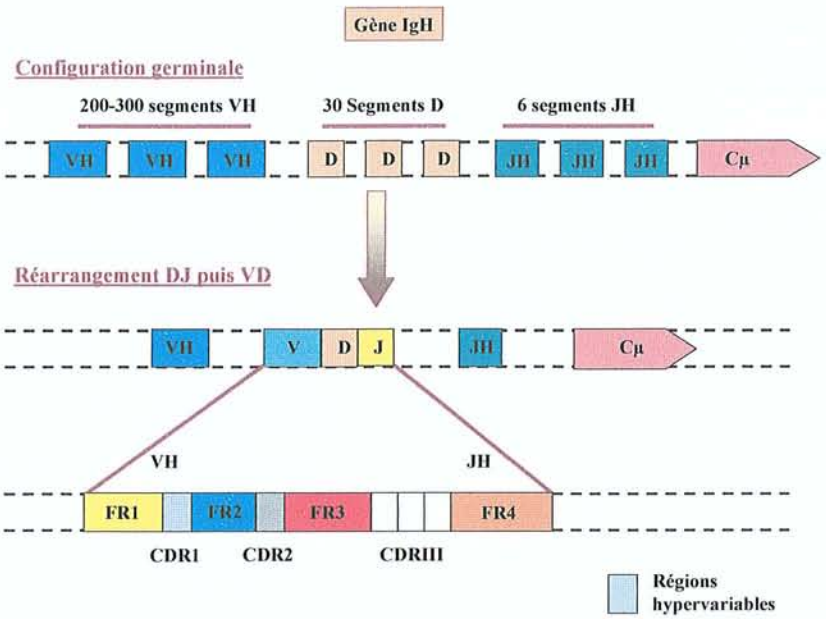


Figure n° 2 : Représentation schématique du gène codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines

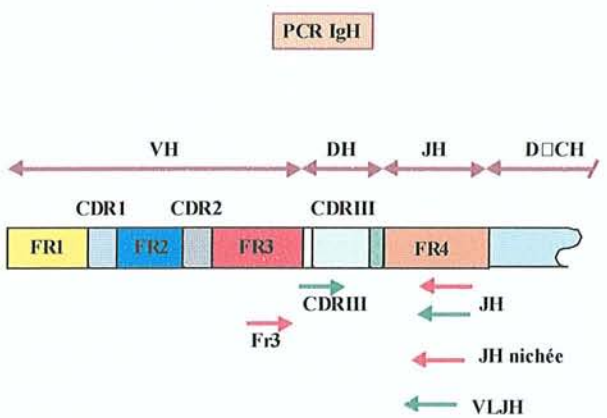


Figure n° 3 : Position schématique des amorces utilisées pour l'étude des réarrangements des gènes IgH (CDRIII et FR3A)

2.2.4.1 Le recueil de l'ADN

- La déprotéinisation

Selon le mode de fixation de l'échantillon (fixation formolique ou congélation), la méthode de déprotéinisation était variable.

A partir de tissu congelé, les cellules ont été lysées par une solution d'urée/SDS. Vingt à 40 mg de tissu, soit 2 à 4 coupes de 20 µm d'épaisseur, réalisées au cryostat (Leica CM3050 S, Leica systems, Nussloch, Allemagne) préalablement nettoyé à l'alcool, ont été déposés dans un tube Eppendorf stérile puis 400 µL de solution urée/SDS ont été ajoutés. Après agitation douce pendant une minute, la digestion protéique s'est effectuée pendant 12 heures, sur agitateur à roue, à température ambiante.

A partir de tissu fixé et inclus en paraffine, une lyse enzymatique a été réalisée par la protéinase K. Vingt à 40 mg de tissu, soit 2 à 4 coupes de 20 µm d'épaisseur réalisées sur le microtome (Microm HM 340 E, Francheville, France) stérilisé, ont été déposés dans un tube Eppendorf stérile contenant 800 µL de tampon à protéinase K. La solution enzymatique a été déposée (40 µl de solution de protéinase K à 10 mg/mL) et les tubes ont été incubés au bain-Marie à +57°C pendant 12 heures. A la fin de l'opération, la protéinase K était dénaturée à la chaleur par ébullition à +100°C pendant 10 minutes.

- L'extraction de l'ADN

La première étape a consisté en un traitement de l'échantillon par un volume égal de phénol saturé en Tris pH 8,0 de chloroforme et d'alcool isoamylique (25/24/1 v/v). Après agitation pendant 2 à 3 minutes, le mélange a été centrifugé à 10 000 tours par minute pendant 5 minutes à température ambiante. La phase aqueuse a été recueillie par pipetage en évitant soigneusement de prélever les protéines. L'opération a été renouvelée une fois. Le phénol résiduel a été éliminé par deux extractions successives dans un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1 v/v). Le mélange était agité doucement pendant 2 à 3 minutes puis à nouveau centrifugé à 10 000 tours par minute pendant 5 minutes à température ambiante.

- La précipitation et la remise en solution des acides nucléiques

A la phase aqueuse recueillie, ont été ajoutés 2 volumes d'éthanol froid et 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3M pH 5,2. La solution était doucement mélangée et au bout d'une minute environ, le précipité d'ADN apparaissait sous la forme d'une «méduse». Celle-ci a été retirée du tube Eppendorf grâce à une pointe de pipette, en prenant garde à éviter d'emporter de l'éthanol. Cent à 200 µL de tampon Tris-EDTA ont été ajoutés pour remettre en suspension l'ADN et un dosage a été réalisé à 260 et 280 nm par spectrophotométrie (spectrophotomètre Beckman DU640B, Gagny, France).

2.2.4.2 La réaction de PCR CDR III

La PCR CDR III semi nichée associe une première amplification par un couple d'amorces externes, VH et JH externe, une dilution intermédiaire des produits obtenus et une seconde amplification par un couple d'amorces internes, VH et JH interne (nichée).

La première réaction a été réalisée sur un échantillon de 500 ng d'ADN auquel on ajoute les réactifs suivants :

Amorces	VH	0,2 µM
	JH externe	0,2 µM
dNTP		200 µM de chaque
Tampon 10 X		1/10ème du volume réactionnel
$MgCl_2$		1,5 mM
Taq polymérase (Q-BIOgene)		1,5 U

VH : 5' CTG TCG ACA CGG CCG TGT ATT ACT G 3'
JH externe : 5' ACC TGA GGA GAC GGT GAC C 3'

Le tube a été complété à 50 µL avec de l'eau ultra-pure sans DNAse. Dans le thermocycleur (Gene Amp PCR Systems 9600, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), l'amplification a été réalisée selon les cycles suivants :

Première dénaturation	94°C	4 minutes
Dénaturation	94°C	40 secondes
Hybridation	55°C	40 secondes 30 cycles
Elongation	72°C	40 secondes
Dernière élongation	72°C	10 minutes

La seconde réaction a été réalisée sur une dilution au 1/100ème du produit de la première amplification. Le même protocole, en utilisant les amorces VH et JH nichée, a été répété 35 cycles.

Amorces	VH	0,2 µM
	JH nichée	0,2 µM
dNTP		200 µM de chaque
Tampon 10 X		1/10ème du volume réactionnel
$MgCl_2$		1,5 mM
Taq polymérase (Q-BIOgene)		1,5 U

VH : 5' CTG TCG ACA CGG CCG TGT ATT ACT G 3'
JH nichée : 5' ACC AGG GTC CCT TGG CCC CA 3'

2.2.4.3 La réaction de PCR FR3A

Il s'agit également d'une PCR semi nichée. Elle associe une première amplification par un couple d'amorces externes, FR3A et LJH, une dilution intermédiaire des produits obtenus et une seconde amplification par un couple d'amorces internes, FR3A et VLJH.

Les modes opératoires étaient superposables à ceux utilisés pour la réaction de PCR CDRIII. Les conditions de réalisation étaient les suivantes :

FR3A : 5' ACA CGG C(C/T)(G/C) TGT ATT ACT GT 3'
LJH : 5' TGA GGA GAC GGT GAC C 3'
VLJH : 5' GTG ACC AGG GTN CCT TGG CCC CAG 3'

Première amplification :

Amorces	FR3A	1,3 µM
	LJH	1,6 µM
dNTP		250 µM de chaque
Tampon 10 X		1/10ème du volume réactionnel
$MgCl_2$		1,5 mM
Taq polymérase (Q-BIOgene)		1,25 U

Première dénaturation	94°C	5 minutes	
Dénaturation	93°C	45 secondes	
Hybridation	60°C	45 secondes	30 cycles
Elongation	72°C	2 minutes	
Dernière élongation	72°C	10 minutes	

Seconde amplification :

Amorces	FR3A	1,3 µM
	VLJH	2 µM
dNTP		250 µM de chaque
Tampon 10 X		1/10ème du volume réactionnel
$MgCl_2$		1,5 mM
Taq polymérase (Q-BIOgene)		1,25 U

La seconde réaction comportait 20 cycles.

2.2.4.4 Les contrôles

A chaque amplification, des contrôles ont été assurés en réalisant, conjointement aux échantillons, l'amplification de l'ADN provenant de prélèvements dont les profils étaient typiques et connus : un témoin monoclonal (obtenu à partir d'un cas de lymphome malin non

hodgkinien B), un témoin polyclonal (ADN extrait d'un ganglion réactionnel) et un témoin négatif (eau ultra-pure).

2.2.4.5 La visualisation des résultats

Les produits obtenus ont été analysés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide, à 12 % pour CDRIII et à 8 % pour FR3 (compositions en annexe). Après polymérisation du gel, 20 µL de produit de PCR ont été ajoutés à 5 µl de tampon de charge coloré et déposés sur le gel. La migration s'est effectuée à puissance constante (20 Watt) pendant 2 heures environ, dans un tampon TBE. La longueur des bandes a été appréciée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (PGEM DNA Marker, Promega, Charbonnières, France), après coloration par le bromure d'éthidium et observation sous lampe à ultra-violets.

2.3 Mise au point d'une technique d'amplification génomique à partir de l'ADN d'une ou plusieurs cellules isolées obtenues par microdissection laser

2.3.1 Le matériel étudié sur le plan moléculaire

2.3.1.1 Notre série

Concernant l'étude moléculaire, l'analyse du matériel disponible à partir de la cohorte anatomoclinique a démontré que seules 7 observations comportaient du tissu fixé par le formol (cas n°2, 3, 4, 5, 6, 7 et 9) et que 2 cas devaient être exclus en raison d'une fixation exclusive du matériel par le liquide de Bouin alcoolique (cas n°1 et 8). En revanche, la cohorte du GOELAMS a permis d'identifier 3 nouvelles observations de MH associée à des lymphomes, et de découverte simultanée, pour lesquelles nous disposions de matériel fixé par le formol, respectivement 1 tumeur composite associant lymphome lymphoplasmocytaire et MH (cas n°10) et 2 lymphomes composites associant lymphome lymphocytique et MH (cas n°11 et 12).

Dans ce travail, nous avons effectué la microdissection cellulaire et l'étude moléculaire sur les seuls cas pour lesquels nous disposions de tissu congelé en quantité suffisante (cas n°2, 4, 8 et 10). La seconde partie de l'étude concernant la microdissection cellulaire et l'étude moléculaire sera effectuée dans un travail ultérieur, à partir des cas pour lesquels nous disposons de tissu fixé par le formol.

Caractéristiques anatomopathologiques des 3 nouveaux cas inclus dans notre étude moléculaire :

- Patient 10 (lymphome lymphoplasmocytaire et MH)

Cette volumineuse masse ganglionnaire cervicale droite de 5 cm de grand axe était occupée par une prolifération tumorale d'architecture diffuse, homogène, de cellules lymphocytaires et lymphoplasmocytaires de taille petite et moyenne, correspondant à une maladie de Waldenström. Le tissu adipeux périganglionnaire était largement infiltré. A faible grossissement, il persistait quelques zones claires correspondant à des centres folliculaires. A fort grossissement, on retrouvait des cellules HRS disposées de manière éparse dans le tissu ganglionnaire, ou parfois regroupées. Il n'était pas observé de granulome.

- Patient 11 (lymphome lymphocytique et MH)

Ce ganglion inguinal gauche mesurait 2,7 cm dans son plus grand axe. Le parenchyme ganglionnaire était totalement détruit par une prolifération cellulaire diffuse constituée de lymphocytes atypiques et des cellules moins nombreuses de type prolymphocytaire. Les cellules HRS étaient tantôt disposées de manière isolée au sein des lymphocytes atypiques (90 % des cellules HRS), tantôt situées au sein du granulome hodgkinien habituel, de type à cellularité mixte (10 % des cellules HRS).

- Patient 12 (lymphome lymphocytique et MH)

Cette biopsie de ganglion sus-claviculaire correspondait à un nodule de 2 cm de diamètre. Son architecture était partiellement désorganisée par une prolifération cellulaire atteignant les zones inter-folliculaires et comprenant des lymphocytes T, de nombreux histiocytes, des plasmocytes et de rares polynucléaires. Au sein de ces granulomes polymorphes étaient

dispersées des cellules HRS. En périphérie du prélèvement se trouvaient des zones minoritaires refoulées par les granulomes, correspondant au lymphome lymphocytique.

Cas	CD30 /Ber-H2	CD15 /Leu-M1	CD20 /L26	CD79a	CD3	CD5	Oct-2	chaîne J	Bcl6	Pax-5	EBV Eber	LMP1	EBNA2
10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	+	+	-
11	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

2.3.1.2 Le cas témoin ayant permis les mises au point techniques

Préalablement à l'étude de notre série, un cas de lymphome malin non hodgkinien B a été choisi puis microdisséqué, pour permettre une large gamme d'essais techniques et la mise au point de l'amplification à partir de cellules isolées. Il s'agissait d'un cas de lymphome splénique B de la zone marginale, recueilli dans le service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU de Nancy (Hôpital d'Adultes de Brabois). Ce cas de lymphome répondait, en outre, aux caractéristiques suivantes : richesse du matériel congelé et du matériel fixé par le formol, monoclonalité des réarrangements du gène de l'IgH.

2.3.2 La préparation des échantillons

A partir d'un fragment congelé, une coupe de 5 µm d'épaisseur a été réalisée au cryostat et déposée sur une lame recouverte d'une membrane plastique. Après fixation dans une solution de formaldéhyde 4 % (m/v), préparé par dépolymérisation du paraformaldéhyde dans un tampon PBS, pendant 10 minutes et rinçage à l'eau distillée pendant 10 minutes également, les lames étaient conservées dans un tampon phosphate salé pH 7,6 contenant du tampon PBS-Tween.

2.3.2.1 Marquage des populations cellulaires d'intérêt

Un marquage immunohistochimique pouvait être réalisé afin d'individualiser formellement les cellules. Les anticorps utilisés ont été l'anti-CD20/L26 pour caractériser la population de lymphocytes B et l'anti-CD30/BerH2 pour marquer les cellules HRS. Il n'a pas été réalisé de pré-traitement par la chaleur (ni micro-ondes, ni cocotte-minute). Les anticorps primaires, préalablement dilués dans une solution diluante, ont été déposés sur les lames aux concentrations suivantes :

CD30/Ber-H2	1/20
CD20/L26	1/1000

Les lames ont été incubées en chambre humide à +4°C pendant une nuit. Le lendemain matin, elles ont été rincées à la pissette contenant du PBS-Tween, en prenant garde d'éviter les contaminations d'une lame à l'autre, puis dans deux bains successifs de tampon.

Les coupes ont été recouvertes, pendant une heure en chambre humide, d'une solution d'anticorps secondaire conjugué à la biotine (chèvre anti-IgG de souris, réactif Dako E433 pour les anticorps monoclonaux et chèvre anti-IgG de lapin, réactif Dako E432 pour les polyclonaux), tous deux dilués au 1/200ème dans du tampon PBS-Tween.

Après un nouveau rinçage au tampon, l'activité peroxydasique endogène a été inhibée par une incubation des coupes pendant 15 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 6 % (v/v) dans l'eau déminéralisée.

Les coupes ont été de nouveau rincées au tampon puis incubées une heure à température ambiante dans une solution de streptavidine conjuguée à la peroxydase (réactif Dako P397) diluée au 1/200ème dans du tampon PBS-Tween.

Après rinçage, l'activité peroxydasique a été révélée à température ambiante par la technique du NovaRED, en utilisant un kit de coloration (Vector, référence SK-4800). Aucune contre coloration n'a été réalisée. Les lames ont été déshydratées par séchage lent, à température ambiante, pendant 10 jours au minimum, afin de limiter la quantité d'eau résiduelle et la

vaporisation lors de la microdissection. Les lames pouvaient être conservées à l'abri de la lumière à température ambiante.

2.3.2.2 Principe de fonctionnement de la microdissection laser

La microdissection utilise un procédé sans contact physique avec l'échantillon. La découpe est réalisée par un faisceau laser focalisé sur la coupe. Le rayonnement fonctionne à l'azote et agit par impulsions. La longueur d'onde du laser est de 337 nm ce qui le place dans les rayonnements UVA, hors du spectre d'absorption des UV par l'ADN, et évite les altérations génomiques. L'épaisseur du trait de coupe dépend de la nature du tissu disséqué, de la focalisation du laser (et de l'objectif utilisé) ; il peut être inférieur au micron.

Le système ne produit pas de chaleur délétère pour l'échantillon et est contrôlé par l'opérateur par l'intermédiaire d'un ordinateur et d'une souris. Le laser découpe le tissu grâce à un procédé photochimique sans formation de chaleur et qui se produit pendant un temps très court (impulsion de l'ordre de la nanoseconde). Il n'existe pas d'altérations des tissus voisins de l'impact (100). Les cellules sont découpées grâce à la répétition de minuscules trous. Le déplacement de l'échantillon par rapport au laser est assuré par une platine mobile, qui se déplace autour du faisceau laser fixe. La récupération de l'échantillon est effectuée par catapultage, par «souffle» laser, dans un microtube placé au dessus de la lame, après la défocalisation du laser.

2.3.2.3 La microdissection des 4 échantillons de notre série

La microdissection de nos quatre échantillons congelés a été réalisée à l'Hôpital Saint Louis (Paris) dans le service du Professeur A. Janin, par le Professeur E. Labouyrie (Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU de Nancy, Hôpital d'Adultes de Brabois) et le Docteur L. Legres (EA-2378, IFR Biomédical Saint-Louis – Paris) sur un appareil de microdissection Palm-Olympus (Olympus, Rungis, France) de première génération. Les cellules recueillies correspondaient d'une part à la population lymphocytaire de la LLC, et d'autre part aux cellules HRS de la maladie de Hodgkin.

Sous contrôle visuel, par l'intermédiaire d'une caméra numérique, les contours de la cellule sélectionnée ont été dessinés grâce au logiciel de l'ordinateur qui pilote le laser. Une fois la

zone définie, la découpe était automatiquement réalisée par l'ordinateur, et suivie visuellement à l'écran. L'échantillon cellulaire était recueilli dans un microtube contenant 15 µL de tampon de lyse. Les échantillons étaient ensuite transportés à température ambiante à Nancy, où le protocole pouvait être poursuivi, le lendemain ou parfois, 3 jours plus tard. Une digestion par la protéinase K était effectuée, selon le protocole utilisé en routine. Les tubes étaient immédiatement conservés au congélateur, à –20°C.

