



HAL
open science

L'expression du nerve growth factor (NGF) et de ses récepteurs dans le lymphome folliculaire: étude anatomo-clinique de 25 observations

Maud Piet Ounnoughene

► **To cite this version:**

Maud Piet Ounnoughene. L'expression du nerve growth factor (NGF) et de ses récepteurs dans le lymphome folliculaire: étude anatomo-clinique de 25 observations. Sciences du Vivant [q-bio]. 2000. hal-01734310

HAL Id: hal-01734310

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734310>

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.



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>

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur en Médecine



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

par

Maud PIET épouse OUNNOUGHENE

le 25 octobre 2000

**L'EXPRESSION DU NERVE GROWTH FACTOR (NGF) ET DE SES
RECEPTEURS DANS LE LYMPHOME FOLLICULAIRE**

Etude anatomo-clinique de 25 observations.

BIBLIOTHEQUE MEDECINE NANCY 1



D 007 184139 8

Examineurs de la thèse :

| | | | |
|------------------------|------------|---|------------------|
| M. A. DUPREZ | Professeur |) | <i>Président</i> |
| M. P. LEDERLIN | Professeur |) | |
| M. F. PLENAT | Professeur |) | <i>Juges</i> |
| M. E. LABOUYRIE | Professeur |) | |

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur en Médecine

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

par

Maud PIET épouse OUNNOUGHENE

le 25 octobre 2000

L'EXPRESSION DU NERVE GROWTH FACTOR (NGF) ET DE SES RECEPTEURS DANS LE LYMPHOME FOLLICULAIRE

Etude anatomo-clinique de 25 observations.

Examineurs de la thèse :

| | | | |
|------------------------|------------|---|------------------|
| M. A. DUPREZ | Professeur |) | <i>Président</i> |
| M. P. LEDERLIN | Professeur |) | |
| M. F. PLENAT | Professeur |) | <i>Juges</i> |
| M. E. LABOUYRIE | Professeur |) | |



UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1

FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY

Président de l'Université : Professeur Claude BURLET

Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Jacques ROLAND

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

Assesseurs

du 1er Cycle :
du 2ème Cycle :
du 3ème Cycle :
de la Vie Facultaire :

Mme le Docteur Chantal KOHLER
Mme le Professeur Michèle KESSLER
Mr le Professeur Jacques POUREL
Mr le Professeur Philippe HARTEMANN

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Jean-Bernard DUREUX
Professeur Georges GRIGNON - Professeur François STREIFF

PROFESSEURS HONORAIRES

Monsieur PIERQUIN - Etienne LEGAIT - Jean LOCHARD - René HERBEUVAL - Gabriel FAIVRE - Jean-Marie FOLIGUET
Guy RAUBER - Paul SADOUL - Raoul SENAULT - Pierre ARNOULD - 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 - François STREIFF - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone GILGENKRANTZ
Pierre ALEXANDRE - Robert FRISCH - Jean GROSDIDIER - 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 - Max WEBER

=====
**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS -
PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42ème Section : SCIENCES MORPHOLOGIQUES

1ère sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Michel RENARD - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCORBES - Professeur Marc BRAUN

2ème sous-section : (*Histologie, Embryologie, Cytogénétique*)

Professeur Hubert GERARD - Professeur Bernard FOLIGUET - Professeur Bruno LEHEUP

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

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur François PLENAT

Professeur Jean-Michel VIGNAUD - Professeur Eric LABOUYRIE

43ème Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1ère sous-section : (*Biophysique et traitement de l'image*)

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

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

Professeur Jean-Claude HOFFFEL - Professeur Luc PICARD - Professeur Denis REGENT

Professeur Michel CLAUDON - Professeur Serge BRACARD - Professeur Alain BLUM

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

1ère sous-section : (*Biochimie et Biologie Moléculaire*)

Professeur Pierre NABET - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Francine NABET

Professeur Jean-Louis GUEANT

2ème sous-section : (*Physiologie*)

Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean-Pierre MALLIE

Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur François MARCHAL - Professeur Philippe HAOUZI

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

Professeur Claude BURLET

4ème sous-section : (*Nutrition*)

Professeur Olivier ZIEGLER

45ème Section : MICROBIOLOGIE ET MALADIES TRANSMISSIBLES

1ère sous-section : (*Bactériologie, Virologie-Hygiène*)

Professeur Alain LE FAOU

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

Professeur Bernard FORTIER

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

Professeur Philippe CANTON - Professeur Alain GERARD - Professeur Thierry MAY

46ème Section : SANTÉ PUBLIQUE

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

Professeur Jean-Pierre DESCHAMPS - Professeur Philippe HARTEMANN

Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

2ème sous-section : (*Médecine du travail et des risques professionnels*)

Professeur Guy PETIET

3ème sous-section : (*Médecine légale*)

Professeur Henry COUDANE

4ème sous-section (*Biostatistiques et informatique médicale*)

Professeur Bernard LEGRAS - Professeur François KOHLER

47ème Section : HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE, TRANSFUSION, CANCÉROLOGIE ET GÉNÉTIQUE

1ère sous-section : (*Hématologie*)

Professeur Christian JANOT - Professeur Thomas LECOMPTE - Professeur Pierre BORDIGONI -

Professeur Pierre LEDERLIN

(*Génie biologique et médical*)

Professeur J.François STOLTZ

2ème sous-section : (*Cancérologie*)

Professeur François GUILLEMIN - Professeur Thierry CONROY

(*Radiothérapie*)

Professeur Pierre BEY

3ème sous-section : (*Immunologie*)

Professeur Gilbert FAURE - Professeur Marie-Christine BENE

4ème sous-section : (*génétiq*ue)

Professeur Philippe JONVEAUX

48ème Section : ANESTHÉSIOLOGIE, PHARMACOLOGIE, RÉANIMATION ET THÉRAPEUTIQUE

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

Professeur Marie-Claire LAXENAIRE - Professeur Claude MEISTELMAN - Professeur Dan LONGROIS

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

Professeur Alain LARCAN - Professeur Henri LAMBERT - Professeur Nicolas DELORME

Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT

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

Professeur René-Jean ROYER - Professeur Patrick NETTER - Professeur Pierre GILLET

4ème sous-section : (*Thérapeutique*)

Professeur François PAILLE - Professeur Gérard GAY - Professeur Faiez ZANNAD

49ème Section : PATHOLOGIE NERVEUSE, PATHOLOGIE MENTALE et RÉÉDUCATION

1ère sous-section : (*Neurologie*)

Professeur Michel WEBER - Professeur Gérard BARROCHE - Professeur Hervé VESPIGNANI

2ème sous-section : (*Neurochirurgie*)

Professeur Henri HEPNER - Professeur Jean-Claude MARCHAL - Professeur Jean AUQUE

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-vénérologie*)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ

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

Professeur Michel MERLE - Professeur François DAP

51ème Section : PATHOLOGIE CARDIO-PULMONAIRE et VASCULAIRE

1ère sous-section : (*Pneumologie*)

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Jean-Marie POLU - Professeur Yves MARTINET

Professeur Jean-François CHABOT

2ème sous-section : (*Cardiologie et maladies vasculaires*)

Professeur Etienne ALIOT - Professeur Nicolas DANCHIN - Professeur Yves JUILLIERE - Professeur Nicolas SADOUL

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

Professeur Pierre MATHIEU - Professeur Jacques BORRELLY - Professeur Jean-Pierre VILLEMOT

Professeur Jean-Pierre CARTEAUX

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

Professeur Gérard FIEVE

52ème Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE

1ère sous-section : (*Hépatologie, gastro-entérologie*)

Professeur Pierre GAUCHER - 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 et CHIRURGIE GÉNÉRALE
MÉDECINE ET CHIRURGIE EXPÉRIMENTALE**

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

Professeur Gilbert THIBAUT - Professeur Francis PENIN

Professeur Denise MONERET-VAUTRIN

Professeur Jean DE KORWIN KROKOWSKI - Professeur Pierre KAMINSKY

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

Professeur Patrick BOISSEL - Professeur Laurent BRESLER

**54ème Section : PATHOLOGIE DE L'ENFANT, OBSTÉTRIQUE, SYSTÈME ENDOCRINIEN
REPRODUCTION ET DÉVELOPPEMENT**

1ère sous-section : (*Pédiatrie*)

Professeur Paul VERT - 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 et obstétrique*)

Professeur Michel SCHWEITZER - Professeur Jean-Louis BOUTROY

Professeur Philippe JUDLIN - Professeur Patricia BARBARINO

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

Professeur Jacques LECLERE - Professeur Pierre DROUIN - Professeur Georges WERYHA

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

55ème Section : SPÉCIALITÉS MÉDICO-CHIRURGICALES

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

Professeur Claude SIMON - Professeur Roger JANKOWSKI

2ème sous-section : (*Ophthalmologie*)

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

3ème sous-section : (*Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale*)

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

Hygiène et santé publique

Professeur Roland SCHULZE-ROBBECKE

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42ème Section : SCIENCES MORPHOLOGIQUES

1ère sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON

2ème sous-section : (*Histologie, Embryologie, cytogénétique*)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER - 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

43ème Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE

1ère sous-section : (*Biophysique et traitement de l'image*)

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 Marie-André GELOT - 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 ET MALADIES TRANSMISSIBLES

1ère sous-section : (*Bactériologie, Virologie-Hygiène*)

Docteur Francine MORY - Docteur Michèle WEBER - Docteur Christine LION

Docteur Michèle DAILLOUX

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

Docteur Marie-France BIAVA - Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU

46ème Section : SANTÉ PUBLIQUE

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

47ème Section : HÉMATOLOGIE, CANCÉROLOGIE, IMMUNOLOGIE ET GÉNÉTIQUE

1ère sous-section : (*Hématologie*)

Docteur Jean-Claude HUMBERT - Docteur François SCHOONEMAN

3ème sous-section : (*Immunologie*)

Docteur Marie-Nathalie SARDA

4ème sous-section : (*Génétique*)

48ème Section : ANESTHÉSIOLOGIE, PHARMACOLOGIE, RÉANIMATION 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

=====

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 Gilbert ALIN
Docteur Louis FRANCO

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Georges GRIGNON - Professeur Claude PERRIN
Professeur Jean PREVOT - Professeur Michel MANCIAUX - Professeur Jean-Pierre GRILLIAT
Professeur Michel PIERSON – Professeur Alain GAUCHER – Professeur Michel BOULANGE
Professeur Alain LARCAN - Professeur Michel DUC – Professeur Michel WAYOFF

=====

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)
Université de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
University, Providence (U.S.A)
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)
Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)
Ryland University, Nashville (U.S.A)
Professeur Harry J. BUNCKE (1989)
Université de Californie, San Francisco (U.S.A)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Université d'Anatomie de Würzburg (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 A. DUPREZ

Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques

Doyen honoraire de la Faculté A de Médecine

Chevalier dans l'Ordre National du Mérite

Officier dans l'Ordre des Palmes Académiques

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

A travers vos enseignements, vous avez su nous communiquer votre enthousiasme scientifique et vos précieux conseils.

Veillez trouver dans ce travail le témoignage de notre reconnaissance et de notre respectueuse admiration.

A notre Maître et Juge,

Monsieur le Professeur P. LEDERLIN

Professeur de Médecine Interne

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse.

L'intérêt que vous portez à l'Anatomie Pathologique contribue largement au plaisir de collaborer avec votre discipline.

Veillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre gratitude.

A notre Maître et juge,

Monsieur le Professeur F. PLENAT

**Professeur d'Anatomie et de Cytologie pathologiques (Option
biologique)**

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse.

*Nous vous remercions de l'expérience et de l'enseignement
apportés durant notre internat.*

*Veillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance
et de notre profond 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.

Nous nous souviendrons de ce fameux TrkA.

Veillez trouver ici le témoignage de notre respect.

A nos Maîtres successifs d'Internat,

Monsieur le Professeur A. DUPREZ

Monsieur le Professeur J.-M. VIGNAUD

Monsieur le Professeur J. FLOQUET

Monsieur le Professeur F. PLENAT

Monsieur le Professeur E. LABOUYRIE

Monsieur le Docteur R.M. PARACHE

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

✓ **Madame Nathalie MONHOVEN**

pour ses compétences, sa disponibilité et ses précieux conseils.

✓ **Monsieur le Docteur Jacques CHEMARDIN**

pour son aide concernant l'étude statistique de la série.

✓ **Mesdames Sylviane PIZZAGALLI et Corinne BONNET**

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

✓ **Madame Catherine PERROT**

pour sa bonne humeur, ses conseils avisés et la réalisation dactylographique de ce travail.

✓ **Madame le Docteur Virginie HENNEQUIN et Monsieur le Docteur Laurent ANTUNES**

pour leur aide et leur disponibilité.

✓ **A tous les membres des laboratoires d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques de Messieurs les Professeurs F. PLENAT et J.-M. VIGNAUD et de monsieur le Docteur R.M. PARACHE.**

✓ **A Mes Collègues et Amis.**

A Marc,

Qui partage ma vie. Avec tout mon Amour.

A Clotilde,

Notre fille.

A mes parents,

Qui m'ont aidée et soutenue pendant ces études de médecine.

Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon amour et de ma reconnaissance.

A Alice,

Qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde affection.

A mes grands-parents,

A Marion et Stéphane,

A Valérie, Margot et Arnaud,

A Madame Frédérique GALTEAU

A toute ma famille,

A mes amis,

Je dédie cette thèse.

*Je dédie cette thèse tout particulièrement
à mes Parents.*

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.

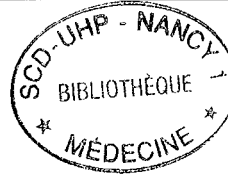
Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne 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 MATIERES



Pages :

| | |
|---|-----------|
| REMERCIEMENTS | 08 |
| SERMENT | 17 |
| TABLE DES MATIERES | 19 |
| ABREVIATIONS | 26 |
| TABLEAUX | 27 |
| FIGURES | 28 |
| GRAPHIQUES | 29 |
| PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES | 30 |
| INTRODUCTION | 31 |
| PREMIERE PARTIE : RAPPELS | 34 |
| | |
| 1.1. <u>CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES</u> <u>LYMPHOMES FOLLICULAIRES</u> | 35 |
| 1.1.1. L'EPIDEMIOLOGIE | 35 |
| 1.1.2. LES ASPECTS CLINIQUES | 35 |
| 1.1.3. LES FACTEURS PRONOSTIQUES | 38 |
| 1.1.3.1. Les facteurs cliniques et biologiques | 38 |
| 1.1.3.2. Les facteurs histo-pronostiques | 39 |
| 1.1.4. LES ASPECTS THERAPEUTIQUES | 40 |
| 1.1.4.1. Les formes localisées (stades I et II avec « faible » masse tumorale) | 41 |
| 1.1.4.2. Les formes disséminées (stades III et IV) | 41 |
| 1.1.4.2.1. La « faible » masse tumorale | |

| | | |
|------------|---|----|
| 1.1.4.2.2. | Les LF à « forte » masse tumorale et les formes asymptomatiques | |
| 1.1.4.3. | La prise en charge des rechutes | 43 |
| 1.1.4.4. | L'immunothérapie par les anticorps monoclonaux anti-CD20 | 43 |
| | ✓ La production de l'anticorps monoclonal | |
| | ✓ L'antigène CD20 cible de l'anticorps monoclonal | |
| | ✓ Le mécanisme d'action de l'antigène CD20 | |
| | ✓ Les indications thérapeutiques actuelles | |
| 1.1.5. | LES ASPECTS MORPHOLOGIQUES | 50 |
| 1.1.5.1. | L'architecture | 50 |
| 1.1.5.2. | La cytologie | 51 |
| 1.1.5.3. | L'immunohistochimie | 53 |
| 1.1.5.4. | Le diagnostic différentiel | 56 |
| | 1.1.5.4.1. L'hyperplasie lymphoïde folliculaire | |
| | 1.1.5.4.2. Le lymphome à cellules du manteau | |
| 1.1.5.5. | La transformation histologique | 60 |
| 1.1.6. | LES ASPECTS CYTOGENETIQUES | 60 |
| 1.1.6.1. | La translocation 14 ; 18 | 60 |
| 1.1.6.2. | Les autres anomalies chromosomiques | 61 |
| 1.1.6.3. | Le gène <i>bcl2</i> | 61 |
| 1.1.7. | LES CLASSIFICATIONS HISTOLOGIQUES | 62 |
| 1.1.7.1. | Les anciennes classifications | 62 |
| 1.1.7.2. | La classification des syndromes lymphoprolifératifs reconnue par le Groupe International d'Etude des Lymphomes (REAL) | 66 |

| | | |
|--|---|----|
| 1.1.7.3. | La classification des lymphomes malins et des leucémies lymphoïdes proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1999 | 68 |
| 1.2. | <u>QUELQUES CARACTERISTIQUES DU NERVE GROWTH FACTOR (NGF) ET DE SES RECEPTEURS</u> | 70 |
| 1.2.1. | INTRODUCTION | 70 |
| 1.2.2. | LE NGF | 71 |
| 1.2.2.1. | Sa structure | 71 |
| 1.2.2.2. | Sa fonction et sa distribution | 72 |
| 1.2.3. | LES RECEPTEURS DU NGF | 74 |
| 1.2.3.1. | Le récepteur p75 ^{NTR} | 74 |
| 1.2.3.1.1. | Sa structure | 75 |
| 1.2.3.1.2. | Sa fonction et sa distribution | 77 |
| 1.2.3.1.3. | Les interactions entre p75 ^{NTR} et TrkA | 79 |
| 1.2.3.2. | Les récepteurs Tyrosine Kinase de la famille Trk | 80 |
| 1.2.3.3. | Le récepteur TrkA | 81 |
| 1.2.3.3.1. | Sa structure | 81 |
| 1.2.3.3.2. | Sa fonction et sa distribution | 84 |
| DEUXIEME PARTIE : L'ETUDE ANATOMO-CLINIQUE DE NOTRE SERIE | | 88 |
| 2.1. | <u>MATERIEL ET METHODES</u> | 89 |
| 2.1.1. | MATERIEL - LE GROUPE ETUDIE | 89 |
| 2.1.2. | METHODE | 90 |
| 2.1.2.1. | Le recueil des données cliniques | 90 |
| 2.1.2.2. | L'étude macroscopique | 90 |

| | | |
|------------|--|-----|
| 2.1.2.3. | L'étude histologique | 91 |
| 2.1.2.4. | L'étude immunohistochimique | 91 |
| 2.1.2.4.1. | La technique immunohistochimique en trois couches faisant appel au couple streptavidine-biotine | 92 |
| | <input type="checkbox"/> Modification de l'inversion de la fixation formolée par la trypsine <input type="checkbox"/> Modification du procédé de fixation <input type="checkbox"/> Modification de la méthode de détection de l'anticorps primaire | |
| 2.1.2.4.2. | La technique immunohistochimique en trois couches faisant appel au couple streptavidine-biotine avec amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique de dérivés de tyramine aux sites de réaction | 97 |
| | <input type="checkbox"/> Le principe et l'intérêt <input type="checkbox"/> La méthode | |
| 2.1.2.4.3. | L'expression des résultats | 100 |
| 2.1.2.5. | L'étude moléculaire par RT - PCR | 100 |
| 2.1.2.5.1. | L'extraction des ARN | 100 |
| 2.1.2.5.2. | La transcription inverse | 102 |
| 2.1.2.5.3. | La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) | 103 |
| | <input type="checkbox"/> Les amorces <input type="checkbox"/> L'amplification <input type="checkbox"/> L'analyse électrophorétique des produits d'amplification | |
| 2.1.2.5.4. | Le séquençage | 107 |
| 2.1.2.6. | L'étude statistique | 108 |
| 2.2. | <u>LES RESULTATS</u> | 109 |
| 2.2.1. | LES CONSTATATIONS CLINIQUES | 109 |
| 2.2.1.1. | Le sexe | 109 |
| 2.2.1.2. | L'âge | 109 |
| 2.2.1.3. | Le stade au moment du diagnostic | 110 |
| 2.2.1.4. | L'existence de signes de « forte » masse tumorale (critères de mauvais pronostic) | 111 |
| 2.2.1.5. | L'évolution | 113 |

| | | |
|--|--|------------|
| 2.2.2. | LES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES | 115 |
| 2.2.2.1. | Le grade selon l'OMS | 115 |
| 2.2.2.2. | L'expression de P53, Bcl2 et Bcl6 | 115 |
| 2.2.2.3. | L'indice de prolifération cellulaire évalué par le Ki67 (MiB1) | 116 |
| 2.2.2.4. | L'expression du NGF et de ses récepteurs | 117 |
| 2.2.3. | LA VALEUR PRONOSTIQUE DES PARAMETRES ETUDIES : résultats de l'analyse multivariée | 124 |
| 2.2.3.1. | Les signes anatomo-cliniques | 124 |
| 2.2.3.2. | Les signes morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires | 124 |
| 2.2.3.3. | Les corrélations entre les signes cliniques et les résultats de l'immunohistochimie | 125 |
| | <input type="checkbox"/> Les résultats significatifs | |
| | <input type="checkbox"/> Les résultats non significatifs | |
| 2.2.4. | LES RESULTATS DE LA RT-PCR | 127 |
| TROISIEME PARTIE : DISCUSSION ET PERSPECTIVES | | 129 |
| 3.1. | LES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET ANATOMO- PATHOLOGIQUES DES LYMPHOMES FOLLICULAIRES DE LA SERIE | 130 |
| 3.2. | L'EXPRESSION DU NGF ET DE SES RECEPTEURS, p75 ^{NTR} ET TrkA, DANS LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES | 135 |
| | <input type="checkbox"/> Les protéines NGF, p75 ^{NTR} et TrkA sont exprimées dans les LF | 135 |
| | <input type="checkbox"/> La recherche des transcrits de NGF, p75 ^{NTR} et trkA par RT-PCR | 138 |
| 3.3. | TENTATIVE DE COMPREHENSION DE L'EXPRESSION DE NGF, p75 ^{NTR} ET TrkA DANS LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES | 140 |
| 3.4. | NGF, p75 ^{NTR} ET TrkA : LES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES | 143 |

CONCLUSION 146

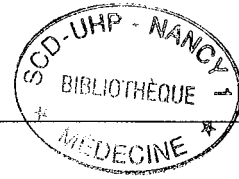
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 149

ANNEXES 189

- dNTP à 1%
- DPBS
- Fast Red
- Gel d'agarose d'ADN à 2 %
- Gel d'agarose d'ARN à 2 %
- Gel de polyacrylamide à 15 %
- Hématoxyline
- Lévamisol
- Milieu de montage contenant du Polyvinyl
- MR 50X Peroxydase
- MR 50X Phosphatase Alcaline
- NAOH 1 N
- Naphtol AS-MX
- Paraformaldéhyde à 4 %
- Tampon Citrate pH : 6,0
- Tampon PBS-Tween
- Tampon TRIS IMIDAZOLE
- TBST
- Tris Hcl 0,1 M pH 8,2
- Tyramide-Biotine



ABREVIATIONS



| | |
|---------------------------------|---|
| BDNF : | Brain Derived Growth Factor |
| FIUC : | Formulation Internationale à Usage Clinique |
| GELA : | Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte |
| GELF : | Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires |
| IHC : | Immunohistochimie |
| LF : | Lymphome Folliculaire |
| LMNH : | Lymphome Malin Non Hodgkinien |
| NGF : | Nerve Growth Factor |
| OMS : | Organisation Mondiale de la Santé |
| PCR : | Réaction de Polymérisation en Chaîne |
| p75^{NTR} : | Neurotrophin Receptor |
| REAL : | Revised European American classification of Lymphoid neoplasme |
| TGF-β : | Tumor Growth Factor |
| TNF : | Tumor Necrosis Factor |
| TrkA : | Tropomyosin-related kinase |
| VEGF : | Vascular Endothelial Growth Factor |
| WF : | Working Formulation |

TABLEAUX



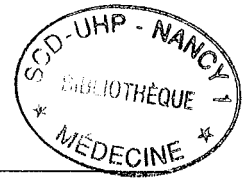
| | Page : |
|---|---------------|
| Tableau n°1 : L'indice de performance selon le code de l'OMS | 36 |
| Tableau n°2 : La classification de l'extension selon Ann Arbor | 37 |
| Tableau n°3 : Le diagnostic différentiel des lymphomes folliculaires : critères morphologiques et immunohistochimiques | 58 |
| Tableau n°4 : L'orientation diagnostique devant une prolifération lymphoïde d'architecture nodulaire | 59 |
| Tableau n°5 : Formulation Internationale à Usage Clinique (FIUC, 1981) | 65 |
| Tableau n°6 : Les caractéristiques des anticorps utilisés dans notre étude | 92 |
| Tableau n°7 : Les caractéristiques anatomocliniques des 25 lymphomes folliculaires | 114 |
| Tableau n°8 : Les caractéristiques immunohistochimiques des 25 lymphomes folliculaires | 120 |

FIGURES



| | Page : |
|---|---------------|
| Figure n°1 : La structure de l'anticorps monoclonal anti-CD20 . | 46 |
| Figure n°2 : Le mécanisme d'action du rituximab | 48 |
| Figure n°3 : Les quatre principaux types histologiques de lymphome folliculaire décrits par LUKES (116) selon le degré de nodularité du ganglion | 51 |
| Figure n°4 : Les récepteurs du NGF : TrkA et p75 ^{NTR} d'après CHAO (32) | 76 |
| Figure n°5 : Le récepteur TrkA/gp ¹⁴⁰ TrkA d'après BARBACID (6) | 83 |
| Figure n°6 : Les isoformes trkA d'après BARKER (7) | 84 |

GRAPHIQUES



| | Page : |
|--|---------------|
| Graphique n°1 : La répartition des lymphomes folliculaires selon l'âge et le sexe | 109 |
| Graphique n°2 : Les stades des 25 lymphomes folliculaires au moment du diagnostic | 110 |
| Graphique n°3 : La répartition des facteurs de mauvais pronostic ... | 112 |
| Graphique n°4 : La répartition des 25 lymphomes folliculaires selon les grades cytologiques et architecturaux | 115 |
| Graphique n°5 : L'étude immunohistochimique à l'aide des marqueurs P53, Bcl2 et Bcl6 | 116 |
| Graphique n°6 : L'indice de prolifération cellulaire évalué par le Ki67 (MiB1) | 117 |
| Graphique n°7 : L'étude immunohistochimique à l'aide des marqueurs NGF, TrkA et p75 ^{NTR} | 119 |
| Graphique n°8 : La corrélation du stade et de l'indice de prolifération cellulaire évalué par le Ki67 (MiB1) | 125 |
| Graphique n°9 : La corrélation du stade et de l'expression de p75 ^{NTR} | 126 |

PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES



| | Page : |
|--|---------------|
| Planche n°1 : La morphologie et l'immunophénotypage du lymphome folliculaire | 55 |
| Planche n°2 : L'expression du NGF dans le lymphome folliculaire | 121 |
| Planche n°3 : L'expression de TrkA dans le lymphome folliculaire | 122 |
| Planche n°4 : L'expression de p75 ^{NTR} dans le lymphome folliculaire | 123 |
| Planche n°5 : L'analyse électrophorétique des produits d'amplification après RT-PCR | 128 |

INTRODUCTION

Le Nerve Growth Factor (NGF), chef de file de la famille des neurotrophines, protéine essentielle à la survie, au développement et à la différenciation des neurones se lie à deux récepteurs respectivement de basse et de haute affinité : p75^{NTR} (Neurotrophin Receptor) et TrkA (Tropomyosin-related kinase). L'intensité de l'expression de TrkA dans les cellules des neuroblastomes est positivement corrélée avec un bon pronostic. Initialement isolées dans le tissu nerveux, ces molécules ont ensuite été retrouvées dans beaucoup d'autres organes normaux ou pathologiques et notamment dans des tissus lymphoïdes puis dans quelques cas de lymphomes folliculaires (LF). Il nous a donc paru logique de préciser l'existence et l'intensité de l'expression de ces molécules dans ce type de lymphome.

Parmi les lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH), les LF forment un groupe homogène de par leurs caractéristiques morphologiques, immunologiques et moléculaires mais également par leur évolution clinique paucisymptomatique. Leur fréquence n'est pas négligeable puisqu'ils représentent 20 % des LMNH de l'adulte en Europe et constituent le deuxième sous-groupe des lymphomes après les lymphomes B diffus à grandes cellules. Sensibles au traitement conventionnel actuel fondé sur une polychimiothérapie souvent associée à de l'interféron α , ces lymphomes, dits « de bas grade », demeurent cependant incurables car les rechutes sont constantes et l'évolution toujours fatale en 7 à 10 ans. Des espoirs importants sont actuellement placés dans l'immunothérapie par des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement les cellules tumorales.

Compte-tenu des nombreuses données référencées dans la littérature à propos de l'implication pronostique de l'expression du NGF et de ses récepteurs dans les tumeurs neuroectodermiques et thymiques, nous avons réalisé une étude anatomo-clinique rétrospective portant sur 25 LF afin de préciser leur modalité d'expression. Nous avons corrélé ces

résultats avec les facteurs de mauvais pronostic du LF afin de déterminer si ces molécules, lorsqu'elles étaient exprimées, permettaient de définir des facteurs prédictifs.

Dans une première partie, nous exposerons les principales caractéristiques cliniques, morphologiques et moléculaires des LF ainsi que les différents aspects du traitement des patients atteints de LF. Nous rappellerons également quelques aspects de la structure, de la fonction et de la distribution du NGF et de ses récepteurs dans les tissus normaux et pathologiques.

Dans une seconde partie, nous présenterons notre étude anatomo-clinique concernant 25 LF. Nous décrirons d'abord le matériel et les méthodes employées pour rechercher, par immunohistochimie, l'expression des antigènes régulièrement retrouvés dans les LF ainsi que celle du NGF et de ses récepteurs. Nous exposerons ensuite les techniques de biologie moléculaire utilisées pour tenter de mettre en évidence les transcrits de NGF, TrkA et p75^{NTR} par RT-PCR. Nous rapporterons enfin nos résultats.

Dans une troisième partie, nous confronterons nos résultats aux données actuelles de la littérature et discuterons leurs particularités.

PREMIERE PARTIE :

Rappels

1.1. CONSIDERATIONS GENERALES SUR LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES :

1.1.1. L'EPIDEMIOLOGIE :

Les LF, individualisés dans toutes les classifications récentes des lymphomes (71) sont des proliférations malignes monoclonales dérivant des cellules B des centres germinatifs des follicules lymphoïdes (84). Ils représentent 20 à 30 % des LMNH en Europe et aux Etats-Unis mais moins de 10 % en Asie.

Leur incidence, en France, a augmenté de 60 % entre 1975 et 1995. Le nombre de nouveaux cas par an est évalué à respectivement 13,7 et 8,5 cas pour 100 000 habitants pour les patients de sexe masculin et féminin (73). Il existe une discrète prédominance masculine (sex-ratio de 1,27/1 dans la série du Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires (GELF)) et l'âge médian de survenue se situe autour de 55 ans. Ils sont rares avant 20 ans et plus fréquents après 50 ans. Ces néoplasies, considérées comme insidieuses et sensibles aux chimiothérapies sont en réalité fatales et la médiane de survie, selon les séries, n'est que de 7 à 10 ans (186).

Leur transformation en prolifération histologique de haut grade de malignité signe un mauvais pronostic avec alors une médiane de survie inférieure à un an (1).

1.1.2. LES ASPECTS CLINIQUES

Le diagnostic est souvent porté tardivement après plusieurs mois, voire années d'évolution. Les adénopathies superficielles et/ou profondes

sont les motifs de consultation les plus fréquents. Ces adénopathies sont peu symptomatiques sauf lorsqu'elles sont volumineuses, pouvant alors être responsables de compression notamment dans leur localisation rétro-péritonéale. Elles évoluent par poussées et peuvent régresser spontanément.