2.3.3 Mise en évidence des réarrangements du gène de l'IgH par PCR CDRIII et FR3A

En raison de la faible quantité d'ADN qui pouvait être extrait d'un nombre limité de cellules (une, 5, 10, 20 ou 50 cellules selon le cas), il nous a paru intéressant d'amplifier l'ADN de départ pour pouvoir pratiquer le protocole de PCR de routine diagnostique (où le mode opératoire amplifie une quantité d'ADN avoisinant les 500 ng) et, d'autre part, de réaliser plusieurs amplifications à partir d'un même échantillon.

2.3.3.1 L'étape de pré amplification de l'ADN total

La technique de PEP (Primer Extension Preamplification – Préamplification) utilisée a été celle décrite par Zhang *et al.* en 1992 ; elle a été mise au point initialement sur l'ADN d'un spermatozoïde (120). L'ADN est copié au cours de plusieurs cycles d'une PCR utilisant des amorces de séquences variables (Random Primers, Operon Technologies, Alameda, CA, USA). Le mélange d'amorces est composé d'oligonucléotides mesurant 15 bases et dont la composition, au niveau de chaque base, est variable et peut correspondre à chacune des quatre nucléotides A, T, C, ou G. Les combinaisons de séquence présentes sont donc en théorie au nombre de 4^{15}.

Selon Zhang *et al.*, cette procédure permet d'amplifier au minimum 78 % des séquences génomiques de départ en une trentaine de copies au minimum. Certains fragments mesurent plus de 800 paires de bases de longueur, ce qui permet statistiquement la réalisation d'une technique de PCR CDRIII ou FR3A, dont les zones d'intérêt mesurent entre 100 et 200 paires de bases.

Après recueil de l'échantillon cellulaire (une à 50 cellules recueillies selon le tube) et digestion enzymatique, le tube contenait la matrice d'ADN dans 25 µL de tampon de protéinase K.

Le protocole d'amplification a été le suivant :

Amorces	400 µM
dNTP	2 mM de chaque
Tampon 10 X	1/10ème du volume réactionnel
$MgCl_2$	2,5 mM
Taq polymérase (Q-BiOgene)	5 U

Première dénaturation	94°C	5 minutes	
Dénaturation	92°C	1 minute	50 cycles
Hybridation	37°C	2 minutes	
Etape passerelle de changement de température	10 secondes par degré Celsius	3 minutes	
Elongation	55°C	4 minutes	

2.3.3.2 Contrôle de la qualité de l'ADN après microdissection

- Contrôle de la longueur des fragments d'ADN obtenu après PEP

Afin de préciser la nature des produits obtenus après l'étape de pré amplification non spécifique de l'ADN, le produit de PEP a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. La migration s'est effectuée à tension constante (50 Volt) pendant 2 heures environ. Les résultats ont été appréciées par la présence d'une bande correspondant à la longueur des fragments obtenus par la PEP et comparaison avec un marqueur de taille (λ/HindIII, Proméga, Charbonnières, France).

- Contrôle de la qualité de l'ADN obtenu après microdissection

Afin de s'assurer que la microdissection ait effectivement produit une quantité d'ADN manipulable et qu'aucun résultat négatif ne soit lié à la perte ou à l'absence d'ADN, l'amplification d'un gène «de ménage» ubiquitaire, a été réalisée. Le gène choisi était celui de l'enzyme GAPDH (glycéraldéhyde - 3 - phosphate déshydrogénase). Les conditions de PCR ont été les suivantes :

sens : GAA GGT GAA GGT CGT CGG AGT
anti-sens : GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC

Amorces	sens	2,3 µM
	anti-sens	2,4 µM
dNTP		250 µM de chaque
Tampon 10 X		1/10ème du volume réactionnel
$MgCl_2$		1,5 mM
Taq polymérase (Q-BIOgene)		1,5 U

Première dénaturation	94°C	4 minutes	
Dénaturation	94°C	1 minute	
Hybridation	55°C	1 minute	30 cycles
Elongation	72°C	1 minute	
Dernière élongation	72°C	10 minutes	

Après électrophorèse sur un gel de polyacrylamide à 8 %, la longueur des bandes a été appréciée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (PGEM DNA Marker, Promega, Charbonnières, France). La longueur attendue était de 226 paires de bases.

2.3.3.3 Sensibilité des techniques de PCR CDRIII et FR3A

Nous avons vu que, en routine, 500 ng d'ADN sont utilisés pour réaliser une amplification. Certaines équipes (83, 114) travaillent avec des quantités moindre, de l'ordre de 100 ou même

50 ng d'ADN matriciel. Afin de vérifier si nos techniques de PCR étaient applicables avec de plus faibles quantités et de définir un seuil de sensibilité, des essais de dilution de l'ADN matriciel ont été réalisés. Des quantités variables d'ADN total du cas de lymphome témoin, allant de 10 pg à 500 ng, ont été amplifiées, en utilisant une technique de routine CDRIII puis une technique FR3A. Ces essais ont utilisé l'enzyme *Taq* polymérase Gold et une concentration en $MgCl_2$ à 2,5 mM.

Des essais d'amplification par PCR ont également été réalisés à partir de cellules isolées par microdissection laser, sans réalisation de PEP préalable, et sur des échantillons contenant un nombre décroissant de cellules : les essais ont porté sur 50, 20, 10, 5 et une cellules isolées à partir du lymphome témoin et de notre série

2.3.3.4 L'optimisation de la technique de PCR pour l'étude des échantillons obtenus par microdissection laser

2.3.3.4.1 Les amorces CDRIII et FR3A

De nombreuses études de la littérature (83, 19) analysant la clonalité B lymphocytaire à l'échelon unicellulaire utilisent la méthode de PCR semi nichée à l'aide d'amorces encadrant la région hypervariable CDRIII. Nous avons donc testé, à l'échelon unicellulaire, les protocoles de PCR CDRIII et FR3A de routine diagnostique du laboratoire, appliqués à notre cas témoin.

Avec les deux types de PCR, CDRIII et FR3A, des études de mise au point technique ont été nécessaires pour affiner la procédure. Le cas témoin a été utilisé pour déterminer les conditions optimales : concentration de $MgCl_2$, qualités de l'enzyme, quantité d'ADN matriciel pour chaque étape de la PCR semi nichée.

2.3.3.4.2 Les enzymes *Taq* polymérase

Les enzymes *Taq* polymérases utilisées pour les techniques de PCR proviennent d'une bactérie (*Thermophilus aquaticus*) qui a été découverte dans les sources chaudes. Ces

enzymes sont capables de recopier un brin d'ADN à partir d'une matrice monocaténaire et de bases nucléotidiques, lorsque la température est de +72°C.

Nous avons comparé l'emploi de deux enzymes différentes : une *Taq* polymérase classique (*Taq* polymérase, Q-BIOgene, Illkirch, France), utilisée en routine diagnostique et une *Taq* polymérase Gold (Ampli *Taq* Gold, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Les enzymes *Taq* polymérases nécessitent un travail rapide, à +4°C (sur lit de la glace).

L'enzyme *Taq* polymérase Gold (Ampli*Taq* Gold, Applied Biosystems) repose sur le principe de "hot-start": en effet, elle est thermostable grâce à sa liaison avec un groupement chimique qui inactive le site enzymatique. Durant les étapes de préparation de la réaction et la montée en température du premier cycle d'amplification (alors que la réaction se trouve à des températures d'hybridation non optimales), l'enzyme est inactive. Elle ne commence à fonctionner qu'après une étape d'activation de 5 à 10 minutes à +95°C lors de laquelle le groupement chimique est clivé. Ceci augmente la qualité de l'amplification par diminution des produits non spécifiques synthétisés pendant les étapes de manipulation des tubes et la première étape de dénaturation de 5 minutes où les échantillons sont amenés de +4°C à +94°C et pendant laquelle des hybridations non spécifiques peuvent se produire. Elle est plus coûteuse qu'une enzyme classique (0,70 €/U contre 0,28 €/U pour la *Taq* polymérase classique). Elle permet également une amplification correcte à partir d'un ADN matriciel de très faible abondance, comme c'est le cas sur cellules isolées. En revanche, à partir d'un ADN tissulaire total, extrait de tissu congelé, et disponible en quantité abondante, l'utilisation de la *Taq* polymérase classique (*Taq* polymérase, Q-BIOgene) paraît suffisante.

2.3.3.4.3 La concentration en MgCl2

Le chlorure de magnésium ($MgCl_2$) est un paramètre important pour définir les conditions de stringence de la réaction de PCR ; l'ion magnésium Mg^{2+} joue le rôle de cofacteur pour l'enzyme *Taq* polymérase. Il intervient dans la spécificité de reconnaissance des substrats nucléotidiques triphosphates (dNTP). Un excès d'ion magnésium Mg^{2+} provoque une accumulation de produits non spécifiques, alors qu'une baisse de sa concentration diminue de façon importante la quantité de séquences synthétisées.

Une étude d'amplification du cas témoin a été réalisée en utilisant des gammes variables de concentration de $MgCl_2$, allant de 2,5 mM (quantité habituellement utilisée dans les protocoles de PCR) à 4 mM, en utilisant la *Taq* polymérase Gold et en faisant varier la quantité d'ADN matriciel de 10 pg à 500 pg.

2.3.3.4.4 Contrôle de la technique

Pour chaque PCR, nous avons introduit systématiquement des témoins, monoclonal (lymphome malin non hodgkinien B), polyclonal (ganglion réactionnel) et négatif (eau ultra-pure) afin de démontrer que la technique a fonctionné. Un témoin tissulaire, extrait à partir d'un fragment congelé de l'échantillon, a été parallèlement amplifié afin de le comparer, après PCR, aux produits d'amplification obtenus à partir des cellules isolées.

Troisième partie :

résultats

3 Résultats

3.1 Les patients

Le groupe étudié était constitué de 7 hommes et de 2 femmes, âgés de 59 à 77 ans (moyenne 68 ans) au moment du diagnostic de maladie de Hodgkin.

- Patient 1

Il s'agissait d'une femme âgée de 66 ans en 1992, lorsqu'il avait été découvert une LLC de stade A. Elle avait été traitée pendant 6 mois, dès 1993, par Chlorambucil, en raison d'une hépatomégalie symptomatique importante ; une atteinte spécifique de la LLC avait été retrouvée à la biopsie hépatique. Devant l'accentuation du syndrome tumoral, le traitement par Chlorambucil était repris, sans efficacité. Le diagnostic de maladie de Hodgkin était porté en 1998 sur l'exérèse d'un polype nasal obstruant. Le bilan d'extension a conclu à une maladie de stade IVBa et un traitement associant 3 cures de type ABVD, suivies d'une radiothérapie locale (30 Gray) ont permis d'obtenir une rémission complète avec un recul de 6 ans. A 72 mois du diagnostic de MH, la LLC était stable, en stade A de Binet.

- Patient 2

Il s'agissait d'un homme présentant des antécédents d'insuffisance respiratoire avec retentissement cardiaque droit, âgé de 63 ans (1994), lorsque était découverte, de façon fortuite, une lymphocytose. L'hémogramme initial retrouvait des leucocytes à $16,4x10^9$/L dont 63 % de lymphocytes, sans anémie ni thrombopénie. Le diagnostic de LLC, de stade clinique B selon la classification de Binet, était posé et un traitement associant Chlorambucil et corticoïdes était débuté en cures discontinues mensuelles, ce qui avait permis une réponse partielle après trois cures. Un traitement identique était repris quelques mois plus tard en raison d'une aggravation de la lymphocytose et de l'apparition d'une localisation pulmonaire spécifique. Fin 1998, le diagnostic de maladie de Hodgkin était porté sur la biopsie d'une adénopathie axillaire. Il s'agissait d'un stade IIIAa. Un traitement de type MOPP était alors instauré. Les trois premières cures permettaient une nette diminution du syndrome tumoral,

mais étaient marquées par des complications infectieuses et une mauvaise tolérance hématologique, conduisant au remplacement des cures de MOPP par des injections de Velbé®, également mal tolérées sur le plan cardiorespiratoire. Le patient était décédé un an après le diagnostic de maladie de Hodgkin à la suite d'une nouvelle décompensation cardiorespiratoire.

- Patient 3

Il s'agissait d'un homme âgé de 65 ans en 1998, chez qui était diagnostiquée une leucémie lymphoïde chronique de stade B de Binet. Un traitement initial par Chlorambucil était instauré pendant quelques semaines puis un relais était entrepris par 6 cures de chimiothérapie de type «mini CHOP», sans efficacité. Six cures de Fludarabine permettaient, en octobre 1999, d'obtenir une rémission complète. En juillet 2001, le diagnostic de maladie de Hodgkin était porté sur une médiastino-biopsie réalisée en raison d'une anémie inflammatoire. Le bilan d'extension concluait à un stade IIIBb et le patient a reçu une chimiothérapie de type «COPP/ABV hybride». Après 5 cures, une réponse clinique et radiologique était notée mais le patient a présenté une complication infectieuse de type SDRA (syndrome de détresse respiratoire aiguë) dont il est décédé.

- Patient 4

Il s'agissaitt d'une femme âgée de 59 ans en 1985, lorsque le diagnostic de LLC de stade A a été porté. Après une période d'abstention thérapeutique de 6 ans, un traitement par Chlorambucil en cures discontinues était instauré, puis poursuivi pendant 4 ans. En raison d'une évolution en stade C en 1998, elle avait bénéficié de 5 cures de Fludarabine, relayées ensuite, notamment en raison d'une hémolyse, par une chimiothérapie associant des agents alkylants et des corticoïdes, ce qui permettait d'obtenir une réponse partielle. En l'an 2000, le diagnostic de maladie de Hodgkin était porté au décours d'une biopsie ganglionnaire axillaire réalisée en raison de l'apparition d'une altération de l'état général et d'une fièvre. Le bilan d'extension concluait à un stade IIBb. Une chimiothérapie de type «CHOP lymphome» était alors débutée ; la patiente a reçu 5 cures mensuelles mais a présenté, au décours de la cinquième cure, une complication infectieuse dont elle est décédée, alors qu'il existait une réponse partielle de la maladie de Hodgkin à la chimiothérapie.

- Patient 5

Il s'agissait d'un homme de 62 ans, asymptomatique, chez qui était découverte fortuitement une LLC de stade A en 1986. Après une période cliniquement asymptomatique de 13 ans, le patient évoluait vers un stade C. Une splénectomie était alors réalisée puis le patient recevait 3 cures de Fludarabine en raison d'une insuffisance médullaire importante ; ce traitement permettait d'obtenir une réponse partielle. Tout traitement spécifique était arrêté à partir de février 2000. Cinq nouvelles cures de Fludarabine ont été administrées de février à juillet 2001 en raison d'une évolution de la maladie. En octobre 2001, la biopsie d'une adénopathie cervicale permettait de porter le diagnostic de maladie de Hodgkin. Le bilan d'extension concluait à un stade IIBb. Un traitement par 4 cures de chimiothérapie de type «ABVD» était administré puis était suivi d'une radiothérapie des sites initialement envahis (40 Gray en région cervicale), ce qui permettait d'obtenir une rémission complète de la maladie de Hodgkin. Deux mois après la fin du traitement, la LLC était stable, sans traitement, en stade A de Binet.

- Patient 6

Il s'agissait d'un homme de 54 ans, asymptomatique, chez qui était découverte une lymphocytose en décembre 1994. L'hémogramme initial retrouvait des leucocytes à $29,3x10^9$/L dont 73 % de lymphocytes, sans anémie ni thrombopénie. Le diagnostic de LLC, de stade clinique A selon la classification de Binet, était posé et une surveillance clinique et biologique semestrielle était proposée. Après une période cliniquement asymptomatique de 30 mois, le patient développait des adénopathies périphériques axillaires, cervicales et inguinales. L'hémogramme révèlait une hyper leucocytose à $88,3x10^9$/L dont 85 % de lymphocytes, sans anémie ni thrombopénie associée. Le patient était traité par 6 cures de chimiothérapie de type «mini CHOP» qui conduisaient à une rémission partielle ; un traitement de consolidation par Chlorambucil était débuté en avril 1998. En novembre 1999, le patient était hospitalisé pour fièvre, sueurs nocturnes et apparition rapide d'une polyadénopathie et d'une splénomégalie. L'hémogramme montrait des leucocytes à $15,4x10^9$/L dont 60 % de lymphocytes, toujours sans anémie ni thrombopénie. La biopsie d'un ganglion cervical révèlait une maladie de Hodgkin de type «à cellularité mixte». Le bilan d'extension concluait à une maladie de stade IIIBb selon la classification modifiée d'Ann Arbor. Le patient recevait 6 cures de chimiothérapie de type «MOPP/ABV hybride», ce qui permettait une stabilisation de la

maladie de Hodgkin. Deux mois plus tard, une insuffisance rénale motivait la réalisation d'un examen tomodensitométrique qui découvrait un sarcome à cellules fusiformes au niveau de la vessie. Le patient décèdait un mois plus tard.

- Patient 7

Il s'agissait d'un homme suivi depuis l'âge de 66 ans (1981) pour une LLC de stade A selon Binet. Après une période d'évolution asymptomatique de 6 ans, sans aucun traitement spécifique, une chimiothérapie orale par Chlorambucil était débutée en raison du doublement de la lymphocytose en 6 mois. Un an plus tard, des adénopathies superficielles et médiastinales s'étaient développées et le patient présentait une dyspnée. La biopsie ganglionnaire montrait une maladie de Hodgkin, de type «à prédominance lymphocytaire». Le bilan d'extension concluait à une maladie de stade IIIBb. Le patient recevait 4 cures de chimiothérapie de type «MOPP-ABV», ce qui aboutissait à une rémission partielle de la maladie et une normalisation de l'hémogramme. Une chimiothérapie orale d'entretien de type prednimustine (Stéréocyt®) était débutée. Dix-huit mois plus tard, le patient présentait une rechute de la maladie de Hodgkin, avec un stade clinique IVBb avec atteinte médullaire. Il recevait 2 cures de chimiothérapie de type «CVPP» sans efficacité clinique et décèdait.

- Patient 8

Il s'agissait d'un homme de 56 ans chez qui le diagnostic de LLC de stade B avait été posé lors de la découverte d'adénopathies et d'une splénomégalie. L'hémogramme retrouvait des leucocytes à $51x10^9$/L dont 85 % de lymphocytes, sans anémie ni thrombopénie. Le traitement initial consistait en 6 cures mensuelles de chimiothérapie de type «CHOP LLC» et aboutissait à une rémission partielle. Il recevait 6 cures trimestrielles de chimiothérapie de type «mini-CHOP» en traitement de consolidation. Après une évolution clinique asymptomatique de 10 mois, le patient présentait une altération de l'état général avec fièvre et amaigrissement, des adénopathies périphériques et une splénomégalie. L'hémogramme révèlait une lymphopénie. La biopsie ganglionnaire cervicale montrait une maladie de Hodgkin, à «cellularité mixte». L'hémogramme retrouvait une anémie à 8,9 g/dL, isolée. La moelle osseuse était infiltrée par les lymphocytes de la LLC mais sans cellules de la maladie de Hodgkin. Le bilan d'extension concluait à une maladie de stade IIIBb. A partir de janvier 2000, le patient recevait 8 cures de chimiothérapie selon le protocole «ABVD», aboutissant à

une rémission complète de la maladie de Hodgkin. A 34 mois du diagnostic de syndrome de Richter, le patient était en rémission complète de la maladie de Hodgkin et la LLC était en stade A de Binet, sans aucun traitement spécifique.

- Patient 9

Il s'agissait d'un homme âgé de 62 ans en 1993 chez qui le diagnostic de LLC de stade A selon Binet était porté. Aucun traitement spécifique n'était instauré. Après une période d'évolution asymptomatique de 5 ans, une chimiothérapie orale par Chlorambucil et prednisone était débutée en 1998, en raison d'un passage au stade B ; ce traitement ne permettait qu'une stabilité de la maladie. En février 2001, en raison d'une symptomatologie associant fièvre à +40°C et sueurs nocturnes, une biopsie d'une adénopathie cervicale était réalisée et permettait de porter le diagnostic de maladie de Hodgkin. Le bilan d'extension concluait à un stade IIIBb selon Ann Arbor. Un traitement par chimiothérapie de type «CHOP lymphome» (6 cures) suivi d'un entretien par Vépéside puis Chlroraminophène avait permis de stabiliser le syndrome tumoral. Devant la réapparition des signes généraux et l'apparition de nouvelles adénopathies, un traitement associant Ifosfamide, Vépéside et corticoïdes était débuté fin 2002. Le patient recevait 6 cures de ce type aboutissant à une réponse minime.

Tableau n° 6: histoire clinique des 9 patients

Patient n°	Sexe	Age lors du diagnostic de MH	Délai de survenue entre la LLC et la MH	Stade selon Ann Arbor	Recul depuis le diagnostic de MH	Traitement reçu
1	F	70 ans	4 ans	IVBa	72 mois RC	ABVD, Rx
2	M	67 ans	4 ans	IIIAa	14 mois DCD	MOPP, Velbé
3	M	68 ans	3 ans	IIIBb	4 mois DCD	COPP/ABV hybride
4	F	75 ans	16 ans	IIBb	6 mois DCD RP	CHOP
5	M	77 ans	15,5 ans	IIBb	7 mois RC	ABVD
6	M	59 ans	5 ans	IIIBb	14 moins DCD	MOPP/ABV hybride
7	M	73 ans	7 ans	IIIBb	31 mois DCD	MOPP-ABV, CVPP
8	M	59 ans	2,3 ans	IIIBb	34 mois RC	ABVD
9	M	70 ans	8 ans	IIIBb	20 mois	CHOP, Holoxan+Vépéside

F : sujet féminin RC : rémission complète DCD : patient décédé

M : sujet masculin RP : rémission partielle

3.2 Caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques

3.2.1 Observations morphologiques

- Patient 1

Ce fragment biopsique a intéressé la muqueuse de la fosse nasale gauche et mesurait 0,8 cm de diamètre. Il renfermait un chorion dont l'architecture était massivement modifiée par une prolifération tumorale maligne, composée de petits lymphocytes atypiques correspondant à la LLC. Au sein de ces plages monomorphes, se trouvaient des zones plus nodulaires composées de prolymphocytes et de paraimmunoblastes, associés à des cellules HRS isolées, en l'absence de granulome hodgkinien.

- Patient 2

Ces trois ganglions axillaires droits mesuraient respectivement 6, 4,5 et 3,5 cm de grand axe. Ils étaient d'aspect identique. L'architecture générale était totalement remaniée et la majorité des zones examinées comportait des plages diffuses monomorphes constituées de lymphocytes atypiques, parfois activés, de taille moyenne (paraimmunoblastes), associés à quelques immunoblastes. Ces plages renfermaient également quelques cellules HRS isolées. On observait des zones minoritaires granulomateuses constituées d'un fond d'histiocytes épithélioïdes, de polynucléaires, sur lequel se détachaient de grandes cellules HRS parfois en mitose.

- Patient 3

Le matériel examiné correspondait à 6 ganglions médiastinaux mesurant de 0,5 à 2,5 cm de grand axe. Toutes ces formations ganglionnaires avaient le même aspect histologique. Le parenchyme était totalement détruit par des plages tumorales constituées de cellules de petite taille, correspondant à des lymphocytes atypiques, avec parfois une différenciation

lymphoplasmocytaire (LLC). Ces plages homogènes étaient parsemées de granulomes, comportant des plasmocytes, des polynucléaires éosinophiles, des histiocytes, ainsi que des cellules HRS moyennement nombreuses.

- Patient 4

Ce prélèvement correspondait à une biopsie-exérèse d'adénopathie axillaire gauche, mesurant 0,8 cm de long. L'architecture normale du ganglion apparaissait totalement effacée par la prolifération tumorale de la LLC, sur un mode diffus, avec franchissement de la capsule. Au sein de la population lymphocytaire, on retrouvait des cellules HRS, le plus souvent isolées, et plus rarement situées dans un granulome inflammatoire associant des histiocytes, des plasmocytes et des polynucléaires neutrophiles.

- Patient 5

Ce ganglion cervical droit mesurait 2,5 cm de grand axe. Il possèdait un parenchyme homogénéisé par un fond tumoral lymphocytaire correspondant à la LLC. Dans certaines zones se trouvaient des cellules HRS, qui étaient mêlées à un granulome composé d'histiocytes épithélioïdes, de plasmocytes et pauvres en polynucléaires.

- Patient 6

Cette biopsie-exérèse d'adénopathie sus-claviculaire gauche mesurait 2,5 cm. L'architecture du ganglion était bouleversée sur un mode diffus par une prolifération de lymphocytes atypiques. Au sein de ces plages étaient dispersées des cellules HRS, entourées d'histiocytes épithélioïdes, de plasmocytes et de polynucléaires éosinophiles.

- Patient 7

Cette biopsie ganglionnaire cervicale gauche mesurait 2 cm dans sa plus grande dimension. Le ganglion était totalement remanié par une prolifération d'architecture diffuse, composée pour moitié de plages de lymphocytes atypiques et pour moitié de cellules HRS, situées dans des granulomes associant des histiocytes épithélioïdes, des polynucléaires .

- Patient 8

La biopsie-exérèse du ganglion cervical droit concernait une adénopathie dont l'architecture était complètement détruite par une prolifération cellulaire diffuse composée, d'une part, de plages granulomateuses constituées de lymphocytes T, d'histiocytes épithélioïdes, de polynucléaires éosinophiles et de cellules HRS, et d'autre part, de plages lymphomateuses contenant des lymphocytes, des prolymphocytes, des paraimmunoblastes et des immunoblastes, correspondant à la LLC.

- Patient 9

Ces trois fragments de ganglion sous-digastrique droit mesuraient 5 cm de grand axe. Le parenchyme ganglionnaire était complètement remplacé par une prolifération de petits lymphocytes atypiques correspondant à la LLC, et à des plages d'aspect granulomateux composées de quelques histiocytes épithélioïdes, de lymphocytes et de polynucléaires éosinophiles et neutrophiles. Les cellules HRS étaient retrouvées de manière isolée au sein des plages cellulaires de la LLC et dans les granulomes.

- Au total,

la composante hodgkinienne était représentée par de grandes cellules HRS, en nombre plus ou moins important selon le cas et selon les zones étudiées, disposées au sein d'un granulome hodgkinien typique, chez 8 patients (89 % des cas).

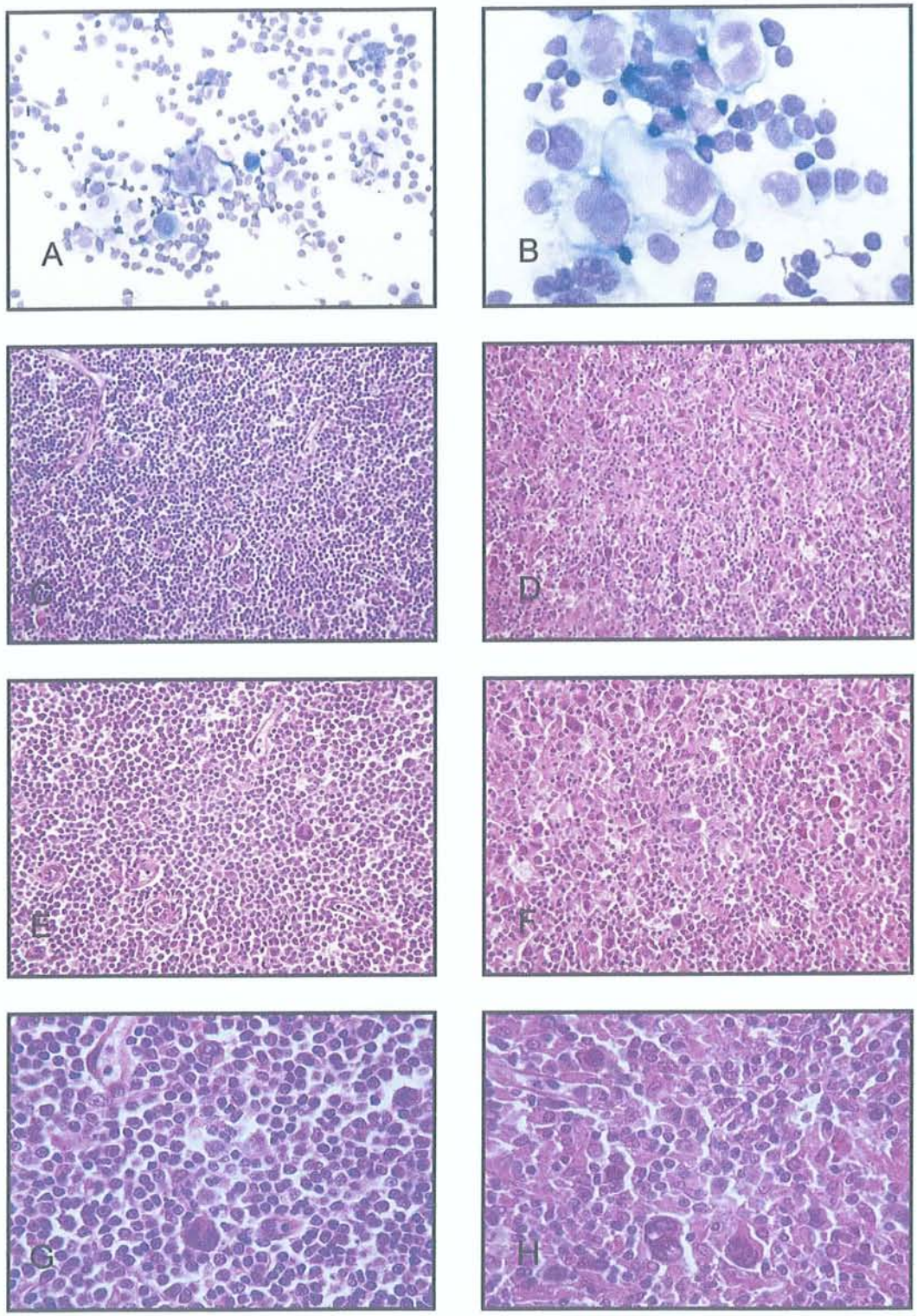
Chez 4 patients (44 % des cas), les cellules HRS étaient isolées et disposées de manière diffuse au sein d'une population lymphocytaire néoplasique correspondant à la leucémie lymphoïde chronique ou au lymphome lymphocytique.

Enfin, dans 3 cas, les deux aspects morphologiques coexistaient sur une même biopsie. Dans un cas (patient n°4), le granulome hodgkinien était focal, disposé dans un ganglion tumoral renfermant en majorité des cellules HRS isolées au sein de plages lymphocytaires néoplasiques.

Tableau n° 7: Données morphologiques

Cas	Siège du prélèvement	Mode de fixation	LLC (%)	Cellules HRS isolées	Granulome hodgkinien	Cellules HRS isolées et dans granulome
1	Fosse nasale	Bouin	90 %	x		
2	Ganglion axillaire droit	Formol	80 %	x	x	50 % - 50 %
3	Ganglion médiastinal	Formol	70 %		x	
4	Ganglion axillaire gauche	Formol	20 %	x	x	80 % - 20 %
5	Ganglion cervical droit	Formol	10 %		x	
6	Ganglion sus-claviculaire G	Formol	50 %		x	
7	Ganglion cervical gauche	Formol	40 %		x	
8	Ganglion cervical droit	Bouin	20 %		x	
9	Ganglion sous-digastrique D	Formol	50 %	x	x	50 % - 50 %
Total				44 %	89 %	33 %

Planche n°1 : Maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter : morphologie



A : Cellules HRS (May-Grünwald-Giemsa, x40)
B : Cellules HRS (May-Grünwald-Giemsa, x100)
C : Cellules HRS isolées (cas n°6, HES, x10)
D : Cellules HRS au sein d'un granulome (cas n°9, HES, x10)

E : Cellules HRS isolées (cas n°6, HES, x20)
F : Cellules HRS au sein d'un granulome (cas n°9, HES, x20)
G : Cellules HRS isolées (cas n°6, HES, x40)
H : Cellules HRS au sein d'un granulome (cas n°9, HES, x4

3.2.2 Le profil immunohistochimique de la composante hodgkinienne

Tableau n° 8 : Données immunohistochimiques des cellules HRS

Cas	CD30 Ber-H2	CD15 Leu-M1	CD20 L26	CD79a	CD3	CD5	Oct-2	chaîne J	Bcl-6	Pax-5
1	+	-	NR	NR	-	-	NR	NR	NR	NR
2	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	+	-	-	+/-	-	-	-/+
6	+	+	-	NR	-	-	+/-	-	NR	NR
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-/+
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-/+
9	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-/+

+ : marquage présent

+/- : marquage faible et présent sur certaines cellules seulement

-/+ : marquage faible et inconstant

- : absence de marquage

NR : technique non réalisée par insuffisance de matériel

Chez les 9 patients de notre étude, toutes les cellules HRS exprimaient l'antigène CD30/BerH2. Le marquage était membranaire et granulaire cytoplasmique, parfois sous forme diffuse.

Chez 8 patients (89 % des cas), les cellules HRS exprimaient également l'antigène CD15/LeuM-1, sous forme d'un marquage cytoplasmique, granuleux, souvent difficile à mettre en évidence, impliquant une lecture attentive des lames. L'intensité du marquage variait selon les zones et les conditions de réalisation de la technique immunohistochimique. Il a été nécessaire de répéter les techniques (de 2 à 5 fois selon le cas) pour obtenir un marquage interprétable, qui, dès lors qu'il a été observé une fois, était considéré comme positif.

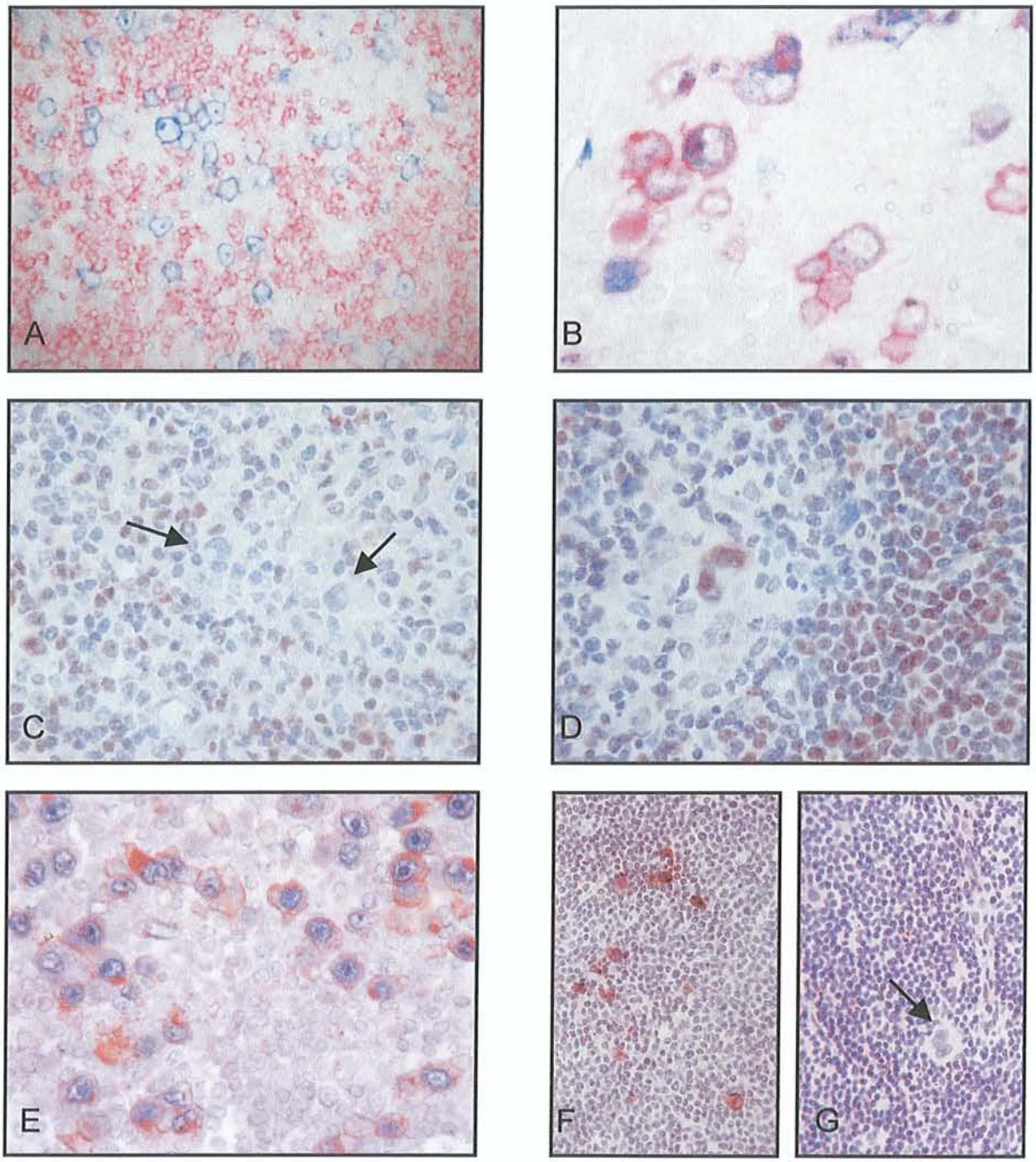
L'antigène CD20/L26 n'était exprimé par les cellules HRS que dans un cas sur 8 (12 % des patients). En revanche, dans tous les cas, les lymphocytes néoplasiques (LLC) exprimaient intensément l'antigène CD20. De même, l'antigène CD79a n'était exprimé que dans un cas sur 7 par les cellules HRS (14 % des cas, étude immunohistochimique non réalisée dans 2 cas). De plus, la positivité des cellules HRS pour ces 2 anticorps était variable et hétérogène selon les cellules au sein d'une même lésion.

En ce qui concerne les marqueurs pan-T (CD3 et CD5), aucun marquage n'a été observé au niveau des cellules HRS.

L'expression du facteur de transcription Oct-2 était retrouvée chez 4 patients sur 8 (50 % des cas), sous forme d'un marquage nucléaire variable d'une cellule HRS à l'autre et d'intensité diminuée par rapport à celui observé dans la population cellulaire lymphoïde adjacente : dans les cas n°5 et 6, seules de rares cellules HRS exprimaient faiblement la protéine Oct-2. Elle était également toujours exprimée par les lymphocytes néoplasiques de la LLC. La chaîne J (J chain) n'était, en revanche, jamais exprimée par les cellules HRS.

Sur les 7 cas où l'étude immunohistochimique à la recherche du proto-oncogène Bcl-6 a pu être réalisée, aucun marquage n'a été retrouvé. Enfin, le facteur de transcription Pax-5 a été observé sous la forme d'un marquage nucléaire le plus souvent faible et hétérogène dans 4 cas sur 7, d'intensité modérée dans 1 cas sur 7 et absent dans 2 cas.