Des signes généraux (amaigrissement, fièvre, sueurs nocturnes) sont présents dans moins de 25 % des cas au moment du diagnostic mais l'état général est habituellement conservé (Indice d'activité selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 0 à 1) (**Tableau n°1**).

| Stade | Performance |
|---------|--|
| Stade 0 | Activité identique à celle précédant la maladie, sans restriction. |
| Stade 1 | Activité physique diminuée, mais malade ambulatoire et capable de travailler. |
| Stade 2 | Malade ambulatoire, capable de prendre soin de lui, incapable de travailler, alité moins de 50 % des heures de veille. |
| Stade 3 | Malade capable seulement de quelques activités, alité ou en fauteuil de 50 à 99% des heures de veille. |
| Stade 4 | Malade incapable de prendre soin de lui-même, alité ou en fauteuil en permanence. |

Tableau n°1 : *L'indice de performance selon le code de l'OMS*

Selon la classification d'Ann Arbor (**Tableau n°2**), 70 % des lymphomes folliculaires sont de stade IV au moment du diagnostic, principalement en raison d'une infiltration médullaire (155).

Inversement les formes localisées (stades I et II selon Ann Arbor) ne représentent que 15 à 20 % des lymphomes folliculaires.

Les localisations extraganglionnaires les plus fréquentes par ordre décroissant sont la moelle osseuse, le foie et le cavum. Les atteintes

digestives sont rares et les localisations cérébro-méningées exceptionnelles.

| Stade | Définition |
|------------------|--|
| Stade I | Atteinte d'une seule aire ganglionnaire (I) ou d'une seule localisation ou territoire extraganglionnaire (IE), la rate était considérée comme un ganglion. |
| Stade II | Atteintes de deux aires ganglionnaires ou plus du même côté du diaphragme (II), éventuellement associée à une atteinte extraganglionnaire de contiguïté (IIE). |
| Stade III | Atteintes ganglionnaires situées de part et d'autre du diaphragme (III), accompagnées éventuellement d'une atteinte splénique (III _s) ou d'une atteinte extraganglionnaire localisée (III _E), éventuellement associée à une atteinte splénique (III _{sE}). |
| Stade IV | Atteintes disséminées d'une ou de plusieurs localisations extraganglionnaires avec ou sans atteinte ganglionnaire. |

L'absence ou la présence de fièvre, de sueurs nocturnes ou d'une perte de poids est indiquée respectivement par la lettre A ou B.

Tableau n°2 :

La classification de l'extension selon Ann Arbor

1.1.3. LES FACTEURS PRONOSTIQUES :

1.1.3.1. LES FACTEURS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES :

Contrairement à ce qui a été obtenu pour les lymphomes agressifs, il n'existe pas de véritable consensus sur les facteurs pronostiques pour des lymphomes folliculaires (9).

Beaucoup d'études sur des séries importantes ont recherché par analyse uniparamétrique et multiparamétrique, les facteurs pronostiques pour la survie globale des lymphomes folliculaires.

Au moment du diagnostic, les paramètres suivants présents sont considérés comme de mauvais pronostic (11, 36) :

- ✓ le sexe masculin,
- ✓ l'âge supérieur à 60 ans,
- ✓ un stade avancé (III ou IV selon Ann Arbor),
- ✓ l'existence de symptômes B (sueurs nocturnes, fièvre > à 38°C, amaigrissement de 10% du poids corporel),
- ✓ l'indice d'activité OMS \geq à 2,
- ✓ la présence de deux localisations extraganglionnaires ou plus,
- ✓ la présence d'une masse tumorale d'une taille supérieure à 7 – 10 cm,
- ✓ une hépatosplénomégalie,
- ✓ une infiltration médullaire massive,
- ✓ une élévation supérieure à la normale (210 à 400 UI/L) du taux de LDH sériques,
- ✓ une augmentation du taux de β 2-microglobuline sérique (> à 3 mg/L).

Ces paramètres sont des critères de « forte » masse tumorale et sont actuellement utilisés dans toutes les études du GELF. Par ailleurs, il est actuellement admis que l'obtention d'une réponse complète après le

traitement initial est corrélée avec un allongement de la survie globale et de la survie sans récurrence (9, 14).

Certains auteurs ont tenté d'appliquer aux lymphomes folliculaires l'indice pronostique international utilisé pour les lymphomes agressifs (10, 68). Cet indice repose sur l'âge, le stade d'extension, le taux de LDH et l'état général selon l'OMS. Il permet effectivement de distinguer plusieurs groupes de pronostic mais paraît peu discriminant puisque 70 % des patients sont classés dans un groupe de faible risque. Ceci est en partie dû au caractère généralement peu évolutif de ces lymphomes.

1.1.3.2. LES FACTEURS HISTO-PRONOSTIQUES

De nombreuses études ont tenté de définir des facteurs histopronostiques des lymphomes folliculaires.

☞ Les formes avec une architecture folliculaire et diffuse auraient un moins bon pronostic que les formes folliculaires pures (60), mais ceci n'a pas été confirmé par d'autres études (36).

☞ Le pourcentage de grandes cellules a servi en 1981 à séparer les lymphomes folliculaires à petites cellules ou mixtes de faible malignité, des lymphomes folliculaires à grandes cellules considérés comme de malignité intermédiaire. Cette distinction reste discutable puisque le pourcentage de grandes cellules peut varier d'un site ganglionnaire à l'autre et que la concordance diagnostique entre les pathologistes est faible pour ces sous-types de lymphomes.

Certaines études ont également tenté de déterminer si les lymphomes folliculaires à grandes cellules étaient des entités distinctes des autres lymphomes folliculaires (65, 109).

Certains les considèrent comme des lymphomes agressifs du fait de leur évolution toujours fatale (90), d'autres comme des lymphomes de faible malignité compte tenu de leur évolution clinique (4).

La tendance actuelle est de les regrouper avec les autres lymphomes folliculaires comme dans la classification de REAL ou de l'OMS.

☞ L'indice de prolifération mesuré en cytométrie de flux (2, 85) à l'aide de l'expression de l'Antigène Nucléaire des Cellules en Prolifération (PCNA) (93) ou de l'antigène Ki-67 (MiB1) aurait une signification pronostique mais aucune série ne repose actuellement sur un nombre suffisant de malades pour conclure avec certitude. Deux études (113, 179) ont démontré que le pourcentage élevé de mitoses anormales dans les lymphomes folliculaires s'est avéré un élément de mauvais pronostic.

☞ Les anomalies chromosomiques sont complexes, multiples et ont actuellement été étudiées dans un petit nombre de cas. L'existence de la translocation (14 ; 18), la présence d'un réarrangement de Bcl2 et sa surexpression ne semblent pas influencer le pronostic des lymphomes folliculaires (144). Les anomalies cytogénétiques portant sur le chromosome 17 sont corrélées à une survie courte et une transformation rapide en lymphome agressif (26, 112, 179). L'implication du gène P53 (situé en 17p13) est alors fortement suspectée (159). En effet, la mutation de la protéine P53 est un événement rencontré dans les lymphomes folliculaires en phase de transformation avec souvent perte d'hétérozygotie par délétion de l'allèle.

1.1.4. LES ASPECTS THERAPEUTIQUES :

Les schémas thérapeutiques restent basés sur la classification d'Ann Arbor définissant les formes localisées : stades I et II (avec « faible » masse tumorale) et les formes disséminées : stades III et IV.

1.1.4.1. LES FORMES LOCALISEES (stades I et II avec « faible » masse tumorale) :

Ces formes ne représentent que 15 à 20 % des lymphomes folliculaires mais sont les seules potentiellement curables. La radiothérapie isolée sur les territoires envahis (35 à 40 Gy en fractionnement classique) reste le traitement de référence.

Le taux de survie sans rechute à 10 ans est alors de 50 % (81). Des études comparant la radiothérapie isolée à une association radiothérapie – chimiothérapie de type Cyclophosphamide ou Chlorambucil n'ont pas démontré de bénéfice significatif à l'utilisation d'une chimiothérapie adjuvante.

1.1.4.2. LES FORMES DISSEMINÉES (stades III et IV) :

L'évolution lente avec un confort de vie longtemps conservé (médiane de survie de 7 à 10 ans selon les séries) et la rechute habituelle après traitement sont des considérations à prendre en compte dans le choix du traitement initial d'un patient atteint d'un lymphome folliculaire.

1.1.4.2.1. La « faible » masse tumorale :

Les options thérapeutiques pour ces patients ne sont pas consensuelles et peuvent encore varier entre une abstention thérapeutique (78, 79) et une chimiothérapie. Une étude du GELF en 1986 (21) a comparé trois groupes de patients ayant bénéficié :

- ✓ d'une abstention thérapeutique,
- ✓ d'un traitement par Prednimustine (association de Chlorambucil à la Prednisolone),

✓ d'un traitement par l'interféron α .

Cet essai randomisé a montré l'absence de différence en terme de survie, de survie sans progression et de survie globale entre les trois groupes.

1.1.4.2.2. Les LF à « forte » masse tumorale et les formes asymptomatiques :

L'attitude thérapeutique va dépendre de l'âge du patient.

La polychimiothérapie de type CVP (Cyclophosphamide – Vincristine – Prednisolone) a longtemps été le traitement de référence. La monochimiothérapie par Chlorambucil ou Cyclophosphamide per-os en continu procure des résultats similaires en terme de survie globale (59, 77). Le taux de réponses varie de 50 à 70 % avec des réponses rarement complètes et en général brèves. Ce type de traitement est aujourd'hui réservé aux patients âgés de plus de 75 ans.

Il est actuellement supplanté par des polychimiothérapies comportant des anthracyclines ou des monochimiothérapies discontinues à forte dose pour les patients de moins de 75 ans.

Les protocoles actuels associent Cyclophosphamide, Adriamycine, VM26, Prednisolone (CHVP) ou Cyclophosphamide, Adriamycine, Oncovin, Prednisolone (CHOP) (170). L'étude du GELF 86 a montré l'intérêt de l'association d'interféron α à la polychimiothérapie qui entraîne un allongement de la survie sans récurrence (34 mois versus 19 mois) et de la survie globale à 3 ans (86 % versus 69 %) (170). Ce traitement est désormais celui de référence pour les patients âgés de 60 à 75 ans (21, 166). Le protocole est le suivant :

Douze cures de mini-CHVP (1 cure par mois pendant 6 mois puis tous les 2 mois pendant 12 mois) :

J1 : Cyclophosphamide 600 mg/m² de surface corporelle (SC).

J1 : Doxorubicine 25 mg/m² de SC.

J1 : Vepeside 100 mg/m² de SC.

J1 à J5 : Prednisolone 46 mg/m² de SC.

Ces cures sont associées à 3 injections sous-cutanées par semaine d'Interféron α (5 millions UI) pendant 18 mois.

Actuellement, l'efficacité de nouvelles substances thérapeutiques comme les analogues de la purine (FLUDARABINE) est en cours d'évaluation (169).

Le nombre élevé de rechutes et les résultats peu encourageants après une chimiothérapie conventionnelle ont conduit à proposer de nouvelles procédures thérapeutiques, caractérisées par l'intensification des destructions cellulaires suivies par une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Ce traitement est toutefois réservé aux patients âgés de moins de 60 ans, aux états réfractaires et aux rechutes précoces des formes disséminées (154) mais la supériorité d'un tel traitement par rapport à celui de référence n'est pas encore démontrée (étude du GELF en cours) (171).

1.1.4.3. LA PRISE EN CHARGE DES RECHUTES :

En ce domaine, les traitements actuels consistent en des polychimiothérapies éventuellement suivies de greffes de cellules souches hématopoïétiques.

1.1.4.4. L'IMMUNOTHERAPIE PAR LES ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-CD20 :

Les anticorps monoclonaux sont devenus des outils indispensables, utilisés quotidiennement pour l'identification de cellules et de molécules

en anatomie pathologique, biologie clinique et recherche scientifique. L'utilisation des anticorps pour le traitement des cancers remonte à presque un siècle. Certains ont proposé de se servir de ces molécules comme des « armes magiques » délivrant des charges destructrices sur des cellules tumorales ciblées (152). Des réponses objectives ont été observées chez quelques patients lors des premiers essais cliniques avec des anticorps monoclonaux (55). Cependant, il apparut, au cours de ces essais, qu'un certain nombre d'obstacles devait être surmonté pour parvenir à une utilisation efficace des anticorps monoclonaux chez les patients atteints d'affections malignes :

- ✍ les réactions croisées des anticorps monoclonaux antitumoraux avec les tissus normaux (67),
- ✍ la modulation, la perte ou l'internalisation de l'antigène de surface sur les cellules malignes après fixation de l'anticorps,
- ✍ les réponses immunitaires de l'hôte contre les anticorps monoclonaux par la production d'anticorps antimurins (161),
- ✍ enfin, l'absence d'effet cytotoxique assez puissant pour parvenir à un effet thérapeutique (pas de synergie avec le système immunitaire (67)).

En effet, le traitement de patients immunocompétents par des anticorps murins non modifiés a conduit fréquemment à la production d'anticorps humains antisouris qui neutralisent l'effet thérapeutique et risquent d'induire des toxicités dues à l'interaction anticorps/protéine comme une maladie sérique, une néphrotoxicité et une réaction anaphylactique.

Pour s'opposer à ces difficultés, des anticorps chimériques pour lesquels le domaine Fc (fixant le complément) de l'anticorps murin est remplacé par un domaine Fc d'origine humaine, ont été construits.

Par ailleurs, pour éviter la réaction croisée avec les tissus normaux, des antigènes qui se révèlent des cibles spécifiques, ont été recherchés.

Parmi eux, figure le CD20 qui est exprimé dans 95 % des cellules malignes des lymphomes B.

L'utilisation d'anticorps chimériques et la spécificité d'action ont abouti au développement d'un nouvel agent thérapeutique : le Mab Thera (rituximab) (133) dont nous rappelons quelques caractéristiques ci-dessous.

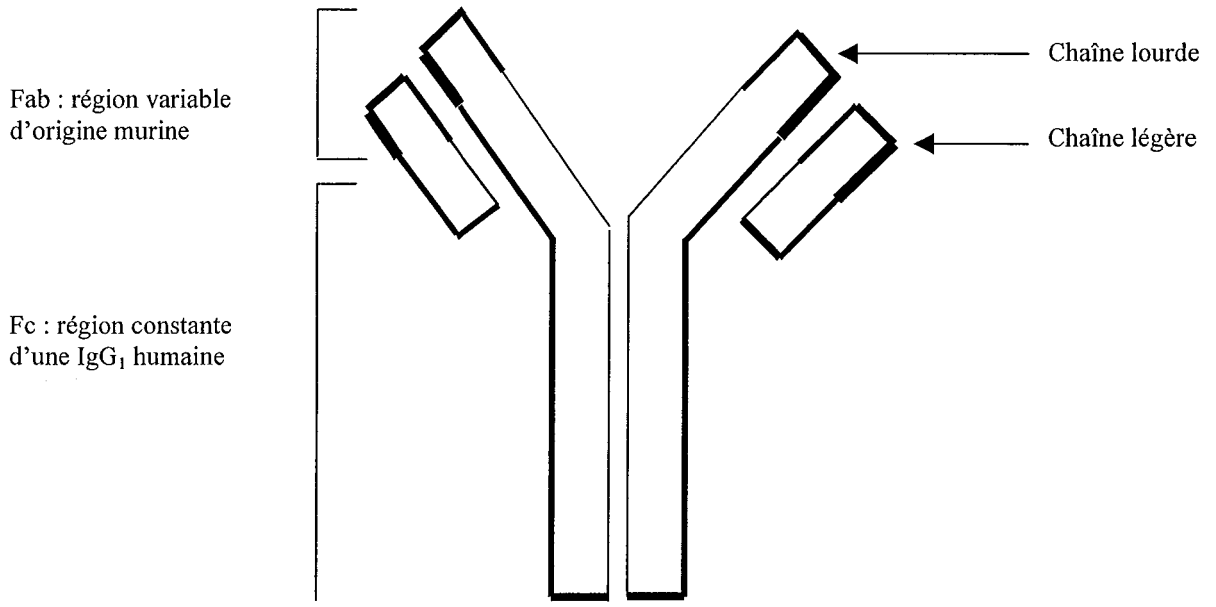
✓ **La production de l'anticorps monoclonal :**

Les immunoglobulines sont des protéines produites par les plasmocytes activés qui représentent le stade ultime de la différenciation des lymphocytes B. Elles sont constituées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères qui comportent chacune une région constante et une région variable. La diversité importante de la séquence en acides aminés des zones hypervariables, correspondant à des sites de combinaison de l'antigène, rend compte de la haute spécificité de chaque anticorps vis-à-vis d'un antigène unique.

Les anticorps monoclonaux sont obtenus par fusion des lymphocytes spléniques d'une souris immunisée contre un antigène particulier (ces lymphocytes produisent des anticorps polyclonaux) avec des cellules immortalisées d'une lignée de myélome. Chaque lymphocyte va fusionner avec une cellule myélomateuse pour donner naissance à un hybridome capable, d'une part, de se multiplier *in vitro* et, d'autre part, de produire en grandes quantités un anticorps monoclonal homogène, c'est-à-dire possédant une seule et même spécificité (95).

La technique développée par KOHLER et MILSTEIN (95), qui reçurent en 1984 le prix Nobel, permet ainsi d'obtenir en grandes quantités des anticorps de la spécificité désirée et dont la production peut être indéfiniment maintenue.

L'anticorps rituximab est une immunoglobine (IgG_{1κ}) qui possède une affinité de liaison pour l'antigène CD20. Ce nouvel anticorps monoclonal est constitué pour les régions variables (Fab) de chaînes lourdes d'origine murine et, pour les parties constantes (Fc) d'une IgG₁ d'origine humaine (**Figure n°1**).



La région variable Fab



(Fragment antigen binding)
d'origine murine :
cible l'antigène CD20

La région constante Fc



(Fragment crystallizable) d'origine humaine :
 > assure une demi-vie plasmatique prolongée (189,9 heures en moyenne après 4 perfusions) par rapport à un anticorps d'origine murine,
 > permet de déclencher les mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire,
 > limite l'apparition d'anticorps antichimères (HACA).

Figure n°1 : La structure de l'anticorps monoclonal anti-CD20.

✓ **L'antigène CD20, cible de l'anticorps monoclonal :**

L'antigène CD20, exprimé régulièrement sur les cellules des L.F., est une protéine membranaire dont l'expression est restreinte aux cellules B précurseurs et B matures (122). Il n'est pas exprimé sur les cellules souches et les cellules pro-B et disparaît lorsque les cellules B normales se différencient en plasmocytes sécrétant des anticorps.

L'antigène CD20 serait un constituant du complexe de signal de transduction impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules B après activation, et pourrait fonctionner comme un canal calcique (25, 178).

L'antigène CD20 ne subit pas de modulation : il ne disparaît pas de la surface membranaire et n'est pas internalisé après fixation de l'anticorps. Il ne circule pas dans le plasma et, de ce fait, il n'y a pas de compétition pour la fixation de l'anticorps avec une forme libre de l'antigène. Le rituximab induit une profonde déplétion, cliniquement asymptomatique, en cellules B matures, mais n'a pas d'effet connu sur les cellules souches hématopoïétiques ou sur les progéniteurs engagés dans une lignée car ces cellules n'expriment pas encore l'antigène CD20. Les cellules CD20+ matures sont régénérées à partir des populations de progéniteurs.

✓ **Le mécanisme d'action de l'antigène CD20 :**

Il a été montré, *in vitro*, que l'anti-CD20 agirait selon plusieurs mécanismes, les uns médiés par des effecteurs du système immunitaire humain, les autres indépendants de ce système (**Figure n°2**).

Le fragment Fab de l'anti-CD20 se lie à l'antigène CD20 des lymphocytes B et génère des fonctions d'effecteur immunitaire qui entraînent la lyse de ces lymphocytes par l'intermédiaire du fragment Fc. Les mécanismes possibles de la lyse cellulaire sont une cytotoxicité

dépendante du complément, faisant intervenir la liaison du fragment C1q, et une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, passant par un ou plusieurs des récepteurs Fc γ de la surface des granulocytes, des macrophages et des cellules NK.

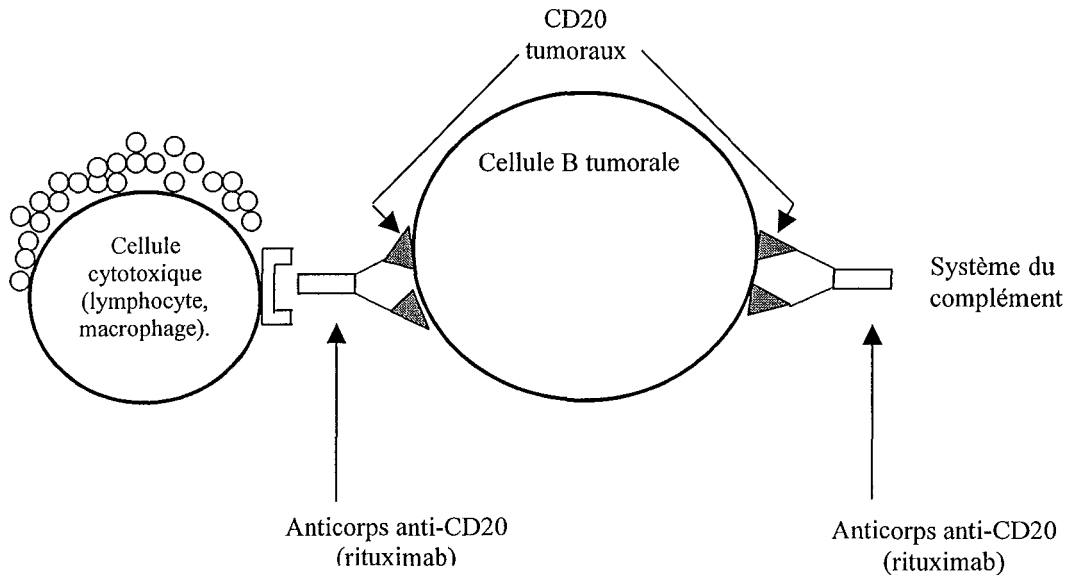


Figure n°2 : Le mécanisme d'action du rituximab

Bien que sa fonction précise ne soit pas parfaitement connue, la protéine CD20 agit probablement tel un canal ionique régulant les flux calciques transmembranaires. Non phosphorylée dans la cellule B au repos, cette protéine devient fortement phosphorylée après activation et serait ainsi impliquée dans les phénomènes de différenciation des cellules B. Des études ont montré que la liaison du CD20 à un anticorps monoclonal inhibait la différenciation des lymphocytes B et bloquait leur progression vers les stades S/G2 et M du cycle cellulaire (92).

✓ Les indications thérapeutiques actuelles :

De nombreuses études cliniques de phases I et II ont évalué l'efficacité de l'anticorps anti-CD20 à des doses variables (3, 37, 42, 47, 119, 122). La dose de 375 mg/m² de surface corporelle en perfusion intraveineuse a été retenue comme dose hebdomadaire et ceci pendant 4 semaines.

L'anticorps anti-CD20 possède actuellement l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) pour le traitement de patients atteints de lymphomes folliculaires de stades III et IV en cas de chimiorésistance ou à partir de la deuxième rechute après chimiothérapie.

Une étude multicentrique récente (39) a évalué l'efficacité de 4 cures de rituximab sur des LF de « faible » masse tumorale pour lesquels l'abstention thérapeutique est généralement recommandée. Dans cette étude, il existait une corrélation positive entre la réponse clinique et la réponse moléculaire (recherche de l'expression de Bcl2 par PCR dans le sang circulant) et une survie significativement meilleure chez les patients « PCR négative pour Bcl2 », que chez les patients « PCR positive pour Bcl2 » un mois après la fin du traitement. L'association du rituximab à une polychimiothérapie, à un traitement par l'interféron α et/ou à l'intensification des destructions cellulaires avant une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques fait actuellement l'objet d'études prospectives (66, 149, 158).

La toxicité hématologique est faible, voire inexistante. Les seules réactions sont celles observées à la première injection avec un état fébrile dans la moitié des cas, des nausées dans un quart des cas et des complications plus sévères (bronchospasmes et hypotension) dans 1 % des cas.

Cette molécule est sans doute la première d'une nouvelle génération de médicaments qui pourrait modifier grandement le traitement des proliférations lymphoïdes.

Il est cependant peu probable qu'à elle seule, surtout dans les formes à très « forte » masse tumorale, elle puisse assurer une éradication

tumorale maximale et les rechutes après élimination importante ou partielle sont fréquentes. En revanche, couplée à un isotope radioactif et associée à la chimiothérapie, elle pourrait permettre une éradication plus complète des cellules résiduelles lymphomateuses exprimant le CD20.

1.1.5. LES ASPECTS MORPHOLOGIQUES :

1.1.5.1. L'ARCHITECTURE :

C'est BRILL-SYWERS qui a décrit le premier cette catégorie de lymphome si particulière par son évolution paucisymptomatique.

Le diagnostic doit être porté sur une biopsie exérèse d'un ganglion lymphatique et non pas sur celle d'une localisation extraganglionnaire. Les lymphomes folliculaires sont définis par la présence de multiples nodules de taille à peu près constante dans le cortex et la médullaire, se disposant « dos à dos ». Ces nodules sont mal limités, ne comportent habituellement pas de centre germinatif et possèdent une couronne lymphocytaire très réduite ou absente. Une infiltration de la capsule et des vaisseaux est possible. L'architecture folliculaire est soulignée par l'accentuation du réseau réticulinique mise en évidence par la coloration de GORDON-SWEET en périphérie des follicules (117) (**Planche 1, photographie B**).

LUKES (116) décrit quatre types de LF en fonction du degré de nodularité de la prolifération (**Figure n°3**) :

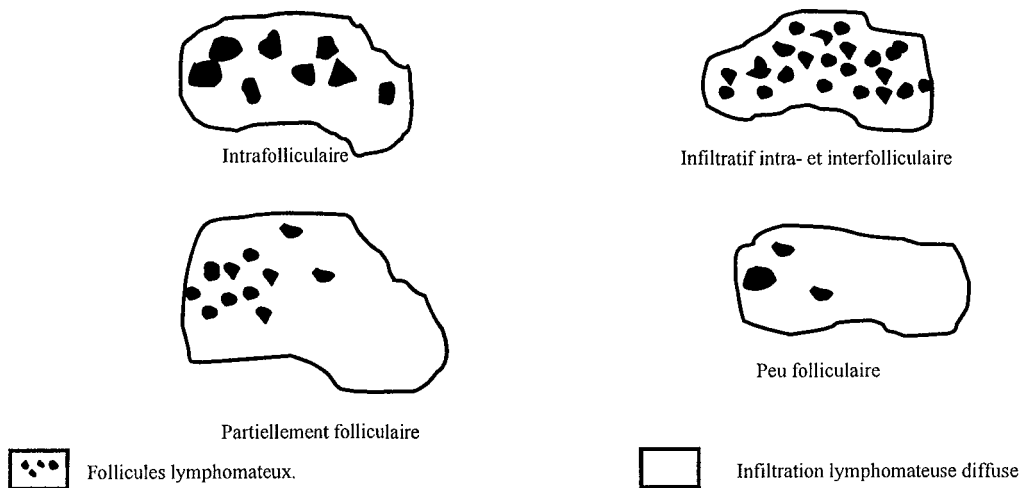
- ✓ **Le type intrafolliculaire.** Les cellules néoplasiques composent les nodules tumoraux, la zone du manteau étant conservée.

✓ **Le type infiltratif (intra- et interfolliculaire).** Les cellules néoplasiques infiltrent en plus ou moins grand nombre le tissu séparant les nodules tumoraux. C'est le type le plus fréquent.

✓ **Le type partiellement folliculaire.** Il existe une association de zones folliculaires et de zones diffuses.

✓ **Le type très peu folliculaire.**

Figure n°3 : Les quatre principaux types histologiques de lymphome folliculaire décrits par LUKES (116) selon le degré de nodularité du ganglion.



1.1.5.2. LA CYTOLOGIE :

La prolifération tumorale caractéristique des lymphomes folliculaires est un mélange en proportions variables de deux populations cellulaires correspondant à :

- ☞ des petites cellules clivées,
- ☞ des grandes cellules (clivées ou non clivées).

☞ **La petite cellule clivée** correspond au centrocyte dans la classification de Kiel (107, 108, 173). Elle se définit par la forme de son noyau mais aussi par d'autres caractères morphologiques. Elle mesure

6 à 12 μm de diamètre, son noyau est allongé, à contours irréguliers, clivé, encoché ou largement indenté. La chromatine est dense, sans nucléole visible ou contient un ou plusieurs nucléoles difficilement identifiables. Enfin, le cytoplasme est peu abondant, faiblement basophile (**Planche n°1, photographie C**).

☛ **Les grandes cellules :**

☛ *Les grandes cellules non clivées* mesurent plus de 20 μm de diamètre et correspondent aux centroblastes selon la classification de Kiel (107, 108, 173). Elles contiennent un noyau ovoïde, régulier, à membrane fine, à chromatine dispersée, comportant deux ou trois nucléoles de taille variable, souvent appendus à la membrane nucléaire. Le cytoplasme est basophile, modérément abondant.

☛ *Les grandes cellules clivées* correspondent aux grands centrocytes dans la classification de Kiel et forment habituellement un contingent minoritaire de la prolifération. Leur noyau est irrégulier, indenté ou clivé ; la chromatine est fine et dépourvue de nucléole.

☛ **Les cellules d'accompagnement :**

☛ Des lymphocytes T réactionnels et des cellules folliculaires dendritiques sont dispersés au sein des follicules tumoraux (**Planche n°1 photographie F**).

☛ Les lymphocytes T ont un petit noyau rond ou apparaissent activés et de taille légèrement augmentée.

☛ Les cellules folliculaires dendritiques s'agencent en réseau irrégulier, possèdent un noyau rond ou ovoïde, un petit nucléole central et des contours cytoplasmiques indistincts.

Certains types particuliers de lymphome folliculaire sont décrits :

⇒ **Les lymphomes folliculaires à cellules en bague à chaton.** Ils sont exceptionnels et caractérisés par la présence de cellules dont le cytoplasme contient de larges vacuoles correspondant à l'accumulation intracellulaire d'immunoglobulines.

⇒ **Les lymphomes folliculaires avec sclérose** seraient de pronostic plus favorable. La prolifération contient une fibrose collagène du tissu interfolliculaire. Ces lésions sont en particulier retrouvées dans les ganglions abdominaux et rétropéritonéaux.

⇒ **Les lymphomes folliculaires avec différenciation plasmocytoïde** où s'associe une population B monotypique intrafolliculaire et une plasmocytose interfolliculaire également monotypique qui pourrait représenter une différenciation des cellules néoplasiques vers le stade plasmocytaire.

⇒ **Les lymphomes folliculaires avec différenciation monocytoïde,** de pronostic particulièrement péjoratif.

1.1.5.3. L'IMMUNOHISTOCHIMIE :

L'étude immunohistochimique montre que les follicules tumoraux sont constitués de cellules B monotypiques, séparés par un tissu riche en cellules T réactionnelles (70).

Le phénotype des cellules B néoplasiques est très proche de celui des cellules B des centres germinatifs normaux. Ces cellules expriment la plupart des antigènes de surface associés aux cellules B : CD19, CD22, CD24, CD9, CD79a et notamment le CD20 (L26) (**Planche n°1 photographie E**).

Elles expriment une immunoglobuline de surface (IgM le plus souvent et plus rarement une IgD, IgG, IgA) et il existe une restriction isotypique de la chaîne légère dans 10 % des cas ($\kappa > \lambda$) (135). Les cellules B possèdent également des récepteurs pour le C3b (CD35) et le C3d

(CD21) et sont HLA DR +. Elles expriment l'antigène CALLA (CD10) dans les 2/3 des cas (140). Enfin, contrairement aux lymphomes du manteau, les cellules B tumorales sont cycline D1, CD5 et CD43 négatives. La protéine Bcl2, du fait de la translocation t (14 ; 18), est surexprimée dans 80 % des lymphomes folliculaires (**Planche n°1 photographie G**) ce qui permet de distinguer les lymphomes folliculaires de l'hyperplasie folliculaire réactionnelle (136).

La protéine P53 peut également être exprimée (137).

Le réseau des cellules folliculaires dendritiques est différent de celui des centres germinatifs normaux : il est dissocié , hétérogène ou absent dans certaines zones du follicule. Il est mis en évidence par les anticorps anti-CD21 et anti-CNA42. Par ailleurs, ces cellules folliculaires dendritiques n'expriment pas les anticorps anti-immunoglobulines.

La couronne lymphocytaire lorsqu'elle subsiste est polytypique.