Planche n°2 : Maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter : immunophénotype



A : Double immunomarquage CD30/Ber-H2 (Fast Blue) et CD20/L26 (New Fuschine) x20 (cas n°9)
B : Double immunomarquage CD15/Leu-M1 (Fast Blue) et CD30/Ber-H2 (New Fuschine) x40
C : Immunomarquage Oct-2 négatif sur les cellules HRS x40 (cas n°10)
D : Immunomarquage Oct-2 positif sur les cellules HRS x40 (cas n°2)
E : Double immunomarquage CD15/Leu-M1 (NovaRed) et hybridation *in situ* EBER (Fast Blue) x20
F : Immunomarquage LMP-1 positif x20 (cas n°2)
G : Immunomarquage EBNA-2 négatif x20 (cas n°12)

3.3 Détection EBV

Tableau n° 9 : Détection du virus d'Epstein-Barr dans les cellules HRS

Cas	EBV Eber	LMP1	EBNA2
1	+	NR	NR
2	+	+	-
3	+	+	-
4	+	+	-
5	+	+	-
6	+	+	-
7	+	+	-
8	+	+	-
9	+	+	-

+ : marquage présent

- : absence de marquage

NR : technique non réalisée par insuffisance de matériel

Dans toutes les observations de notre série, le virus d'Epstein-Barr a été détecté en hybridation *in situ* par la technique des EBER. Le signal, nucléaire, a concerné l'ensemble des cellules HRS examinées. Il n'a jamais été retrouvé dans les lymphocytes tumoraux de la LLC.

L'étude du profil de latence à l'aide des anticorps anti-LMP-1 et anti-EBNA-2 a été réalisé sur 8 cas ; il était de type II : en présence de transcrits EBV Eber, toutes les cellules HRS expriment la protéine membranaire de latence de type 1 d'origine virale et aucune n'exprimait l'antigène EBNA-2.

3.4 Biologie moléculaire

3.4.1 Les résultats des mises au point techniques

Les étapes de mise au point de la technique ont été réalisées sur le cas témoin (lymphome B splénique de la zone marginale étudié dans notre laboratoire). Le témoin a été utilisé pour déterminer les conditions optimales de notre technique : concentration de $MgCl_2$, qualités de l'enzyme, quantité d'ADN matriciel pour chaque étape de la PCR semi nichée.

3.4.1.1 Vérification de la qualité de l'ADN après microdissection laser

- Electrophorèse sur gel d'agarose

En gel d'agarose, l'analyse des produits de PEP a montré la présence d'une quantité détectable d'ADN. Des résultats positifs, visibles sous forme d'une bande d'ADN au fond du puits, ont été observés pour la moitié des échantillons (7 puits sur 14), correspondant à des gammes de 1 à 10 cellules HRS ou de la LLC, ce qui confirmait la présence d'une quantité détectable d'ADN après pré amplification.

- PCR GAPDH

A partir d'ADN non pré amplifié, la PCR GAPDH a permis d'amplifier 2 échantillons (1 et 10 cellules) de cellules isolées par microdissection, sur les 8 tubes testés. Ces résultats ont été visibles sous forme d'une bande étroite sur le gel d'électrophorèse, située en effet au niveau du marqueur de taille de 226 paires de bases.

A partir d'ADN pré amplifié, la PCR GAPDH a permis d'amplifier l'ensemble des échantillons

3.4.1.2 La sensibilité de la PCR CDRIII et FR3A

- Essais de dilution de l'ADN matriciel

Les essais de dilution ont été réalisés à partir d'ADN total du lymphome témoin.

En PCR CDRIII, les résultats pour les quantités allant de 50 pg à 500 ng ont été comparables : l'amplification a généré une bande unique (sauf pour les échantillons de 500 pg et 5 ng où la bande était mélée à une trainée correspondant à un ADN dégradé) et identique entre les tubes. A partir de 10 pg, aucune amplification n'a été visualisée. En PCR FR3A, les résultats ont été similaires et la même bande a été retrouvée dans tous les tubes, à l'exception du tube de 50 ng où une bande aspécifique plus haute que les autres a été retrouvée.

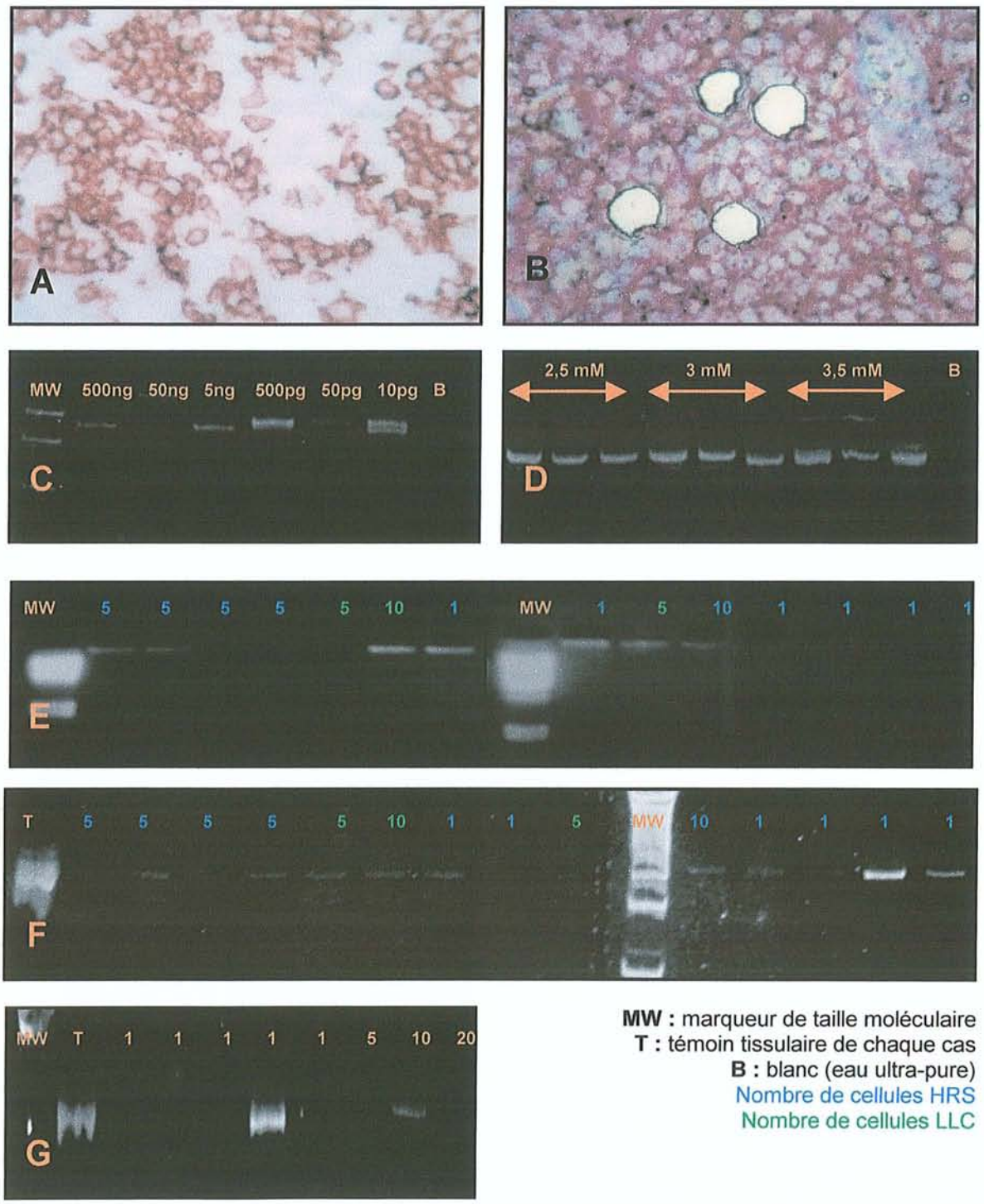
Des résultats ont donc été observés jusqu'à des dilutions correspondant à 10 pg d'ADN matriciel. Cette quantité correspondait à l'ADN présent dans le noyau d'une seule cellule et permettait en conséquence d'envisager des amplifications selon le même protocole sur cellule isolée.

- La PCR directe et la PEP-PCR

Devant une faible reproductibilité des premiers résultats obtenus par PEP-PCR, une modification rapportée par Dietmaier *et al.*, a été ajoutée (21), en accord avec les travaux sur cellules microdisséquée de Vergier (114). Un temps d'élongation à +68°C pendant 30 secondes avant la dénaturation suivante a été réalisé. Selon Dietmaier, le taux d'amplification obtenu par I-PEP (Improved-PEP) par rapport à la PEP initialement décrite est meilleur : pour une cellule, il passe de 0-20 % à 20-50 % et pour 5 cellules, il passe de 10-50 % à 100 % (21).

Par la suite, dans les 4 cas de notre série et lors des mises au point techniques préalables, les résultats obtenus par PEP-PCR ont toujours été meilleurs que ceux obtenus après PCR directe. En effet, la bande d'amplification était plus nette et les bandes additionnelles située au dessous, moins nombreuses. Par ailleurs, le rendement de la PEP-PCR s'est avéré nettement supérieur à celui de la PCR directe.

Planche n°3 : Technique de PEP-PCR pour la détection des gènes IgH CDRIII et FR3A sur cellule isolée par microdissection laser : lymphome non hodgkinien de type B splénique de la zone marginale témoin



A : Immunomarquage CD20/L26 de la lame avant microdissection
B : Immunomarquage CD20/L26 de la lame après microdissection
C : Dilutions de l'ADN matriciel (PCR FR3A sur cas témoin monoclonal, *Taq* Gold)
D : Variations de la concentration en $MgCl_2$ (PCR FR3A sur cas témoin monoclonal, *Taq* Gold, avec 500 pg, 50 pg et 10 pg d'ADN matriciel)
E : Electrophorèse sur gel d'agarose du produit de PEP (5µl, cas 10 et 4)
F : PEP-PCR GA-PDH sur cas 10 et 4
G : PCR GA-PDH sur cas témoin (sans pré amplification)

- Etude sur une gamme de une à 50 cellules

Les études en PCR CDRIII et FR3A ont montré la présence d'une bande spécifique dès les échantillons contenant une seule cellule. L'augmentation du nombre de cellules augmentait la sensibilité de la technique et en diminuait la spécificité, en raison de la production de bandes surajoutées à la première.

3.4.1.3 Les amorces CDRIII et FR3A

Avec les deux types de PCR, CDRIII et FR3A, des mises au point techniques ont été nécessaires pour affiner la procédure.

En utilisant les amorces CDRIII utilisées par les équipes étudiant les cellules isolées (19, 83), nous avons obtenu des résultats peu spécifiques et difficilement reproductibles (présence de plusieurs bandes surajoutées à la bande attendue et variations des résultats obtenus à partir du même échantillon au cours de plusieurs PCR du même type). Nous avons donc élargi la zone étudiée et utilisé l'autre couple d'amorces utilisées dans le laboratoire pour la routine diagnostique, c'est à dire les amorces FR3A. Celles-ci encadrent la région d'intérêt CDRIII sur une zone plus grande sur le gène de l'IgH (les fragments d'ADN obtenus avec la PCR CDRIII sont de 80 à 100 paires de bases, et ceux obtenus avec la PCR FR3A sont de 100 à 120 paires de bases).

3.4.1.4 Les enzymes *Taq* polymérases

Selon les échantillons, nous avons observé différents types de résultats avec les deux enzymes. En effet, dans le cas n°2, les bandes visualisées ont été plus nettes en utilisant la *Taq* polymérase classique que la *Taq* polymérase Gold. En revanche, les résultats des cas n°4 et n°9 ont été obtenus au moyen de la *Taq* polymérase Gold.

3.4.1.5 La concentration en $MgCl_2$

Avec des concentrations de $MgCl_2$ supérieures à 2,5 mM, nous avons constaté l'apparition de bandes aspécifiques. L'intensité du signal de ces bandes s'accroissait avec la concentration en $MgCl_2$. Nous avons donc conclu que la concentration optimale pour notre étude sur cellule

isolée par microdissection correspondait à celle recommandée par les fabricants (Q-BIOgene, Applied Biosystems), c'est à dire 2,5 mM.

3.4.2 La technique de PCR retenue pour l'étude des cellules isolées par microdissection laser

Pour la mise au point de la technique, 13 réactions de PEP, 18 réactions de PCR et 46 réactions de PEP-PCR ont été nécessaires.

La technique retenue pour l'étude de notre série est résumée dans les tableaux suivants.

Première amplification :

Amorces	FR3A	1,3 µM
	LJH	1,6 µM
dNTP		250 µM de chaque
Tampon 10 X		1/10ème du volume réactionnel
$MgCl_2$		2,5 mM
Taq polymérase		1,25 U

Première dénaturation	94°C	5 minutes	
Dénaturation	93°C	45 secondes	
Hybridation	60°C	45 secondes	30 cycles
Elongation	72°C	2 minutes	
Dernière élongation	72°C	10 minutes	

La seconde réaction était réalisée à partir d'un échantillon de 10 µl d'une dilution au 1/1000ème du produit de la première amplification.

Seconde amplification :

Amorces	FR3A	1,3 µM
	VLJH	2 µM
dNTP		250 µM de chaque
Tampon 10 X		1/10ème du volume réactionnel
$MgCl_2$		2,5 mM
Taq polymérase		1,25 U

La seconde réaction comportait 20 cycles.

L'enzyme Ampli*Taq* Gold (Applied Biosystems) a été préférée à partir des échantillons non pré-amplifiés comme à partir des échantillons pré-amplifiés.

3.4.3 Les résultats sur tissu congelé (4 cas)

Tableau n°10 : Rendement des amplifications par PCR, réalisées sur nos 4 cas

Cas	Manipulation	1 cellule LLC	5 cellules LLC	10 cellules LLC	1 cellule HRS	5 cellules HRS	10 cellules HRS	20 cellules HRS
2	PEP-PCR	3/5	1/2	1/2	3/3	3/3	1/1	0/1
	PCR directe	5/5	2/2	2/2	1/2	2/3	1/1	1/1
4	PEP-PCR	4/4	NR	NR	2/4	0/1	NR	NR
	PCR directe	0/2	0/2	0/1	0/2	0/2	0/1	NR
9	PEP-PCR	2/2	2/2	1/1	2/2	2/2	0/1	NR
	PCR directe	0/2	0/2	0/1	0/2	0/2	0/1	NR
10	PEP-PCR	0/2	0/2	0/1	0/2	0/2	0/1	NR
	PCR directe	0/2	0/2	0/1	0/2	0/2	0/1	NR

NR : non réalisé

x/n : x échantillons avec la bande au niveau du témoin tissulaire / n échantillons testés

- **Dans le cas n°2,** en PEP-PCR et en PCR directe, nous avons obtenu des résultats avec la totalité des échantillons, excepté celui qui contenait 20 cellules HRS en utilisant la PEP-PCR. Dans la plupart des cas, la bande visualisée a été étroite, unique et située au même niveau que celle correspondant à l'ADN tissulaire total de la lésion. Les résultats ont cependant été plus nets en PEP-PCR qu'en PCR directe, pour laquelle de légers étalements ont été observés au dessous de la bande principale. Les rendements ont été de 70 % en PEP-PCR et de 87 % en PCR directe.

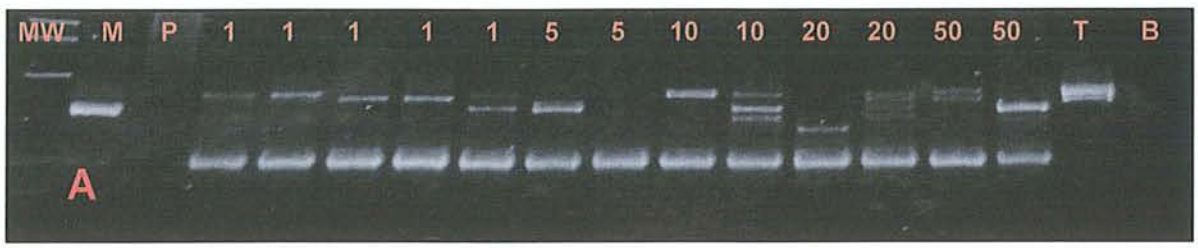
- **Dans le cas n°4,** en PEP-PCR, l'amplification des échantillons unicellulaires de cellules de la LLC a généré une bande composée, dans 2 cas, d'une bande unique et large, et, dans 2 cas, d'une double bande fine correspondant à l'amplification des 2 allèles du gène présents dans la cellule. Pour les échantillons contenant des cellules HRS, les résultats ont été superposables, avec, toutefois, la présence d'une faible traînée sur un des 2 échantillons ayant généré une bande visible. L'échantillon contenant 5 cellules HRS n'a pas été correctement amplifié (traînée). Le rendement a été de 86 % en PEP-PCR et la PCR directe n'a pas fonctionné (3 tentatives de PCR directe).

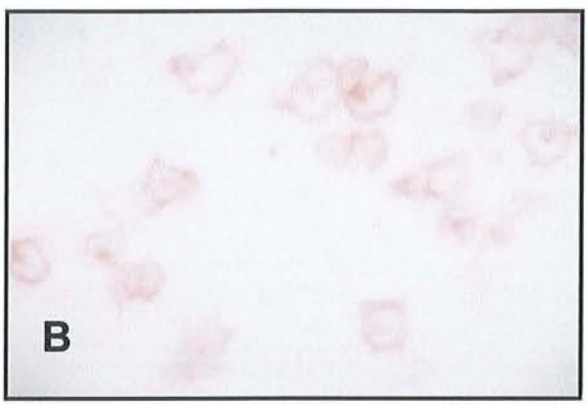
- **Dans le cas n°9,** en PEP-PCR, l'ensemble des échantillons de 1 et 5 cellules LLC ou HRS, a été correctement amplifié sous la forme d'une étroite bande située au même niveau que celle correspondant au témoin tissulaire. Pour les échantillons de 10 cellules, seul celui contenant des cellules LLC a été visible ; celui contenant les cellules HRS n'a pas été amplifié. Le rendement de la PEP-PCR a été de 90 %. La PCR directe n'a pas fonctionné (2 tentatives de PCR directe).

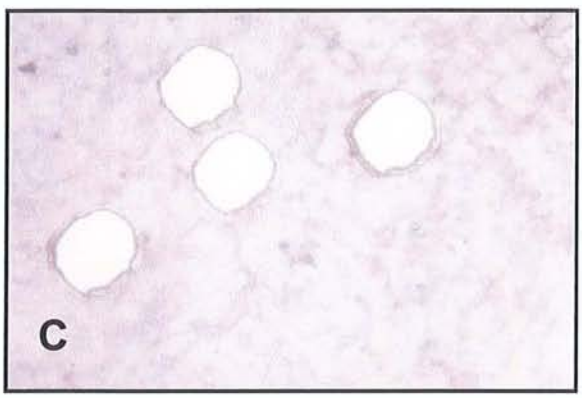
- **Dans le cas n°10,** en PEP-PCR comme en PCR directe, l'amplification sur l'ensemble des échantillons a généré des traînées ; ceci a été observé pour toutes les tentatives de PCR réalisées (3 PEP-PCR et 3 PCR directes).