Le tissu interfolliculaire est riche en cellules T réactionnelles exprimant les antigènes pan T comme par exemple le CD3. (**Planche n°1, photographie F**).

Planche Photographique n°1.

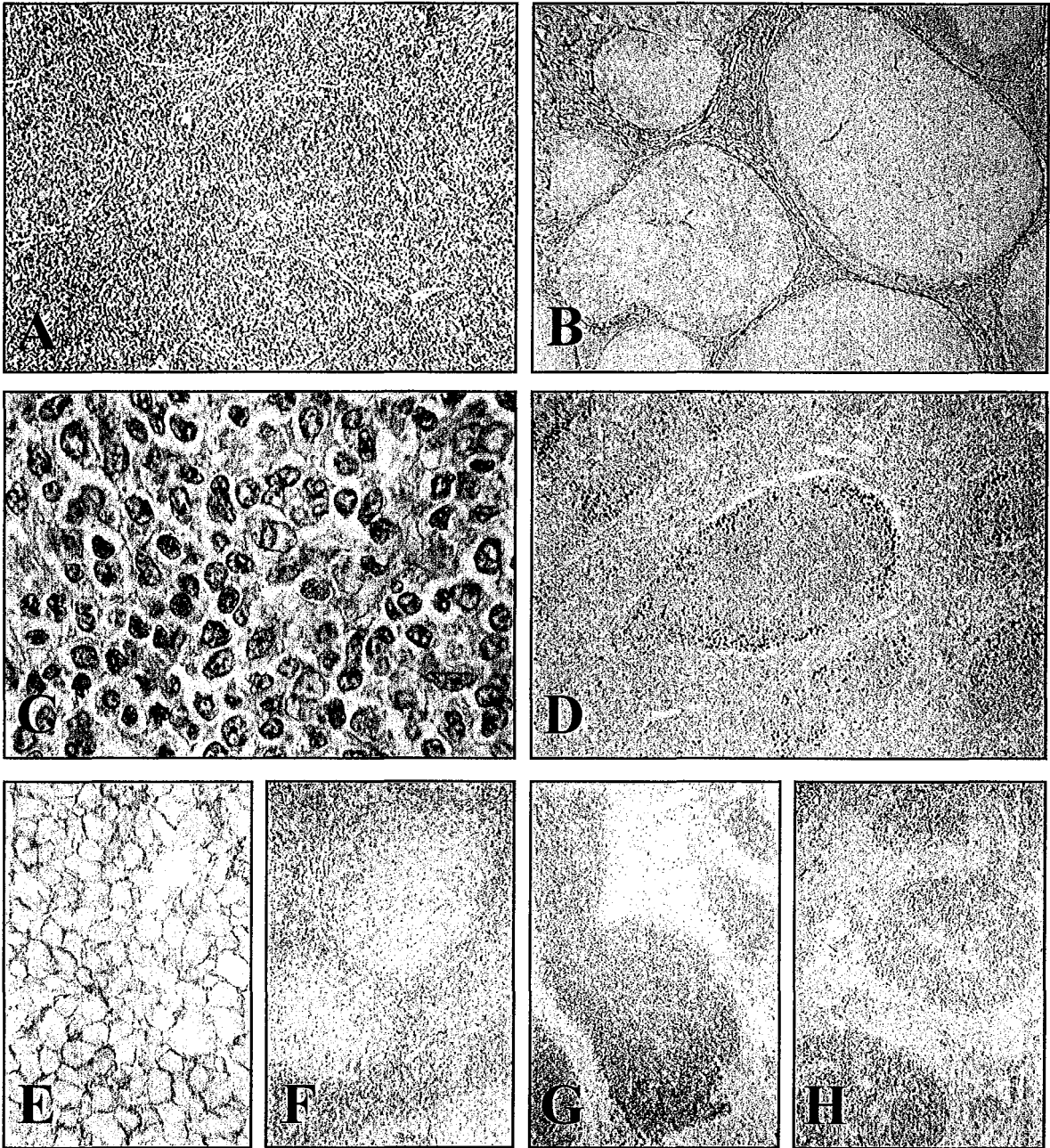


Planche 1: La morphologie et l'immunophénotype du lymphome folliculaire

A : Les dimensions des nodules tumoraux sont similaires; les follicules sont mal limités. (H.E.S X 100)

B : L'imprégnation argentique du réseau réticulinique souligne le caractère nodulaire de la prolifération. (GORDON-SWEET X 50)

C : La population tumorale est composée de petites cellules clivées (centrocytes) et de centroblastes.(H.E.S X 1000)

D : Les cellules en cycle sont mises en évidence par détection de la protéine Ki67 (MiB1).Immunomarquage en croissant à la périphérie des follicules tumoraux. (X 100)

E : Les cellules néoplasiques expriment fortement les marqueurs pan B (CD20/L26). (X 1000)

F : Le tissu interfolliculaire est riche en cellules T réactionnelles exprimant les marqueurs pan T (CD3).(X 100)

G : La protéine Bcl2 est hyperexprimée dans les follicules tumoraux. (X 100)

H : Les cellules lymphomateuses expriment également la protéine Bcl6. (X 100)

1.1.5.4. LE DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL :

Les deux principaux diagnostics différentiels des lymphomes folliculaires sont l'hyperplasie folliculaire lymphoïde réactionnelle et le lymphome du manteau dans sa forme nodulaire (**Tableau n°3**). Les autres diagnostics à évoquer correspondent aux proliférations lymphoïdes d'architecture nodulaire et sont résumés dans le **tableau n°4**.

1.1.5.4.1. L'hyperplasie lymphoïde folliculaire :

Les caractères histologiques les plus significatifs en faveur du lymphome folliculaire sont :

- ✓ la distribution régulière et uniforme des follicules dans toute l'étendue du ganglion,
- ✓ leur disposition dos à dos avec peu de tissu interfolliculaire,
- ✓ la disparition de la couronne périfolliculaire,
- ✓ une composition cytologique différente avec une disparition des macrophages à corps tingibles et une plus grande richesse en petites cellules lymphoïdes clivées,
- ✓ la présence dans le tissu interfolliculaire de cellules possédant les mêmes caractères cytologiques que les cellules intrafolliculaires.

L'étude immunohistochimique aide à résoudre les cas difficiles : la monotypie des cellules B intrafolliculaires, l'accumulation des cellules T au contact des follicules sont des éléments évocateurs d'un lymphome folliculaire.

Enfin, l'expression de la protéine Bcl2 par les cellules des follicules lymphoïdes, permet de porter le diagnostic de lymphome folliculaire.

1.1.5.4.2. **Le lymphome à cellules du manteau :**

Le lymphome à cellules du manteau est caractérisé par une prolifération de cellules lymphoïdes de taille moyenne à noyau irrégulier ou indenté, formant d'épais manteaux autour de centres germinatifs persistants, non tumoraux, de morphologie normale, atrophiques ou hypertrophiques. Les nodules sont souvent plus volumineux que ceux des lymphomes folliculaires à petites cellules. Les cellules tumorales ont un phénotype proche de celui des lymphocytes normaux de ce territoire : elles possèdent en particulier une immunoglobuline D de surface et expriment le CD5, la cycline D1 et le CD43.

| | Hyperplasie lymphoïde folliculaire | Lymphome folliculaire | Lymphome du manteau de type nodulaire |
|-------------------------------------|--|---|--|
| Caractéristiques | | | |
| Architecture | Conservée | Détruite | Détruite |
| Follicules : | | | |
| Taille | Variable | Relativement constante | Souvent volumineux |
| Forme | Variable | Souvent régulière | |
| Densité | Faible | Elevée | |
| Centres germinatifs : | | | |
| Couronne | Bien visible | Souvent absente | Hyperplasique (tumorale) |
| Cytologie | Polymorphe | Souvent monomorphe (centrocytes > centroblastes) | Cellules petites clivées et rondes |
| | Nombreuses mitoses | Mitoses rares ou peu nombreuses | Mitoses rares |
| | Phagocytose +++ | Phagocytose absente | |
| Tissu interfolliculaire : | | | |
| Abondance | Abondant | Peu abondant | Souvent absent |
| Cytologie | Polymorphe Cellules réactionnelles | Parfois monomorphe Cellules néoplasiques, parfois mêlées aux cellules réactionnelles | |
| Follicules | | | |
| Cellules folliculaires dendritiques | Réseau régulier | Réseau régulier ou dissocié | Cellules dispersées ou réseau dissocié |
| Couronne ou manteau | polytypique | Souvent absente ou monotypique | monotypique CD5+, CD23-, CD43+ |
| Centre :cellules B | polytypiques Bcl2- CD10- CD5-, CD23-, CD43- | monotypiques Bcl2+ CD10+ CD5-, CD23-, CD43- | Centres germinatifs résiduels normaux Bcl2- |

Tableau n°3 : Le diagnostic différentiel des lymphomes folliculaires : critères morphologiques et immunohistochimiques. D'après SOLAL-CELIGNY (170).

| Diagnostic supposé | Population intra-nodulaire | Population inter-nodulaire | IHC paraffine (nodules) | IHC congélation (nodules) | Cytogénétique (anomalies potentielles) | Biologie moléculaire |
|-----------------------------------|--|---|--|---|--|----------------------|
| L.centro-folliculaire | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Petites cellules clivées ✎ Grandes cellules (centroblastes) ✎ Mitoses et macrophages rares ✎ Pas de centre germinatif (CG) | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Zone du manteau amincie ou absente ✎ Lymphocytes normaux ou petites cellules clivées | Bcl2+ CD43- CD5- | CD10+ CD5- Monotypique | t(14 ;18) | R Bcl2 RIg |
| Hyperplasie folliculaire | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Petites et grandes cellules ✎ Mitoses et macrophages nombreux | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Manteau intact ✎ Lymphocytes normaux ✎ Immunoblastes, histiocytes | Bcl2- CD43- | CD5- | Aucune | Aucun R |
| Tumeur de Castleman | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Idem avec pénétration de vaisseaux et dépôts de hyalinose | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Idem avec nombreux vaisseaux et plasmocytes | Bcl2- CD43- CD5- | Polytypique | | |
| L. du manteau | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Cellules petites à moyennes ✎ Noyau rond ou clivé ✎ Rares grandes cellules ✎ Macrophages rares ✎ Mitoses variables ✎ CG résiduels parfois | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Manteau absent | Bcl2+ (sauf CG résiduels) CD43+ Cycline D+ CD5+ CD23- | CD10- CD5- Monotypique CD23- | t(11 ;14) | R Bcl1 RIg |
| LLC pseudo-nodulaire | Paraimmunoblastes Prolymphocytes | Petits lymphocytes matures | Lymphocytes CD5+CD43+ | Lymphocytes CD23+ | Trisomie 12 | RIg |
| L. des zones marginales | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Cellules moyennes, cytoplasme clair, abondant ✎ Parfois CG résiduels | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Cellules atypiques ✎ Manteau souvent persistant | Bcl2+ (sauf CG résiduels) CD43+/- CD5- CD23- | CD10- CD5- CD23- Monotypie | Trisomie 3 | RIg |
| Hodgkin type 1 (Popema) | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Petits lymphocytes identiques à ceux du manteau ✎ Histiocytes ✎ Rares grandes cellules à noyau boursoufflé « pop corn » | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Persistance de CG normaux à côté des nodules anormaux | Cellules « Pop-Corn » CD20+ EMA+ CD45+ CD30-,CD15- Petites cellules B>T | Non contributif (polytypie) | Aucune | Aucun R |
| Transformation progressive des CG | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Idem mais pas de cellules « pop corn » | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Lymphocytes normaux ✎ CG colonisés par cellules du manteau | Bcl2+ (sauf CG résiduels) | Polytypie | Aucune | Aucun R |
| Hodgkin type 2 | <ul style="list-style-type: none"> ✎ Granulome inflammatoire, cellules de Sternberg | FIBROSE | Cellules atypiques CD15+ CD30+ CD45- | Non contributif | Anomalies variables | Aucun R |

Abréviations : R : réarrangement

Tableau n°4 : *L'orientation diagnostique devant une prolifération lymphoïde d'architecture NODULAIRE. D'après XERRI (189).*

1.1.5.5. LA TRANSFORMATION HISTOLOGIQUE :

Au cours de leur évolution, les lymphomes folliculaires peuvent se transformer en lymphome de haut grade de malignité (1, 38). Le lymphome transformé et le lymphome folliculaire sont alors issus de la même population clonale (180). Ces lymphomes sont le plus souvent de type diffus centroblastique ou immunoblastique, rarement de type anaplasique.

Cependant, la fréquence de la transformation est difficile à estimer. En effet, il n'existe pas de consensus des anatomo-pathologistes concernant la définition de la transformation, les biopsies ganglionnaires ne sont pas itératives lors de l'évolution clinique et le recours à l'autopsie n'est pas systématique.

La transformation histologique doit donc être suspectée et doit entraîner une nouvelle biopsie ganglionnaire lors de chaque nouvelle poussée évolutive d'un lymphome considéré comme folliculaire (191).

1.1.6. LES ASPECTS CYTOGENETIQUES

1.1.6.1. LA TRANSLOCATION 14 ; 18 :

La translocation $t(14;18)(q32;q21)$ est l'anomalie cytogénétique de structure la plus fréquente dans les LMNH (104, 105, 114, 181). Décrite initialement par FUKUHARA (63) en 1979, puis par YUNIS (192, 193), elle est retrouvée dans 80 % des lymphomes folliculaires et 20 à 30 % des lymphomes diffus à grandes cellules (105). Il s'agit d'une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 14 et 18, intéressant les régions 14q32.3 et 18q21.3. Le point de cassure intéresse en 14q32 le segment J_H du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines et en 18q21 le gène *bcl2* aboutissant ainsi à la

dérégulation de la production de Bcl2. Sa surexpression inhibe l'apoptose et favorise alors le développement de la tumeur.

La translocation (14 ; 18) est retrouvée dans 45 à 90 % des lymphomes folliculaires (179). Sa fréquence est la plus grande dans les lymphomes folliculaires à prédominance de petites cellules (80 %) et la plus faible dans les lymphomes à prédominance de grandes cellules (40%).

Il existe certains cas de lymphomes folliculaires où la translocation n'est pas retrouvée mais où existe une surexpression de la protéine Bcl2 (143). Dans ces cas, d'autres anomalies ont été décrites comme la translocation (8 ; 14) différente de celle des lymphomes de Burkitt ou une duplication 12q ; sans incidence sur la survie (143).

1.1.6.2. LES AUTRES ANOMALIES CHROMOSOMIQUES :

La translocation t(14 ; 18) peut être rencontrée seule ou accompagnée d'autres anomalies chromosomiques (délétion 6q ; trisomie 3, 7, 12, 18 ou 21) (192, 193). Elle est plus souvent isolée dans les lymphomes folliculaires à petites cellules (113). Elle n'est jamais retrouvée de façon isolée dans les lymphomes diffus. De multiples anomalies de nombre et de structure ont été décrites. Leur fréquence augmenterait avec le nombre de grandes cellules présentes (192).

1.1.6.3. LE GENE *bcl2* :

Le gène *bcl2* est l'un des plus longs gènes connus. La découverte de son mode d'action en tant d'inhibiteur de l'apoptose a permis de proposer un nouveau modèle de tumorigenèse (96, 138). Par son mécanisme d'action originale, le gène *bcl2* constitue un membre d'une nouvelle catégorie d'oncogènes : celle des régulateurs de l'apoptose.

Le mécanisme exact par lequel la protéine Bcl2 bloque l'apoptose reste mal connu. Le fait qu'elle inhibe la peroxydation des lipides ainsi que sa localisation au niveau des sites intracellulaires de synthèse de radicaux libres ont fait penser qu'elle pouvait bloquer la mort cellulaire programmée en s'opposant à l'action des radicaux oxygène. Cette hypothèse est remise en question à l'heure actuelle car le gène *bcl2* conserve ses capacités anti-apoptotiques même en situation d'hypoxie (82). Le gène *bcl2* interviendrait également dans la régulation des flux calciques en bloquant le calcium dans le réticulum endoplasmique (48). Enfin, le gène *bcl2* semble capable de conduire les cellules hors du cycle cellulaire (en G0) et de retarder le passage de G1 en S (128).

1.1.7. LES CLASSIFICATIONS HISTOLOGIQUES :

1.1.7.1. LES ANCIENNES CLASSIFICATIONS :

De très nombreuses classifications des lymphomes malins non hodgkiniens (LMNH) ont été proposées. Les classifications de RAPPAPORT en 1966, de LENNERT en 1967 et de KIEL-LENNERT (108) en 1978 se sont succédées.

En 1982, le « National Cancer Institute » a subventionné une étude ayant pour but d'évaluer l'intérêt clinique et pronostique des classifications existantes. C'est ainsi qu'est née la « Working Formulation » (WF) qui n'est pas une classification mais une formulation internationale à usage clinique (FIUC) (**Tableau n°5**). Elle individualise en particulier des lymphomes folliculaires de faible malignité : (B : à petites cellules ; C : mixte à petites et grandes cellules) et les lymphomes folliculaires de malignité intermédiaire (D : folliculaire à grandes cellules). La WF n'est pas fondée sur l'existence d'entités mais se contente de regrouper des tumeurs avec des survies apparemment

identiques et dont les cellules ont la même taille mais sont de phénotype (B ou T) souvent très différent.

L'essor des techniques immunohistochimiques, le développement des anticorps monoclonaux et l'utilisation courante des techniques de biologie moléculaire comme la PCR ont profondément transformé l'approche des LMNH et ont fourni la mise en place d'une nouvelle classification en 1994 : la REAL (Revised European American classification of Lymphoid neoplasme) (72). Après la parution de la REAL, l'OMS a décidé de soutenir la mise en place d'une classification des hémopathies malignes qui est acceptée par les pathologistes et les hématologistes. Ce projet a été finalisé lors d'une réunion qui s'est tenue à Washington en 1997 et qui a abouti à la classification OMS en 1999 (83). Celle-ci est très complète mais très proche de la REAL. Elle détermine des entités définies sur des critères morphologiques, cliniques, immunologiques et de génétique moléculaire.

Ainsi, les lymphomes folliculaires sont réunis dans le même groupe selon la REAL ou la WF et subdivisés en trois grades selon la richesse en grandes cellules.

| | |
|-------------|--|
| Grade I : | A prédominance de petites cellules (< à 5 % de centroblastes). |
| Grade II : | Mixte, petites et grandes cellules (5 à 50 % de centroblastes). |
| Grade III : | A prédominance de grandes cellules (> à 50 % des centroblastes). |

La nouvelle classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) réalisée en 1999 (71) affirme un changement de nomenclature, le lymphome centrofolliculaire devenant lymphome folliculaire.

Trois grades cytologiques sont décrits suivant la richesse en centroblastes :

| | |
|-----------|---------------------------|
| Grade 1 : | < à 5 % de centroblastes |
| Grade 2 : | 6 à 15 % de centroblastes |
| Grade 3 : | > à 15 % de centroblastes |

L'existence de zones diffuses doit également être rapportée en utilisant par exemple les critères de la REAL :

| | |
|-----------|----------------------------------|
| Grade 1 : | > à 75 % de zones folliculaires |
| Grade 2 : | 25 à 75 % de zones folliculaires |
| Grade 3 : | < à 25 % de zones folliculaires |

| | | | |
|--------------------------------|---|--|--|
| Faible malignité | A | Petits lymphocytes | <ul style="list-style-type: none"> • Leucémie lymphoïde chronique • Lymphoplasmocytoïde |
| | B | Folliculaire à petites cellules | <ul style="list-style-type: none"> ± Zones diffuses ± Fibrose |
| | C | Folliculaire mixte, à petites et grandes cellules | <ul style="list-style-type: none"> ± Zones diffuses ± Fibrose |
| Malignité intermédiaire | D | Folliculaire à grandes cellules | <ul style="list-style-type: none"> ± Zones diffuses ± Fibrose |
| | E | Diffus à petites cellules clivées | <ul style="list-style-type: none"> ± Fibrose |
| | F | Diffus mixte, à petites et grandes cellules | <ul style="list-style-type: none"> ± Fibrose ± Composante épithélioïde |
| | G | Diffus à grandes cellules clivées ou non clivées | <ul style="list-style-type: none"> ± Fibrose |
| Malignité élevée | H | Grandes cellules immunoblastiques | <ul style="list-style-type: none"> • Plasmocytoïde • Cellules claires • Polymorphe • Composante épithélioïde |
| | I | Lymphoblastique | <ul style="list-style-type: none"> • A noyaux convolutés • A noyaux non convolutés |
| | J | A petites cellules non clivées : <ul style="list-style-type: none"> • Burkitt • Type Burkitt | <ul style="list-style-type: none"> ± Fibrose |
| Divers | | <ul style="list-style-type: none"> Composite Mycosis fongoïde Histiocytique Plasmocytome extra-médullaire Inclassable Autres | |

Tableau n°5 : Formulation Internationale à Usage Clinique (FIUC, 1981)

1.1.7.2. La classification des syndromes lymphoprolifératifs reconnue par le Groupe International d'Etude des Lymphomes (REAL).

LYMPHOMES B

□ Lymphomes développés à partir des précurseurs lymphoïdes B :

❖ *Lymphomes / leucémies lymphoblastiques B.*

□ Lymphomes développés à partir des lymphocytes B matures :

1. Leucémie lymphoïde chronique B ou lymphome à petits lymphocytes :

- ↳ variante polylimphocytaire
- ↳ variante avec différenciation plasmocytoïde.

2. Lymphome lymphoplasmoïde (maladie de Waldenström) ou immunocytome.

3. Lymphome du manteau.

4. Lymphome centrofolliculaire :

- ↳ **Grade cytologique :**
 - . Grade I : à petites cellules.
 - . Grade II : mixte, à petites et grandes cellules.
 - . Grade III : à grandes cellules.
- ↳ **Sous-type :**
 - . Diffus, à prédominance de petites cellules.

5. Lymphome B des zones marginales :

- ↳ **Extraganglionnaire :**
 - . Lymphome de faible malignité du MALT.
- ↳ **Ganglionnaire :**
 - . Lymphome B à cellules monocytoïdes.

6. Lymphome splénique de la zone marginale avec ou sans lymphocytes villeux.

7. Leucémie à tricholeucocytes.

8. Plasmocytome / Myélome.

9. Lymphome diffus à grandes cellules B :

- ↳ **variante :**
 - . Lymphome diffus à grandes cellules B du médiastin.

10. Lymphome de Burkitt.

11. Lymphome B de haut grade de type Burkitt (« Burkitt-like »).

LYMPHOMES T et LYMPHOMES A CELLULES NK

- Lymphomes développés à partir des précurseurs lymphoïdes T :
❖ *Lymphomes / leucémies lymphoblastiques T.*

- Lymphomes développés à partir des lymphocytes T matures et des cellules NK :

1. *Leucémie lymphoïde chronique chronique à cellules T / leucémie prolymphocytaire.*

2. *Leucémie à grands lymphocytes à grains (LGL) du type T ou NK.*

3. *Mycosis fungoides / Syndrome de SEZARY.*

4. *Lymphome T Périphérique :*

- ↘ à cellules de taille moyenne,
- ↘ mixte, à cellules de taille moyenne et grande,
- ↘ à grandes cellules,
- ↘ à cellules lymphoépithélioïdes.

Sous-type :

- ↘ Hépatosplénique gamma-delta,
- ↘ Panniculite sous-cutanée.

5. *Lymphome T angio-immunoblastique (AILD)*

6. *Lymphome T angiocentrique :*

- ↘ Atteinte faciale : granulome centrofacial,
- ↘ Atteinte pulmonaire : granulomatose lymphocytoïde.

7. *Lymphome T intestinal (avec ou sans entéropathie associée)*

8. *Leucémie / Lymphome de l'adulte à cellules T (ATL/L).*

9. *Lymphome anaplasique à grandes cellules CD30+ (de phénotype T ou nul)*

- ↘ systémique,
- ↘ cutané primitif.

10. *Lymphome anaplasique à grandes cellules de type HODGKIN.*

MALADIE DE HODGKIN

- Prédominance lymphocytaire (paragranulome).
- Sclérose nodulaire.
- Cellularité mixte.
- Déplétion lymphocytaire.
- Maladie de Hodgkin de type classique riche en lymphocytes.

1.1.7.3. La classification des lymphomes malins et des leucémies lymphoïdes proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1999 (71).

LYMPHOMES B

□ Lymphomes développés à partir des précurseurs lymphoïdes B :

❖ *Lymphomes / leucémies lymphoblastiques B.*

□ Lymphomes développés à partir des lymphocytes B matures :

- ↘ Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire
- ↘ Leucémie prolymphocytaire.
- ↘ Lymphome lymphoplasmocytaire
- ↘ Lymphome splénique de la zone marginale (lymphocytes villeux +/-)
- ↘ Leucémie à tricholeucocytes.
- ↘ Myélome/plasmocytome.
- ↘ Lymphome extra-ganglionnaire développé à partir de la zone marginale du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (lymphome de type MALT).
- ↘ Lymphome ganglionnaire de la zone marginale (lymphome B monocytoïde)
- ↘ Lymphome folliculaire
- ↘ Lymphome du manteau
- ↘ Lymphome B diffus à grandes cellules :
 - > lymphome B du médiastin
 - > lymphome B des séreuses
- ↘ lymphome de Burkitt

LYMPHOMES T et NK

□ Lymphomes développés à partir des précurseurs lymphoïdes T :

❖ *Lymphomes / leucémies lymphoblastiques T.*

□ Lymphomes développés à partir des lymphocytes T matures et des cellules NK :

- ↘ Leucémie prolymphocytaire
- ↘ Leucémie à grands lymphocytes granuleux (LGL)
- ↘ Leucémie à cellules NK
- ↘ Lymphome / leucémie de l'adulte associé au virus HTLV1
- ↘ Lymphome NK / T extra-ganglionnaire de type nasal
- ↘ Lymphome intestinal de type « associé à une entéropathie ».
- ↘ Lymphome hépato-splénique γ/δ .
- ↘ Lymphome T sous-cutané de type panniculite.
- ↘ Mycosis fungoïdes / Syndrome de Sézary

- ↘ Lymphome anaplasique à grandes cellules T ou Nul de type cutané primitif
- ↘ Lymphome T périphérique (sans autre spécification)
- ↘ Lymphome T angio-immunoblastique.
- ↘ Lymphome anaplasique à grandes cellules T ou Nul de type systémique.

LYMPHOME DE HODGKIN (MALADIE DE HODGKIN)

□ Lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire nodulaire

□ Lymphome de Hodgkin classique :

- ↘ *Lymphome de Hodgkin scléro-nodulaire (grades 1 et 2).*
- ↘ *Lymphome de Hodgkin classique riche en lymphocytes.*
- ↘ *Lymphome de Hodgkin à cellularité mixte.*
- ↘ *Lymphome de Hodgkin avec déplétion lymphoïde.*

En utilisant les diverses caractéristiques rappelées dans ce chapitre, nous avons constaté que nos cas de LF correspondaient bien à ceux des grandes séries publiées dans la littérature.

1.2. QUELQUES CARACTERISTIQUES DU NERVE GROWTH FACTOR (NGF) ET DE SES RECEPTEURS :

1.2.1. INTRODUCTION :

L'expression des récepteurs des neurotrophines dans les tissus lymphoïdes et hématopoïétiques humains ainsi que celle des récepteurs de la famille Trk au niveau du système nerveux central ont récemment été étudiées en particulier par DORFMAN (51) puis par LABOUYRIE (98) et MERLIO (129).

Les neurotrophines sont des polypeptides constituant un groupe de facteurs neurotrophiques indispensables à la différenciation du système nerveux au cours du développement ainsi qu'à la survie des neurones chez l'adulte (28). Les effets de ces facteurs de survie seraient indispensables, non seulement pour le développement normal et le maintien du système nerveux, mais également pour assurer sa capacité à répondre en cas de lésion. La famille des neurotrophines comporte différents membres, le Nerve Growth Factor (NGF), le Brain Derived Growth Factor (BDNF), la neurotrophine 3 (NT-3), la neurotrophine 4/5 et la neurotrophine 6 (NT-6).

Le NGF est le chef de file de la famille des neurotrophines. Il a été isolé à partir de venin de serpent puis dans la glande sous-maxillaire de souris et identifié comme étant une substance diffusible capable de stimuler la différenciation et la survie de certains neurones sympathiques et sensoriels (28, 111, 188). Au niveau du système nerveux central, le NGF est impliqué dans la survie et le maintien de la fonction des neurones cholinergiques du cerveau antérieur basal (56). Les neurotrophines activent spécifiquement des récepteurs situés à la

surface de cellules cibles dépendantes. Ces récepteurs sont de deux types : le p75^{NTR} (Low-Affinity-Nerve Growth Factor) également appelé « Neurotrophin Receptor », protéine de 75kD (32), et les récepteurs tyrosine kinase de la famille Trk « Tropomyosin-related kinase » possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque, TrkA, TrkB et TrkC. Le récepteur p75^{NTR} possède des homologies dans ses domaines extracellulaires avec le CD40 et l'OX40. Ces molécules, exprimées par les cellules du système immunitaire, pourraient être des récepteurs de basse affinité des neurotrophines (32). Les molécules de type Trk, récepteurs de haute affinité, ont des activités tyrosine kinase et possèdent un domaine catalytique cytoplasmique responsable de la transduction du signal et des effets biologiques (91).

Nous rappelons ici quelques aspects de la structure, de la fonction et de la distribution du NGF et de ses deux récepteurs dans les tissus normaux et pathologiques. Ils sont en effet impliqués dans de nombreuses pathologies. Dans ce travail, nous étudierons leur expression dans les L.F.

1.2.2. LE NGF :

1.2.2.1. Sa structure :

Le NGF est constitué de trois sous-unités α , β et γ dont seule la fraction β est responsable de l'activité biologique. Le gène du NGF est situé sur le bras court du chromosome 1. La sous-unité β , dimère de 118 acides aminés est communément appelée NGF. Grâce à la synthèse d'oligonucléotides construits à partir de la séquence protéique du NGF de souris, l'isolement du cDNA du NGF a été possible chez la souris puis chez l'homme (182). La séquence protéique comprend un pré-pro-

NGF de 307 acides aminés. Le clivage C-terminal de la protéine libère le NGF mature de 118 acides aminés (182).

1.2.2.2. Sa fonction et sa distribution :

□ Dans les tissus normaux :

Au niveau du système nerveux central, les transcrits du NGF prédominent dans l'hippocampe et le cortex (164) qui sont les principales cibles de l'innervation cholinergique. L'étude en hybridation *in situ* a montré que la biosynthèse du NGF était neuronale (101).

Au niveau du système nerveux périphérique, la biosynthèse du NGF est effectuée par le tissu cible de l'innervation. Elle est suivie d'un transport rétrograde intraneuronal (43). La quantité de NGF est proportionnelle à la densité de l'innervation sympathique (163). Le NGF permet la survie des neurones sympathiques et sensoriels dérivés des crêtes neurales et des ganglions rachidiens (111) ainsi que la différenciation et la prolifération cellulaire des tissus périphériques. Au niveau cutané, il stimule la croissance kératinocytaire (46).

Les ARN messagers de NGF et p75^{NTR} ont été retrouvés par Northern Blot au niveau du myocarde, de la prostate, du placenta et du rein alors que les ARN messagers de TrkA n'étaient pas retrouvés à ce niveau (118).

Dans le tissu hématopoïétique et lymphoïde, le NGF induit la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, la prolifération et la différenciation des précurseurs granuleux, la prolifération des lymphocytes T et B (89). Il augmente l'activité cytotoxique des monocytes, l'expression des récepteurs à l'interleukine 2 au niveau des lymphocytes T murins ainsi que la synthèse d'immunoglobulines par les lymphocytes B (23, 24). Le NGF est exprimé dans les cellules

réticulaires interdigitées thymiques (141). Il est synthétisé, *in vitro*, par les mastocytes et par les lymphocytes T CD4+ (100). Dans les cellules épithéliales, il est exprimé par les cellules épithéliales thymiques (141), les cellules basales conjonctivales (17) et les kératinocytes des couches basales (44).