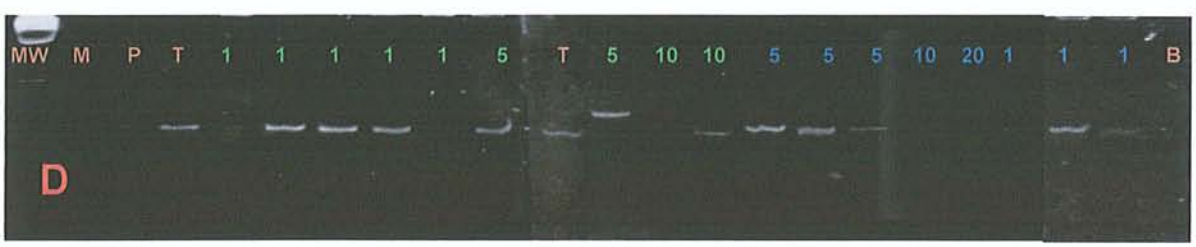
Le rendement global de la PEP-PCR FR3A a été de 60 % et celui de la PCR FR3A directe de 30 %.

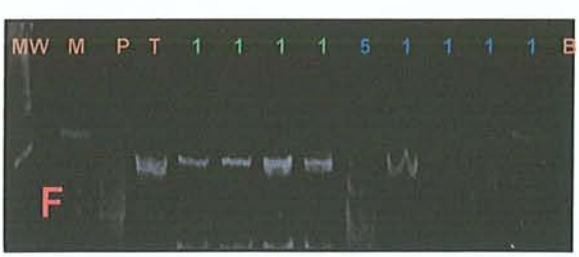
Planche n°4 : Technique de PEP-PCR pour la détection des gènes IgH CDRIII et FR3A sur cellule isolée par microdissection laser dans la MH – variant du syndrome de Richter

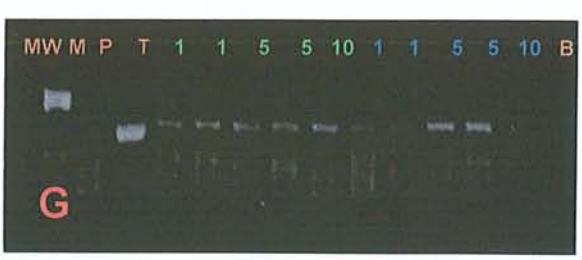












A : PEP-PCR CDRIII cas témoin (*Taq* Gold, gamme de cellules isolées)
B : Immunomarquage CD30/Ber-H2 de la lame avant microdissection
C : Immunomarquage CD30/Ber-H2 de la lame après microdissection
D : PEP-PCR FR3A cas n°2 (gamme de cellules **LLC** et **MH**)
E : PCR FR3A directe cas n°2 (gamme de cellules **LLC** et **MH**)
F : PEP-PCR FR3A cas n°4 (gamme de cellules **LLC** et **MH**)
G : PEP-PCR FR3A cas n°9 (gamme de cellules **LLC** et **MH**)

3.4.4 Les résultats des contrôles

Au cours de toutes les amplifications que nous avons réalisées, les témoins, monoclonal et polyclonal, ont été correctement amplifiés. Aucun produit d'amplification n'a pu être visualisé lors de l'amplification de l'eau ultra-pure (témoin négatif), ce qui démontrait l'absence de contamination de la manipulation de PCR. De plus, le résultat de l'amplification du témoin tissulaire a toujours consisté en une bande étroite et unique, à laquelle ont pu être comparées les bandes obtenues avec nos échantillons.

Discussion

4 Discussion

La maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter est une lésion rare, 44 cas bien documentés ayant été décrits dans la littérature (13, 28, 54, 59, 76, 82, 83, 87, 110, 116, 119). Les 9 cas de notre étude ont pu être réunis grâce à un recrutement large effectué dans les centres du groupe GOELAMS. On retrouve seulement 4 séries récentes regroupant une cohorte conséquente de patients : Brecher *et al.* (13), en 1990, étudient les présentations clinique et morphologique de la maladie à partir de 8 cas ; en 1992, Momose *et al.* (76), analysent le rôle du virus d'Epstein-Barr dans la pathogénie ; Weisenberg *et al.* (116), en 1995, rapportent 8 cas de MH concomitante avec une LLC, à propos de 6 cas de MH classique et 2 cas de paragranulome de Poppema-Lennert. Enfin, Fayad *et al.* (28), en 1996 analysent les aspects clinicopathologiques et immunophénotypiques de la MH - variant du syndrome de Richter, à partir des 7 cas recueillis au MD Anderson Cancer Center. Ohno *et al.* (83) et Kanzler *et al.* (54), plus récemment, se sont plus particulièrement attachés aux aspects moléculaires de la maladie.

4.1 Données anatomocliniques

4.1.1 Une lésion agressive et disséminée d'emblée

Dans notre étude, les patients étaient âgés de 68 ans en moyenne (59-77 ans), au moment du diagnostic de MH, ce qui correspond exactement à l'âge moyen de survenue de la MH rapporté par Brecher *et al.* (13) et Fayad *et al.* (28).

D'après notre étude, la survenue d'une MH chez un patient porteur d'une LLC a été plus fréquente chez l'homme que chez la femme : en effet, le rapport H/F était de 3,5, ce qui est bien supérieur aux données connues concernant la MH classique. Dans la MH - variant du syndrome de Richter, la prédominance de l'atteinte masculine est également rapportée par Brecher *et al.* qui constatent un sexe ratio de 7/8 (13), Momose *et al.* un sexe ratio de 69 % (76), Weisenberg *et al.* un sexe ratio de 83 % (116) et Fayad *et al.* un sexe ratio de 86 % (28). Cette prédominance masculine est à rapporter à celle de la LLC où les hommes sont 2 fois

plus fréquemment atteints que les femmes et à la MH qui touche également plus volontiers les hommes que les femmes.

Dans notre série, nous avons observé un délai d'apparition moyen entre le diagnostic de LLC et la découverte de la MH de 86 mois (27-92 mois). Brecher *et al.* (13) rapportent un délai plus court, de 57 mois (0-132 mois), ainsi que Fayad *et al.* (28) qui observent un délai de 45 mois (0-96 mois). Ces auteurs décrivent des séries concernant des patients recensés avant 1990 ou même 1980 ; en effet, la série de Brecher *et al.* intéresse des patients dont le diagnostic de LLC est posé à une date antérieure à 1990, au minimum de 0 à 11 ans, et Fayad *et al.* ont recueilli les patients de leur cohorte entre 1972 et 1992. Au contraire, dans notre étude, les diagnostics de LLC ont, pour la plupart été posés dans les années 1990, sauf pour 3 d'entre eux (patient n°5, LLC en 1985 et MH en 2000, patient n°7, LLC en 1986 et MH en 2001 et patient n°9, LLC en 1981 et MH en 1988). Il existe donc une différence d'une vingtaine d'années entre les deux séries de Brecher *et al.* et Fayad *et al.* et la nôtre. Une meilleure prise en charge, la réalisation d'hémogrammes systématiques et l'amélioration de la survie sont peut être à l'origine de la survenue plus tardive de la MH, en raison d'une progression plus lente de la LLC.

La maladie de Hodgkin est d'emblée disséminée lors du diagnostic puisque 78 % de nos patients présentaient un stade d'extension clinique selon Ann Arbor de III ou IV. Ceci différencie la MH survenant chez un patient porteur d'une LLC de celle survenant dans la population générale car les stades disséminés ne représentent qu'un quart des patients (39). Brecher *et al.* (13) et Fayad *et al.* (28) rapportent également une maladie diséminée lors du diagnostic de maladie de Hodgkin, avec respectivement 7 cas sur 8 et 6 cas sur 7 de patients à un stade avancé (stade III ou IV selon Ann Arbor).

Les 5 patients de notre série clinique qui sont décédés au moment de l'étude ont survécu 14 mois en moyenne, soit exactement la même durée que celle rapportée par Fayad *et al.* (28) à partir du registre du MD Anderson Cancer Center. Les patients en vie lors de son étude ont un recul de 38 mois (7-72 mois) et sont en rémission complète de la MH.

4.1.2 Le pléiomorphisme histologique

Sur le plan morphologique, dans tous les cas et conformément aux données de la littérature (13, 28, 54, 59, 76, 82, 83, 87, 110, 116, 119), la MH - variant du syndrome de Richter correspond à un lymphome composite. Dans notre série, la lésion associait, dans des proportions variables selon les cas, une composante de type LLC (de 10 % à 90 % de la surface du fragment examiné) à une composante hodgkinienne, conférant un polymorphisme parfois trompeur au néoplasme. La composante hodgkinienne était exclusivement constituée, dans 5 cas sur 9, de véritables granulomes de type à «cellularité mixte», associant une majorité de cellules inflammatoires à une minorité de cellules HRS néoplasiques. Cet aspect correspondait à une MH «classique», et prenait un aspect trompeur occultant presque complètement la composante de la LLC dans le cas n°5.

Dans un cas (cas n°1), il s'agissait de cellules HRS isolées et éparses au sein des plages de LLC, en l'absence de granulome, d'interprétation difficile : s'agissait-il d'une maladie de Hodgkin compliquant la LLC ou encore, à ce stade, d'une LLC simple? C'est dans cette situation que l'étude immunohistochimique prend toute son importance. Dans les cas de LLC non transformées, ces cellules correspondent habituellement à des cellules B CD20 +, parfois activées CD30 +/- et CD15 - (76, 110, 116).

Ce profil morphologique où les cellules HRS sont disposées, isolément, au sein de plages de lymphocytes B atypiques correspondant à la LLC, est fréquemment retrouvé dans la littérature, dans 4 cas sur 8 par Brecher *et al.* (13), 5 cas sur 7 par Weisenberg *et al.* (116) et dans tous les cas de la série de Momose *et al.* (76). En l'absence de granulome, le diagnostic différentiel entre MH survenant chez un patient atteint de LLC et LLC simple avec présence de cellules d'allure sternbergoïdes au sein de la LLC, se pose et l'étude immunohistochimique est indispensable.

Enfin, dans un tiers des cas, on notait un aspect «mixte», les deux aspects morphologiques coexistant sur une même biopsie.

4.1.3 Un immunophénotype caractéristique : co-expression des antigènes CD30 et CD15, et profil lymphoïde B tronqué ou absent

Pour différencier une authentique maladie de Hodgkin compliquant une LLC de la simple présence de cellules sternbergoïdes au sein de la population de lymphocytes tumoraux, l'étude immuno-histochimique est décisive : dans les cas de LLC «simple», ces cellules correspondent habituellement à des cellules B CD20 + , CD79a + et CD15 -. Il s'agit alors de cellules de type HRS correspondant à des immunoblastes activés, exprimant l'antigène CD30/BerH2 de façon hétérogène au sein d'une même lésion (76, 110, 116). Momose *et al.*, notamment, à partir de leur série de 13 patients (76), rapportent 3 groupes «immunophénotypiques» de cellules HRS : un groupe de patients où les cellules HRS expriment l'antigène CD20 mais pas l'antigène CD15 (5 cas sur 13), un groupe de patients où les cellules expriment l'antigène CD15 mais pas l'antigène CD20 (6 cas sur 13) et enfin, un groupe intermédiaire de patients où les cellules HRS expriment à la fois les antigènes CD15 et CD20, au moins dans une sous-population (2 cas sur 13). Les auteurs suggèrent l'existence d'une forme de passage entre les lymphocytes néoplasiques de la LLC et les cellules tumorales d'allure sternbergoïde et de phénotype CD20 + et CD15 -. Ces cellules transformées conservent parfois le phénotype B ou présentent un phénotype habituel et caractéristique des cellules HRS de la MH.

Cependant, il existe quelques observations de LLC qui contiennent des cellules HRS CD30 + CD15 + CD20 -/+ isolées, dès le diagnostic initial et qui se sont compliquées ultérieurement d'une MH «classique» comportant un granulome, avec un temps de latence d'environ 36 mois (76, 87, 119). Comme dans notre étude, de telles formes avec cellules de Reed-Sternberg CD30 +, CD15 + et CD20 -/+ doivent d'emblée être considérées comme des MH - variants du syndrome de Richter.

Dans notre série, les cellules HRS avaient un profil immunohistochimique caractéristique. En effet, dans tous les cas, les cellules HRS exprimaient l'antigène CD30 sous forme d'un marquage membranaire et/ou cytoplasmique. Ceci est conforme aux données rapportées dans les séries récentes. Ainsi Momose *et al.* retrouvent l'expression de l'antigène CD30 dans 10 cas sur 13 (76). Cha *et al.* (59) et O'Sullivan *et al.* (82) rapportent tous les deux un cas de MH - variant du syndrome de Richter pour lequel les cellules HRS expriment l'antigène CD30.

Ohno *et al.* (83) et Kanzler *et al.* (54) retrouvent également l'expression de l'antigène CD30 par les cellules HRS de leurs séries de 3 cas étudiés sur le plan moléculaire. Ceci est aussi comparable aux données concernant la MH classique de la population générale.

De la même manière, un marquage des cellules HRS par l'anticorps anti-CD15 a été obtenu dans 89 % des cas, comme dans la MH classique (47) et dans la MH - variant du syndrome de Richter (13, 28, 76, 116).

Enfin, comme dans la MH «classique», les cellules HRS de la plupart de nos patients présentaient un immunophénotype B absent (7/9) ou incomplet (2/9), et, dans tous les cas, on notait l'absence d'expression de l'antigène CD45 (leucocyte commun), profil caractéristique des cellules HRS. Ici, l'expression d'antigènes de la lignée lymphoïde B a été rarement observée alors que dans les séries publiées de la littérature, les cellules HRS expriment, de manière inconstante et variable au sein d'une même lésion, les antigènes de la lignée lymphoïde B dans 30 à 50 % des cas (20, 46).

La protéine Oct-2 est exprimée par les cellules HRS dans la MH classique (95) alors que le gène et les transcrits sont absents ou hyporégulés (40, 93, 101, 102, 104). Ici, par immunohistochimie, nous avons détecté l'expression du facteur de transcription Oct-2 par les cellules HRS dans la moitié des cas. En effet, si le gène Oct-2 et ses transcrits sont constamment absents ou hyporégulés dans la cellule HRS, la protéine Oct-2 est fréquemment détectée, probablement en raison d'une demi-vie et/ou de son abondance. Ainsi, Saéz *et al.* ont détecté, par immunohistochimie, la protéine Oct-2 dans 10 cas de MH «à cellularité mixte» sur 12, dans 4 cas de MH «scléronodulaire» sur 8, les 2 cas de MH «à déplétion lymphoïde» et un cas de MH «riche en lymphocytes», mais toujours de façon diminuée et inconstante selon les cellules au sein d'une même lésion (95). Dans notre étude, où la forme «à cellularité mixte» prédominait, l'expression du facteur Oct-2 était inconstante d'une cellule HRS à l'autre au sein d'un même échantillon et l'intensité du marquage était diminuée par rapport à celle observée dans la population cellulaire lymphoïde adjacente. Ces résultats sont superposables à ceux obtenus par Saéz.

Le gène Pax-5 code pour la protéine BSAP (B-cell specific activator protein), un facteur de transcription «clé», spécifique à la lignée lymphoïde B, impliqué dans la mise en place et dans le maintien de l'identité B. Son expression est détectée à tous les stades de développement de

la cellule B, excepté au stade plasmocytaire et elle régulerait positivement l'expression membranaire de certains antigènes B. En immunohistochimie, Pax-5 est retrouvé, de manière intense et constante, en position intra-nucléaire, dans la plupart des lymphomes malins non hodgkiniens B et, le plus souvent faiblement et de façon hétérogène au sein de la tumeur, dans 36% à 97% des MH «classiques» selon les séries (57, 107). Hertel *et al.* ont également noté la diminution ou l'absence d'expression, selon les cas, de la protéine Pax-5 dans 78 % des cas de maladie de Hodgkin «classique» (40). Dans notre série, l'expression de la protéine Pax-5 était non modifiée dans un cas sur 7, diminuée dans 4 cas et absente dans 2 cas, ce qui correspond effectivement à une hypoexpression du gène.

4.1.4 La présence constante de l'EBV

Le virus d'Epstein-Barr a été détecté dans tous les cas de notre série. Cette fréquence est nettement supérieure à celle observée dans la maladie de Hodgkin classique où, selon les types histopathologiques, le taux varie de 10 à 60 % des cas. Dans la littérature, une seule série conséquente rapporte la fréquence de l'infection par le virus d'Epstein-Barr dans les cellules HRS de la MH - variant du syndrome de Richter. Momose *et al.* retrouvent 12 cas d'infection des cellules HRS sur 13 patients (76). Le treizième cas comporte de rares lymphocytes «bystanders» EBV +, en l'absence de signal spécifique dans les cellules HRS et les cellules lymphocytaires de la composante LLC. Dans les autres études, Kanzler *et al.* détectent l'EBV dans les cellules HRS de deux patients sur 3 (53) tandis que ni Kuppers *et al.*, ni van den Berg *et al.* ne retrouvent la trace du virus dans les cellules HRS de leur observation isolée de MH – variant du syndrome de Richter rapporté (61, 111).

La fréquente infection par l'EBV des cellules HRS retrouvée dans notre série est comparable à celle observée dans la maladie de Hodgkin survenant chez l'immunodéprimé, où elle atteint 100 % des cas chez le patient atteint de SIDA. Les patients atteints de LLC présentent également une immunodépression liée, d'une part, à la diminution des fonctions de leurs lymphocytes T cytotoxiques (4) et de la réponse humorale et, d'autre part, à leur âge ; cette immunodépression serait responsable de la plupart des décès de ces patients.

Les travaux de Delsol *et al.* (20) ont mis en relief l'implication de l'EBV dans la maladie de Hodgkin. Ces résultats sont confirmés par l'étude immunohistochimique qui montre que la

protéine membranaire de latence LMP-1, d'origine virale, est électivement localisée aux cellules de Reed-Sternberg et de Hodgkin. Dans la maladie de Hodgkin, contrairement aux lymphoprolifératıons lymphoïdes atypiques liées à l'EBV, le profil de latence est intermédiaire, de type II : EBNA 1 +, EBNA 2 à 6 -, LMP1 +, EBER +.

Le rôle de l'EBV reste à démontrer dans la MH classique mais, dans la mesure où il est constamment retrouvé dans la MH – variant du syndrome de Richter, il pourrait jouer un rôle important compte tenu de l'immunodépression et à l'instar des lymphoprolifératıons des sujets immunodéprimés transplantés ou liées au VIH. Il pourrait s'agir de l'induction du facteur NF-κB secondaire à l'expression des protéines EBV LMP-1 et LMP-2a (50).

4.2 Optimisation de la technique de PCR sur cellules isolées par microdissection laser

4.2.1 La technique de microdissection

La technique de microdissection des cellules HRS a déjà été utilisée par de nombreux auteurs, tels Marafioti *et al.*, pour démontrer la présence de réarrangements fonctionnels non exprimés dans la MH classique survenant dans la population générale (71). Cependant, comme dans la plupart des séries rapportées à ce jour, la technique utilisée fait appel à la micromanipulation hydraulique et l'échantillon, recouvert de tampon, est découpé et recueilli à l'aide de micropipettes, ce qui implique un contact physique avec le support. Les problèmes de contaminations ont été fréquents. En effet, alors que la clonalité des cellules HRS est largement démontrée depuis, en 1995, Hummel *et al.* retrouvaient, par étude moléculaire sur des cellules HRS de 12 patients atteints de MH, 3 cas pour lesquels le profil clonal était identique, 3 cas où les cellules HRS présentaient les mêmes profils monoclonaux sur un fond polyclonal et 6 cas où les cellules HRS représentaient des clones différents (45). De même, Delabie *et al.*, en 1996, sur une étude moléculaire des cellules HRS, rapportaient 3 cas où des réarrangements polyclonaux de l'IgH étaient observés (19). En 1999, Hummel a repris les 12 cas étudiés en 1995 et a finalement trouvé un clone identique dans toutes les cellules HRS

testées (44), ce qui souligne l'importance des précautions à prendre lors de la récupération de l'échantillon cellulaire, afin d'éviter toute contamination.