□ Dans les tissus pathologiques :

Dans le système nerveux central, une expression élevée de TrkA et de NGF est observée dans le cortex frontal de patients atteints de démence du SIDA et de démence vasculaire (18, 124). Le NGF serait impliqué dans la pathogénie de l'insensibilité congénitale à la douleur associée à l'anhidrose, neuropathie sensitive, à transmission autosomique récessive. En effet, l'anomalie génique se situerait au niveau du gène codant pour le récepteur tyrosine kinase (177).

Le NGF est une molécule impliquée dans la pathologie immuno-allergique. Les mastocytes synthétisent NGF et des niveaux sériques élevés de NGF sont corrélés avec la quantité de mastocytes présents dans les conjonctives de patients atteints de kératoconjonctivites immuno-allergiques (17).

Des niveaux élevés de NGF, corrélés à la sévérité de l'atteinte, ont également été observés dans le sérum et le liquide de lavage broncho-alvéolaire de patients asthmatiques (17, 19, 20).

Un nouveau membre de la famille Trk, appelé TrkE, également retrouvé dans les acini pancréatiques serait exprimé par les cellules des couches épidermiques basales (45). Le NGF serait également le ligand préférentiel de TrkE et stimulerait la croissance kératinocytaire par un mécanisme autocrine (46). Les kératinocytes des couches basales épidermiques expriment les deux récepteurs du NGF et une hyperexpression de TrkA est observée dans certaines dermatoses comme le psoriasis (147). La stimulation, *in vitro*, des cellules basales

épidermiques par le NGF serait impliquée dans les dermatoses avec hyperplasie épidermique (44).

Le NGF est également impliqué en pathologie cancérologique. Dans une lignée de cellules de carcinome bronchique et de glioblastome humain, l'expression du NGF et de son récepteur TrkA entraînerait la croissance cellulaire mais l'administration d'anti-NGF neutraliserait la croissance de ces cellules (139).

Le NGF interviendrait dans la constitution du micro-environnement, de la stroma réaction et de l'invasion des cellules tumorales du mélanome en compagnie d'autres facteurs de croissance comme le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ou le Tumor Growth Factor (TGF- β). Exprimé par les cellules mélanocytaires malignes, il agirait, par un mécanisme paracrine, sur l'angiogenèse, la stroma réaction, la réponse immunitaire, l'activation des enzymes protéolytiques, les molécules d'adhésion et le développement des métastases (102). Par les mêmes mécanismes, il stimulerait, *in vitro*, la prolifération kératinocytaire dans les carcinomes cutanés (44).

1.2.3. LES RECEPTEURS DU NGF :

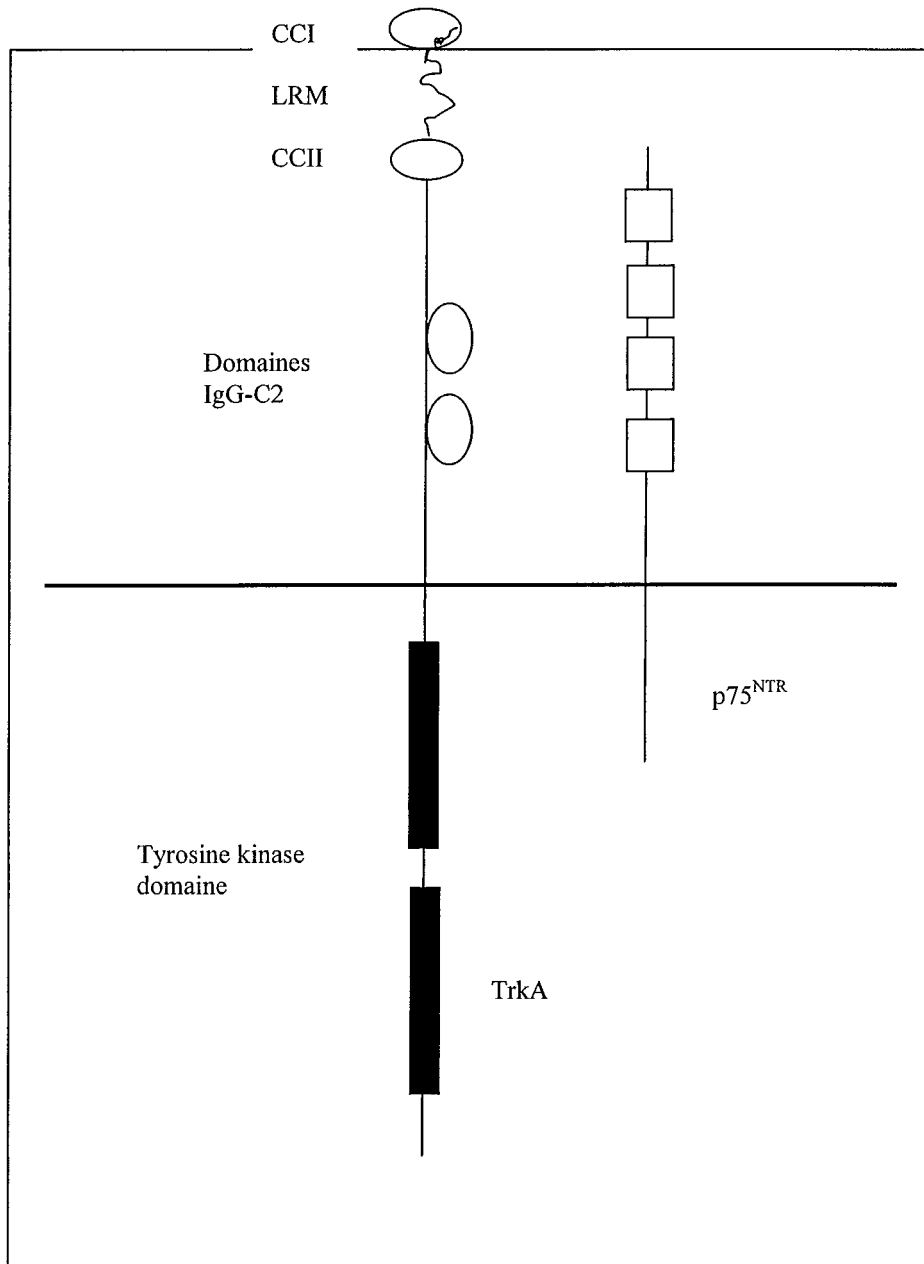
1.2.3.1. Le récepteur p75^{NTR} :

Le récepteur p75^{NTR} est un récepteur de faible affinité commun à l'ensemble des neurotrophines. Il a été cloné et séquencé chez l'homme (86) et le gène codant pour ce récepteur est situé au niveau du chromosome 17 (151).

1.2.3.1.1. Sa structure :

Le récepteur p75^{NTR} est constitué d'une seule chaîne polypeptidique transmembranaire de 75 kD (**figure n°4**). Son domaine extramembranaire possède quatre régions riches en résidus cystéine caractéristiques d'une famille de récepteurs membranaires de surface comprenant, notamment, les récepteurs de type I et II du TNF (Tumor Necrosis Factor), l'antigène de surface Fas (impliqué dans les phénomènes d'apoptose), les antigènes de surface des lymphocytes CD30 et CD40 (54) et l'antigène CD27. La région extracytoplasmique, riche en résidus cystéine, est responsable de la reconnaissance du ligand (187). La portion cytoplasmique est courte, ne possède aucun motif particulier et aucune analogie de séquence avec d'autres molécules connues.

Chez l'homme, trois isoformes solubles tronquées du récepteur p75^{NTR} ont été décrites : NGFRt-1, NGFRt-2 et NGFRt-3, respectivement de 45 kD, 40 kD et 35 kD qui ont été isolées dans le milieu de culture d'une lignée de mélanome, dans l'urine et le liquide amniotique (194).



Légende :

LRM : Région riche en résidus leucine.

CCI, CCII : Domaines riches en résidus cystéine du récepteur TrkA.


 : Domaines riches en résidus cystéine du récepteur p75^{NTR}.

Figure n°4 :

Les récepteurs du NGF : TrkA et p75^{NTR}, d'après CHAO (32).

1.2.3.1.2. Sa fonction et sa distribution :

□ Dans les tissus normaux :

Le récepteur p75^{NTR} se lie avec des affinités comparables à tous les membres de la famille des neurotrophines mais il ne peut lier NGF avec une haute affinité en l'absence de TrkA (91). Le rôle de p75^{NTR} dans les interactions entre les neurotrophines et leurs récepteurs reste obscur.

Le récepteur p75^{NTR} serait impliqué au cours du développement du système nerveux périphérique. Ainsi des souris porteuses de mutations nulles du gène codant pour p75^{NTR} ont un déficit au niveau du système nerveux périphérique sensoriel avec innervation cutanée réduite et diminution de la sensibilité à la douleur (103, 120). La signification de l'expression du p75^{NTR} pourrait notamment résider dans la formation d'hétérodimères « TrkA - p75^{NTR} » correspondant à l'un des schémas d'activation par le NGF (31). La coexpression au niveau d'une même cellule de récepteurs d'affinité différente a été observée dans le système nerveux central (130). De plus, p75^{NTR} participerait, comme dans le système nerveux central, au recrutement et à la sélection des neurotrophines. Il pourrait aussi, par phénomène de compétition ou de séquestration, augmenter la concentration des neurotrophines dans le milieu, favoriser l'action du NGF ou d'une autre neurotrophine au niveau du récepteur TrkA (32). En effet, il a été montré *in vitro*, que l'altération de la liaison du couple « TrkA - p75^{NTR} » s'accompagnait d'une baisse de la fixation du NGF au niveau du récepteur TrkA. Par ailleurs, il a également été montré que p75^{NTR} possédait un potentiel d'inhibition de l'activité basale du récepteur TrkA, sur cultures de fibroblastes (185).

Récemment p75^{NTR} a été impliqué dans différents mécanismes de signalisation cellulaire. La fonction anti-apoptotique de p75^{NTR} pendant

le développement puis pro-apoptotique en période postnatale pour les neurones sensoriels de souris privées de NGF a été démontrée (8) *In vitro*, dans les cultures de cellules cérébelleuses de rat, en l'absence de NGF, p75^{NTR} induirait la mort cellulaire programmée (150). Dans des cultures de cellules rétinienne de poulet exprimant p75^{NTR} mais non TrkA, le NGF endogène induirait l'apoptose pendant la période embryonnaire (5, 62). La liaison du NGF sur p75^{NTR} déclenche l'hydrolyse de la sphingomyéline et la production de céramide, second messenger lipidique impliqué dans les mécanismes de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire programmée, dans une lignée cellulaire de gliome et dans des fibroblastes transfectés, retardant ainsi la croissance cellulaire (49). L'augmentation de la concentration cellulaire en céramide a été observée avec d'autres cytokines, en particulier avec le TNF α , cytokine participant à la réponse immunitaire et inflammatoire, capable d'induire une activité cytotoxique, une réponse antivirale et une mort cellulaire programmée. Aussi, l'analogie entre p75^{NTR} et les récepteurs au TNF constitue une voie de signalisation commune activant la prolifération, la différenciation ou l'apoptose (31, 156). En l'absence de TrkA, p75^{NTR} activerait le facteur de transcription NF κ B dans des cultures de cellules de Schwann (27) et interviendrait dans les interactions entre cellules épithéliales et mésenchymateuses au cours du développement (160).

Le p75^{NTR} est exprimé dans le système nerveux périphérique et dans le micro-environnement des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes humains. Il est exprimé par les cellules folliculaires dendritiques au niveau des follicules lymphoïdes ganglionnaires (51, 175) et amygdaliens (69), dans les cellules réticulaires interdigitées ganglionnaires et thymiques (99), dans les cellules réticulaires adventitielles médullaires (34), dans les cellules épithéliales médullaires et sous-capsulaires thymiques (142), dans les cellules endothéliales des sinus médullaires ganglionnaires (99) et dans les filets nerveux capsulaires et périvasculaires (69).

□ Dans les tissus pathologiques :

L'expression de p75^{NTR} est augmentée dans les neurites dystrophiques (167).

Le p75^{NTR} faciliterait l'invasion par dégradation enzymatique de la matrice extracellulaire des cellules de mélanome (75). Dans des cultures cellulaires d'une lignée de neuroblastome, l'expression de NGF et de son récepteur p75^{NTR} induirait l'apoptose (97).

Les thymomes agressifs et les carcinomes thymiques, à indice de prolifération élevé, expriment intensément p75^{NTR} en l'absence d'expression de TrkA (141). Il est également exprimé par les cellules folliculaires dendritiques réactionnelles accompagnant les lymphomes du manteau et les lymphomes de Hodgkin de type nodulaire à prédominance lymphocytaire (51).

1.2.3.1.3. Les interactions entre p75^{NTR} et TrkA :

En fait, les fonctions du p75^{NTR} dépendent de la présence du récepteur TrkA et de la quantité limitante de neurotrophines capables ou non de dissocier les hétérodimères « p75^{NTR} – TrkA » ou d'activer le récepteur TrkA au dessus d'un certain seuil (156).

Les fonctions biologiques de p75^{NTR}, encore mal connues, sont mieux expliquées en considérant les situations suivantes :

• **p75^{NTR} augmente la survie et la différenciation cellulaire :**

Lorsque p75^{NTR} et TrkA sont coexprimés, p75^{NTR} renforce l'action biologique de TrkA et se comporte alors comme un facteur anti-apoptotique.

La régulation de la formation de récepteurs de haute affinité par la coexpression de p75^{NTR} et TrkA fournit une explication à la coopération des deux récepteurs pour augmenter la réponse au NGF lors du développement. D'autre part, chaque récepteur peut transmettre le signal de façon indépendante, ceci impliquant que l'action sur la survie cellulaire ou l'apoptose dépend, selon les cas, de l'expression de TrkA, du complexe « p75^{NTR} et TrkA » ou de p75^{NTR}.

⇒ **p75^{NTR} est un récepteur pro-apoptotique actif :**

L'expression isolée de p75^{NTR} dans les neurones cholinergiques induit l'apoptose. L'absence de TrkA expliquerait l'entrée de la cellule dans un processus de mort cellulaire programmée et ceci par l'intermédiaire de l'analogie structurelle du domaine intracytoplasmique de p75^{NTR} avec celui des récepteurs du TNF (Fas en particulier).

En somme, l'effet pro-apoptotique de p75^{NTR} nécessite un certain équilibre entre l'activation et l'inactivation de signaux spécifiques engendrés par certaines molécules comme le céramide, les Caspases, les JNK Kinases, le Bax (facteurs entraînant la mort cellulaire), le Bcl2, le NFκB, la P13 Kinase, les MAP kinases (facteurs entraînant la survie cellulaire) (183).

1.2.3.2. LES RECEPTEURS TYROSINE KINASE DE LA FAMILLE

Trk :

Ils possèdent un domaine catalytique cytoplasmique responsable de la transduction du signal qui entraîne les effets biologiques. Ces protéines ont une structure en trois domaines qui comprend une région extracellulaire, un segment transmembranaire et une région cytoplasmique. La région extracellulaire des récepteurs tyrosine kinase

possède des caractéristiques qui permettent de distinguer les différentes sous-classes de cette famille, une région riche en résidus leucine (LRM) de 24 acides aminés (3 tandems de motifs riches en leucine) flanquée de domaines riches en résidus cystéine (CCI, CCII), suivie de deux domaines dont la structure a une certaine analogie avec celle des immunoglobulines. Ces régions, de type « immunoglobuline » pourraient être responsables de la liaison au ligand et de l'activation du domaine cytoplasmique.

Les récepteurs tyrosine kinase de la famille Trk se lient spécifiquement à une ou plusieurs neurotrophines. Le récepteur Trk ou TrkA fixe préférentiellement le NGF, le récepteur TrkB fixe le BDNF et la NT4/5, le récepteur TrkC fixe uniquement la NT-3. De plus, des interactions croisées surviennent *in vitro*, pour des concentrations élevées de neurotrophines considérées comme non physiologiques : ainsi NT-3 et NT-4 se lieraient au récepteur TrkA. Le récepteur TrkE, exprimé par les kératinocytes, fixerait également NGF (45). Après fixation avec le ligand, les récepteurs tyrosine kinase transmettent les signaux à travers la membrane par un mécanisme biochimique comportant plusieurs étapes : tout d'abord, la dimérisation du récepteur induite par la fixation du ligand, puis l'autophosphorylation du récepteur, initiant la transduction du signal aux protéines intracellulaires cibles qui produisent les effets biologiques.

1.2.3.3. LE RECEPTEUR TrkA :

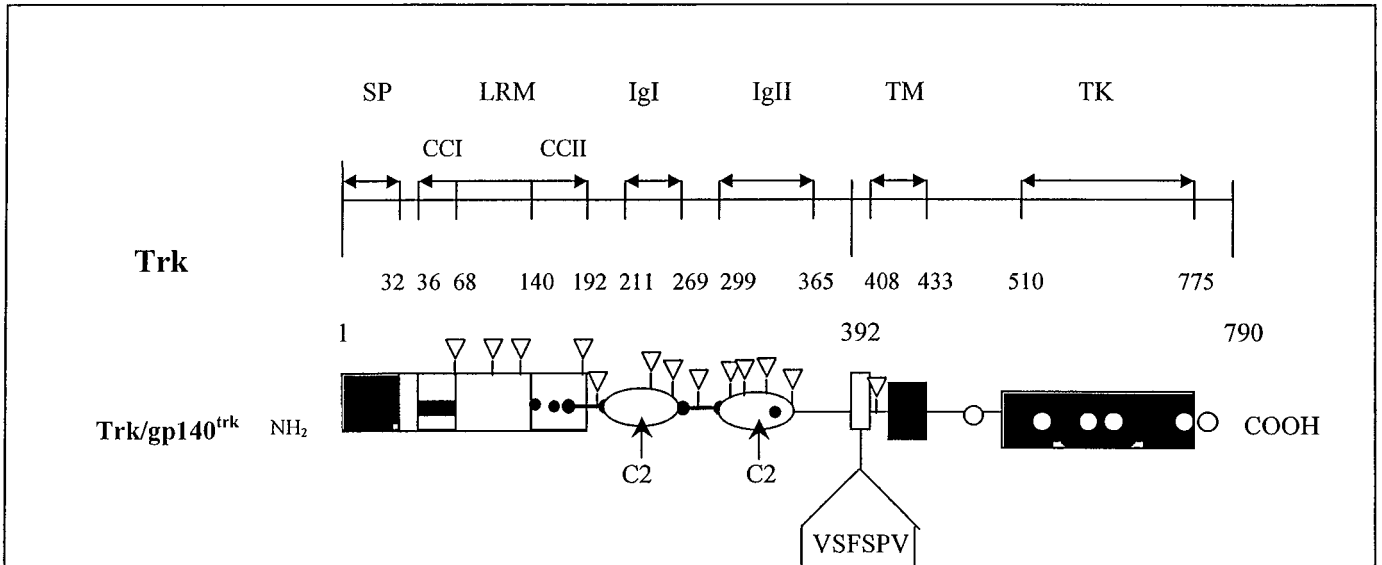
1.2.3.3.1. Sa structure :

Le récepteur Trk ou TrkA (**Figure n°5**) constitue le prototype des récepteurs de la famille Trk. TrkA est le produit du proto-oncogène *trk* et a été initialement identifié comme gène transformant dans une

biopsie de carcinome colique humain (126, 127). Ce nouvel oncogène était activé par un réarrangement somatique entre les séquences codant pour les domaines transmembranaires et tyrosine-kinase de *trkA* et des séquences du gène de la tropomyosine non musculaire. Le proto-oncogène *trkA* a été cloné et séquencé à partir d'une lignée érythroleucémique humaine immature. Après avoir cloné et séquencé les différents récepteurs Trk humains, SHELTON (165) a rapporté une séquence en acides aminés de TrkA divergeant de la séquence humaine initialement publiée (127) par la présence d'une cystéine en position 300, mais identique à celle décrite chez le rat. Le proto-oncogène *trkA*, NTRK1, est situé chez l'homme au niveau du chromosome 1q21-q22 (184). Au niveau du système nerveux central, le proto-oncogène *trkA* code pour un transcrit dont le produit correspond à une protéine native de 796 acides aminés de poids moléculaire 80kD. Après l'épissage, deux protéines de poids moléculaire 140 kD et 110 kD correspondent aux formes glycosylées, fonctionnelles de la protéine.

Plus récemment, deux isoformes catalytiques, de 790 et 796 acides aminés générées par épissage d'un mini-exon et différant uniquement par une insertion de 6 acides aminés dans le domaine extramembranaire, ont été décrites, *trkAI* et *trkAII* (**Figure n°6**) (7). Cette insertion survient, de façon intéressante, à proximité de la région transmembranaire, exactement au niveau du point de cassure observé au niveau de l'oncogène réarrangé *trkA*. Le mini-exon de 18 nucléotides codant pour le segment inséré, ou bien les séquences introniques l'encadrant, pourraient constituer le ou les site(s) de survenue des réarrangements somatiques du gène humain *trk* (7). Si la signification biologique de cet épissage alternatif n'est connue, *trkAI* et *trkAII* ont des propriétés semblables (7). Cependant, il a été démontré que seule l'isoforme *trkAII* pourrait être impliquée dans la reconnaissance et la liaison à la NT-3 (35). Chez le rat, deux nouvelles isoformes de *trkA* ont été mises en évidence dans le thymus, le poumon, le rein et le testicule mais non dans le système nerveux central et correspondent à des

délétions sur le domaine extracellulaire du récepteur au niveau des régions riches en leucine (53).



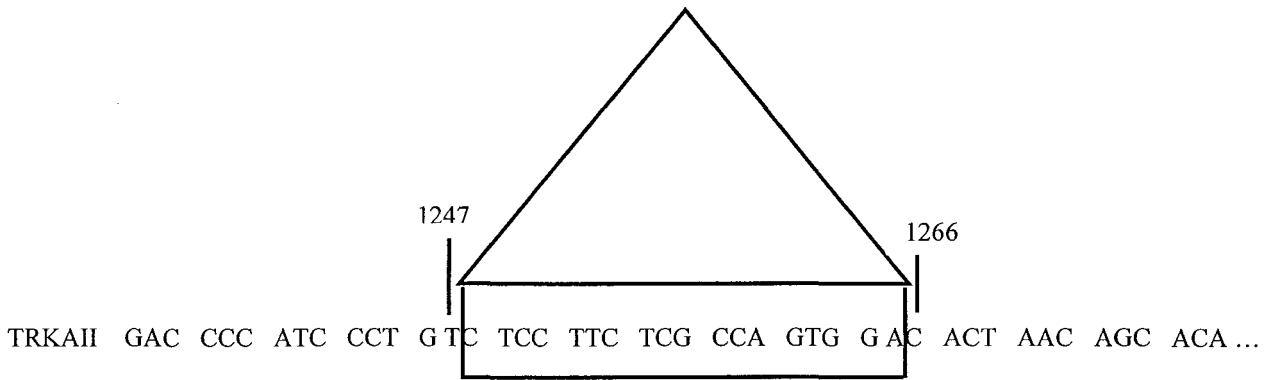
Légende : Le récepteur TrkA/gp140 TrkA comporte : le peptide signal (SP), des régions riches en résidus cystéine (CCI, CCII), un domaine riche en résidus leucine (LRM), des domaines présentant une homologie de structure avec celle des immunoglobulines (IgGI, IgGII), un domaine transmembranaire (TM) et un domaine catalytique tyrosine kinase (TK). Une insertion de 6 acides aminés (VSFSPV) dans le domaine extramembranaire est retrouvée dans l'isoforme TrkAII.

▽ : Sites de N-glycosylation

● : Résidus cystéine

○ : Résidus tyrosine

Figure n°5 : *Le récepteur TrkA/gp140 TrkA. d'après Barbacid. (6).*



Légende : Les deux isoformes catalytiques *trkA*, générées par épissage alternatif, diffèrent dans leurs séquences par la présence d'un mini-exon de 18 nucléotides (cadre). Ce mini-exon, codant pour une insertion de 6 acides aminés et caractérisant l'isoforme « centrale » TrkAII, n'est pas retrouvé au niveau de l'isoforme « périphérique » TrkAI.

Figure n°6 : Les isoformes *trkA*, d'après Barker (7).

1.2.3.3.2. Sa fonction et sa distribution :

□ Dans les tissus normaux :

Par hybridation *in situ*, les transcrits de *trkA* ont été localisés chez le rat au niveau du système nerveux central dans le noyau septohippocampique, le noyau medioseptal la bande diagonale de Broca, la substance innominée, le nucleus basalis de Meynert, dans les noyaux caudés, le putamen, le pallidum, l'accumbens et le striatum (130) et au niveau du système nerveux périphérique dans les ganglions de la racine dorsale et certains ganglions crâniens sensoriels dérivés de la crête neurale (les ganglions des nerfs trijumeaux, supérieurs et jugulaires) (125).

Récemment, grâce à des techniques d'hybridation *in situ* et de RT-PCR, les transcrits *trkA* ont également été identifiés au niveau de l'hippocampe (30).

L'isoforme longue neuronale, *trkAII*, est une isoforme exclusivement retrouvée dans le système nerveux (ganglions sympathiques et de la racine dorsale, ganglions des nerfs trijumeaux (homme) et cerveau (rat)). L'isoforme courte, *trkAI*, retrouvée également dans le système nerveux, est exprimée majoritairement dans les tissus périphériques (rein, poumon) chez le rat (7). Certains modèles cellulaires, comme les cellules de phéochromocytome de rat expriment les deux isoformes (7). Dans le tissu lymphoïde et hématopoïétique humain, TrkA est exprimé par les précurseurs des lignées hématopoïétiques (29, 34, 88, 99), dans les cellules folliculaires dendritiques de ganglions réactionnels (64) et dans les cellules réticulaires interdigitées ganglionnaires et thymiques (141). Il est également retrouvé dans l'épithélium amygdalien, dans les cellules épithéliales médullaires, sous-capsulaires thymiques (99) et dans les cellules basales conjonctivales (17) et épidermiques (147). *In vitro*, il est exprimé dans les monocytes (57), les mastocytes (176), les lymphocytes B et les lymphocytes T activés (58).

□ Dans les tissus pathologiques :

Dans la maladie d'Alzheimer, il existe une nette diminution de l'expression de TrkA par les neurones cholinergiques du nucléus basal de Meynert et du striatum, ceci contribuant à la mort cellulaire de ces neurones cholinergiques (15). Au niveau du striatum de ces patients, l'expression des transcrits de *trkAII* est diminuée par rapport à celle observée chez des patients sans pathologie démentielle (52). Dans le système nerveux périphérique, l'expression de TrkA est diminuée dans les neuropathies diabétiques et celle de p75^{NTR} est augmentée dans les neurites dystrophiques (167).

Un meilleur pronostic des neuroblastomes exprimant TrkA a été rapporté, indiquant un rôle du NGF dans la différenciation tumorale et

l'arrêt de la croissance cellulaire. Dans les neuroblastomes, l'expression des transcrits (22) ou de la protéine TrkA (76) a été corrélée avec un stade peu évolué et un meilleur pronostic. Le pronostic des neuroblastomes coexprimant les transcrits *trkA* et *p75^{NTR}* serait meilleur que celui des neuroblastomes *trkA*⁺/*p75^{NTR}*⁻ (94). Par ailleurs, l'expression des transcrits *p75^{NTR}* a été associée à une amplification de *n-myc* (de pronostic péjoratif) alors que celle de *trkA* était inversement corrélée avec une amplification de *n-myc* (22).

L'activation oncogénique par réarrangement somatique du gène *trkA* a été initialement rapportée dans un adénocarcinome colique, résultant de la fusion entre le gène de la tropomyosine et de la tyrosine kinase (126).

Le réarrangement de *trkA*, également observé dans la moitié des carcinomes thyroïdiens papillaires, était alors associé à un réarrangement de *ret* dans ces mêmes tumeurs. Les oncoprotéines étaient les suivantes : NTRK1, Trk-2h, Trk-T1, Trk-T2 et Trk-3 (16, 146).

L'intense expression de TrkA observée dans les hyperplasies thymiques, au niveau de toutes les cellules épithéliales, y compris les cellules épithéliales corticales, pourrait être liée à une hyperexpression ou à une dysrégulation du récepteur TrkA par les conditions pathologiques. Une intense expression du récepteur TrkA dans les cellules lymphoïdes activées et dans les immunoblastes, dans les tissus inflammatoires et néoplasiques évoque sa participation au processus inflammatoire.

Les thymomes bénins, à indice de prolifération faible possédaient une immunoréactivité TrkA alors que les thymomes agressifs et les carcinomes thymiques, à indice de prolifération élevée, exprimaient intensément *p75^{NTR}* en l'absence d'expression de TrkA (141).

L'expression de TrkA n'a pas été retrouvée dans les LMNH (50) contrairement à l'expression de *p75^{NTR}*, restreinte aux seules cellules folliculaires dendritiques dans des lymphomes d'architecture nodulaire (51). Dans ce cas, l'expression de *p75^{NTR}* était retrouvée dans les seules

cellules folliculaires dendritiques réactionnelles accompagnant le néoplasme. Des LMNH de haut grade et de phénotype B, des lymphomes anaplasiques CD30+ et certains lymphomes de Hodgkin présentaient un phénotype TrkA+/p75^{NTR}- (98).

Tous ces résultats démontrent que NGF, TrkA et p75^{NTR} sont impliqués dans de nombreuses pathologies et en particulier en oncologie, ce qui explique que nous allons étudier l'expression de ces protéines dans les LF.

DEUXIEME PARTIE :

**L'étude anatomo-clinique
de notre série**

2.1. MATERIEL ET METHODES

2.1.1. MATERIEL - LE GROUPE ETUDIE :

Le matériel est constitué des lymphomes folliculaires définis selon les critères du paragraphe 1.1. et recueillis entre 1992 et 2000 dans les services d'Anatomie Pathologique de Monsieur le Professeur PLENAT du C.H.U. de Nancy Brabois et de Monsieur le Professeur de MASCAREL du C.H.U. de Bordeaux.

Les diagnostics anatomo-pathologiques ont été confirmés par une deuxième lecture et par une étude immunohistochimique complémentaire avec l'anticorps anti-CD5 en particulier. Parmi les 40 lymphomes folliculaires répertoriés dans le service d'Anatomie pathologique du C.H.U. de Brabois, deux anciens cas de 1992 se sont avérés être des lymphomes du manteau tandis que 24 autres ont été exclus de l'étude en raison de l'absence de matériel congelé ou de fragment fixé dans du formol à 4% (m/v).

Seuls ont été retenus les cas pour lesquels une partie de la biopsie exérèse ganglionnaire avait été congelée à -80°C et l'autre partie avait été fixée dans du formol à 4% (m/v). Les cas où le matériel concernait une biopsie à l'aiguille ou une masse tumorale non ganglionnaire (localisation ORL, hépatique ou mésentérique) ont été exclus.

Au total, parmi les 25 patients inclus dans notre étude, 14 ont été suivis dans le service d'Hématologie de Monsieur le Professeur LEDERLIN du C.H.U. de Brabois et 11 dans le service d'Hématologie de Monsieur le Professeur MARRIT du C.H.U. de Bordeaux.

2.1.2. METHODE :

2.1.2.1. LE RECUEIL DES DONNEES CLINIQUES :

Les critères cliniques et biologiques de « forte » masse tumorale au moment du diagnostic ont été appréciés pour chaque patient. Ces critères sont les suivants : stade d'Ann Arbor, élévation de la concentration sérique des LDH (valeurs normales comprises entre 210 et 400 UI/L), élévation supérieure à 3 mg/L de la concentration sérique de la β 2-microglobuline (valeurs normales comprises entre 1,1 et 2,4 mg/L), existence de symptômes B, d'une altération de l'état général et d'une « grosse » masse tumorale. A l'exception du stade au moment du diagnostic, ces paramètres n'ont pu être retrouvés dans les observations n°16 et 19 pour lesquelles les dossiers cliniques n'ont pu être consultés.

2.1.2.2. L'ETUDE MACROSCOPIQUE :

Les prélèvements ont été acheminés stérilement et rapidement au laboratoire d'Anatomie Pathologique (un quart d'heure à une demi-heure en moyenne à Nancy). Toutes les manipulations ont été effectuées de façon stérile (port de gant, lames de bistouri stériles). Les ganglions ont été coupés selon leur plus grand axe. Un petit fragment, prélevé dans une zone tumorale non nécrotique, a été placé dans un cryotube, lui-même plongé dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide ; la conservation du matériel étant assurée dans des congélateurs à -80°C dont les éventuelles variations de température (coupure d'électricité sur le réseau, défaillance d'un groupe électrogène) sont signalées par des alarmes.

L'autre partie du ganglion a été fixée dans du formol à 4% (m/v) dilué dans un tampon phosphate 0,1M pH 7,4. Si la quantité de matériel le

permettait, un fragment a également été fixé dans du liquide de Bouin alcoolique.

2.1.2.3. L'ETUDE HISTOLOGIQUE:

Après une fixation de 16 heures, les prélèvements ont été inclus dans la paraffine dans un automate de type V.I.P. (Tissue-Tek). Ils ont ensuite été débités en coupes de 5 μm d'épaisseur et montés soit sur des lames ordinaires à l'eau albumineuse, soit sur des lames « Superfrost » à l'eau distillée. 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'alcool de concentration décroissante, puis dans de l'eau courante et enfin colorées à l'H.E.S. (hémateïne-éosine-safran) avant le montage de la lamelle à l'Eukitt (Labonord). L'imprégnation argentique de la réticuline a été réalisée suivant la méthode du Gordon-Sweet.

2.1.2.4. L'ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE:

La composition des différents tampons, des gels de polymérisation, des milieux de montage et de révélation est indiquée en **annexe (page n°189)**.

Douze anticorps dont les caractéristiques sont détaillées dans le **tableau n°6** ont été testés dans chaque cas.

| Anticorps primaires | Monoclonal | | Référence du | | Prétraitement |
|---------------------|------------|-------------|--------------|----------|---------------------|
| | Polyclonal | Clone | produit | Dilution | |
| CD3 | P | | Dako | 1/600 | C.M. 7 min |
| L26 | M | L26 | Dako | 1/1600 | C.M. 7 min |
| CD5 | M | 4C7 | Novocastra | 1/60 | C.M. 7 min |
| CD10 | M | 56C6 | Novocastra | 1/20 | C.M. 7 min |
| CNA42 | M | CNA42 | Dako | 1/200 | C.M. 7 min |
| Bcl2 | M | Bcl2/100/D5 | Novocastra | 1/50 | C.M. 7 min |
| Bcl6 | M | PG-B6p | Dako | 1/10 | C.M. 7 min |
| P53 | M | D07 | Dako | 1/10000 | C.M. 7 min |
| Mib1 | M | Mib1 | Immunoteck | 1/800 | C.M. 7 min |
| TrkA | P | | Santa Cruz | 1/30000 | C.M. 7 min |
| | | | | | Trypsine 0,1% (m/v) |
| P75 ^{NTR} | M | 8211 | Boehringer | 1/10 | 10 min à 37°C |
| NGF | P | | Santa Cruz | 1/800 | C.M. 7 min |

Légende : C.M. : Cocotte Minute M : Monoclonal P : Polyclonal.

Tableau n°6 : Les caractéristiques des anticorps utilisés dans notre étude.

2.1.2.4.1. La technique immunohistochimique en trois couches faisant appel au couple streptavidine-biotine :

La technique de mise en évidence indirecte des anticorps primaires fait appel à un anticorps biotinylé anti-IgG de souris ou de lapin, suivant l'espèce d'origine de l'anticorps primaire, puis à une streptavidine peroxydase.

Après séchage à l'étuve à +37°C pendant deux heures, les coupes montées sur des lames Superfrost sont déparaffinées dans trois bains

successifs de toluène, réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante, puis dans de l'eau du robinet.

Un prétraitement des coupes visant à inverser la fixation formolée est effectué. Pour ce faire, les lames rangées sur un support métallique sont immergées dans un litre de tampon citrate 10mM, pH 6,0 porté à ébullition dans une cocotte minute dont le couvercle a été refermé. Lorsque la vapeur s'échappe par la soupape, un temps de 7 minutes est décompté. Les lames sont ensuite immédiatement plongées dans de l'eau du robinet pour les refroidir (1 minute) puis dans un tampon phosphate salé pH 7,6 contenant du Tween (PBS-Tween).

Chaque image est encerclée par un film de silicone, afin de limiter l'écoulement des solutions d'incubation, responsable d'un dessèchement des tissus.

Tous les rinçages sont réalisés à la pissette avec un tampon PBS-Tween.

Les anticorps primaires dilués dans du tampon PBS-Tween sont déposés aux concentrations citées dans le **tableau n°6** et incubés en chambre humide à 4°C pendant une nuit.

Après rinçage, les coupes sont recouvertes, pendant une heure en chambre humide, d'une solution d'anticorps secondaire conjugué à la biotine (chèvre anti-IgG de souris, réactif Dako E 433 pour les monoclonaux et chèvre anti-IgG de lapin, réactif Dako E 432 pour les polyclonaux), tous deux dilués au 1/200^{ème} dans du tampon PBS-Tween.

Après un nouveau rinçage, l'inhibition de l'activité peroxydasique endogène est réalisée par l'incubation des coupes pendant 15 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 6% (v/v) dans l'eau déminéralisée.

Après lavage, les coupes sont incubées une heure à température ambiante dans une solution de streptavidine peroxydase (réactif Dako P397) diluée au 1/200^{ème} dans du tampon PBS-Tween.

Après rinçage, l'activité peroxydasique est enfin révélée par la technique classique au tétrahydrochlorure de di-aminobenzidine (DAB Alrich 26.189-0). Le milieu de révélation est préparé en dissolvant successivement 6 mg de DAB, 200 µL de « MR 50X peroxydase » et 18µL d'H₂O₂ à 6% (v/v) dans 9,8 mL d'un tampon Tris-HCl 1M, pH 7,6. La révélation est contrôlée au microscope et arrêtée par immersion de la lame dans du tampon PBS-Tween.

Les coupes sont contre-colorées à l'hématéine de Harris diluée au 1/2 pendant 20 secondes puis rincées à l'eau courante et bleuies dans du tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8.

Après déshydratation dans l'éthanol et passage dans le toluène, les lamelles sont montées à l'Eukitt.

Des contrôles positifs (tissu de spécificité connue pour chaque anticorps) et négatifs (omission de l'anticorps primaire) sont réalisés parallèlement pour chaque série de lames étudiées.

Ce protocole a été utilisé pour une majorité d'anticorps (CD3, L26, CD5, CD10, CNA42, P53, Mib1, Bcl2 et Bcl6). Devant la négativité des signaux obtenus, il a dû être modifié pour TrkA, NGF et p75^{NTR}.

Les modifications suivantes ont donc été testées.

□ Modification de l'inversion de la fixation formolée par la trypsine :

✓ Le démasquage antigénique par digestion trypsine :

Après séchage à l'étuve à +37°C pendant deux heures, les coupes montées sur des lames Superfrost sont déparaffinées dans trois bains successifs de toluène, réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante, puis dans de l'eau courante.

Les lames sont ensuite immergées dans une solution de trypsine à 0,1% (m/v), 200 U FIP (Fédération Internationale)/g, pH 7,8 dans du CaCl₂ à 0,4% (m/v) pendant 10 minutes. Après rinçage dans un tampon PBS-Tween, la suite de la méthode est identique à ce qui a été décrit précédemment.

✓ Une association d'un prétraitement thermique suivi d'une digestion trypsine a également été testée (succession des deux méthodes décrites précédemment).

□ Modification du procédé de fixation :

Devant les difficultés rencontrées pour détecter le NGF sur le prélèvement fixé dans du formol à 4% (m/v) et inclus dans la paraffine, la technique a également été réalisée sur coupes de tissus congelés non fixés.

Les prélèvements sont coupés au cryostat à 5 µm et déposés sur des lames Superfrost puis immédiatement fixés pendant 10 minutes dans une solution de formaldéhyde à 4% (v/v) préparé par hydrolyse de paraformaldéhyde.

Après rinçage à la pissette dans du tampon PBS-Tween, les lames sont prétraitées 5 minutes dans une solution acide (pH inférieur à 3) préparée par ajout d'HCl 1N à un tampon phosphate salé de type DULBECCO (DPBS). Les lames sont ensuite plongées dans une solution

de NAOH 1N pendant 2 minutes. Cette méthode a été mise au point dans le service de Monsieur le Professeur DE MASCAREL du C.H.U. de Bordeaux.

La suite de la technique immunohistochimique est identique à ce qui a été décrit précédemment.

□ Modification de la méthode de détection de l'anticorps primaire.

✓ *Méthode faisant appel au couple streptavidine-phosphatase alcaline.*

Cette technique étant plus sensible et permettant d'obtenir des signaux plus fins, nous l'avons testée pour chacun de nos anticorps.

Après le dépôt de l'anticorps secondaire biotinylé, les lames sont incubées une heure à température ambiante dans une solution de streptavidine phosphatase diluée au 1/2000^{ème} dans un tampon PBS-Tween.

Après rinçage dans du TBS-Tween, la révélation de l'activité phosphatase alcaline s'effectue par une technique au NAPHTHOL-AS-MX phosphate ; les sels de diazonium (Fast Red) faisant office d'agents de capture du naphthol libéré sous l'action de la phosphatase.

Les milieux d'incubation sont préparés de la façon suivante : 2 mg de naphthol-AS-MX phosphate dissous dans 0,2 mL de N,N diméthyl formamide sont mis en solution dans 9,8 mL de Tris-HCl 0,1M, pH 8,2. A cette solution sont ajoutés 1 mL de lévamisole 1M puis 10 mg de Fast Red TR. La révélation est suivie au microscope et arrêtée par passage des coupes sous l'eau courante.

Les coupes sont contre-colorées à l'hématéine de Harris, diluée de moitié, pendant 20 secondes puis rincées à l'eau courante et bleuies dans du tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8. La lamelle est montée avec une solution d'alcool polyvinylique à 13% (m/v) dans du Tris-HCl 0,1M, pH 8,5.

2.1.2.4.2. La technique immunohistochimique en trois couches faisant appel au couple streptavidine-biotine avec amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique de dérivés de tyramine aux sites de réaction :

□ Le principe et l'intérêt :

Devant les résultats d'interprétation difficile avec la technique décrite précédemment pour l'anticorps anti-TrkA, nous avons jugé intéressant de tester la technique d'amplification à la tyramine qui est actuellement la méthode de révélation la plus sensible mais qui reste difficile à mettre en place en routine.

La méthode utilise la peroxydase pour catalyser le dépôt de tyramine biotinylée sur les protéines attachées au substrat, au niveau des sites de l'activité peroxydasique. La liaison de la tyramine modifiée aux protéines serait covalente et ferait intervenir un couplage oxydatif phénolique par un mécanisme radicalaire.

□ La méthode :

Après séchage à l'étuve à +37°C pendant deux heures, les coupes montées sur des lames Superfrost sont déparaffinées dans trois bains successifs de toluène, réhydratées par passage dans des bains d'alcool de concentration décroissante, puis dans de l'eau du robinet.

Un prétraitement des coupes par digestion trypsique (méthode décrite au paragraphe 2.1.2.4.1.) visant à inverser la fixation formolée est effectué.

Après rinçage, les coupes sont immergées pendant 20 minutes dans une solution d'albumine bovine à 3% (m/v) dans un tampon PBS-Tween.

Après lavage, les anticorps primaires dilués dans du tampon PBS-Tween sont déposés aux concentrations citées dans le **tableau n°6** et incubés en chambre humide à 4°C pendant une nuit.

Après un nouveau rinçage, les coupes sont incubées pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution d'albumine bovine à 0,5% (m/v) dans un tampon PBS-Tween afin de fournir le dépôt protéique nécessaire à la fixation activée aux sites de la réaction immunologique.

Après lavage, les coupes sont recouvertes, pendant 45 minutes en chambre humide, d'une solution d'anticorps secondaire conjugué à la biotine (chèvre anti-IgG de lapin, réactif Dako E 432), dilué au 1/200^{ème} dans du tampon PBS-Tween.

Après rinçage, l'inhibition de l'activité peroxydasique endogène est réalisée par l'incubation des coupes pendant 15 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 6% (v/v) dans l'eau déminéralisée.

Après un nouveau lavage, les coupes sont incubées une heure à température ambiante dans une solution de streptavidine peroxydase (réactif Dako P 397) diluée au 1/200^{ème} dans du tampon PBS-Tween.

Après rinçage, les coupes sont incubées dans une solution de tyramine biotinylée diluée au 1/100^{ème} dans un tampon TRIS HCl 200mM, pH 8,8/ IMIDAZOLE 10mM en présence de 1µL d'H₂O₂ à 30% (v/v).

La tyramine biotinylée est synthétisée préalablement de la manière suivante : 5mL d'une solution 8,8 mM d'ester de succinimide de biotine (Pierce) dans du tampon borate de sodium pH 8,0 sont mélangés à un volume équivalent d'une solution de tyramine-HCl (Sigma) 7,4 mM dans le même tampon. Les esters de succinimide sont solubilisés dans un volume minimum de diméthylformamide anhydre avant la mise en solution dans du tampon borate. Les mélanges sont agités pendant 16 heures à l'obscurité, à température ambiante, lyophilisés et remis en solution dans 10 mL d'éthanol à 85%.

Après rinçage, les coupes sont incubées une heure à température ambiante dans une solution de streptavidine peroxydase (réactif Dako P 397) diluée au 1/200^{ème} dans du tampon PBS-Tween.

Après lavage, l'activité peroxydasique est révélée non par la DAB mais par une méthode à l'AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Zymed) qui permet l'obtention d'un signal plus fin mais moins sensible.

Les lames sont incubées une heure à température ambiante dans une solution diluée au 1/2000^{ème} de streptavidine peroxydase dans un tampon PBS-Tween. Après rinçage dans du TBS-Tween, la révélation de l'activité peroxydasique est réalisée dans une solution d'AEC, suivie au microscope et arrêtée en plongeant les lames sous l'eau courante.

Les coupes sont contre-colorées à l'hématéine de Harris non alcoolisée diluée au 1/2 pendant 20 secondes puis rincées à l'eau courante et bleuies dans du tampon Tris-HCl 0,1M, pH 8. La lamelle est montée avec une solution d'alcool polyvinylique à 13% (m/v) dans du Tris-HCl 0,1M, pH 8,5.

Des contrôles positifs (tissus de spécificité connue pour chaque anticorps) et négatifs (omission de l'anticorps primaire) sont réalisés parallèlement pour chaque série de lames étudiées.

2.1.2.4.3. L'expression des résultats :

Les résultats de cette étude immunohistochimique ont été interprétés par deux observateurs. Les résultats ont été exprimés de façon qualitative pour P53, Bcl2 et Bcl6 :

- + : expression.
- : absence d'expression.

Devant la difficulté de compter les cellules néoplasiques marquées (marquage parallèle des cellules du micro-environnement), les résultats ont été exprimés de façon semi-quantitative pour MiB1, p75^{NTR}, TrkA et NGF :

- + < à 10 % de cellules marquées (expression faible).
- ++ 10 à 30 % de cellules marquées (expression modérée).
- +++ 30 à 50 % de cellules marquées (expression forte).

2.1.2.5. L'ETUDE MOLECULAIRE PAR RT-PCR :

2.1.2.5.1. L'extraction des ARN :

L'existence de nombreuses ARNases dans le milieu environnant nous a conduit à adopter les précautions jugées actuellement indispensables lors de la manipulation des ARN. Le port de gants, le nettoyage du cryostat à l'éther, l'utilisation d'Eppendorf, de pointes de pipettes et d'aiguilles stériles à usage unique, le respect de la chaîne du froid (travail sur un lit de glace, temps réduit de passage des prélèvements dans le cryostat) ainsi que l'utilisation d'eau stérile ultra pure ayant

subi une double distillation et dont l'activité enzymatique ARNase est éliminée par le diéthylpyrocarbamate (DEPC) ont été rigoureusement respectés.

La méthode d'extraction consiste à extraire l'ARN total à partir des tissus congelés, par dissolution des constituants cellulaires dans une solution monophasique de phénol acide et d'isothiocyanate de guanidine puis par précipitation différentielle des ARN totaux dans du phénol / chloroforme.

Dans un premier temps, une coupe à 5 μm colorée par l'hématéine et l'éosine permet de vérifier la représentativité du prélèvement (présence d'une zone tumorale non nécrotique). Les tissus congelés sont ensuite coupés à 20 μm à -25°C dans un cryostat (Leica) pour obtenir environ 1mg de tissu (une vingtaine de copeaux) pour 1 mL de réactif TRIZOL (Gibco-BRL).

Les prélèvements sont récupérés avec une aiguille stérile, placés dans un tube Eppendorf refroidi préalablement à -20°C puis dissous par ajout d'1 mL de solution de lyse (TRIZOL). Ils sont ensuite incubés 5 minutes à température ambiante.

Deux cent microlitres de chloroforme sont ajoutés aux échantillons puis incubés 3 minutes à température ambiante.

La phase aqueuse qui renferme les ARN totaux est séparée du phénol par centrifugation différentielle à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C . Elle est ensuite récupérée par précipitation dans 0,5 mL d'isopentane puis incubée 10 minutes à température ambiante.

Une centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C permet d'isoler un culot d'ARN total qui est alors lavé avec 1 mL d'éthanol à 75% puis centrifugé pendant 5 minutes à 7 500 g à 4°C . Le culot est ensuite séché à l'air libre puis resuspendu dans de l'eau stérile ultra pure. Il est ensuite incubé 10 minutes à 55°C .

La concentration des ARN totaux et une éventuelle contamination des solutions par des protéines sont appréciées par spectrophotométrie (spectrophotomètre Beckman DU640B).

L'intégrité des ARN est vérifiée par migration électrophorétique à puissance constante (35V) pendant 2 heures sur un gel d'agarose à 1% (m/v) dans un tampon TBE. Les ARN sont observés sous U.V. après coloration par le bromure d'éthidium 10 mM et leur qualité est comparée à celle d'un témoin (RNA ribosomal marker, Promega).

2.1.2.5.2. La transcription inverse :

Avant l'étape de transcription inverse, les solutions sont préalablement traitées par une ADNase (Boehringer) de façon à hydrolyser tout ADN génomique résiduel.

Le volume réactionnel suivant est incubé pendant 20 minutes à 37°C :

12 µL d'ARN total

4 µL de ADNase (10 U/µL)

1 µL de ARNasin, inhibitrice de ARNase (Boehringer 40 U/µL)

1,25 µL de tampon TRIS 2M

0,5 µL de MgCl₂ 1M

31,25 µL d'eau traitée DEPC.

Après traitement par l'ADNase, la solution est déprotéinisée par extraction phénolique. Pour ce faire, cette solution est diluée dans 150µL d'eau traitée DEPC puis 100 µL de phénol et 100 µL de chloroforme lui sont ajoutés.

Après agitation douce puis centrifugation à 12 000 tours/minute pendant 15 minutes, la phase aqueuse comportant les acides nucléiques est récupérée dans un tube Eppendorf. L'ARN total est ensuite précipité par ajout de 15 µL d'acétate de sodium 3M et 1 mL

d'éthanol absolu refroidi préalablement à -20°C . La solution est ensuite placée au congélateur à -20°C pendant 2 heures.

Le culot précipité est récupéré, lavé dans 100 μL d'éthanol puis resuspendu dans 100 μL d'eau traitée DEPC. Les ARN totaux sont ensuite dosés par spectrophotométrie (spectrophotomètre Beckman DU640B) puis aliquotés.

Ils sont alors transcrits en cDNA par la transcriptase inverse (Superscript II Rnase H-Reverse Transcriptase, Gibco-BRL).

◆ **Milieu de réaction :**

- ✍ x μL d'ARN (x = volume correspondant à environ 4 μg d'ARN).
- ✍ 1 μL de pd(N)₆. (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mélange d'hexamères correspondant à toutes les séquences possibles).
- ✍ qsp 20 μL d'eau stérile ultra pure traitée DEPC.

Après une incubation de 10 minutes à 70°C , un passage dans la glace puis une incubation à température ambiante pendant 10 minutes, les composés suivant sont additionnés puis incubés 2 minutes à 42°C :

- ✍ 4 μL de tampon 5X
- ✍ 2 μL de DTT (Dithiothréitol)
- ✍ 2 μL de dNTP (desoxyribonucléotide Tri-phosphate) 1 % (v/v).

Enfin, 1 μL d'enzyme (1 U/ μL) est ajouté, incubé 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C .

2.1.2.5.3. **La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) :**

□ **Les amorces :**

Les amorces ont été synthétisées par le Service Commun de Biologie Moléculaire du C.H.U. de Nancy (responsable : F. PLENAT) sur le

synthétiseur automatique Applied Biosystems 392 par la technique des phosphoramidites en phase solide conformément au protocole du fabricant. L'oligonucléotide est détaché de la colonne puis les sites protégés sont rendus actifs par un passage dans l'ammoniaque à 33% pendant 16 heures à +55°C. Les oligonucléotides sont ensuite purifiés par chromatographie en phase inverse sur une colonne « OPC » (Applied Biosystems). L'éluat est séché et mis en solution dans de l'eau stérile ultra pure. Les oligonucléotides sont ensuite dosés par spectrophotométrie (spectrophotomètre Beckman DU640B) et conservés à -20°C sous forme d'aliquots. Les séquences oligonucléotidiques pour NGF sont les suivantes :

5' ATT CGC CCC TGT GGA AGA TG 3'

5' TAA AAA GVG ACT CCG TT 3'

□ L'amplification :

Quatre microlitres de la solution de RT correspondant à une quantité non mesurée de cDNA sont amplifiés dans le milieu de réaction suivant :

- ◆ 5 µL de dNTP (1mM)
 - ◆ 5 µL de tampon Taq 10X
 - ◆ 1 µL d'amorce sens (50 pmol/µL)
 - ◆ 1 µL d'amorce antisens (50 pmol/µL)
 - ◆ 4 µL de cDNA
 - ◆ 0,3 µL de Taq polymérase (ONCOR, 5U/µL)
 - ◆ 33,7 µL d'eau stérile ultra pure non traitée DEPC.
- ↘ Volume réactionnel total : 50 µL.

Les conditions de PCR sont adaptées pour le thermocycleur PERKIN ELMER 9600 :

- ◆ 5 min de dénaturation à 94°C.
- ◆ 1 min de dénaturation à 94°C suivie de 6 cycles d'hybridation à 60°C et d'1 min de polymérisation à 72°C.
- ◆ 1 min de dénaturation à 94°C suivie de 6 cycles d'hybridation à 58°C et d'1 min de polymérisation à 72°C.
- ◆ 1 min de dénaturation à 94°C suivie de 6 cycles d'hybridation à 54°C et d'1 min de polymérisation à 72°C.
- ◆ 1 min de dénaturation à 94°C suivie de 18 cycles d'hybridation à 52°C et d'1 min de polymérisation à 72°C.

- ◆ 10 min de polymérisation finale à 72°C.

□ L'analyse électrophorétique des produits d'amplification :

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15% (v/v).

Après polymérisation du gel, 20 µL de produit de PCR sont ajoutés à 5µL de tampon de charge avant d'être déposés sur le gel.

La migration s'effectue à puissance constante (20 Watts) pendant 2 à 3 heures dans un tampon TBE. Les produits d'amplification sont observés sous ultraviolets après coloration par du bromure d'éthidium 10mM. La longueur des bandes est appréciée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (PGEM DNA marker, Promega).

Cette méthode a permis de mettre en évidence les transcrits de NGF.

Devant la négativité de l'amplification, la tentative de recherche de l'expression des transcrits de *trkA* de *p75^{NTR}* a nécessité de nombreuses manipulations faisant intervenir les modifications techniques suivantes :

✍ **L'utilisation de différents tissus témoins :**

Les différents tissus témoins humains suivants ont été utilisés : thymus, cerveau (striatum) et amygdale. Le thymus et l'amygdale ont été prélevés dans les conditions décrites au paragraphe 2.1.2.2. tandis que le cerveau a été prélevé stérilement au cours d'une nécropsie, mais seulement 24 heures après le décès.

Du cerveau (striatum) de rat prélevé stérilement et congelé à -80°C dans un cryotube dans de l'azote dans les 10 minutes suivant le décès de l'animal a également été testé.

✍ **La modification des amorces :**

Elles ont été synthétisées par le Service Commun de Biologie Moléculaire selon la méthode décrite précédemment ou achetées aux Laboratoires Promega ou Eurogentec et les séquences oligonucléotidiques sont les suivantes :

Pour p75^{NTR} :

5' TGA ATG CGA AGA GAT CCC TGG 3'

5' GCC AAG ATG GAG CAA TAG ACA GG 3'

et p75 Primer Pair (Promega) :

5' AGC CAA CCA GAC CGT GTG TG 3'

5' TTG CAG CTG TTC CAC CTC TT 3'

Pour TrkA :

5' TCT TCA CTG AGT TCC TGG AG 3'

5' TTC TCC ACC GGG TCT CCA GA 3'

et TrkA (ENROGENTEC) : séquence non connue,
ainsi que TrkA Primer Pair (Promega) : séquence non connue.

Toutes ces amorces ont été employées à des quantités variant de 25 à 100 pmol en faisant alors également varier les quantités de cDNA (4 à 20 μ L de la réaction de transcription inverse).

✍ **La modification de l'amplification :**

✎ Plusieurs Taq polymérase provenant des Laboratoires Oncor, Perkin et Promega possédant dans leur tampon des quantités variables et ajustables de $MgCl_2$ (1,5 à 5 mM) ont été utilisées. Ces enzymes ont également été employées à des concentrations variant de 1U/ μ L à 5U/ μ L.

✎ Des conditions de stringence variables (différentes températures d'hybridation des amorces variant de $-10^{\circ}C$ à $+10^{\circ}C$ autour de la température d'hybridation théorique), à température d'hybridation constante ou à température décroissante (PCR Touch-Down) ont été testées.

Durant tous ces essais, la validité de la transcription inverse était assurée par la présence d'un témoin interne positif lors de l'amplification (couple d'amorces Actine 1).

2.1.2.5.4. **Le séquençage :**

Afin de déterminer la séquence oligonucléotidique des transcrits de NGF, les produits de PCR sont actuellement en cours de séquençage ; une quantité importante d'ADN est en effet nécessaire à la réalisation de la technique.

2.1.2.6. L'ETUDE STATISTIQUE :

Après une analyse descriptive (moyenne), nous avons effectué des tests de corrélation entre les différents facteurs cliniques et biologiques de mauvais pronostic et l'expression de P53, Bcl2, Bcl6, MiB1, TrkA, p75^{NTR} et NGF.

Le test non paramétrique de KRUSKAL-WALLIS est utilisé pour les variables dichotomiques avec un risque α de première espèce fixé à 5 %.

La corrélation entre deux variables quantitatives a été testée par régression linéaire permettant le calcul du r . Une analyse multivariée par régression logistique ($\alpha = 5\%$) a permis d'identifier les paramètres intéressants.

Le nombre limité de patients étant fixé par les modalités rétrospectives de l'étude, la puissance des tests est donc relativement faible.

2.2. LES RESULTATS :

2.2.1. LES CONSTATATIONS CLINIQUES :

2.2.1.1. LE SEXE :

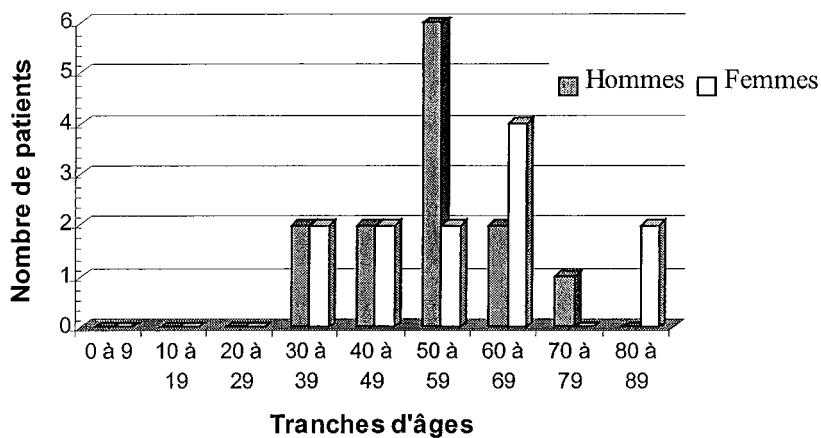
Notre série de 25 L.F comporte 13 hommes et 12 femmes soit un sex-ratio de 1,08 : 1.

2.2.1.2. L'AGE :

L'âge moyen au moment du diagnostic est de 55,1 ans. Le patient le plus jeune a 32 ans (cas n°16) et le plus âgé 83 ans (cas n°17).

La moyenne d'âge chez les patients de sexe féminin est de 58 ans tandis que celle des patients de sexe masculin est de 52,4 ans.

Graphique n°1 : La répartition des L.F. selon l'âge et le sexe.



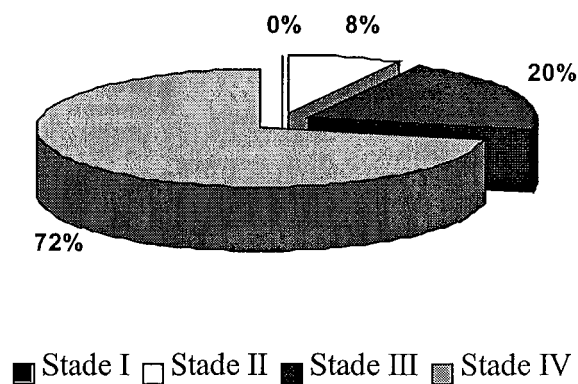
2.2.1.3. LE STADE AU MOMENT DU DIAGNOSTIC :

Les 25 L.F. se répartissent de la façon suivante selon le stade d'Ann Arbor :

| <i>Stade d'Ann Arbor</i> | <i>Nombre de cas</i> |
|--------------------------|----------------------|
| Stade I | 0 |
| Stade II | 2 |
| Stade III | 5 |
| Stade IV | 18 |

Parmi les 18 L.F. au stade 4 au moment du diagnostic, 12 d'entre eux (66 %), avaient une localisation médullaire. Dans les autres cas, il s'agissait de localisations hépatiques, épidurales, amygdaliennes ou coliques.

Graphique 2 : Les stades des 25 L.F. au moment du diagnostic.



2.2.1.4. L'EXISTENCE DE SIGNES DE « FORTE » MASSE TUMORALE (FACTEURS DE MAUVAIS PRONOSTIC) :

Cette étude ne porte que sur 23 cas, les malades correspondant aux cas n°16 et 19 ayant été perdus de vue.

□ L'élévation supérieure à la normale (210 à 400 UI/L) des LDH :

Elle est présente chez 13 patients (56 %) et il s'agit du facteur de mauvais pronostic le plus fréquemment retrouvé dans notre série.

□ L'élévation supérieure à 3 mg/L de la β 2-microglobuline (B2) :

Elle existe chez 5 patients (22 %). Parmi eux, 4 ont également une élévation des LDH et cumulent alors les deux facteurs biologiques de mauvais pronostic.

□ L'existence de symptômes B (B) :

Seulement 3 patients (13 %) avaient des signes d'évolutivité clinique (sueurs nocturnes, fièvre supérieure à 38°C depuis plus de 3 semaines et/ou amaigrissement de plus de 10% en 6 mois).

□ L'existence d'une altération de l'état général (AEG) :

Elle n'est constatée que chez 3 patients (13 %).

□ L'existence d'une « forte » masse tumorale (FM) :

Une « forte » masse tumorale existe chez 10 patients (43 %) correspondant :

- . dans 2 cas à un syndrome compressif,
- . dans 1 cas à un épanchement
- . dans 4 cas à la présence d'une masse tumorale de plus de 7 cm de grand axe.

Trois patients cumulent plus de deux signes de « forte » masse tumorale.

Pour le cas n°6, il existe une élévation des LDH, une « grosse » masse tumorale, un épanchement et un syndrome compressif. Pour le cas n°10, il s'agit d'une « grosse » masse tumorale et d'une splénomégalie symptomatique et pour le cas n°24, d'une « grosse » masse tumorale et d'un syndrome compressif.