Dans notre étude, la microdissection a été réalisée sur un appareil utilisant le laser pour la découpe et le recueil de l'échantillon. Toutes les étapes de la technique ont été pilotées par l'opérateur grâce à un ordinateur ; découpe et recueil de l'échantillon ont été réalisés sans contact direct avec les cellules de l'environnement. Ce protocole permettait de diminuer le risque de contaminations.

4.2.2 Calibrage et ajustement des conditions de PCR

L'amplification par PCR est une technique sensible. Elle permet une approche moléculaire à partir d'un matériel peu abondant. Les protocoles utilisés en routine dans le cadre du diagnostic utilisent des quantités d'ADN matriciel de l'ordre de 500 ng. Les études de dilution que nous avons réalisées ont montré que la matrice génomique peut être diminuée jusqu'à 10 pg. Cette quantité correspond à celle présente dans une seule cellule et confirme la faisabilité des études moléculaires sur cellules isolées.

La sensibilité rapportée dans la littérature est variable. Delabie *et al.*, en 1996, ont réalisé une PCR CDRIII sur cellules isolées, sans étape préalable de PEP ; ils ont obtenu une sensibilité de 12 % (19). La même année, Kanzler *et al.* ont utilisé une technique complexe associant les amorces FR1 et FR2, et ont obtenu un rendement de 39 % (53). En 1998, Ohno *et al.* ont obtenu un rendement global de 23 % avec une technique PCR CDRIII réalisée sur cellules isolées à partir de trois cas de MH - variant du syndrome de Richter de leur série (83). En 2000, Kanzler *et al.* ont également réalisé une étude sur trois cas de MH - variant du syndrome de Richter, pour lesquels ils ont préamplifié la matrice d'ADN par une technique de PEP avant de réaliser une PCR FR1 et ont observé une sensibilité de 22 % (54). Enfin, en 2001, Vergier a observé une sensibilité de 40 % de la technique de PEP-PCR FR3A, qu'elle a appliquée à un panel de cellules isolées à partir de lymphome bigénotypique (114). Le rendement global que nous avons obtenu à partir de cellules isolées par microdissection laser et amplification par PCR FR3A était de 60 % (de 70 % à 90 % pour les cas n°2, 4 et 9, 0 % pour le cas n°10). Il est plus faible que celui observé par Vergier ; ceci peut s'expliquer peut-être par une dégradation de l'ADN lors des longues étapes de transfert en train des

échantillons, inhérentes à l'éloignement du lieu de microdissection (Paris) et du lieu de notre étude (Nancy). En effet, Dietmaier *et al.* recommandent un travail de microdissection rapide, avec mise en œuvre sans délai des étapes de biologie moléculaire, pour éviter la dégradation de l'ADN matriciel par les nucléases présentes dans l'environnement du noyau de la cellule microdisséquée (21). Malgré une conservation à +4°C, le délai avant l'extraction, la PEP et la congélation des aliquotes n'a pas pu être inférieur à 48 heures.

La technique est sensible mais pose souvent des problèmes de reproductibilité et de spécificité. En effet, nous avons réalisé des amplifications sur un nombre décroissant de cellules microdisséquées et les résultats obtenus sur des aliquotes de 10 ou 20 cellules n'ont pas été meilleurs que sur cellule unique. Les nombreuses bandes aspécifiques observées pourraient être liées à la possibilité de contaminations croissantes proportionnelles au nombre de cellules recueillies. Ce manque de spécificité nous a imposé l'utilisation systématique de contrôles rigoureux. Ils ont consisté à l'amplification conjointe, à chaque manipulation, de l'ADN des témoins monoclonal et polyclonal, de l'ADN tissulaire extrait du tissu total et d'un témoin négatif représenté par de l'eau ultra-pure.

Enfin, l'utilisation d'une enzyme *Taq* polymérase «hot start», l'Ampli*Taq* Gold de Applied Biosystems, a permis une amplification plus spécifique car le système «hot start» réduit les mésappariements des amorces qui se produisent lors des étapes de montée en température du thermocycleur, qui seraient rapidement délétères sur les résultats d'amplification de petites quantités d'ADN.

4.2.3 La PCR directe

Ohno *et al.*, et van den Berg *et al.* réalisent l'étude moléculaire des contingents tumoraux de la MH - variant du syndrome de Richter à l'aide de technique de PCR directe, respectivement PCR IgH CDRIII et association complexe de PCR IgH CDRIII, FR2 et FR3, sans réalisation préalable d'une amplification totale du génome des cellules recueillies par microdissection (83, 111).

Dans notre série, seul un cas (cas n°2) a été correctement amplifié en PCR FR3A directe, avec un rendement de 60 % (100 % pour les cellules LLC et 57 % pour les cellules HRS). Dans les

3 autres cas, la PCR a généré des traînées d'ADN sans bande isolée visible. Les résultats pourraient être liés à nos conditions de microdissection laser et d'amplification, réalisées non pas d'un seul tenant, mais en 2 temps, parfois séparés par un intervalle de quelques jours, dans la mesure où la microdissection a été réalisée à l'hôpital Saint-Louis (Paris) et les techniques moléculaires au CHU de Brabois (Nancy). En effet, il apparaît souhaitable d'enchainer directement dissection, déprotéinisation et pré amplification (114). Ohno rapporte un rendement de 20 à 30 % pour les cellules LLC et de 40 à 45 % pour les cellules HRS (83). Nos meilleurs résultats, concernant un seul cas cependant, peuvent correspondre à l'utilisation de tissu congelé, plus facilement amplifiable que le tissu fixé dans le formol utilisé par Ohno.

La MH - variant du syndrome de Richter étant une lésion rare, dont le matériel est précieux, de nombreuses mises au point techniques ont été réalisées afin de confirmer les résultats (9 tentatives de PCR directe, dont une seule a fonctionné, cas n°2). Dans ces conditions, la réalisation préalable d'une amplification totale par PEP est donc indispensable.

4.2.4 La PEP-PCR

Initialement décrite par Zhang *et al.* (120), la technique d'amplification génomique totale par PEP permet d'augmenter la quantité d'ADN matriciel de façon à pouvoir réaliser, sur un même échantillon, plusieurs protocoles d'amplification par PCR, en théorie, jusqu'à 60 PCR par échantillon.

Selon Wells *et al.*, plusieurs types de PEP existent (118). Les deux principales utilisables pour étude sur cellule isolée sont la DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed PCR – PCR avec amorce oligonucléotidique dégénérée) et la PEP. Elles sont efficaces et couvrent respectivement 91 % et 89 % du génome (118). Pour certains, elle peut amplifier la totalité du génome (6, 9). Dans notre étude, nous avons, dans un premier temps, tenté d'amplifier l'ADN d'une cellule isolée par la technique de PEP, telle qu'elle est définie par Zhang *et al.* (120).

Elle permet d'obtenir environ 30 copies d'un ADN double brin, correspondant à 60 copies d'un allèle donné (120). La technique est sensible : elle amplifie 29 échantillons sur 30 pour les 12 loci étudiés par Zhang, avec une probabilité de 0,78. Dans notre étude, 50 % des échantillons soumis à la PEP ont été visualisés sur gel d'agarose, témoignant de la présence

d'une quantité détectable d'ADN. De plus, après PEP, la PCR GAPDH a généré un produit d'amplification spécifique à partir de 100 % des échantillons. La comparaison du rendement de la pré amplification de l'ADN des cellules isolées de notre étude avec celui rapporté dans la littérature, nous a conduit à conserver ce protocole pour l'analyse de notre série.

La technique pose cependant des problèmes de reproductibilité, lors de l'application sur de petites quantités d'ADN, en particulier au cours d'études de perte d'hétérozygotie ou d'instabilité des microsatellites (3). Cette difficulté est confirmée par Dietmaier *et al.*, qui détectent des amplifications monoalléliques artificielles dans 2 échantillons sur 4 contenant seulement 5 cellules (21). Zhang suggère l'utilisation d'une quantité aliquote assez abondante pour disposer d'assez de matériel matriciel. Il recommande d'utiliser des quantités aliquotes de 2,5 µl au minimum. Kanzler *et al.*, dans leur étude sur les cellules isolées à partir de trois cas de MH - variant du syndrome de Richter, utilisent des quantités aliquotes de 4 µl du produit de PEP, combinées au protocole d'amplification de Zhang (54). Dietmaier *et al.* recommandent l'utilisation d'une quantité aliquote mesurant $1/10^{ème}$ du volume du produit de PEP, ce qui correspond à un volume de 6 µl (33).

Dans notre étude, cependant, nous avons réalisé la PCR FR3A sur des aliquotes de 1 µl du produit de PEP. Les contrôles de qualités, réalisés grâce à l'amplification du gène GAPDH, et les essais d'amplification à partir de quantités aliquotes de PEP variables (1, 2 et 5 µL) ont montré que l'ADN amplifié était quantitativement suffisant et qualitativement satisfaisant.

Wells *et al.* mentionnent parfois la présence de fragments amplifiés tronqués (118). Des phénomènes de «dérapage» de l'enzyme lors de l'étape de polymérisation de la PEP peuvent survenir, générant des fragments plus courts ; ce phénomène est amplifié par la faible température d'hybridation de la PEP (+37°C). Avec l'amplification du gène IgH, il ne nous a pas été possible de vérifier cette hypothèse ; néanmoins, lors de la PEP-PCR GAPDH, les fragments obtenus avaient toujours la taille attendue.

Dietmaier *et al.* ont comparé différentes méthodes d'amplification génomique totale et ont proposé certaines modifications pour en améliorer le rendement : ils suggèrent l'utilisation d'un mélange d'enzymes dite «HiFi» (High Fidelity, mélange de *Taq polymérase* et *Pwo polymérase*) (77). Cette enzyme permet de synthétiser des fragments d'ADN de plus grande

taille ; elle n'a pas été testée dans notre travail, en raison de son coût élevé (1,20 €/U) et de résultats satisfaisants obtenus sur gel d'agarose avec la *Taq* polymérase.

Dans notre série, l'approche moléculaire utilisant le PEP-PCR a donné des résultats variables selon les échantillons, sur les plans du rendement et de la qualité des produits d'amplification obtenus, ce qui est différent de ce qu'a rapporté Vergier *et al.* (114) : en effet, dans son étude, le rendement de la PEP-PCR est identique à celui de la PCR directe. De plus, le signal observé sur le gel d'électrophorèse est plus net. Dans notre expérience, des bandes aspécifiques ont cependant été plus souvent observées avec la PEP-PCR qu'avec la PCR directe, en raison probablement de l'amplification aléatoire réalisée pendant le protocole de PEP. Ce phénomène a été partiellement compensé par une dilution intermédiaire plus importante avant le second cycle d'amplification de la PCR (second cycle réalisé sur un volume de 1 µl d'une dilution au 1/1000ème du produit de la première amplification, au lieu de 10 µl).

4.3 Profil moléculaire des réarrangements du gène IgH FR3A dans notre série

La maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter représente une lésion hétérogène dont la pathogénie demeure inconnue. Existe-t-il une filiation entre les cellules de la LLC et les cellules HRS ou s'agit-il de deux néoplasmes différents ? Dans la mesure où les cellules correspondant au clone hodgkinien sont largement minoritaires et indissociables par des techniques habituelles des cellules de la LLC, aucune étude classique ne pouvait répondre à la question. Les difficultés techniques inhérentes à l'étude des lymphomes composites ont été contournées, dans notre travail, grâce à l'utilisation de méthodes moléculaires associées à la microdissection. En effet, l'étude de cellules isolées par microdissection permet d'extraire, dans un lymphome hétérogène, une cellule de son environnement et de l'analyser sur le plan moléculaire, spécifiquement et avec une sensibilité élevée. Cette technique a déjà été largement utilisée pour déterminer l'origine clonale B de lymphomes hétérogènes tels que le lymphome de Poppema (12, 70), la maladie de Hodgkin (60, 71), le lymphome B riche en cellules T (11) ; la technique a également été utilisée pour étudier des lymphomes composites, tels qu'un lymphome associant lymphome T périphérique et MH (90), un lymphome B

composite (29), et enfin pour des lymphomes survenant de manière séquentielle, chez un même patient, lymphome de type MALT amygdalien puis MH et enfin lymphome B diffus anaplasique à grandes cellules CD30 + (86).

En ce qui concerne la MH – variant du syndrome de Richter, les données de la littérature sont peu nombreuses et discordantes. Les deux séries les plus importantes sont celles de Ohno *et al.* en 1998 (83) d'une part, et Kanzler *et al.* en 2000 (54) d'autre part, qui ont réalisé, chacun sur 3 cas, une étude moléculaire à partir de cellules microdisséquées. Dans le travail de Ohno, la clonalité des sous-populations tumorales est démontrée dans deux cas sur trois par PCR CDRIII directe à partir de l'ADN de cellules fixées par le formol et isolées par microdissection hydraulique, suivie du séquençage des produits d'amplification ; dans le troisième cas, aucune amplification n'a pu être obtenue et l'auteur n'a pas pu conclure sur ce cas. Kanzler utilise une PEP-PCR complexe recouvrant les séquences FR1 et FR2 à partir de tissu congelé et microdisséqué à l'aide d'un système hydraulique ; il retrouve un clone identique entre les deux sous-populations dans le premier cas étudié, et une clonalité différente dans les deux autres cas. Kuppers *et al.* rapportent deux cas de lymphomes composites associant un lymphome folliculaire ou une LLC à une MH (61). En ce qui concerne les sous-populations «LLC» et «MH», l'étude porte sur du matériel congelé ; la microdissection hydraulique est suivie d'une PEP-PCR FR1 et d'un séquençage. Les auteurs concluent à la clonalité des échantillons testés. Enfin, van den Berg *et al.* rapportent une observation intéressante de lymphome composite associant une LLC, un lymphome anaplasique à grandes cellules et une MH (111), sur tissus congelés ou fixés. Des amplifications PEP-PCR CDRIII, FR2 et FR3A ont été réalisées et montrent, après séquençage, un même clone B dans les 3 populations tumorales. Au total, la clonalité des deux contingents tumoraux de la MH - variant du syndrome de Richter est retrouvée dans 5 cas (54, 61, 83, 118) alors que les clones sont différents dans 2 autres cas (54).

Dietmaier *et al.*, dans leur travail sur les méthodes d'amplification totale du génome, affirment obtenir de meilleurs résultats sur cellules microdisséquées à partir de tissu congelé, où ils observent un rendement cinquante fois plus élevé que sur cellules microdisséquées à partir de tissu fixé dans le formol. Ceci n'a pu être vérifié dans notre étude où nous avons réalisé l'étude moléculaire exclusivement sur les 4 cas pour lesquels nous disposions de matériel congelé en quantité suffisante, mais se conçoit aisément, car il est habituel, en routine diagnostique, de parvenir à amplifier facilement l'ADN extrait à partir de tissu congelé alors

que l'ADN extrait à partir de tissu fixé dans le formol s'amplifie d'autant plus difficilement que les produits attendus sont de grande taille.

Dans notre série de 4 échantillons congelés, des produits d'amplification obtenus à partir de cellules isolées ont été observés sur le gel d'électrophorèse, ce qui est conforme avec l'origine B des cellules HRS, en particulier dans les cas de MH - variant du syndrome de Richter, rapportée dans la littérature et par Ohno *et al.* (83) et Kanzler *et al.* (83).

Par ailleurs, l'amplification de la chaîne lourde des immunoglobulines, par notre protocole de PCR FR3A, a montré des produits de même longueur à partir des cellules de la LLC, des cellules HRS et de l'ADN total extrait des coupes tissulaires dans les cas n°2, 4 et 9. Dans le cas n°10, l'amplification a généré une trainée pour tous les échantillons testés et lors de toutes les tentatives de (PEP-)PCR ; il n'a donc pas été possible de déterminer leur clonalité. L'étude du cas n°10 pourra être renouvelée avec l'apport d'autres modifications et tentée à partir de matériel fixé en formol.

Sur gel d'électrophorèse, après coloration par le bromure d'éthidium, il semble que la hauteur des bandes observées à partir des cellules de la LLC et des cellules HRS montrent des résultats clonaux et concordants avec ceux des 4 travaux existants. Nos résultats supportent donc l'hypothèse, déjà émise par Kanzler *et al.* (54), de l'existence d'un précurseur commun pour les cellules de la LLC et les cellules HRS de la MH survenue ensuite. Comme dans la littérature, il faudra confirmer la clonalité par séquençage.

Dans la littérature, il semble que les profils clonaux identiques entre les 2 composantes néoplasiques soient restreints aux cas où l'EBV est absent, et inversement que la présence de l'EBV dans les cellules HRS soit correlée à des réarrangements clonaux différents dans les 2 populations LLC et MH. Dans ces cas, la MH correspond à un deuxième cancer, conséquence de l'immunodépression constatée chez les patients atteints de LLC. En effet, Kanzler, Kuppers et van den Berg ont détecté une infection par l'EBV dans les cellules HRS (54, 61, 111) et retrouvent un profil différent selon que les cellules HRS ont un profil clonal identique à celles de la LLC ou que les deux sous-populations renferment des réarrangements différents. Kanzler retrouve l'EBV dans les cellules HRS chez les deux patients pour lesquels les clones LLC et MH sont différents alors que, chez le patient pour lequel les clones sont identiques, il n'est pas retrouvé d'EBV (54). De même, chez les patients étudiés par van den Berg et

Kuppers, l'EBV n'est pas retrouvé et les profils des deux sous-populations tumorales sont identiques (61, 111).

Dans notre étude, cependant, l'EBV a été détecté dans toutes les cellules HRS des 4 échantillons qui ont fait l'objet de l'étude moléculaire alors que les profils des réarrangements sont superposables du point de vue de la taille des fragments d'ADN amplifié. Ceci est *a priori* différent des résultats de la littérature, et impose le séquençage de nos produits amplifiés.

Conclusion

Conclusion

La maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter est une lésion rare, dont l'étude a été rendue possible dans ce travail par la collaboration de plusieurs centres, dans le cadre du groupe GOELAMS.

Elle présente les mêmes caractéristiques morphologiques que la MH classique survenant dans la population générale, notamment un immunophénotype B tronqué ou absent et une expression diminuée, et parfois même absente, de certains facteurs de transcription (Oct-2, PAX-5). Cependant, elle en diffère par sa présentation clinique agressive et disséminée d'emblée, la fréquence des signes généraux et biologiques péjoratifs et la présence constante d'une infection à virus d'Epstein-Barr, ce qui la rapproche de la MH survenant chez le sujet immunodéprimé, en particulier le patient infecté par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH).

Comme dans la MH classique, les cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg (HRS) de la MH - variant du syndrome de Richter présentent le réarrangement du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH CDRIII et FR3A), détecté sur cellule isolée par microdissection laser à partir de tissu congelé, dans 3 des 4 cas de notre série. Le réarrangement monoclonal B des cellules HRS était identique à celui retrouvé dans la composante de type lymphocytique ou de la LLC, après électrophorèse sur gel d'acrylamide et coloration par le bromure d'éthidium.

A ce stade, il apparaît nécessaire, d'une part, de confirmer ces données par le séquençage des produits d'amplification provenant des 2 composantes néoplasiques de chaque lésion, d'autre part, de poursuivre notre étude moléculaire sur les autres cas de la série fixés par le formol. Enfin, nous envisageons de rechercher, sur préparation cytologique, des anomalies cytologiques et moléculaires classiquement rattachées à la LLC dans les cellules HRS par la technique de FISH afin de compléter l'analyse de la filiation entre ces deux composantes néoplasiques.