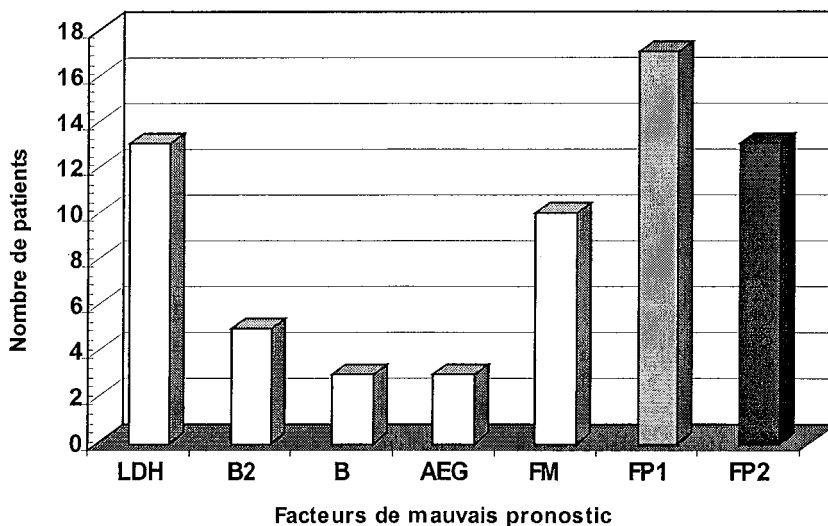
□ L'existence d'au moins un facteur de mauvais pronostic (FP1) :

Au moins un facteur de mauvais pronostic est observé chez 17 patients (74 %) ; le plus fréquemment retrouvé est l'élévation supérieure à la normale des LDH (12 cas).

□ L'existence d'au moins deux facteurs de mauvais pronostic (FP2) :

Parmi les 17 patients, 13 (56 %) ont au moins 2 facteurs de mauvais pronostic.

Graphique n°3 : La répartition des facteurs de mauvais pronostic.



Légendes :

LDH : Existence d'une élévation supérieure à la normale des LDH - **B2** : Elévation supérieure à 3 mg/L de la β 2-microglobuline - **B** : Existence de symptômes B - **AEG** : Existence d'une altération de l'état général - **FM** : Existence d'une « forte » masse tumorale - **FP1** : Existence d'au moins un facteur de mauvais pronostic - **FP2** : Existence d'au moins 2 facteurs de mauvais pronostic.

2.2.1.5. L'EVOLUTION :

Le lymphome folliculaire des 25 patients a été diagnostiqué entre 1992 et 2000 mais la plupart l'a été entre 1998 et 2000 ce qui exclut toute analyse de longue survie.

Six patients (24 %) sont décédés, la médiane de survie dans ces cas est alors de 39 mois, la survie la plus longue est de 69 mois, la plus courte de 3 mois.

Parmi les 19 patients vivants, la survie la plus longue est actuellement de 82 mois.

Tableau n°7 : Les caractéristiques anatomo-cliniques des 25 lymphomes folliculaires.

| Cas n° | Sexe | Age | Evolution | Stade | LDH | B2 | B | AEG | FM | FP1 | FP2 |
|--------|------|--------|-----------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | M | 37 ans | V 18 m | III | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | M | 55 ans | V 41 m | IV | + | + | - | - | + | + | + |
| 3 | M | 55 ans | V 42 m | IV | + | - | - | - | + | + | + |
| 4 | F | 63 ans | V 82 m | III | + | + | - | - | - | + | + |
| 5 | F | 64 ans | D 69 m | IV | + | - | - | - | - | + | - |
| 6 | F | 82 ans | D 3 m | IV | + | - | + | + | + | + | + |
| 7 | F | 66 ans | D 18 m | IV | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | M | 42 ans | D 66 m | IV | + | - | - | - | - | + | - |
| 9 | M | 63 ans | D 31 m | IV | - | - | + | + | + | + | + |
| 10 | F | 34 ans | D 48 m | IV | - | - | + | - | + | + | + |
| 11 | M | 55 ans | V 14 m | II | + | - | - | - | + | + | + |
| 12 | M | 52 ans | V 14 m | III | + | + | - | - | - | + | + |
| 13 | M | 34 ans | V 6 m | IV | + | - | - | - | - | + | - |
| 14 | F | 59 ans | V 3 m | III | - | + | - | - | + | + | + |
| 15 | M | 66 ans | V 18 m | IV | + | + | - | - | - | + | + |
| 16 | F | 32 ans | V 18 m | IV | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. |
| 17 | F | 83 ans | V 17 m | IV | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | M | 43 ans | V 22 m | IV | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | F | 46 ans | V 24 m | IV | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. | n.r. |
| 20 | M | 51 ans | V 11 m | IV | + | - | - | - | - | + | - |
| 21 | F | 57 ans | V 14 m | III | + | - | - | - | + | + | + |
| 22 | M | 55 ans | V 13 m | IV | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | M | 73 ans | V 10 m | IV | - | - | - | + | + | + | + |
| 24 | F | 62 ans | V 10 m | IV | + | - | - | - | + | + | + |
| 25 | F | 48 ans | V 9 m | II | - | - | - | - | - | - | - |

Légende :

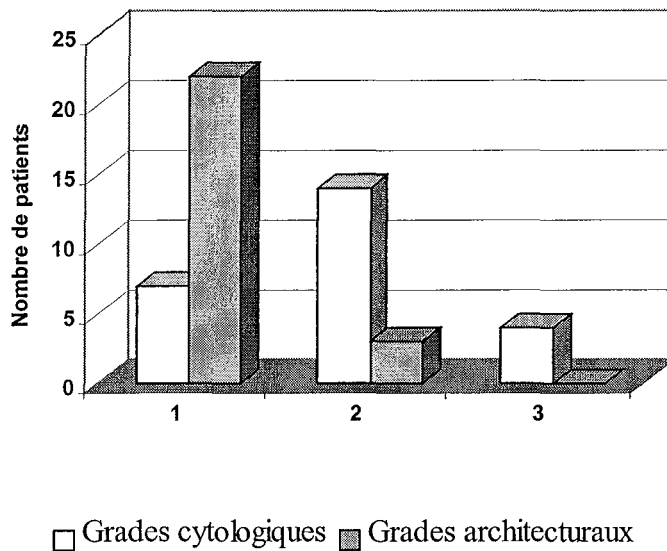
F : féminin - M : masculin - V : vivant - D : décédé - m : mois - n.r. : non réalisé - Stade : stade au diagnostic - LDH : existence d'une élévation supérieure à la normale des LDH (>400 UI/L) - B2 : élévation supérieure à 3 mg/L de la β 2-microglobuline - B : existence de symptômes B - AEG : existence d'une altération de l'état général - FM : existence d'une « forte » masse tumorale - FP1 : existence d'au moins un facteur de mauvais pronostic - FP2 : existence d'au moins 2 facteurs de mauvais pronostic.

2.2.2. LES CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET IMMUNOHISTOCHIMIQUES :

2.2.2.1. LE GRADE SELON L'OMS :

Selon la nouvelle classification de l'OMS, les 25 L.F. se répartissent de la façon suivante en trois grades cytologiques et architecturaux :

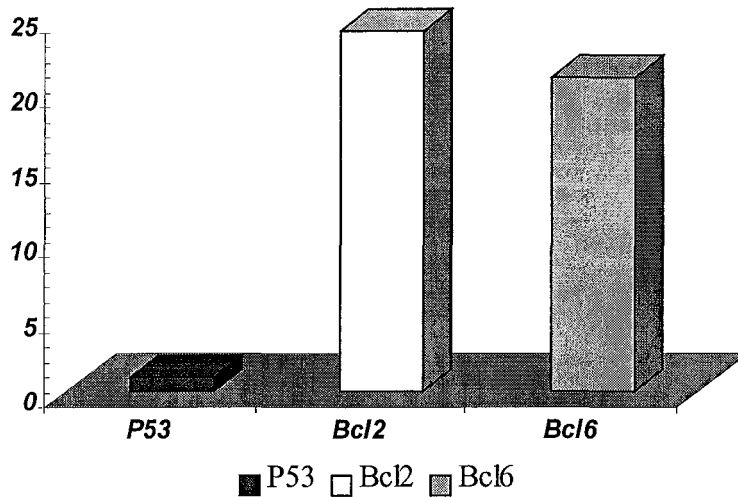
Graphique n°4 : La répartition des 25 L.F. selon les grades cytologiques et architecturaux.



2.2.2.2. L'EXPRESSION DE P53, Bcl2 ET Bcl6 :

Seulement 2 L.F. (4 %) expriment P53 tandis que 24 L.F. (96 %) expriment Bcl2 et 21 L.F. (84 %) expriment Bcl6. L'immunomarquage par Bcl2 et Bcl6 met bien en évidence le caractère nodulaire des L.F.

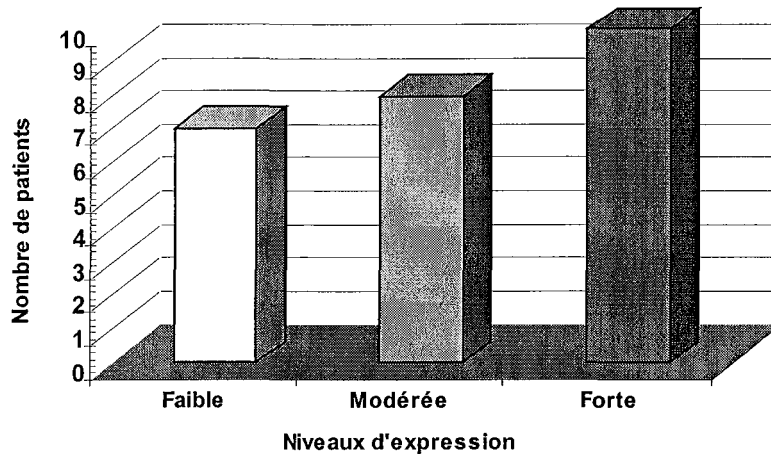
Graphique n°5 : L'étude immunohistochimique à l'aide des marqueurs P53, Bcl2 et Bcl6



2.2.2.3. L'INDICE DE PROLIFERATION CELLULAIRE EVALUE PAR LE Ki67 (MiB1) :

Selon les critères définis dans le paragraphe 2.1.2.4.3., l'expression du MiB1 est faible dans 7 L.F. (28 %), modérée dans 8 L.F. (32 %) et forte dans 10 L.F. (40 %). Elle est topographiquement particulière et se caractérise par un marquage en couronne des follicules tumoraux.

Graphique n°6 : L'indice de prolifération cellulaire évalué par le Ki67 (MiB1)



2.2.2.4. L'EXPRESSION DU NGF ET DE SES RECEPTEURS :

Les critères d'intensité d'expression ont été précisés dans le paragraphe 2.1.2.4.3.

L'expression de NGF a été recherchée sur coupes de tissus congelés non fixés, celle de p75^{NTR} a été obtenue sur coupes de tissus fixés dans du formol à 4% (m/v).

L'expression de TrkA a été recherchée sur coupes de tissus fixés en utilisant la technique d'amplification à la tyramine, la détection de l'anticorps primaire étant réalisée par une méthode à l'AEC.

En immunohistochimie, l'expression de NGF est observée dans les cellules réticulaires interdigitées mais également dans les cellules néoplasiques, à un degré variable selon les cas. Pour des insuffisances de matériel congelé, l'étude de l'expression de NGF n'a pu être réalisée pour les cas n°4, 5, 9 et 12.

☞ **NGF** est exprimé dans les cellules lymphomateuses de 11 L.F. (11/21 : 52 % des cas). L'expression est faible (**planche 2, photos A et B**) dans 7 L.F. (33 % des cas), modérée dans 3 L.F. (14 % des cas) et forte (**planche 2, photos C et D**) dans 1 L.F. (5 % des cas) seulement.

☞ **Le récepteur de haute affinité du NGF, TrkA** est exprimé dans les cellules folliculaires dendritiques, les cellules endothéliales et les cellules réticulaires interdigitées. NGF est également retrouvé dans les cellules néoplasiques (21 cas, 84 %). L'expression est faible dans 9 L.F. (36 %) (**planche 3, photos A et B**), modérée dans 7 cas (28 %) et forte dans 5 cas (20 %) (**planche 3, photos C et D**).

☞ **Le récepteur de faible affinité du NGF, p75^{NTR}**, exprimé dans les cellules folliculaires dendritiques, les cellules endothéliales et les filets nerveux périvasculaires et sous-capsulaires, est également retrouvé dans les cellules lymphomateuses (18 cas, 72 %). L'expression est faible dans 14 L.F. (56 %) (**planche 4, photos A et B**), modérée dans 3 L.F. (12 %), et forte dans 1 L.F. (4%) (**planche 4, photos C et D**).

(Graphique n°7)

Graphique n°7 : L'étude immunohistochimique à l'aide des marqueurs NGF, TrkA et p75^{NTR}.

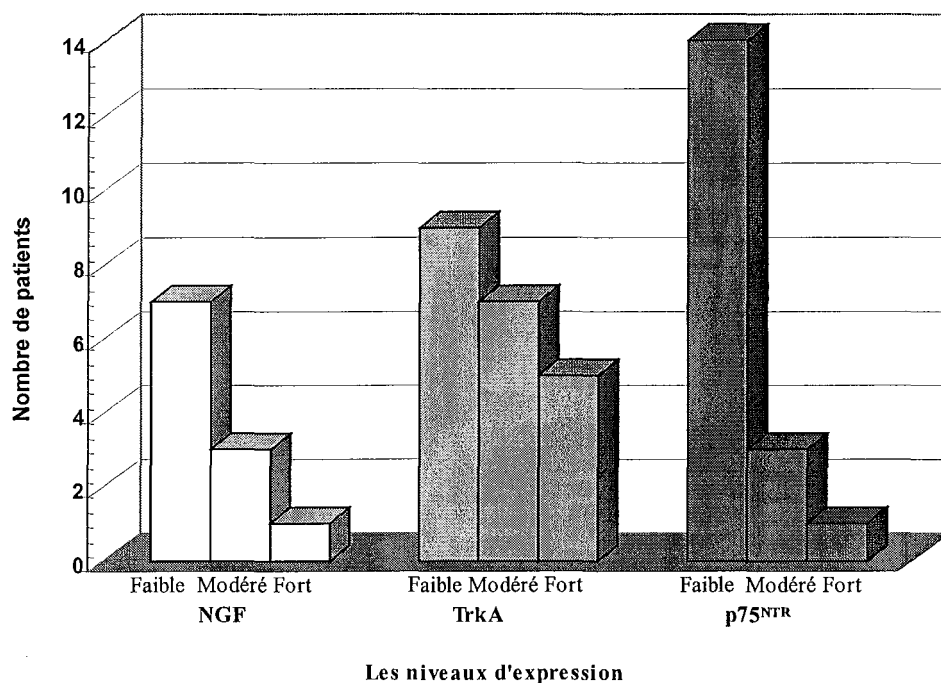


Tableau n°8 : Les caractéristiques immunohistochimiques des 25 lymphomes folliculaires

| Cas n° | Cyto | Archi | P53 | Bcl2 | Bcl6 | MiB1 | NGF | TrkA | p75 ^{NTR} |
|--------|------|-------|-----|------|------|------|------|------|--------------------|
| 1 | 3 | 1 | + | + | - | ++ | + | - | - |
| 2 | 2 | 1 | - | + | + | ++ | ++ | + | + |
| 3 | 1 | 1 | - | - | + | +++ | + | ++ | ++ |
| 4 | 2 | 1 | - | + | + | +++ | n.r. | + | + |
| 5 | 2 | 1 | - | + | + | + | n.r. | +++ | + |
| 6 | 1 | 1 | - | + | - | + | - | ++ | +++ |
| 7 | 2 | 1 | - | + | + | + | + | + | ++ |
| 8 | 1 | 1 | - | + | + | ++ | - | + | + |
| 9 | 3 | 1 | - | + | + | + | n.r. | ++ | - |
| 10 | 2 | 1 | - | + | + | +++ | + | + | + |
| 11 | 1 | 1 | - | + | + | +++ | +++ | + | - |
| 12 | 1 | 1 | - | + | + | + | n.r. | - | + |
| 13 | 2 | 1 | - | + | + | + | ++ | ++ | + |
| 14 | 2 | 1 | - | + | - | ++ | ++ | ++ | - |
| 15 | 2 | 1 | - | + | - | ++ | - | - | + |
| 16 | 3 | 2 | - | + | + | +++ | - | ++ | + |
| 17 | 2 | 1 | + | + | + | ++ | - | + | ++ |
| 18 | 2 | 1 | - | + | + | + | + | +++ | + |
| 19 | 3 | 2 | - | + | + | +++ | + | +++ | - |
| 20 | 1 | 1 | - | + | + | ++ | - | ++ | + |
| 21 | 1 | 1 | - | + | + | +++ | - | + | + |
| 22 | 2 | 1 | - | + | + | ++ | - | +++ | + |
| 23 | 2 | 1 | - | + | + | +++ | + | + | - |
| 24 | 2 | 2 | - | + | + | +++ | - | + | + |
| 25 | 2 | 1 | - | + | + | +++ | - | - | - |

Légende : Cyto : grades cytologiques (1, 2 ou 3 selon le nombre de grandes cellules) - Archi : grades architecturaux (1, 2 ou 3 selon l'importance des territoires folliculaires) - P53, Bcl2 et Bcl6 : - : absence d'expression ; + : expression - MiB1, NGF, TrkA et p75^{NTR} : - : absence d'expression ; + : expression faible ; ++ : expression modérée ; +++ : expression intense - n.r. : non réalisé.

☞ **Planches photographiques n°2, 3 et 4.**

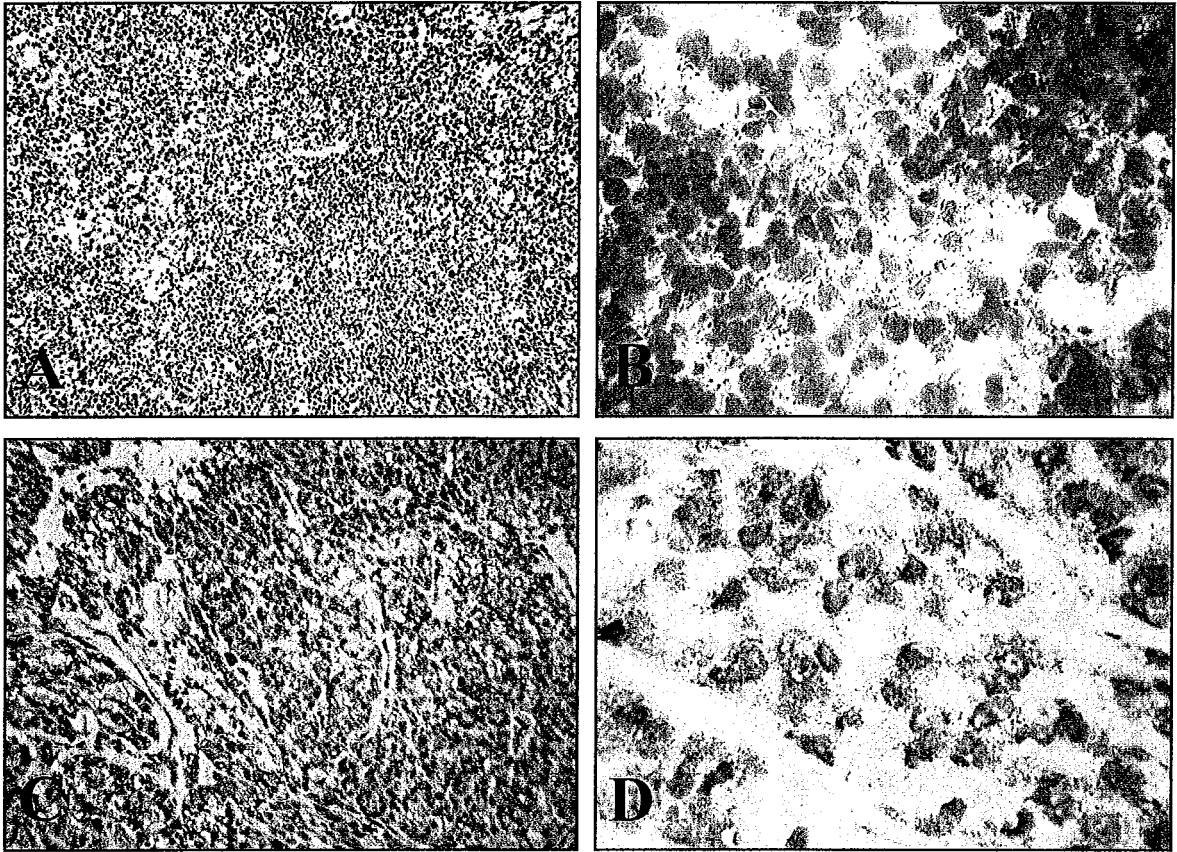


Planche 2 : L'expression du NGF dans le lymphome folliculaire

L'expression de la protéine NGF, recherchée sur des prélèvements congelés, par une méthode faisant appel au couple streptavidine-phosphatase alcaline, est observée à des niveaux variables, selon les cas, dans les cellules néoplasiques.

A : (X 200) et B : (X 1000) : expression faible

C : (X 200) et D : (X 1000) : expression forte

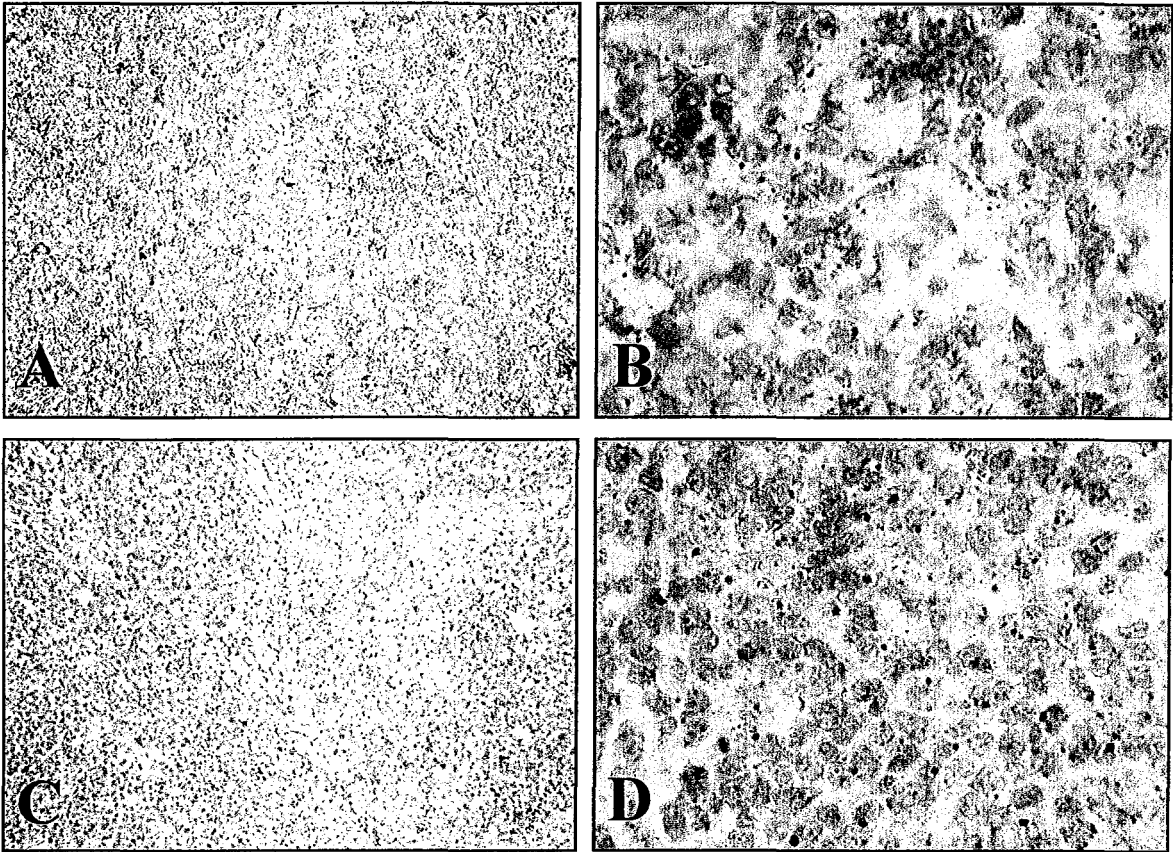


Planche 3 : L'expression du TrkA dans le lymphome folliculaire

Mise en évidence de l'expression de la protéine TrkA dans les cellules néoplasiques sur des prélèvements fixés dans du formol à 4% (m/v) par une méthode faisant appel à la tyramine biotinylée (révélation de l'activité peroxydasique par l'AEC). Les niveaux d'expression sont variables selon les observations.

A : (X 200) et B : (X 1000) : expression faible

C : (X 200) et D : (X 1000) : expression forte

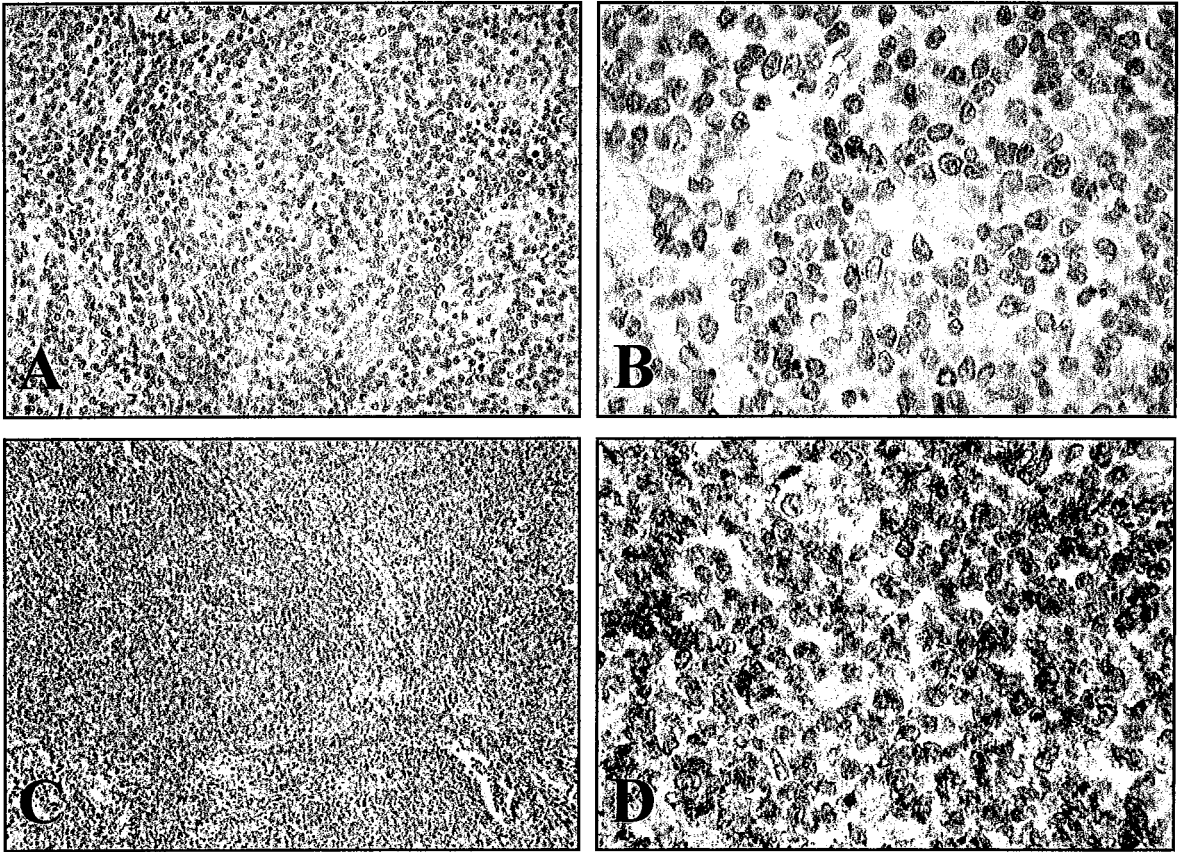


Planche 4 : L'expression de p75^{NTR} dans le lymphome folliculaire

L'expression de la protéine p75^{NTR}, recherchée sur des prélèvements fixés dans du formol à 4% (m/v) par une méthode faisant appel au couple streptavidine-phosphatase alcaline, est observée à des niveaux variables, selon les cas, dans les cellules néoplasiques.

A : (X 400) et B : (X 1000) : expression faible

C : (X 200) et D : (X 1000) : expression forte

2.2.3. LA VALEUR PRONOSTIQUE DES PARAMETRES ETUDIES : résultats de l'analyse multivariée :

2.2.3.1. LES SIGNES ANATOMO-CLINIQUES :

En analyse multivariée, par régression logistique, avec un risque de première espèce $\alpha = 0,05$, aucun modèle statistiquement significatif ($p > 0,05$) n'est retrouvé en étudiant successivement le stade au moment du diagnostic, l'existence d'une élévation supérieure à la normale des LDH ou supérieure à 3 mg/l de la $\beta 2$ -microglobuline, l'existence de symptômes B, d'une altération de l'état général ou d'une « forte » masse tumorale, la présence d'au moins un ou deux facteurs de mauvais pronostic.

Dans notre série, il n'existe donc pas de corrélation statistiquement significative entre ces différentes variables.

2.2.3.2. LES SIGNES MORPHOLOGIQUES, IMMUNOHISTO- CHIMIQUES ET MOLECULAIRES :

En analyse multivariée, par régression logistique, avec un risque de première espèce $\alpha = 0,05$, aucun modèle statistique significatif ($p > 0,05$) n'est retrouvé en étudiant successivement l'expression de Bcl2, Bcl6, P53, MiB1, NGF, TrkA et p75^{NTR} ainsi que les grades cytologiques et architecturaux.

Dans notre série, il n'existe donc pas de corrélation statistiquement significative entre ces différentes variables.

2.2.3.3. LES CORRELATIONS ENTRE LES SIGNES CLINIQUES ET LES RESULTATS DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE :

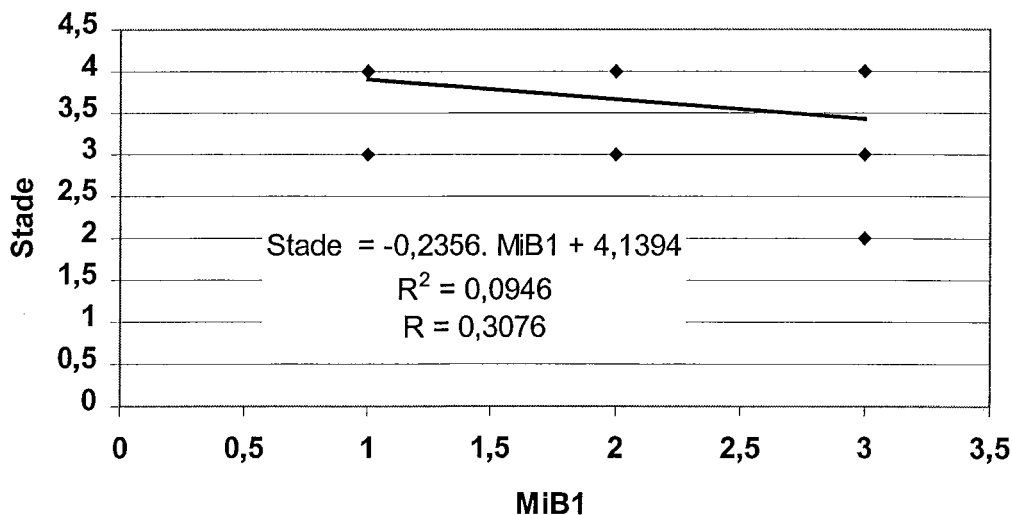
□ Les résultats significatifs :

En utilisant le test non paramétrique de KRUSKAL-WALLIS, le grade cytologique est significativement moins élevé (risque $\alpha = 0,05$) lorsqu'il existe une élévation supérieure à la normale des LDH ($p = 0,019$).

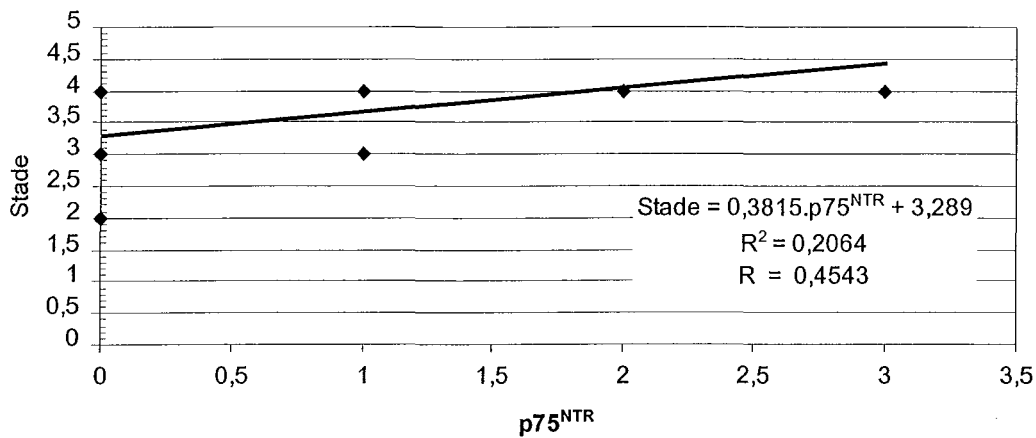
Il semble que plus l'indice de prolifération est élevé, plus le stade au moment du diagnostic est bas. Cette tendance a été confirmée par le faible coefficient de corrélation obtenu par régression linéaire ($r = 0,48$).

Il semble que plus le stade au moment du diagnostic est élevé, plus l'expression de p75^{NTR} est importante. Cette tendance a également été confirmée par le faible coefficient de corrélation obtenu par régression linéaire ($r = 0,45$).

Graphique n°8 : La corrélation du stade et de l'indice de prolifération cellulaire évalué par le Ki67 (MiB1).



Graphique n°9 : La corrélation du stade et de l'expression de p75^{NTR}.



□ Les résultats non significatifs :

En utilisant le test de KRUSKAL-WALLIS, certaines tendances statistiques semblent s'établir sans corrélation significative réelle ($0,05 < p < 0,20$).

✍ Le grade cytologique est plus faible lorsqu'il existe plus d'un facteur de mauvais pronostic ($p = 0,06$).

✍ L'expression de TrkA est plus faible lorsqu'il existe une élévation supérieure à 3 mg/l de la $\beta 2$ -microglobuline ($p = 0,11$).

✍ L'expression de TrkA est plus faible lorsqu'il existe plus de deux facteurs de mauvais pronostic ($p = 0,06$).

✍ L'expression de NGF est plus élevée lorsqu'il existe une « grosse » masse tumorale ($p = 0,17$).

Au terme de cette étude, il apparaît que le niveau d'expression de p75^{NTR} semble associé à certains facteurs pronostics anatomo-cliniques de mauvais pronostic.

2.2.4. LES RESULTATS DE LA RT-PCR :

Après extraction des ARN totaux, l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (m/v) a montré que les ARN provenant des cas n°13 à 25 étaient très dégradés. Les transcrits de NGF ne sont observés, après RT-PCR, que pour les cas n°1 à 12 et correspondent à une séquence de 167pb (**planche 5**).

Malgré les diverses tentatives de mise au point de la technique de RT-PCR avec les amorces p75^{NTR} et TrkA, aucun résultat n'a été obtenu (absence de produit d'amplification même aspécifique après migration électrophorétique et coloration au bromure d'éthidium).

Planche photographique n°5.

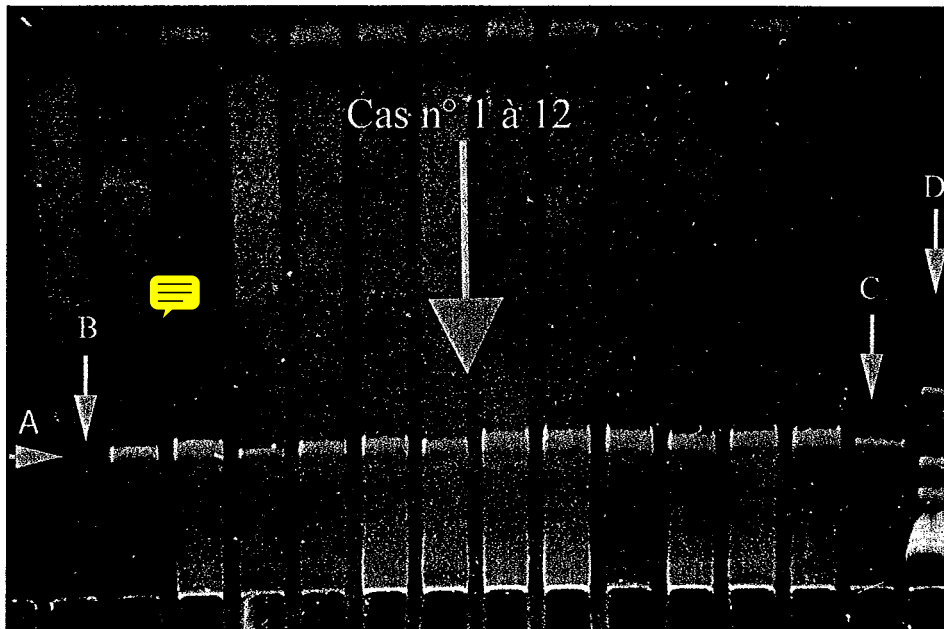


Planche 5 : L'analyse électrophorétique des produits d'amplification après RT-PCR

A : Présence de transcrits de NGF (167 pb) pour les cas n° 1 à 12.

B : Témoin négatif.

C : Témoin positif (striatum humain).

D : Marqueur de taille (PGEM DNA Marker).

TROISIEME PARTIE :

Discussion et perspectives

3.1. LES CARACTERISTIQUES CLINIQUES ET ANATOMO-PATHOLOGIQUES DES LYMPHOMES FOLLICULAIRES DE LA SERIE :

Les caractéristiques cliniques des patients de notre série étaient superposables à celles des grandes cohortes publiées récemment dans la littérature médicale. Même si notre étude ne comprenait qu'un nombre de cas limité, ne permettant pas une analyse statistique significative, nous avons cependant pu comparer nos résultats à ceux des séries publiées, les plus importantes étant celles du GELF en 1996 et en 1997 qui comportent plus de 500 malades. Les patients étaient âgés de 32 à 82 ans et il existait une très discrète prépondérance masculine (sex-ratio : 1,08). L'âge moyen au moment du diagnostic était de 55,1 ans (54 ans dans la série du GELF 1996 (169)). La moyenne d'âge de nos patients de sexe féminin au moment du diagnostic (58 ans) était supérieure à celle de nos patients de sexe masculin (52,4 ans) et les sujets de plus de 50 ans (84 %) étaient plus fréquemment atteints. Comme dans la littérature, l'atteinte des sujets de moins de 20 ans reste exceptionnelle (notre patient le plus jeune avait 32 ans). Ici, 72 % de nos patients avaient atteint un stade IV selon la classification d'Ann Arbor, dès le diagnostic. La localisation métastatique était préférentiellement de siège médullaire (66 %) (SOLAL CELIGNY (169) : stade 4 : 70 % ; atteinte médullaire : 63,5 %). Par ordre de fréquence décroissante, les autres atteintes étaient hépatiques, épidurales, amygdaliennes ou coliques.

L'existence de facteurs de « forte » masse tumorale et leur prépondérance respective suivaient les tendances des séries multicentriques (170). Au moment du diagnostic, les trois-quarts de nos patients (74 %) avaient au moins un facteur de « forte » masse tumorale

et plus de la moitié d'entre eux (56 %) au moins deux. Cette fréquence était plus élevée que dans l'étude d'HERMANS (74) qui a étudié la valeur pronostique d'une « forte » masse tumorale en la corrélant avec la survie mais à propos de 229 lymphomes à petites cellules, sans dissocier les LF des autres types de lymphomes. Dans son étude, 32 % et 37 % possédaient respectivement au moins un ou deux facteurs de mauvais pronostic.

L'altération de l'état général ou l'existence de symptômes B n'a été observée que chez 13 % de nos patients (GELF 1996 : 18 %) ; l'élévation supérieure à la normale des LDH chez 56 % des patients (GELF 1996 : 22 %) ; l'élévation supérieure à 3 mg/L de la β 2-microglobuline chez 22 % de nos patients (GELF 1996 : 35 % , SOLAL CELIGNY 1993 : 25 %) (169, 171).

La plupart des 25 LF de nos patients a été diagnostiquée entre 1998 et 2000 ce qui excluait toute étude de survie à long terme. Dix-neuf patients étaient en vie en juillet 2000 et pour les 6 patients décédés, la médiane de survie a été de 39 mois (9 ans pour JOHNSON (87)). Avant l'introduction de l'immunothérapie anti-CD20, JOHNSON a également démontré qu'aucun gain de survie n'avait été obtenu ces trente dernières années malgré les progrès thérapeutiques.

Nos 25 LF ont été classés selon les critères de la récente classification de l'OMS en trois grades cytologiques et architecturaux (71). Sur le plan architectural, on notait une majorité de LF à prédominance folliculaire (88 %), 12 % de LF folliculaires et diffus et aucun LF à prédominance diffuse. D'un point de vue cytologique, il existait une prépondérance de grade 2 cytologique (56 %), 28 % de grade 1 et seulement 16 % de grade 3. Ces résultats ne peuvent être confrontés point par point aux données de la littérature, car, d'une part, la classification OMS est trop récente et, d'autre part, les anciennes classifications ne faisaient pas appel aux mêmes critères. La méthode d'appréciation semi-quantitative du grade

cytologique est fondée sur le comptage des centroblastes et sa reproductibilité intra- et inter-observateur est relative (4). Il s'agit probablement d'une explication aux résultats contradictoires en terme de survie globale des séries publiées (74, 169). Par ailleurs, le pourcentage de grandes cellules et de plages tumorales diffuses varie selon les aires ganglionnaires chez un même patient. La relecture systématique des LF de notre série par deux anatomo-pathologistes expérimentés a montré que les résultats correspondaient aux types histologiques habituels des LF. Actuellement, il n'existe cependant pas de différence significative en terme de pronostic entre les grades cytologiques 1 et 2. La nouvelle classification de l'OMS les avait initialement réunis en un seul groupe (centroblastes < à 15 % de la population tumorale) puis réindividualisés pour éviter toute confusion avec la précédente classification (REAL, 1994). En pratique, seuls les grades 3 (centroblastes > à 15 % de la population tumorale) doivent être isolés en raison de la fréquence des rechutes précoces, le pronostic à long terme restant inchangé. Le grade cytologique était significativement moins élevé ($p = 0,019$) lorsqu'il existait une élévation supérieure à la normale des LDH, ce qui n'a pas été rapporté dans la littérature et pourrait correspondre à un biais statistique compte-tenu du petit nombre de cas de la série.

Dans notre étude, aucune corrélation statistiquement significative n'a été retrouvée entre les différents critères anatomo-cliniques définis précédemment (stade d'Ann Arbor, existence d'une élévation supérieure à la normale des LDH ou supérieure à 3 mg/L de la β 2-microglobuline, existence de symptômes B, d'une altération de l'état général ou d'une « forte » masse tumorale). Ces facteurs, définis par le GELF, constituent les critères d'inclusion des patients dans les protocoles de chimiothérapie (CHVP-Interféron).

L'indice de prolifération cellulaire évalué par l'anticorps anti-Ki67 (MiB1) était faible, modéré ou fort dans respectivement 28 %, 32 % et 40 % des LF de notre série. Nous avons également mis en évidence une tendance de corrélation linéaire négative ($r = 0,48$) entre l'expression élevée de l'antigène Ki67 et le stade de la maladie au moment du diagnostic. Ces résultats (indice de prolifération élevé, stade bas), non relatés dans la littérature, apparemment contradictoires pourraient relever d'un biais statistique en raison du faible nombre de cas étudiés. Ainsi, dans l'observation n°4 concernant le patient ayant la plus longue survie de la série (82 mois), l'expression de Ki67 était élevée au moment du diagnostic.

En immunohistochimie, l'expression de Bcl2 était observée dans 96 % des cas, celle de Bcl6 dans 84 % des cas et celle de P53 dans seulement 4 % des cas. Selon NGAN (136), la protéine Bcl2 est surexprimée dans 85 % des LF et ce, quel que soit leur grade histologique. L'action anti-apoptotique de Bcl2 favoriserait la résistance aux chimiothérapies inductrices de l'apoptose et rendrait les cellules néoplasiques moins sensibles à l'action des cytotoxiques. Ceci expliquerait le contrôle médiocre des LF par les polychimiothérapies actuelles (145). La valeur pronostique des LF « Bcl2- » est actuellement étudiée dans une série française multicentrique du Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). Dans notre série, un seul LF était « Bcl2- ». Il existait deux facteurs de mauvais pronostic au moment du diagnostic et la survie a été de 42 mois (médiane de survie de 39 mois dans notre série). La mise en évidence de la protéine P53 mutée dans de nombreuses tumeurs et l'étroite corrélation entre les mutations du gène *p53* et l'expression protéique de P53 dans les lymphomes B diffus de « faible » masse tumorale (110) nous a incité à rechercher l'expression de P53 dans les LF. Lorsque le gène suppresseur de tumeur *p53* est altéré, il se comporte comme un oncogène dans plus de la moitié des cancers humains incluant notamment certains types de leucémies et

lymphomes. Ainsi, des mutations du gène *p53* ont été retrouvées dans la moitié des leucémies aiguës lymphoïdes de type 3, dans un tiers des LMNH de type Burkitt et dans 10 % des leucémies lymphoïdes chroniques (145, 168). En revanche, la plupart des lymphomes de bas grade n'expriment pas P53, ces résultats suggérant une oncogénicité tardive du gène *p53* en pathologie tumorale (168). Dans une étude récente du GELA, l'expression de P53 est corrélée à une progression rapide de la maladie et à une diminution de la survie dans les lymphomes B diffus à grandes cellules de « faible » masse tumorale (110). Dans notre série, P53 était exprimée avec une intensité faible dans le cas n°1 seulement, le patient étant toujours en vie mais en rechute 18 mois après le diagnostic. Il s'agissait d'un grade 3 cytologique, les cellules tumorales coexprimaient P53 et Bcl2, il n'existait aucun facteur clinique de mauvais pronostic au moment du diagnostic. Pour certains, la coexpression de P53 et Bcl2 favoriserait la résistance aux polychimiothérapies (145, 168).

Enfin, aucune corrélation n'a été retrouvée entre le grade cytologique ou architectural et l'expression de Bcl2, Bcl6, P53, MiB1, NGF, TrkA et p75^{NTR} ; ceci laissant supposer que l'expression de ces différentes protéines serait indépendante.

3.2. L'EXPRESSION DU NGF ET DE SES RECEPTEURS, p75^{NTR} ET TrkA, DANS LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES (LF) :

□ **Les protéines NGF, p75^{NTR} et TrkA sont exprimées dans les LF :**

En immunohistochimie, l'expression du NGF et de ses récepteurs a été retrouvée de manière variable dans toutes les observations de notre série. Quel que soit le type cellulaire ou le niveau d'expression de la protéine, le signal était soit membranaire diffus, soit intracytoplasmique et punctiforme.

Le NGF est exprimé dans les cellules réticulaires interdigitées thymiques (141). Il est synthétisé, *in vitro*, par les mastocytes et par les lymphocytes T CD4+ (100). Dans les cellules épithéliales, il est exprimé par les cellules épithéliales thymiques (141), les cellules basales conjonctivales (17) et les kératinocytes des couches basales dont il stimulerait, *in vitro*, la croissance dans les dermatoses avec hyperplasie épidermique comme le psoriasis ou les carcinomes cutanés (44). Les transcrits de NGF sont également retrouvés dans les cellules myocardiques, rénales, prostatiques et placentaires (118).

Dans notre série, l'expression du NGF était retrouvée, comme dans la littérature, dans les cellules réticulaires interdigitées. **Nous avons en revanche montré pour la première fois, *in vivo*, chez l'homme, que le NGF était exprimé par les cellules tumorales des LF.** Le NGF était retrouvé dans 11 LF parmi les 21 LF étudiés (52 % des cas) ; avec un niveau d'expression faible dans 7 cas (33 %), modéré dans 3 cas (14 %) et fort dans un cas (5 %) seulement. Dans notre série, l'expression plus intense de NGF dans les cellules néoplasiques était liée à l'existence d'une « grosse » masse tumorale, donc à un facteur de mauvais

pronostic mais ce résultat, non significatif ($p = 0,17$) sur le plan statistique, doit être interprété avec prudence.

Le récepteur p75^{NTR} est exprimé dans le micro-environnement des tissus lymphoïdes par les cellules folliculaires dendritiques au niveau des follicules lymphoïdes ganglionnaires (51, 175) et amygdaliens (69), dans les cellules réticulaires interdigitées ganglionnaires et thymiques (99), dans les cellules réticulaires adventitielles médullaires (34), dans les cellules épithéliales médullaires et sous-capsulaires thymiques (142), dans les cellules endothéliales des sinus médullaires ganglionnaires (99), dans les filets nerveux sous-capsulaires et périvasculaires (69) et dans les cellules folliculaires dendritiques réactionnelles accompagnant certains lymphomes du manteau et certains lymphomes de Hodgkin de type nodulaire à prédominance lymphocytaire (51).

Dans notre série, p75^{NTR} était également majoritairement exprimé dans les cellules non lymphoïdes. Il était observé dans les filets nerveux périvasculaires et sous-capsulaires, les cellules endothéliales, les cellules histiomonocytaires et les cellules folliculaires dendritiques, comme cela a été déjà décrit dans la littérature. L'expression la plus intense était observée dans les cellules folliculaires dendritiques et les filets nerveux périvasculaires. **L'expression de p75^{NTR} a, en revanche, été observée pour la première fois dans les cellules lymphomateuses (18 LF, 72 % des cas).** Le niveau d'expression était faible dans 14 LF (56 % des cas), modéré dans 3 LF (12 % des cas) et fort dans un LF (4 % des cas). Cette expression restreinte aux seules cellules réactionnelles accompagnant le néoplasme avait déjà été rapportée dans quelques cas de lymphomes folliculaires (51, 99), de lymphomes du manteau et de lymphomes de Hodgkin nodulaires (51) mais jamais dans les cellules néoplasiques. L'analyse statistique multivariée a montré que plus le stade au moment du diagnostic était

élevé, plus l'expression de p75^{NTR} était importante ($r = 0,45$) et que l'hyperexpression de p75^{NTR} serait plutôt un facteur de mauvais pronostic des LF. De façon intéressante, l'hyperexpression de p75^{NTR} a déjà été décrite dans des thymomes agressifs et des carcinomes thymiques de mauvais pronostic (141). Dans notre observation n°6 associant une hyperexpression de p75^{NTR} et une hypoexpression de TrkA, nous avons retrouvé 5 facteurs de mauvais pronostic (stade IV d'Ann Arbor, augmentation supérieure à la normale des LDH sériques, existence de symptômes B, d'une altération de l'état général et d'une « forte » masse tumorale) et la survie la plus courte de la série (3 mois).

La mise en évidence de l'expression de TrkA a nécessité une méthode d'amplification faisant appel au couple tyramine-biotine. En 1989, BOBROW a décrit une méthode très sensible d'amplification du signal antigène – anticorps. Cette technique, mise au point dans le service par le Professeur PLENAT (148) a nécessité des manipulations complémentaires mais a permis d'identifier des antigènes faiblement exprimés, non retrouvés par les techniques immunohistochimiques conventionnelles en trois couches. Pour l'anticorps anti-TrkA n'ayant donné lieu qu'à des signaux faibles avec les techniques classiques, le gain en intensité a été important. Le récepteur TrkA est exprimé par les précurseurs des lignées hématopoïétiques (29, 34, 88, 99), dans les cellules folliculaires dendritiques de ganglions réactionnels (64) et dans les cellules réticulaires interdigitées ganglionnaires et thymiques (141). Il est également retrouvé dans l'épithélium amygdalien et dans les cellules épithéliales médullaires et sous-capsulaires thymiques (99), dans les cellules basales conjonctivales (17) et épidermiques (147). *In vitro*, il est exprimé dans les monocytes (57), les mastocytes (176), les lymphocytes B, les lymphocytes T activés (58), ainsi que dans les immunoblastes présents dans les adénites suppurées de patients infectés par le VIH (99).

Dans notre étude, l'expression de *TrkA* était observée dans les cellules folliculaires dendritiques, les cellules endothéliales et les cellules réticulaires interdigitées, ce qui concorde avec les données de la littérature. **L'expression de *TrkA* a été observée dans les cellules lymphomateuses de 21 LF parmi les 25 LF étudiés (84 % des cas) ce qui n'avait pas été relaté jusqu'alors dans la littérature.** Le niveau d'expression était faible dans 9 LF (36 % des cas), modéré dans 7 LF (28% des cas) et fort dans 5 LF (20 % des cas). L'expression faible de *TrkA* était également liée à l'existence de plus de deux facteurs de mauvais pronostic et à une élévation supérieure à 3 mg/L de la β 2-microglobuline mais ces résultats sont à interpréter avec prudence car non statistiquement significatifs ($p = 0,06$ et $p = 0,11$), et parce que nous n'avons pu effectuer d'étude de longue survie.

□ La recherche des transcrits de NGF, *p75^{NTR}* et *trkA* par RT-PCR :

Les transcrits de NGF n'ont été retrouvés que chez les patients des observations n°1 à 12. Dans les cas n°13 à 25, l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (m/v) avait montré que ces ARN étaient très dégradés. Cette mauvaise conservation des ARN peut s'expliquer par de mauvaises conditions de congélation, de stockage (un incident de décongélation avait été signalé), ou lors du transport entre Bordeaux et Nancy.

Aucune tentative de mise au point de la technique de RT-PCR avec les amorces *p75^{NTR}* et *TrkA* n'a abouti (techniques décrites au paragraphe 2.1.2.5.3.).

Cette absence de résultat peut s'expliquer par plusieurs hypothèses. Parmi elles, les deux explications suivantes peuvent être évoquées :

⇒ *Les ARN messagers codant pour les protéines p75^{NTR} et TrkA seraient très peu nombreux et rapidement dégradés.* L'étude immunohisto-chimique a montré que même si les cellules lymphomateuses exprimaient les deux récepteurs du NGF, cette expression restait faible, variable en intensité selon les cas et nécessitait parfois des techniques d'amplification (tyramine biotinylée pour TrkA). Les ARN messagers codants pourraient donc être présents en très faible quantité et une altération, aussi minime soit elle, aurait pu encore réduire leur quantité. La quantité de cDNA obtenue après la transcription inverse serait alors trop faible pour que les amorces, habituellement présentes en large excès, puissent s'hybrider et être ensuite amplifiées.

⇒ *La configuration tridimensionnelle des amorces pourrait être particulière.* Plusieurs séquences oligonucléotidiques de longueur variable et de nombreuses conditions de PCR ont été testées sans obtenir de résultat. Pendant le temps d'hybridation et d'élongation, ces amorces auraient pu adopter une configuration tertiaire particulière qui aurait empêché l'hybridation (même aspécifique) du cDNA. Par ailleurs, les températures théoriques d'hybridation des amorces TrkA sont différentes et éloignées de plus de 10°C ce qui impose le choix d'une température moyenne d'hybridation difficile à optimiser.

3.3. TENTATIVE DE COMPREHENSION DE L'EXPRESSION DE NGF, p75^{NTR} ET TrkA DANS LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES :

L'effet « prolifératif » ou « anti-prolifératif » du NGF est un phénomène connu dans les cellules dérivant des crêtes neurales (111). Son rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire des cellules épithéliales et immunitaires est maintenant largement démontré. Le NGF induit la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, la prolifération et la différenciation des précurseurs granuleux et la prolifération des lymphocytes T et B (20, 89, 100). Le NGF est également considéré comme un facteur de la croissance cellulaire dans des conditions pathologiques. En effet, il induit, *in vitro*, la prolifération des kératinocytes des couches basales épidermiques dans certaines dermatoses hyperplasiques comme le psoriasis (147), des cellules épithéliales dans les carcinomes épidermoïdes cutanés (44) et il stimule la croissance tumorale des cellules de carcinomes bronchiques et de glioblastomes (139).

Le rôle démontré du NGF dans la croissance et la prolifération cellulaire pourrait expliquer, du moins en partie, que dans notre série, l'expression du NGF était associée à l'existence d'une « grosse » masse tumorale. La croissance tumorale pourrait être liée soit à l'action du NGF sur les cellules néoplasiques, sur un mode autocrine et/ou paracrine, soit indirectement par la constitution d'un micro-environnement en intervenant dans la stroma réaction et le mécanisme d'invasion des cellules tumorales (102). En raisonnant par similitude, et inversement, en présence d'une hyperexpression de TrkA dans les neuroblastomes de bon pronostic, le NGF induirait la différenciation et l'arrêt de la croissance tumorale (76).

Le récepteur p75^{NTR}, récepteur des neurotrophines et notamment du NGF, intervient en fait dans différents mécanismes de signalisation cellulaire. Il a également des fonctions différentes suivant le stade du développement cellulaire, le type de cellule et l'éventuelle coexpression de TrkA (156). Par un phénomène de compétition ou de séquestration, la présence de p75^{NTR} augmenterait la concentration des neurotrophines dans le milieu et favoriserait l'action du NGF au niveau du récepteur TrkA (32). Le domaine extramembranaire de p75^{NTR} possède des analogies structurelles avec les récepteurs de la superfamille du TNF et particulièrement avec l'antigène de surface Fas, impliqué dans les phénomènes d'apoptose. L'analogie entre p75^{NTR} et les récepteurs au TNF constitue une voie de signalisation commune activant la prolifération, la différenciation ou l'apoptose (31, 156). *In vitro*, dans les cultures de cellules cérébelleuses de rat, en l'absence de NGF, p75^{NTR} induit la mort cellulaire programmée (150). Dans des cultures de cellules rétiniennes de poulet exprimant p75^{NTR} mais non TrkA, le NGF endogène induit l'apoptose pendant la période embryonnaire (5, 62). La liaison du NGF sur p75^{NTR} déclenche l'hydrolyse de la sphingomyéline et la production de céramide, molécule impliquée dans les mécanismes de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire programmée (49). Enfin, en l'absence de TrkA, p75^{NTR} activerait le facteur de transcription NFκB dans des cultures de cellules de Schwann (27) et interviendrait dans la constitution du micro-environnement par des interactions entre les cellules épithéliales et mésenchymateuses au cours du développement (160). Dans notre étude, l'hyperexpression de p75^{NTR}, corrélée à un stade élevé du LF au moment du diagnostic, suggérerait une action plutôt anti-apoptotique de p75^{NTR} ou une interaction de p75^{NTR} avec les mécanismes de prolifération ou d'invasion tumorale. Ces données sont en accord avec les résultats publiés récemment montrant soit l'hyperexpression de p75^{NTR} en l'absence d'expression de TrkA dans les thymomes agressifs et les carcinomes thymiques (141), soit une corrélation forte entre

l'hyperexpression de p75^{NTR} et l'amplification de *n-myc* dans les neuroblastomes de mauvais pronostic (22).

Comme cela a été rapporté dans d'autres études de la littérature, la faible expression de TrkA dans les LF de notre étude était associée à des facteurs de mauvais pronostic (présence de deux facteurs de mauvais pronostic et élévation de la β 2-microglobuline) ce qui pourrait correspondre à un rôle « protecteur » de TrkA. De la même façon, TrkA est hyperexprimé dans des neuroblastomes d'évolution favorable et la quantité de transcrits est inversement corrélée avec l'amplification péjorative de *n-myc* (22) mais il n'est pas ou peu exprimé dans les thymomes agressifs et les carcinomes thymiques (141). L'expression différentielle de p75^{NTR} et TrkA entraînant, selon les cas, l'apoptose ou la survie cellulaire (150) et en raison de l'expression hétérogène des récepteurs selon les LF dans notre série, toute tentative d'explication trop simple serait probablement erronée à ce stade de l'étude, compte-tenu du petit nombre de cas et de l'absence de corrélation statistique entre l'expression de TrkA et celle de p75^{NTR}. Cependant, un profil d'expression différentielle « TrkA- / p75^{NTR}+ » est déjà décrit dans les thymomes agressifs et les carcinomes thymiques (141) et évoqué dans des lymphomes lymphoblastiques, des lymphomes de Burkitt (50), des LMNH de haut grade et de phénotype B, des lymphomes anaplasiques CD30+ et certains lymphomes de Hodgkin (99).

Même si sa valeur pronostique n'est pas encore validée, l'existence du réarrangement de *trkA*, initialement décrit dans un adénocarcinome colique (126) puis retrouvé dans des carcinomes thyroïdiens papillaires (16, 146) pourrait faire l'objet d'une recherche systématique dans le cadre d'études prospectives. Ainsi, le niveau d'expression de NGF, p75^{NTR} et TrkA, pourrait constituer un indicateur pronostic dans les LF.

3.4. NGF, p75^{NTR} ET TrkA : LES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES :

Des espoirs importants sont actuellement placés dans le traitement des lymphomes par une immunothérapie. Le lymphome folliculaire constitue l'une des pathologies lymphoïdes où les essais en ce domaine ont été les plus développés (40, 41, 115). A côté d'une immunothérapie non spécifique, actuellement représentée par l'interféron α , qui a fait ses preuves comme un traitement efficace pour améliorer le pronostic des patients lorsqu'il est associé à la chimiothérapie (172), des essais d'immunothérapie spécifique passive (anticorps) ou active (vaccination) (134) ont été réalisés dans cette catégorie de lymphome (12, 13, 80). Si les premiers résultats thérapeutiques furent encourageants, l'obligation de développer un anticorps spécifique pour le traitement de chaque patient constitue, malgré le développement des biotechnologies, un obstacle indiscutable à la généralisation de telles substances thérapeutiques.

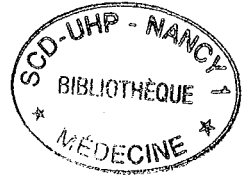
Certains auteurs rapportent déjà l'utilisation de NGF dans un but thérapeutique dans certaines pathologies. L'administration de NGF représenterait une alternative thérapeutique dans de nombreuses pathologies cérébrales, en particulier ischémiques et neuro-dégénératives (157, 190). Cependant, le NGF n'étant pas capable de traverser la barrière hémato-méningée, l'administration systémique d'inducteurs lipophiles de la synthèse de NGF comme les agonistes β adrénergiques serait une méthode élégante pour contourner les problèmes de biodisponibilité. Les effets secondaires indésirables seraient contrôlés par la coadministration d'un antagoniste β adrénergique (162). Dans les adénomes hypophysaires à prolactine mal maîtrisés par l'administration de Bromocriptine, un traitement parallèle par NGF, stimulant la différenciation et la prolifération des cellules

hypophysaires sécrétant la prolactine, pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique (131, 132). Chez l'animal, dans les hypoacousies et les surdités de perception par atteinte des cellules sensorielles de l'oreille interne, l'administration de NGF stimule la régénération des neurones de la cochlée (121). Chez l'homme, l'application locale de NGF sur les ulcères de cornée entraîne la cicatrisation totale des lésions, suggérant ainsi l'effet stimulant de NGF sur la prolifération fibroblastique et la matrice extracellulaire (17). Enfin, l'instillation nasale de NGF réduit l'hyperactivité bronchique (17, 19, 20).

Si p75^{NTR} et dans une moindre mesure TrkA et NGF constituaient des facteurs pronostiques des LF de stade élevé, l'idée d'employer des anticorps monoclonaux dirigés contre p75^{NTR} pourrait être évoquée. Cependant, le NGF et ses récepteurs étant d'une part largement exprimés dans les tissus normaux et dans certaines néoplasies, et possédant d'autre part des fonctions biologiques incomplètement connues, l'utilisation d'éventuelles molécules reconnaissant spécifiquement NGF ou ses récepteurs devra nécessairement réunir des critères de spécificité. Pour ce faire, la mise au point d'un « véhicule pharmacologique » ciblant spécifiquement à la fois NGF ou ses récepteurs et les cellules B tumorales des LF est obligatoire pour une utilisation *in vivo* chez l'homme.

En définitive, cette longue étude anatomo-clinique a permis de mettre en évidence pour la première fois, *in vivo*, chez l'homme, l'expression du NGF et de ses récepteurs dans les cellules tumorales des LF. Au vu de nos résultats acquis sur une petite série aux caractéristiques superposables à celles des grandes séries de la littérature, l'expression du NGF et de ses récepteurs devra être recherchée sur de grandes séries homologues à la nôtre. Si ces molécules étaient retrouvées, leur niveau d'expression devrait être corrélé à la fréquence et à la précocité des

rechutes, à la transformation histologique et surtout à la survie. Alors seulement, le caractère pronostic éventuel du niveau d'expression du NGF et de ses récepteurs et un traitement spécifique éventuel pourront être définis.