Références bibliographiques

1- BARGOU RC, EMMERICH F, KRAPPMANN D, BOMMERT K, MAPARA MY, ARNOLD W, ROYER HD, GRINSTEIN E, GREINER A, SCHEIDEREIT C, DORKEN B

Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells

J Clin Invest, 1997; 100: 2961-2969

2- BARGOU RC, LENG C, KRAPPMANN D, EMMERICH F, MAPARA MY, BOMMERT K, ROYER HD, SCHEIDEREIT C, DORKEN B

High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells

Blood, 1996 ; 87 : 4340-4347

3- BARRET MT, REID BJ, GEOFFREY J

Genotypic analysis of multiple loci in somatic cells by whole genome amplification

Nucleic Acids Res, 1995; 23:3488-3492

4- BARTIK MM, WELKER D, KAY NE

Impairments in immune cell function in B cell chronic lymphocytic leukemia

Sem Oncol, 1998; 25: 27-33

5- BASH J, ZONG WX, BANGA S

Rel/NF-κB can trigger the Notch signaling pathway by inducing the expression of Jagged1, a ligand for Notch receptors

EMBO J, 1999; 18: 2803-2811

6- BECK JC, KIM CH, HOOVER ML, MULIVOR RA

Whole genome amplification of genomic DNA: implications for multiple analysis of tumor samples

Proc Am Asso Cancer Res, 1996; 37-570

7- BELLEVIA D, CAMPESE AF, ALESSE E
Constitutive activation of NF-κB and T-cell leukemia/lymphoma in Notch 3 transgenic mice
EMBO J, 2000; 19: 3337-3348

8- BEN EZRA J, BURKE JS, SWARTZ WG, BROWNELL MD, BRYNES RK, HILL LR, NATHWANI BN, OKEN MM, WOLF BC, WOODRUFF R
Small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic analysis of 268 cases
Blood, 1989, 73:579-587

9- BENDER P, HOOVER M, BYAR J, LEONHARD J, BECK JC
Representative whole genome amplification
Am J Hum Genet, 1997; 60 (suppl): A231

10- BINET JL, AUQUIER A, DIGHIERO G, CHASTANG C, PIGUET H, GOASGUEN J, VAUGIER G, COLONA P, OBERLING F, THOMAS M, TCHERNIA G, JACQUILLAT C, BOIVIN P, LESTY C, DUAULT MC, MONCONDUIT M, BELABBES S, GREMY F
A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia derived from a multivariate survival analysis
Cancer, 1981, 48:198-206

11- BRAUNINGER A, KUPPERS R, SPIEKER T, SIEBERT R, STRICKLER J, SCHLEGELBERGER B, RAJEWSKY K, HANSMANN ML
Molecular analysis of single B cells from T-cell-rich B-cell lymphoma shows the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells
Blood, 1999; 93: 2679-2687

12- BRAUNINGER A, KUPPERS R, STRICKLER J, WACKER HH, RAJEWSKY K, HANSMANN ML
Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease - represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells
Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 9337-9342

13- BRECHER M, BANKS PM
Hodgkin's disease variant Richter's syndrome. Report of eight cases
Am J Clin Pathol, 1990; 93:333-339

14- BROUSSET P, SCHLAIFER D, MEGGETTO F, BACHMANN E, ROTHENBERGER S, PRIS J, DELSOL G, KNECHT H
Persistence of the same viral strain in early and late relapses of Epstein-Barr virus-associate Hodgkin's disease
Blood, 1994; 84: 2447-2451

15- CAPELLO D, VITOLO U, PASQUALUCCI L, QUTTRONE S, MIGLIARETTI G, FASSONE L, ARIATTI C,VIVENZA D, GLOGHINI A, PASTORE C, LANZA C, NOMDEDEU J, BOTTO B, FREILONE R, BUONAIUTO D, ZAGONEL V, GALLO E, PALESTRO G SAGLIO G, DALLA-FAVERA R, CARBONE A GAIDANO G
Distribution and pattern of Bcl-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia
Blood, 2000; 95: 651-659

16- COLEMAN MP, ESTEVE J, DAMIECKI P, ARSLAN A, RENARD H
Trends in cancer incidence and mortality, World Health Organization, IARC Scientifif Publications n°121
Lyon: International agency for research on cancer, 1993:673-704

17- CORDONE I, MASI S, MAURO FR, SODDU S, MORSILI O, VALENTINI T, VEGNA ML, GUGLIEMI C, MANCINI F, GIULACCI S, SACCHI A, MANDELLI F, FOA R
P53 expression in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a marker of disease progression and poor prognosis
Blood, 1998, 91:4342-4349

18- DAMLE RN, WASIL T, FAIS F, GHIOTTO F, VALETTO A, ALLEN SL, BUCHBINDER A, BUDMAN D, DITTMAR K, KOLITZ J, LICHTMAN SM, SCHULMAN P, VINCIGUERRA VP, RAI KR, FERRARINI M, CHIORAZZI N
Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukaemia
Blood, 1999, 94:1840-1847

19- DELABIE J, TIERENS A, GAVRIIL T, WU G, WEISENBURGER D,CHAN W
Phenotype, genotype and clonality of Reed-Sternberg cells in nodular sclerosis Hodgkin's disease: results of a single-cell study
Br J Haematol, 1996;94:198

20- DELSOL G, AL SAATI T, LAMANT L, BROUSSET P
Biologie de la cellule de Reed-Sternberg.
In : SOLAL-CELIGNY P, BROUSSE N, FERME , GISSELBRETCH C, REYES F, COIFFIER B.
Lymphomes non-hodgkiniens – Maladie de Hodgkin
Paris : Editions Frison-Roche, 1997, 442-449

21- DIETMAIER W, HARTMANN A, WALLINGER S, HEINMOLLER E, KERNER T, ENDL E, JAUCH KW, HOFSTADTER F, RUSCHOFF J
Multiple mutation analyses in single tumor cells with improved whole genome amplification
Am J Pathol, 1999; 154: 83-95

22- DOHNER H, FISCHER K, BENTZ M, HANSEN K, BENNER A, CABOT G, DIEHL D, SCHLENK R, COY J, STILGENBAUER S
P53 gene deletion predicts for poor survival and non response to therapy with purine analogs in B-cell leukaemias
Blood, 1995, 85:1580-1589

23- DOHNER H, STILGENBAUER S, DOHNER K, BENTZ M, LICHTER P
Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: reassessement based on molecular cytogenetic analysis
J. Mol. Med., 1999, 77:266-281

24- DOHNER H, STILGENBAUER S, FISCHER K, BENTZ M, LICHTER P
Cytogenetics and molecular cytogenetic analysis of B cell chronic lympholytic leukaemia: specific chromosome aberrations identify prognostic subgroups of patients and point to loci of candidate genes
Leukemia, 1997, 11, Suppl 2:S19-S24

25- DOHNER H, STILGENBAUER S, JAMES MR, BENNER A, WEILGUNI T, BENTZ M, FISCHER K, HUNSTEIN W, LICHTER P
11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukaemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis
Blood, 1997,89:2516-2522

26- DUBUS P, LABOUYRIE E, BILHOU-NABERA C, BELLEANNEE G, VERGIER B, BERNARD P, DE MASCAREL A, MERLIO JP
Study of B lymphocyte clonality using in vitro gene amplification (PCR) in paraffin embedded sample
Ann Pathol, 1994 ; 14: 227-233

27- EMMERICH F, MEISER M, HUMMEL M, DEMEL G, FOSS HD, JUNDT F, MATHAS S, KRAPPMANN D, SCHEIDEREIT C, STEIN H, DORKEN B
Over expression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells
Blood, 1999; 94: 3129-3134

28- FAYAD L, ROBERTSON LE, O'BRIEN S, MANNING JT, WRIGHT S, HAGEMEISTER F, CABANILLAS F, KEATING MJ
Hodgkin's disease variant of Richter's syndrome: experience at a single institution
Leuk Lymphoma, 1996; 23:333-337

29- FEND F, QUINTILLA-MARTINEZ L, KUMAR S, BEATY M, BLUM L, SORBARA L, JAFFE ES, RAFFELD M
Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclonal lymphomas
Am J Pathol, 1999; 154: 1857-1866

30- GALLAGHER A, PERRY J, FREELAND J, ALEXANDER F, CARMAN W, SHIELD L, CARTWRIGHT R, JARRET R
Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus (EBV): no evidence to support hit-and-run mechanism in cases classified as non-EBV-associated
Int J Cancer, 2003; 104:624-630

31- GARCIA J, CAMACHO F, MORENTE M, FRAGA M, MONTALBAN C, ALVARO T, BELLAS C, CASTANO A, DIEZ A, FLORES T, MARTIN C, MARTINEZ M, MAZORRA F, MENARGUEZ J, MESTRE M, MOLLEJO M, SAEZ A, SANCHEZ L, PIRIS M
Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays
Blood, 2003; 101: 681-689

32- GATTER K, DELSOL G
Atlas : The diagnosis of lymphoproliferative diseases
New York, Oxford University Press, 2002, 262p

33- GHIA P, GUIDA G, STELLA S, GOTTARDI D, GEUNA M, STROLA G, SCIELZO C, CALIGARIS-CAPPIO F
The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukaemia (CLL) patients risk of disease progression
Blood, 2003; 101: 1262-1269

34- GUAN E, WANG J, LABORDA J, NORCROSS M, BEAUERLE PA, HOFFMAN T
T cell leukemia-associated human Notch/translocation-associated Notch homologue has IκB-like activity and physically interacts with nuclear factor-κB proteins in T cells
J Exp Med, 1996; 183: 2025-2032

35- HAMBLIN TJ, DAVIS Z, GARDINER A, OSCIER DG, STEVENSON FK
Unmutated Ig (VH) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia
Blood, 1999, 94:1848-1854

35bis- HASENCLEVER D, DIELH V
A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. In ternational prognostic project on advanced Hodgkin's disease
N Engl J Med, 1998; 339: 1506-1514

36- HELL K, LORENZEN J, FISHER R, HANSMANN ML
Hodgkin cells accumulate mRNA for Bcl-2
Lab Invest, 1995; 73: 492-496

37- HELL K, PRINGLE JH, HANSMANN ML, LORENZEN J, COLLOBY P, LAUDER I, FISCHER R
Demonstration of light chain mRNA in Hodgkin's disease
J Pathol, 1993; 171: 137-143

38- HENDERSON S, ROWE M, GREGORY C, CROOM-CARTER D, WANG F, LONGNECKER R, KIEFF E, RICKINSON A
Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death
Cell, 1991; 65: 1107-1115

39- HENRY-AMAR M, AEPPLI DM, ANDERSON J, ASHLEY S, BONICHON F, COX RS
Workshop statistical report
In: SOMERS R, HENRY-AYMAR M, MEERWALDT JK, CARDE P
Treatment strategy in Hodgkin's disease. Proceeding of the Paris international workshop and symposium held on June 28-30, 1989.
Colloque INSERM nj186.
London, Paris: INSERM/John Libbey Eurotext, 1989: 169-422

40- HERTEL C, ZHOU X, HAMILTON-DUTOIT S, JUNKER S
Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma
Oncogene, 2002; 21:4908-4920

41- HINZ M, LOSER P, MATHAS S
Constitutive NF-κB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells
Blood, 2001; 97: 2798-2807

42- HSU SM, JAFFE ES
Phenotypic expression of T lymphocytes in thymus and peripheral lymphoid tissues
Am J Pathol, 1985 ; 121: 69-78

43- HSU SM, JAFFE ES
Leu-M1 and peanut agglutinin stain the neoplastic cells of Hodgkin's disease
Am J Clin Pathol, 1984; 82: 29-32

44- HUMMEL M, MARAFIOTI T, STEIN H
Clonality of Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease
N Engl J Med, 1999; 340: 394-395

45- HUMMEL M, ZIEMANN K, LAMMERT H, PILERI S, SABATTINI E, STEIN H
Hodgkin's disease with monoclonal and polyclonal populations of Reed-Sternberg cells
N Engl J Med, 1995;333:901

46- ISAACSON PG, ASHTON-KEY M
Phenotype of Hodgkin and Reed-Sterngerg cells
Lancet, 1996 ; 347(8999) : 481

47- JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H, VARDIMAN JW
Tumours of Haemopoietic and Lymphoid Tissues
WHO Classification of Tumours, edition 2001: 237

48- JOSTING A, WOLF J, DIELH V
Hodgkin disease: prognostic factors and treatment strategies
Curr Opin Oncol, 2000;12:403-411

49- JOX A, ZANDER T, KUPPERS R, IRSCH J, KANZLER H, KORNACKER M, BOHLEN H, DIELH V, WOLF J
Somatics mutations within the untranslated regions of rearranged Ig genes in a case of classical Hodgkin's disease as a potential cause for the absence of immunoglobulin in th lymphoma cells
Blood, 1999; 93: 3964-3972

50- JUNDT F, ANASGNOSTOPOULOS I, FORSTER R, MATHAS S, STEIN H, DORKEN B
Activated Notch 1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma
Blood, 2002; 99:3398-3403

51- JUNDT F, KLEY K, ANAGNOSTOPOULOS I, SCHULZE PROBSTING K, GREINER A, MATHAS S, SCHEIDEREIT C, WIRTH T,STEIN H, DORKEN B
Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease
Blood, 2002; 99:3060-3062

52- KADIN ME, STITES DP, LEVY R, WARNKE R
Exogenous immunoglobulin and the mcrophage origin of Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease
N Engl J Med, 1978 ; 299 : 1208-1214

53- KANZLER H, KUPPERS R, HANSMANN ML,RAJEWSKY K
Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells
J Exp Med, 1996 ;184 :1495-1505

54- KANZLER H, KUPPERS R, HELMES S, WACKER HH, CHOTT A, HANSMANN ML, REJEWSKY K
Hodgkin and Reed-Sternberg-like cellsin B-cell chronic lymphocytic leukemia represent the outgrowth of single germinal-center B-cell-derived clones: potential precursors of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease
Blood, 2000; 95: 1023-1031

55- KAPLAN HS
From experimental animal models to human lymphoid tisssue neoplasia: search for a viral etiology
Recent Results Cancer Res, 1978 ; 64: 325-336

56- KRAPPMANN D, EMMERICH F, KORDES U, SCHARSCHMIDT E, DORKEN, B SCHEIDEREIT C
Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells
Oncogene, 1999;18:943-953

57- KRENACS L, HIMMELMANN A, QUINTANILLA-MARTINE L, FEST T, RIVA A, WELLMANN A, BAGDI E, KEHRL J, JAFFE E, RAFFELD M
Transcription factor B-cell-specific activator protein (BSAP) is differentially expressed in B cells and in subsets of B-cell lymphomas
Blood, 1998; 92: 1308-1316

58- KUPPERS R, KLEIN U, HANSMANN ML, RAJEWSKY K
Cellular origin of human B-cell lymphhomas
N Engl J Med, 1999; 341: 1520-1529

59- KUPPERS R, KLEIN U, SCHWERING I, DISTLER V, BRAUNINGER A, CATTORETTI G, TU y, STOLOVITZKY G, CALIFANO A, HANSMANN ML, DALLA-FAVERA R
Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling
J Clin Invest, 2003: 111: 529-537

60- KUPPERS R, RAJEWSKY K
The origin of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease
Annu Rev Immunol, 1998;16 :924-928

61- KUPPERS R, SOUSA A, BAUR A, STRICKLER J, RAJEWSKY K, HANSMANN ML
Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL
Mol Med, 2001; 7: 285-292

62- LAM KP, KUHN R, RAJEWSKY K
In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death
Cell, 1997 ; 90 : 1073-1083

63- LANDMAN-PARKER J, AUBIN J, DELABESSE E, TABONE MD, ADAM M, MILLIEN C, LEBOEUF D, BUZYN-VEIL A, DOLLFUS C, LEVERGER G, MACINTYRE EA
Simplified strategies for minimal residual disease detection in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia
Br J Haematol, 1996 ; 95: 281-290

64- LAUMEN H, NIELSEN PJ, WIRTH T
The BOB.1/OBF.1 co-activator is essential for octamer-dependent transcription in B cells.
Eur J Immunol, 2000 ; 30:458-469

65- LAURITZEN AF, HORDING U, NIELSEN HW
Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: a comparative immunological, in situ hybridization, and polymérase chain reaction
APMIS, 1994; 102 : 495-500

66- LENNERT K, FELLER AC
Histopathology of non-Hodgkin's lymphoma. 2nd edition
Berlin, Springer Verlag: 1992

67- LISTER TA, CROWTHER D, SUTCLIFFE SB, GLATSTEIN E, CANELLOS GP, YOUNG RC *et al.*
Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswold meeting
J Clin Oncol, 1989;7:1630-1636

68- LUO Y, FUJII H, GESTER T, ROEDER RG
A novel B-cell-derived coactivator potentiates the activation of immunoglobulin promoters by octamer-binding transcription factors
Cell, 1992;71:231-241

69- MAC CARTNEY JS, Jr
Malignant lymphoblastome: A report of two cases
J Cancer Res, 1928; 12:195-207

70- MARAFIOTI T, HUMMEL M, ANAGNOTOPOULOS I, FOSS HD, FALINI B, DELSOL G, ISAACSON P, PILERI S, STEIN H
Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells
N Engl J Med, 1997; 337: 453-458

71- MARAFIOTI T, HUMMEL M, FOSS HD, LAUMEN H, KORBJUHN P, ANAGNOSTOPOULOS I, LAMMERT H, DEMEL G, THEIL J, WIRTH T, STEIN H
Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functionnal immunoglobuline gene rearrangements but defective immunoglobulin trancription
Blood, 2000; 95:1443-1450

72- MATUTES E, OSCIER D, GARCIA-MARCO J, ELLIS J, COPPLESTONE A, GILLINGHAM R, HAMBLIN T, LENS D, SWANSBURY GJ, CATOWSKY D
Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetics, clinical and laboratory features in 544 patients
Br. J. Haematol., 1996, 92:382-388

73- MELO JV, CATOVSKY D, GREGORY WM, GALTON DA
The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. IV. Analysis of survival and prognostic features
Br J Haematol, 1987; 65:23-29

74- MIR S, RICHTER B, DUCKETT C
Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells
Blood, 2000; 96: 4307-4312

75- MOLICA S, LEVATO D, DATTILO A
Natural history of early chronic lymphocytic leukaemia. A single institution study with emphasis on the impact of disease-progression on overall survival
Haematologica 1999 ;84 : 1094-1099

76- MOMOSE H, JAFFE ES, SHIN SS, CHEN YY, WEISS LM
Chronic lymphocytic lymphoma with Reed-Sternberg-like cells and possible transformation to Hodgkin's disease. Mediation by Epstein-Barr virus
Am J Surg Pathol, 1992; 16(9):859-867

77- MONIMURA T, GOITSUKA R, ZHANG Y
Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch 1 in B cells
J Biol Chem, 2000; 275: 36523-36531

78- MONTSERRAT E, VINOLAS N, REVERTER JC, ROZMAN C
Natural history of chronic lymphocytic leukemia: on the progression and progression and prognosis of early clinical stages
Nouv Rev Fr Hématol, 1988; 30: 359-361

79- MORISSON A, NUTT S, THEVENIN C, ROLINK A, BUSSLINGER M
Loos- and gain-of-function mutations reveal an important role of BSAP (Pax-5) at the start and end of B cell differentiation
Sem Immunol, 1998; 10: 133-142

80- MUSCHEN M, RAJEWSKY K, BRAUNINGER A, BAUR AS, OUDEJANS JJ, ROERS A, HANSMANN ML, KUPPERS R
Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T-cell lymphoma
J Exp Med, 2000; 191: 387-394

81- NUTT SL, THEVENIN C, BUSSINGLER M
Essential functions of Pax.5 (BSAP) in pro-B cell development
Immunobiology, 1997; 198:227-235

82- O'SULLIVAN MJ, KALEEM Z, BOLGER MJ, SWANSON PE, ZUTTER MM
Composite prolymphocytoïd and Hodgkin transformation of chronic lymphocytic leukemia
Arch Pathol Lab Med, 2000; 124:907-909

83- ONHO T, SMIR B, WEISENBURGER D, GASCOYNE R, HINRICHS S, CHAN W
Origin of the Hodgkin/Reed-Sternberg cells in chronic lymphocytic leukemia with "Hodgkin's transformation"
Blood, 1998; 91: 1757-1761

84- OSCIER DG, THOMPSETT A, ZHU D, STEVENSON FK
Differential rates of somatic hypermutation of V(H) genes among subsets of chronic lymphocytic leukaemia defined by chromosomal abnormalities
Blood, 1997, 89:4153-4160

85- OUDEJANS J
Granzyme B expression in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease
Am J Pathol, 1996; 148: 233-240

86- PARRENS M, VERGIER B, FITOUSSI O, LAHET C, BELLEANNEE G, MARIT G, DUBUS P, DE MASCAREL A, DELFAU-LARUE MH, MERLIO JP
Sequential development of Hodgkin's disease and CD30+ diffuse large B-cell lymphoma in a patient with MALT-type lymphoma : evidence of different clonal origin of single microdissected Ree-Sternberg cells
Am J Surg Pathol, 2002, 26: 1634-1642

87- PETRELLA T, YAZIJI N, COLLIN F, RIFLE G, MORVELAT F, ARNOULD L, FARGEOT P, DEPRET O
Implication of the Epstein-Barr virus in the progression of chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma to Hodgkin-like lymphomas
Anticancer Res, 1997; 17(5B):3907-3913

88- PINKUS GS
Fascin, a sensitive new marker for Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation?
Am J Pathol, 1997; 150: 543-562

89- POWELL J
Enhanced concatemer cloning – a modification to the SAGE (serial analysis of gene expression) technique
Nucleic Acids Res, 1998; 26: 3445-3446

90- QUINTILLA-MARTINEZ L, FEND F, RODRIGEZ-MOGUEL L, SPILOVE L, BEATY M, KINGMA D, RAFFELD M, JAFFE ES
Peripheral T-cell lymphoma with Reed-Sternberg-like cells of B-cell phenotype and genotype associated with Epstein-Barr virus infection
Am J Surg Pathol, 1999; 23: 1233-1240

91- RAI KR, SAWITSKY A, CRONKITE EP, CHANANA AD, LEVY RN, PASTERNACK BS
Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.
Blood. 1975; 46: 219-234.

92- RAPHAEL M, CHASTANG C, BINET JL
Is bone marrow biopsy a prognostic parameter in B-CLL ?
Nouv Rev Fr Hématol, 1998 ; 30: 377-378

93- RE D, MUSCHEN M, AHMADI T, WICKENHAUSER C, STARATSCHEK-JOX A, HOLTICK U, DIELH V,WOLF J
Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed-Sternberg cells
Cancer Res, 2001;61:2080-2084

94- RICHTER M
Generalized reticular cell sarcoma of lymph nodes associated with lymphocytic leukaemia
Am. J. Pathol., 1928, 4: 285-292

95- SAEZ AI, ARTIGA MJ, SANCHEZ-BEATO M, SANCHEZ-VERDE L, GARCIA JF, CAMACHO FI, FRANCO R, PIRIS M
Analysis of Octamer-binding transcription factors Oct2 and Oct1 and their coactivator BOB.1/OBF.1 in lymphomas
Mod Pathol, 2002; 15(3): 211-220

96- SARRIS A, JHANWAR S, CABANILLAS F
Cytogenetic of Hodgkin's disease
In: MAUCH P, ARMITAGE JO, DIELH V
Hodgkin's Disease
Edition Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia: 1995

97- SCHWERING I, BRAUNINGER A, KLEIN U, JUNGNICKEL B,TINGUELY M, DIELH V, HANSMANN ML, DALLA-FAVERA R, RAJEWSKY K, KUPPERS R
Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma
Blood, 2003; 101:1505-1512

98- SEITZ V, HUMMEL M,MARAFIOTI T, ANAGNOSTOPOULOS I,ASSAF C, STEIN H
Detection of clonal T-cell receptor γ-chain rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease
Blood, 2000; 95: 3020-3024

99- SIGAUX F
Physiologie et pathologie de la recombinaison V(D)J
Paris : Médecine Sciences, 1994 ; 10: 995-1005

100- SRANIVASAN R
Ablation of polymers and biological tissue by ultraviolet lasers
Science, 1986; 234: 559-565

101- STEIN H, UCHANSKA-ZIEGLER B, GERDES J, ZIEGLER A, WERNET P
Hodgkin and Reed-Sternberg cells contain antigens specific to late cells of granulopoiesis
Int J Cancer, 1982 ; 29 :283

102- STEIN H,MARAFIOTI T, FOSS HD, LAUMEN H,HUMMEL M, ANAGNOSTOPOULOS I, WIRTH T,DEMEL G, FALINI B
Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription
Blood, 2001;97:496-501

103- THE NON-HODGKIN'S LYMPHOMA CLASSIFICATION PROJECT
A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma
Blood, 1997, 89:3909-3918

104- THEIL J, LAUMEN H, MARAFIOTI T, HUMMEL M, LENZ G, WIRTH T,STEIN H
Defective octamer-dependant transcription is responsible for silenced immunoglobulin transcription in Reed-Sternberg cells
Blood, 2001; 97:3191-3196

105- THOMAS R, KALLENBORN A, WICKENHAUSER C, SCHULTZE J, DRAUBE A, VOCKERODT M, RE D, DIELH V, WOLF J
Constitutive expression of c-FLIP in Hodgkin and Reed-Sternberg cells
Am J Pathol, 2002; 160: 1521-1528

106- TORLAKOVIC E, TIERENS A, DANG H, DELABIE J
The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin' disease
AJP, 2001;159:1807-1814

107- TORLAKOVIC E, TORLAKOVIK G, NGUYEN P, BRUNNING R, DELABIE J
The value of anti-Pax.5 immunostaining in routinely fixed and paraffin-embedded sections
Am J Surg Pathol, 2002; 26:1343-1350

108- TRAVADE P, TOURNILHAC O, DIGHIERO G
Leucémie lymphoïde chronique.
Encycl Med Chir (Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS, Paris), Hématologie, 13-013-B-20, 2000, 12p

109- TRAVIS LB, CURTIS RE, HANKEY BF, FRAUMENI JF
Second cancer in patients with CLL
J Natl Can Inst 1992; 84: 1422-1427

110- TSANG WYW, CHAN JKC, SING C
The nature of Reed-Sternberg-like cells in chronic lymphocytic leukaemia
Am J Surg Pathol, 1993; 99(3):317-323

111- VAN DEN BERG A, MAGGIO E, RUST R, KOOISTRA K, DIEPSTRA A, POPPEMA S
Clonal relation in a case of CLL, ALCL, and Hodgkin composite lymphoma
Blood, 2002; 100: 1425-1429

112- VAN DEN BERG A, VISSER L, POPPEMA S
High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltration Hodgkin's lymphoma
Am J Pathol, 1999; 154: 1685-1691

113- VELCULESCU VE, ZHANG L, VOGELSTEIN B, KINZLER KW
Serial analysis of gene expression
Science, 1995; 270: 484-487

114- VERGIER B
Intérêt de la microdissection unicellulaire dans l'étude des lymphomas – 130 pages
Th : Sciences Biologiques et Médicales. Option Biologie Santé : Bordeaux : Année 2001 ; n° 871

115- WATSON CJ
The reticulo-endothelial system (including Hodgkin's disease, lymphosarcoma and alaukemias). Review of the American literature for 1926
Folia Haematol, 1928; 35-369 (Abstract)

116- WEISENBERG E, ANSTASI J, ADEYANJU M, VARIAKOJIS D, VARDIMAN JW
Hodgkin's disease associated with chronic lymphocytic leukaemia. Eight additional cases, including two of the nodular lymphocytic predominant type
Am J Clin Pathol, 1995; 103(4):479-484

117- WEISS LM, MOVAHED LA, WARNKE RA, SKLAR J
Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed/Sternberg cells of Hodgkin's disease
N Engl J Med, 1989;320:502-506

118- WELLS D, SHERLOCK J, HANDYSIDE A, DELHANTY J
Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridisation
Nucleic Acids Res, 1999; 27: 1214-1218

119- WILLIAMS J, SCHNED A, COTELINGAM JD, JAFFE ES
Chronic lymphocytic leukaemia with coexistent Hodgkin's disease. Implications for the origin of the Reed-Sternberg cell
Am J Surg Pathol, 1991; 15(1):33-42

120- ZHANG L, CUI X, SCHMITT K, HUBERT R, NAVIDI W, ARNHEIM N
Whole genome amplification from a single cell : implications for genetic analysis
Proc Natl Acad Sci USA, 1992; 89: 5847-5851

Annexes

◻ Hématoxyline-Eosine-Safran

▪ Protocole

Hématoxyline	6 minutes
Eau distillée	
Alcool chlorhydrique	3 secondes
Eau distillée	2 fois 3 minutes
Eosine	5 minutes
Eau distillée	3 minutes
Alcool 95°	3 minutes
Alcool absolu	3 minutes
Safran	5 minutes
Alcool absolu	5 minutes
Toluène	passage
Monter à l'Eukitt	

▪ Solutions

Alcool chlorhydrique :

- Ethanol 100° : 2000 ml
- Eau distillée : 2000 mL
- Acide chlorhydrique : 10 mL

Eosine :

- Solution aqueuse d'érythrosine à 1 %
- Acidifier par quelques gouttes d'acide acétique avant utilisation

Solution alcoolique de safran :

- Faire sécher 10g de safran à 56°C pendant 24 heures
- Réduire le safran en poudre et ajouter 1000 mL d'éthanol absolu
- Laisser infuser à l'étuve plusieurs jours

- Réactifs

Erythrosine B :	réf 1.15936 - MERCK
Safran :	réf 11507736 – LABONORD
Hématoxyline stabilisée :	réf 00911 – SPECI

◻ Coloration de Giemsa différenciée

▪ Protocole

Solution de Giemsa diluée au 1/50ème dans l'Hépès 0,03M pH6	4 heures
Eau distillée	3 secondes
Acide paratoluène sulfonique à 0,1 %	10 à 30 secondes
Eau distillée	3 secondes
Hydrogénocarbonate de sodium à 0,1 %	3 secondes
Isopropanol	3 fois 30 secondes
Toluène	passage
Monter à l'Eukitt	

▪ Solutions

Solution d'Hépes 0,03M :

- Hépes (Sigma) : 7,14 g
- Eau distillée : 1000 mL
- Ajuster à pH 6,0

▪ Réactifs

Giemsa :	ref 1.09204.0500 - MERCK Diagnostica
Hépès :	réf H 3375 – SIGMA
Acide paratoluène sulfonique à 0,1 % :	réf 9613 – MERCK
Hydrogénocarbonate de sodium à 0,1 % :	réf 27 778 29 – MERCK
Isopropanol :	réf propanol 2 MC310656.5000

◻ Imprégnation argentique selon la méthode de Gordon-Sweet

▪ Protocole

Permanganate sulfurique	10 minutes
Eau distillée	
Acide oxalique 5 %	blanchir
Eau distillée	
Alun de fer à 2,5 %	15 minutes
Eau distillée	
Nitrate d'argent ammoniacal	2 minutes
Eau distillée	
Formol	2 minutes
Eau distillée	2 passages
Chlorure d'or à 0,5 %	3 minutes
Eau distillée	
Hyposulfite de sodium (thiosulfate de sodium à 5 %)	3 minutes
Eau distillée	
Kernechtrot	4 minutes
Eau distillée	
Alcool 70°	5 minutes
Alcool 95°	5 minutes
Alcool absolu	5 minutes
Toluène	passage
Monter à l'Eukitt	

▪ Solutions

Permenganate sulfurique

- Permenganate de potassium à 0,5 % : 50 mL
- Acide sulfurique à 3 % 3 mL

Nitrate d'argent ammoniacal

- Nitrate d'argent à 10 % : 10 mL
- Ajouter de l'ammoniaque goutte à goutte jusqu'à dissolution du précipité
- Soude à 3 % : 20 mL
- Ajouter de nouveau de l'ammoniaque goutte à goutte jusqu'à dissolution du précipité
- Eau distillée qsp 200 mL

Formol

- Formaldéhyde : 240 mL
- Eau distillée : 800 mL
- Carbonate de calcium : en excès

- Réactifs

Acide oxalique	réf 20 562.291 – PROLABO
Alun de fer	réf 116 2946 – MERCK
Chlorure d'or	réf 29 069.081 – PROLABO
Hyposulfite de sodium	réf 27 910.291 – PROLABO
Permenganate de potassium	réf 26 910.294 – PROLABO
Carbonate de calcium	réf 22 300.290 – PROLABO

- Tampon PBS-Tween pH 7,6 (+/- 0,2) :

  - Tampon phosphate pH 7,4 — 100 mM
  - NaCl — 150 mM
  - Tween 20 — 0,1 % (v/v)

- Solution diluante pour les anticorps primaires :

  - Azide de sodium — 0,3 g
  - N-éthyl-maléimide — 0,18 g
  - BSA à 30 % — 9,9 mL
  - Glycérol — 60 mL
  - Tampon PBS sans Tween — qsp 300 mL

- Tampon diluant pour les anticorps secondaires :

  - Tampon PBS pH 7,4 pour les techniques en peroxydase (le phosphate inhibe la phosphatase alcaline alors que le tampon Tris favorise l'hydrolyse du substrat)
  - Tween 20, agent surfactant qui facilite la formation des immuns-complexes en augmentant la mouillabilité des coupes

UHP - NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE
MÉDECINE

- Kit de coloration *NovaRED* (Vector, Burlingame, CA, USA):

  - La solution est préparée extemporanément et comprend :
  - 15 mL d'eau distillée
  - 3 gouttes du réactif 1 ; bien mélanger
  - 2 gouttes du réactif 2 ; bien mélanger
  - 2 gouttes du réactif 3 ; bien mélanger
  - 2 gouttes de la solution de peroxyde d'hydrogène
  - La solution est déposée sur la lame. Attendre 5 à 15 minutes puis rincer à l'eau courante

- Solution urée/SDS :

▪ Urée	9,6 g
▪ NaCl 3M	2 mL
▪ Tris 1M pH8	200 µL
▪ EDTA 0,4M	500 µL
▪ SDS 10 % (sodium dodecyl sulfate)	4 mL
▪ Eau distillée	QSP 20 mL

- Tampon à protéinase K :

▪ KCl	50 mM
▪ Tris pH 8,3	10 mM
▪ $MgCl_2$	2,5 mM
▪ Gélatine	0,1 mg/mL
▪ Nodinet P40	0,45 %
▪ Tween 20	0,45 %

- Tampon Tris-EDTA :

▪ Tampon Tris 2 mM	0,5 mL
▪ EDTA 0,5 M	0,2 mL
▪ Eau DEPC	QSP 100 mL

- Solution de bromure d'éthidium (BET) :

▪ Solution de conservation de bromure d'éthidium (10 mg/mL)	5 µL
▪ Tampon TBE 1 X	200 µL

- Gel de polyacrylamide à 12 % (v/v) :

  - Acrylamide à 40 % (Appligène) 15 mL
  - Tampon TBE 10x 5 mL
  - Eau ultra-pure QSP 50 mL
  - Agents de polymérisation :
    - Ammonium persulfate à 10 % 0,35 mL
    - TEMED 30 µL

- Gel de polyacrylamide à 8 % : idem avec 10 mL d'acrylamide

- Tampon TBST pH 7,6 :

  - Tris-HCl 1 M pH 7,6 50 mL
  - NaCl 5 M 30 mL
  - Eau ultra-pure 930 mL
  - Ajuster le pH à 7,6

- Gel d'agarose :

  - Agarose 0,5 g
  - Tampon TAE 1X 50 mL
  - Chauffer au four micro-ondes pendant 1 minute 30
  - Solution de conservation du bromure d'éthidium (10 mg/mL) 2 µL

- Tampon TAE 1X :

  - Tris acétate 40 mM
  - EDTA pH 8 1 mM

VU

NANCY, le **15 février 2003**
Le Président de Thèse

Professeur **F. PLENAT**

NANCY, le **11 mars 2003**
Le Doyen de la Faculté de Médecine
Par délégation

Professeur **M. BRAUN**

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, le **14 mars 2003**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1

Professeur **C. BURLET**

RÉSUMÉ DE LA THÈSE :

La maladie de Hodgkin - variant du syndrome de Richter (MHSR) correspond à la survenue d'une maladie de Hodgkin (MH) sur leucémie lymphoïde chronique (LLC). Il s'agit d'un lymphome rare seuls 44 cas ayant été rapportés dans la littérature et les données moléculaires concernant la clonalité des 2 sous-populations respectives sont discordantes. A partir de 9 observations de MHSR issues de la cohorte multicentrique française du groupe GOELAMS, nous avons effectué une étude anatomoclinique, recherché par hybridation *in situ* le virus d'Epstein-Barr, et, dans 4 cas sur tissu congelé, réalisé l'analyse du réarrangement du gène IgH CDRIII et FR3 par PEP-PCR, sur cellules isolées par microdissection laser.

Les caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques de la MHSR étaient identiques à celles du type «à cellularité mixte» de la MH, dans la population générale, associant un immunophénotype CD30 +, CD15 +, CD45 -, l'absence habituelle d'antigènes B (CD20, CD79a) et l'hypoexpression de certains facteurs de transcription (Oct-2, Pax-5). Elle en diffère cependant par sa présentation clinique agressive et disséminée d'emblée, la fréquence des signes généraux et biologiques péjoratifs et l'association constante au virus d'Epstein-Barr. Il s'agit donc d'une entité proche des MH du sujet immunodéprimé, en particulier du patient infecté par le VIH. Sur le plan moléculaire, sur la même lésion, les cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg présentaient le même réarrangement du gène IgH CDRIII et FR3 que la composante LLC, dans 3 cas, après visualisation sur gel de polyacrylamide coloré par le bromure d'éthidium. A l'issue de cette étude, les données moléculaires seront validées par le séquençage des produits d'amplification et l'inclusion, dans l'étude, des cas fixés par le formol.

TITRE EN ANGLAIS :

HODGKIN DISEASE – RICHTER VARIANT.

Pathological and clinical multicentric study from the GOELAMS centers and molecular settings of the IgH gene rearrangements from laser microdissected single cell

THÈSE :

MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2003

MOTS CLEFS :

MALADIE DE HODGKIN, LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE, IMMUNO-HISTOCHIMIE, MICRODISSECTION LASER, PEP-PCR, PCR, RICHTER

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'U.F.R. :

Faculté de Médecine de Nancy

9, avenue de la Forêt de Haye

54505 – VANDOEUVRE LES NANCY Cedex