CONCLUSION

En comparant les caractéristiques cliniques et biologiques des LF des malades de notre petite série, décrite dans la deuxième partie de cette thèse, à celles des patients des grandes cohortes publiées dans la littérature médicale, que nous rapportons dans la première partie, nous avons pu montrer que notre travail reposait sur un groupe représentatif de cette affection. Ainsi, lorsque nos résultats ne sont pas statistiquement significatifs mais mettent toutefois en évidence une tendance, ils pourraient aisément être infirmés ou affirmés par une étude complémentaire.

Comme les autres auteurs, nous avons retrouvé en immunohistochimie, au niveau des cellules saines du micro-environnement des LF, une expression :

- ▼ du NGF dans les cellules réticulaires interdigitées,
- ▼ de p75^{NTR} dans les cellules folliculaires dendritiques, les cellules endothéliales, les filets nerveux périvasculaires et sous-capsulaires.
- ▼ de TrkA dans les cellules réticulaires interdigitées, les cellules endothéliales et les cellules folliculaires dendritiques.

En revanche, nous sommes les premiers, à notre connaissance, à avoir mis en évidence l'expression de NGF, de p75^{NTR} et de TrkA dans les cellules tumorales des LF humains. Pour TrkA, ces résultats ont été acquis grâce à l'utilisation d'une méthode d'amplification qui a permis de déceler de petites quantités de cette protéine non révélées par les méthodes habituelles. Les recherches de biologie moléculaire ont mis en évidence des transcrits de NGF, complétant l'étude immunohistochimique et la confirmant. Les transcrits de p75^{NTR} et de *trkA* n'ont pas été retrouvés par RT-PCR, probablement du fait d'une mauvaise conservation des ARN ou d'une inadéquation des amorces utilisées.

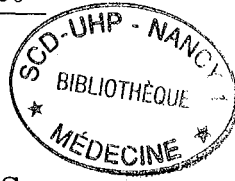
Aucune corrélation n'a été retrouvée entre le niveau d'expression de NGF, de p75^{NTR} et de TrkA avec les critères habituellement considérés comme péjoratifs des LF (le stade d'Ann Arbor au moment du diagnostic, l'élévation sérique du taux de β 2-microglobuline ou des LDH, l'existence de symptômes B, d'une altération de l'état général ou d'une « grosse » masse tumorale) ou avec l'immunoréactivité P53, Bcl2, Bcl6 et Ki67.

A l'inverse, l'hyperexpression de p75^{NTR} était corrélée avec le stade d'Ann Arbor élevé au moment du diagnostic ($r=0,45$).

Enfin, au vu des résultats de notre petite série, dont le suivi n'a été que de deux ans pour la majorité des cas, il serait intéressant de poursuivre l'observation de ces malades et surtout de compléter l'étude de l'expression de NGF, de p75^{NTR} et de TrkA sur de grandes séries rétrospectives de malades décédés avec ou sans rechute ou transformation histologique. Il deviendrait alors possible d'affirmer ou d'infirmer la valeur pronostique de l'expression de ces molécules dans les LF.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



- 1 - ACKER B., HOPPE R.T., COLBY T.V., COX R.S., KAPLAN H.S., ROSENBERG S.A.
Histologic conversion in the non-Hodgkin's lymphomas.
J. Clin. Oncol. 1983, 1, 11-16.

- 2 - ACKERMAN M., BRANDT L., JOHNSON A. et al.
Mitotic activity in non-Hodgkin's lymphoma. Relation to the Kiel classification and to prognosis.
Br. J. Cancer., 1987, 55, 219-223.

- 3 - ANDERSON D.R., GRILLO-LOPEZ A., VARNS C., CHAMBERS K.S., HANNA N.
Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma ;
Biochem. Soc. Trans., 1997, 25, 2, 705-708.

- 4 - ANDERSON J.R., VOSE J.M., BIERMAN P.J. et al.
Clinical features and prognosis of follicular large-cell lymphoma : a report from the Nebraska Lymphoma Study Group.
J. Clin. Oncol., 1993, 11, 218-224.

- 5 - BAMJI S.X., MAJDAN M., POZNIAK C.D., BELLIVEAU D.J., ALOYZ R., KOHN J., CAUSING C.G., MILLER F.D.
The p75 neurotrophin receptor mediates neuronal apoptosis and is essential for naturally occurring sympathetic neuron death.
J. Cell. Biol., 1998, 140, 911-923.

- 6 - BARBACID M..
The TrkA family of neurotrophin receptor.
J. Neurobiol., 1994, 25, 1386-1403.
- 7 - BARKER P., LOMEN-HOERTH C., GENSCHE E., MEAKIN S.,
GLASS D., SHOOTER E.
Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the
trkA receptor.
J. Biol. Chem., 1993, 268, 15150-15157.
- 8 - BARRET L., BARTLETT F.
The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death
depending on the stage of sensory neuron development.
Proc. Natl. Acad. Sci.(USA), 1994, 91, 6501-6505.
- 9 - BASTION Y., BERGER F., BRYON P.A., FELDMAN P., FRENCH
M., COIFFIER B.
Follicular lymphomas : Assessment of prognostic factors in 127
patients followed for 10 years.
Ann. Oncol., 1991, 123, 2, 123.
- 10 - BASTION Y., COIFFIER B.
Is the International Prognostic Index for aggressive lymphoma
patients useful for follicular lymphoma patients ?
J. Clin. Oncol., 1994, 7, 12, 1340-1342.
- 11 - BASTION Y., SEBBAN C., BERGER F., FELMAN P., SALLES G.,
DUMONTET C., BRYON P.A., COIFFIER B.
Incidence, predictive factors, and outcome of transformation in
follicular lymphoma patients.
J. Clin. Oncol., 1997, 15, 1587.

- 12 - BENDANDI M., GOCKE C.D., KOBRIN C.B., BENKO F.A., STERNAS L.A., PENNINGTON R., WATSON T.M., REYNOLDS C.W., GAUSE B.L., DUFFEY P.L., JAFFE E.S., CREEKMORE S.P., LONGO D.L., KWAK L.W.
Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma.
Nat. Med., 1999, 5, 10, 1171-1177.
- 13 - BENDANDI M., LONGO D.L.
Biologic therapy for lymphoma.
Curr. Opin. Oncol., 1999, 11, 5, 343-350.
- 14 - BESA P.C., McLAUGHLIN P.W., COX J.D., FULLER L.M.
Long term assessment of patterns of treatment failure and survival in patients with stage I and II follicular lymphoma.
Cancer 1995, 75, 2361.
- 15 - BOISSIERE F., LEHERICY S., STRADA O., AGID Y., HIRSCH E.C.
Neurotrophin receptors and selective loss of cholinergic neurons in Alzheimer disease.
Mol. Chem. Neuropathol., 1996, 28, 219-223.
- 16 - BONGARZONE I., PIEROTTI M., MONZINI N., MONDELLINI N., MANENTI P., DONGHI R., PILOTTI S., GRIECO M., SANTORO M., FUSCO A.
High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma.
Oncogene 1989, 4, 1457-1462.

- 17 - BONINI S., LAMBIASE A., BONINI S., LEVI-SCHAFFER F., ALOE L.
Nerve Growth Factor : An Important Molecule in Allergic Inflammation and Tissue Remodeling.
Int. Arch. Allergy Immunol., 1999, 118, 159-162.
- 18 - BOVEN L.A., MIDDEL J., PORTEGIES P., VERHOEF J., JANSEN G.H., NOTTET H.S.
Overexpression of nerve growth factor and basic fibroblast growth factor in AIDS dementia complex.
J. Neuroimmunol., 1999, 97, 154-162.
- 19 - BRAUN A., APPEL E., BARUCH R., HERZ U., BOTCHKAREV V., PAUS R., BRODIE C., RENZ H.
Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma.
Eur. J. Immunol., 1998, 28, 3240-3251.
- 20 - BRAUN A., LOMMATZSCH M., RENZ H.
The role of neurotrophins in allergic bronchial asthma.
Clin. Exp. Allergy, 2000, 30, 178-186.
- 21 - BRICE P., BASTION Y., LEPAGE E., BROUSSE N., HAIOUN C., MOREAU P., STRAETMANS N., TILLY H., TABAH I., SALAL-CELIGNY P.
Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no treatment policy, prednimustine or interferon α : a randomized study from the Groupe d'Etude des lymphomes folliculaires.
J. Clin. Oncol., 1997, 15, 1110.

- 22 - BRODEUR G., NAKAGAWARA A., YAMASHIRO D., IKEGAKI N., LIU X., AZAR C., LEE C., EVANS A. .
Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas.
J. Neuro. Oncol., 1997, 31, 49-55.
- 23 - BRODIE C., GELFAND E.
Functional nerve growth receptors on human B lymphocytes.
J. Immunol., 1992, 148, 3492-3497.
- 24 - BRODIE C., GELFAND E.W.
Regulation of immunoglobulin production by nerve growth factor : comparison with anti-CD40.
J. Neuroimmunol., 1994, 52, 87-96.
- 25 - BUBIEN J.K., ZHOU L.J., BELL P.D., FRIZZELL R.A., TEDDER T.F.
Transfection of the CD20 cell surface molecule into ectopic cell types generates a Ca²⁺ conductance found constitutively in B lymphocytes.
J. Cell. Biol., 1993, 121, 1121-1132.
- 26 - CABANILLAS F., PATHAK S., GRANT G. et al.
Refractoriness to chemotherapy and poor survival related to abnormalities of chromosomes 17 and 7 in lymphoma.
Amer. J. Med., 1989, 87, 167-172.

- 27 - CARTER B.D., KALTSCHMIDT C., KALTSCHMIDT B., OFFENHÄUSER N., BÖHM-MATTHAEI R., BAEUERLE P.A., BARDE Y.A.
Selective activation of NF-Kb by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75.
Science 1996, 272, 542-545.
- 28 - CATTANEO E., McKAY R.
Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor.
Nature 1990, 347, 762-765.
- 29 - CATTORETTI G., SCHIRO R., ORAZI A., SOLIGO D., COLOMBO M.
Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells *in vivo* and *in vitro*.
Blood 1993, 81, 1726-1738.
- 30 - CELLERINO A.
Expression of messenger RNA coding for the nerve growth factor receptor trkA in the hippocampus of the adult rat.
Neuroscience 1996, 70, 613-616.
- 31 - CHAO M.V.
The p75 neurotrophin receptor.
J. Neurobiol., 1994, 25, 1373-1385.
- 32 - CHAO M.V., HEMPSTEAD B.L.
p75 and Trk : a two-receptor system.
T.I.N.S., 1996, 18, 321-326.

- 33 - CHESON B.D., HORNING S.J., COIFFIER B., SHIPP M.A., FISHER R.I., CONNORS J.M., LISTER T.A., VOSE J., GRILLO-LOPEZ A., HAGENBEEK A., CABANILLAS F., KLIPPENSTEN D., HIDDEMANN W., CASTELLINO R., HARRIS N.L., ARMITAGE J.O., CARTER W., HOPPE R., CANELLOS G.P.
Report of an International Workshop to Standardize Response Criteria for Non-Hodgkin's Lymphomas.
J. Clin. Oncol., 1999, 17, 4, 1244-1253.
- 34 - CHEVALIER S., PRALORAN V., SMITH C., Mac GROGAN D., YANCOPOULOS G., BRACHET P., POUPLARD A., GASCAN H.
Expression and functionality of the trkA proto-oncogene product/NGF receptor in undifferentiated hematopoietic cells.
Blood 1994, 83, 1479-1485.
- 35 - CLARY D.O., REICHARDT L.F.
An alternatively spliced form of the nerve growth factor receptor TrkA confers an enhanced response to neurotrophin 3.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1994, 91, 11133-11137.
- 36 - COIFFIER B., BASTION Y., BERGER F., FELMAN P., BRYON P.A.
Prognostic factors in follicular lymphomas.
Semin. Oncol., 1993, 20, 5, 89-96.

- 37 - COIFFIER B., HAIOUN C., KETTERER N., ENGERT A., TILLY H., MA D., JOHNSON P., LISTER A., FEURING-BUSKE M., RADFORD J.A., CAPDEVILLE R., DIEHL V., REYES F.
Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma : a multicenter phase II study.
Blood 1998, 92, 6, 1927-1932.
- 38 - COIFFIER B., SEBBAN C., BERGER F. et al.
Transformation histologique des syndromes lymphoprolifératifs de faible malignité. Etude clinique et évolutive de 32 cas.
Presse Med., 1995, 14, 1229-1236.
- 39 - COLOMBAT P., SALLES G., BROUSSE N., EFTEKHARI P., SOUBEYRAN P., DELWAIL V., DECONINCK E., HAIOUN C., FOUSSARD C., SEBBAN C., STAMATOULLAS A., MILPIED N. et al.
Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as single first-line therapy of follicular lymphoma patients with a low tumor burden : clinical and molecular evaluation.
Blood 2000 (sous presse).
- 40 - COTTER F.E.
Antisense therapy of hematologic malignancies.
Sem. Hematol., 1990, 36, 4 Supp.6, 9-14.
- 41 - CROCE C.M.
Molecular biology of lymphomas.
Semin. Oncol., 1993, 20, suppl.5, 31-46.

- 42 - CZUCZMAN M.S., GRILLO-LOPEZ A.J., WHITE C.A., SALEH M., GORDON L., LOBUGLIO A.F., JONAS C., KLIPPENSTEIN D., DALLAIRE B., VARNS C.
Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy.
J. Clin. Oncol., 1999, 17, 1, 268-276.
- 43 - DAVIES A.M., BANDTLOW C., HEUMANN R., KORSCHING S., ROHRER H., THOENEN H.
Timing and site of nerve growth factor synthesis in developing skin in relation to innervation and expression of the receptor.
Nature 1987, 326, 353-358.
- 44 - De LUCA M., PELLEGRINI G., ZAMBRUNO G., MARCHISIO P.C.
Role of integrins in cell adhesion and polarity in normal keratinocytes and human skin pathologies.
J. Dermatol., 1994, 21, 821-828.
- 45 - Di MARCO E., CUTULI N., GUERRA L., CANCEDDA R., De LUCA M.
Molecular Cloning of *trkE*, a Novel *trk*-related Putative Tyrosine Kinase Receptor Isolated from Normal Human Keratinocytes and Widely Expressed by Normal Human Tissues.
J. Biol. Chem., 1993, 268, 24290-24295.

- 46 - Di MARCO E., MATHOR M., BONDANZA S., CUTULI N., MARCHISIO P.C., CANCEDDA R., De LUCA M.
Nerve Growth Factor Binds to Normal Human Keratinocytes through High and Low Affinity Receptors and Stimulates Their Growth by a Novel Autocrine Loop.
J. Biol. Chem., 1993, 266, 21718-21722.
- 47 - DEMIDEM A., LAM T., ALAS S., HARIHARAN K., HANNA N., BONAVIDA B.
Chimeric anti-CD20 (IDEC-C2B8) monoclonal antibody sensitizes a B cell lymphoma cell line to cell killing by cytotoxic drugs.
Cancer Bio. & Radio., 1997, 12, 3, 177-186.
- 48 - DISTELHORST
Bcl2 inhibits hydrogen peroxide - induced ER Ca²⁺ pool depletion.
Oncogene 1996, 12, 2051-2055.
- 49 - DOBROWSKI R.T., WERNER M.H., CASTELLINO A.M., CHAO M.V., HANNUN Y.A.
Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor.
Science 1994, 265, 1596-1599.
- 50 - DONOVAN M.J., HEMPSTEAD B.L., HORVATH C., CHAO M.V., SCHOFIELD D.
Immunohistochemical localization of Trk receptor protein in pediatric small round blue cell tumors.
Am J. Pathol., 1993, 143, 1560-1567.

- 51 - DORFMAN D.M., SHAHSAFAEI A.
Dendritic reticulum cell immunoreactivity for Low-Affinity Nerve growth Factor Receptor in malignant lymphomas.
Modern. Pathol., 1996, 9, 959-965.
- 52 - DUBUS P., FAUCHEUX B., BOISSIERE F., GROUPI A., VITAL C., VITAL A., AGID Y., HIRSCH E.C., MERLIO J.-P.
Expression of Trk Isoforms in Brain Regions and in the Striatum of Patients with Alzheimer's Disease.
Exp. Neurol. 2000, 165, 2, 285-294.
- 53 - DUBUS P., PARRENS M., EL-MOKHTARI Y., FERRER J., GROUPI A., MERLIO J.-P.
Identification of novel trkA variants with deletions in leucin-rich motifs of the extracellular domain.
J. Neuroimmunol., 2000, 107, 42-49.
- 54 - DÜRKOP H., LATZA U., HUMMEL M., EITELBACH F., SEED B., STEIN H.
Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease.
Cell., 1992, 68, 421-427.
- 55 - DVORAK H.F., NAGY J.A., DVORAK A.M.
Structure of solid tumors and their vasculature : implications for therapy with monoclonal antibodies.
Cancer Cells, 1991, 3, 77-85.

- 56 - EBENDAL T.
NGF in CNS : Experimental data and clinical implications.
Prog. in Growth Factor Res., 1989, 1, 143-159.
- 57 - EHRHARD P.B.; ERB P., GRAUMANN U., OTTEN U.
Expression of Nerve Growth Factor and Nerve Growth Factor
receptor tyrosine kinase TRK in activated CD-4 positive T-cell
clones.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1993, 90, 10984-10988.
- 58 - EHRHARD P.B., ERB P., GRAUMANN U., SCHMUTZ B., OTTEN
U.
Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T
cell activation.
J. Immunol. 1994, 152, 2705-2709.
- 59 - EZDINLI E.Z., ANDERSON J.R., MELVIN F. et al.
Moderate versus aggressive chemotherapy of nodular
lymphocytic poorly differentiated lymphoma.
J. Clin. Oncol., 1985, 3, 769-775.
- 60 - EZDINLI E.Z., COSTELLO W.G., KUCUK O. et al.
Effect of the degree of nodularity on the survival of patients with
nodular lymphomas.
J. Clin. Oncol., 1987, 5, 413-418.

- 61 - Fifth International Workshop on Chromosomes in Leukemia-Lymphoma.
Correlation of chromosome abnormalities with histologic and immunologic characteristics in non-Hodgkin's lymphoma and adult T-cell Leukemia-lymphoma.
Blood 1987, 70, 1554.
- 62 - FRADE J., RODRIGUEZ-TEBAR A., BARDE Y.
Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor.
Nature 1996, 383, 166-168.
- 63 - FUKUHARA S., ROWLEY J.D., VARIAKOJIS D. et al.
Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma.
Cancer 1979, 39, 3119.
- 64 - GARCIA-SUAREZ O., HANNESTAD J., ESTEBAN I., MARTINEZ DEL VALLE M., NAVES F.J., VEGA J.A.
Neurotrophin receptor-like protein immunoreactivity in human lymph nodes.
Anat. Rec. 1997, 249, 226-232.
- 65 - GOSPODOROWICZ M.K., BUSH R.S., BROWN T.C. et al.
Prognostic factors in nodular lymphomas: a multi-variate analysis based on the Princess Margaret Hospital experience.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1994, 10, 489-492.

- 66 - GRIBBEN J.G., NEUBERG D., BARBER M. et al.
Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in perysterol blood is significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow.
Blood 1994, 83, 3800-3807.
- 67 - GROSSBARD M.L., PRESS O.W., APPELBAUM F.R. et al.
Monoclonal antibody-based therapies of leukemia and lymphoma.
Blood 1992, 80, 863-878.
- 68 - GUILLERMO A.L., MONSERRAT E., BOSCH M., TEROL M.J., CAMPO E., ROZMAN C.
Applicability of the International Index of aggressive lymphomas patients with low-grade lymphoma.
J. Clin. Oncol., 1994, 12, 1343.
- 69 - HANNESTAD J.; LEVANTI M.B., VEGA J.A.
Distribution of neurotrophin receptors in human palatine tonsils : an immunohistochemical study.
J. Neuroimmunol. 1995, 58, 131-137.
- 70 - HARRIS N.L., DATA R.E.
The distribution of neoplastic and normal B-lymphoid cells in nodular lymphomas : use of an immunoperoxidase technique on frozen sections.
Hum. Pathol., 1982, 13, 610-617.

- 71 - HARRIS N.L., JAFFE E.S., DIEBOLD J., FLANDRIN G., MULLER-HERMELINK H.K., VARDIMAN J.
The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues : report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997.
Histopathology 2000, 36, 69-87.
- 72 - HARRIS N.L., JAFFE E.S., STEIN H., BANKS P.M., CHAN J.K.C., CLEARY M.L., DELSOL G., de WOLF-PEETERS C., FALINI B., GATTER K.C., GROGAN T.M., ISAACSON P.G., KNOWLES D.M., MASON D.Y., MULLER-HERMELINK H.K., PILERI S.A., PIRIS M.A., RALFKIAER E., WARNKE R.A.
A Revised european-american classification of lymphoid neoplasm's : A proposal from the International Lymphoma Study Group.
Blood 1994, 84, 5, 1361-1392.
- 73 - HENRY-AMAR M.
Epidémiologie des lymphomes.
In : Solal-Céligny P., Brousse N., Fermé C. et al. Eds. Lymphomes.
Paris : Frison-Roche, 1997, 16-34.
- 74 - HERMANS J., KROL A.D.G., VAN GRONINGEN K. et al.
International Prognostic Index for aggressive non-Hodgkin's lymphoma is valid for all malignancy grades.
Blood 1995, 86, 1460-1463.

- 75 - HERRMANN J., MENTER D., HAMADA J., MARCHETTI D., NAKAJIMA M., NICOLSON G.
Mediation of NGF-stimulated extracellular matrix invasion by the human melanoma low-affinity p75 neurotrophin receptor : melanoma p75 functions independently of TrkA.
Mol. Biol. Cell., 1993, 4, 1205-1216.
- 76 - HOEHNER J.C., OLSEN L., SANDSTEDT B., KAPLAN D.R., PAHLMAN S.
Association of neurotrophin receptor expression and differentiation in human neuroblastoma.
Am J. Pathol., 1995, 147, 102-113.
- 77 - HOPPE R.T., KUSHLAN P., KAPLAN H.S. et al.
The treatment of advanced stage favorable histology non-Hodgkin's lymphoma : a preliminary report of a randomized trial comparing single agent chemotherapy, combination chemotherapy and whole body irradiation.
Blood 1981, 58, 592-598.
- 78 - HORNING S.J.
Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas.
Semin. Oncol., 1993, 20, 5, 75-88.
- 79 - HORNING S.J., ROSENBERG S.A.
The natural history of initially untreated low-grade non-hodgkin's lymphomas.
N. Engl. J. Med., 1984, 311, 1471.

- 80 - HSU F.J., BENIKE C., FAGNONI F., LILES T.M., CZERWINSKI D., TAIDI B., ENGLEMAN E.G., LEVY R.
Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.
Nat. Med., 1996, 2, 1, 52-58.
- 81 - HUDSON B.V., HUDSON G.V., McLENNAN K.A., ANDERSON L., LINCH D.C.
Clinical stage 1 non-hodgkin's lymphoma : long term follow up of patients treated by the British National Lymphoma Investigation with radiotherapy alone as initial therapy.
Br J. Cancer., 1994, 69, 1088.
- 82 - JACOBSON.
Reactive oxygen species and programmed cell death Trends.
Biochem. Sci., 1996, 21, 83-86.
- 83 - JAFFE E.S., HARRIS N.L., DIEBOLD J., MULLER-HERMELINK H.K.
World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. A progress report.
Am J. Clin. Pathol., 1999, 111(suppl.1), S8-S12.
- 84 - JAFFE E.S., SHEVACH E.M., FRANK M.M., BERARD C.W., GREEN I.
Nodular lymphoma. Evidence for origin from follicular B lymphocytes.
N. Engl. J. Med., 1974, 290, 813-819.

- 85 - JOENSUU H., KLEMI P.J., JALKANEN S.
Biologic progression in non-Hodgkin's lymphomas. A flow cytometry study.
Hematol. Oncol., 1990, 8, 1-12.
- 86 - JOHNSON D., LANAHAN A., BUCK C.R., SEHGAL A., MORGAN C., MERCER E., BOTHWELL M., CHAO M.
Expression and structure of the human NGF receptor.
Cell., 1986, 47, 545-554.
- 87 - JOHNSON P.W.H., ROHATINER A.Z.S., WHELAN J.S., et al.
Patterns of survival patients with recurrent follicular lymphoma : a 20-year study from single center.
J. Clin. Oncol., 1995, 13, 160-167.
- 88 - KAEBISCH A., BROKT S., SEAY U., LOHMEYER J., JAEGER U., PRALLE H.
Expression of the nerve growth factor receptor c-TRK in human myeloid leukemia cells.
Br. J. Haematol. 1996, 95, 102-109.
- 89 - KANNAN Y., MATSUDA H., USHIO H, KAWAMOTO K., SHIMADA Y.
Murine granulocyte-macrophage and mast cell colony formation promoted by nerve growth factor.
Int. Arch. Allergy Immunol., 1993, 102, 362-367.

- 90 - KANTARJIAN H.M., McLAUGHLIN P., FULLER L.M., DIXON D.O., OSBORNE B.M., CABANILLAS F.F.
Follicular large-cell lymphoma : analysis and prognostic factors in 62 patients.
J. Clin. Oncol., 1984, 2, 811-819.
- 91 - KAPLAN D.R., MARTIN ZANCA D., PARADA L.F.
Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF.
Nature 1991, 350, 158-160.
- 92 - KETTERER N. et al.
Anticorps anti-CD20 : vers une nouvelle arme thérapeutique dans les lymphomes ?
Cancer. Auj., 1998, 7, 129-135.
- 93 - KLEMI P.J., ACANEN K., JALKANEN S. et al.
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a prognostic factor in non-Hodgkin's lymphoma.
Br. J. Cancer., 1992, 66, 739-763.
- 94 - KOGNER P., BARBANY G., BJORK O., CASTELLO M.A., DONFRANCESCO A., FALKMER U.G., HEDBORG F., KOUVIDOU H., PERSSON H., RASCHELLA G.
Trk mRNA and low affinity nerve growth factor receptor mRNA expression and triploid DNA content in favorable neuroblastoma tumors.
Prog. Clin. Biol. Res., 1994, 385, 137-145.

- 95 - KOHLER G., MILSTEIN C.
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.
Nature 1975, 256, 495-497.
- 96 - KORSMEYER S.J.
B-cl2 initiates a new category of oncogenes : Regulators of cell death.
Blood 1992, 80, 879.
- 97 - KUNER P., HERTEL C.
NGF induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line expressing the neurotrophin receptor p75^{NTR}.
J. Neurosci. Res., 1998, 54, (4), 465-474.
- 98 - LABOUYRIE, Eric
Expression des récepteurs aux neurotrophines dans le tissu lymphoïde et hématopoïétique chez l'homme. - 140p.
Thèse : Doctorat de l'Université Victor Segalen : Bordeaux 2 : 1997 ; 545.
- 99 - LABOUYRIE E., PARRENS M., de MASCAREL A., BLOCH B., MERLIO J.-Ph.
Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues.
J. Neuroimmunol., 1997, 77, 161-173

- 100 - LAMBIASE A., BRACCI-LAUDIERO L., BONINI S., BONINI S., STARACE G., MILCO D'ELIOS M., de CARLI M., ALOE L.
Immunodeficiency and other clinical immunology. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors.
J. Allergy Clin. Immunol., 1997, 100, 408-410.
- 101 - LAUTERBORD J.C., TRAN T.M., ISACKSON P.J., GALL C.M.
Nerve growth factor mRNA is expressed by GABAergic neurons in rat hippocampus.
Neuroreport., 1993, 5, 273-276.
- 102 - LAZAR-MOLNAR E., HEGYESI H., TOTH S., FALUS A.
Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma.
Cytokine 2000, 12, 6, 547-554.
- 103 - LEE K., LI E., HUBER L., LANDIS S., SHARPE A., CHAO M., JAENISCH R.
Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system.
Cell., 1992, 69, 737-749.
- 104- LEE M.S.
Molecular aspect of chromosomal translocation t(14 ; 18).
Semin. Haematol., 1993, 30, 297.

- 105 - LEE M.S., BLICK M.B., PATHAK S., TRUJILLO J.M., BUTLER J.J., KATZ R.L., McLAUGHLIN P., HAGEMEISTER F.B., VELASQUEZ W.S., GOODACRE A., CORK A., GUTTERMAN J.U., CABANILLAS F.
The gene located at chromosome 18 band q21 is rearranged in uncultured diffuse lymphomas as well as follicular lymphomas.
Blood 1987, 70, 90.
- 106 - LEIBROCK J., LOTTSPEICH F., HOHN A., HOFER M., HENGERER B., MASIAKOWSKI P., THOENEN H., BARDE Y.A.
Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor.
Nature 1989, 341, 149-152.
- 107 - LENNERT K., FELLER A.C.
Histopathologie des lymphomes malins non Hodgkiniens.
Traduit par J. DIEBOLD, avec la contribution clinique et thérapeutique de M. ENGELHARD et G. BRITTINGER. 2^{ème} Edition, Doin, 1991.
- 108 - LENNERT K., MOHRIN., KAISERLING E. et al.
Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease.
Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1978.
- 109 - LEONARD R.C.F., HAYWARD R.L., PRESCOTT R.J., WANG J.L.
The identification of discrete prognostic groups in low-grade non-Hodgkin's lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party.
Ann. Oncol., 1991, 2, 655-662.

- 110 - LEROY K., HAIOUN O., LEPAGE E., LE METAYER N.; BERGER F., LABOUYRIE E., DUVAL C., MEIGNIN V., PETIT B., BASTARD C., SALLES G., GISSELBRECHT C.; REYES F., GAULARD Ph.
p53 gene mutations are associated with rapid progression and poor survival in low and low-intermediate risk diffuse large B-cell lymphoma. A Gela study.
Soumis à publication.
- 111 - LEVI-MONTALCINI R.
The nerve growth factor 35 years later.
Science 1987, 237, 1154-1162.
- 112 - LEVINE E.G., ARTHUR C.D., FRIZZERA G. et al.
There are differences among histologic subtypes of the non-Hodgkin's lymphomas.
Blood 1985, 66, 1414-1422.
- 113 - LEVINE E.G., ARTHUR D.C., FRIZZERA G. et al.
Cytogenetic abnormalities predict clinical outcome in non-Hodgkin's lymphoma.
Ann. Intern. Med., 1988, 108, 14-20.
- 114 - LIU Y., HERNANDEZ A.M., SHIBATA D. et al.
Bcl2 translocation frequency rises with age in humans.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 8910-8914.
- 115 - LONGO D.L.
Immunotherapy for non-Hodgkin's lymphoma.
Curr. Opin. Oncol., 1996, 8, (5), 353-359.

- 116 - LUKES R.J., COLLINS R.D.
New approaches to the classification of the lymphomata.
Br. J. Cancer 1975, 31(suppl.2), 1-28.
- 117 - McCURLEY T.L., GAY R.E. ; GAY S. et al.
The extracellular matrix in « sclerosing » follicular center cell lymphomas : an immunohistochemical and ultrastructural study.
Hum. Pathol., 1986, 17, 930-938
- 118 - McGROGAN D., SAINT-ANDRE J.-P., DICOU E.
Expression of Nerve Growth Factor and Nerve Growth Factor Receptor Genes in Human Tissues and in Prostatic Adenocarcinoma Cell Lines.
J. Neurochem., 1992, 59, 1381-1391.
- 119 - McLAUGHLIN P.,GRILLO-LOPEZ A.J., LINK B.K., LEVY R., CZUCZMAN M.S., WILLIAMS M.E., HEYMAN M.R., BENCE-BRUCKLER I., WHITE C.A., CABANILLAS F., JAIN V., HO A.D., LISTER J., WEY K., SHEN D., DALLAIRE B.K.
Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma : half of patients respond to a four-dose treatment program.
J. Clin. Oncol., 1998, 16, 2825-2833.
- 120 - MAJDAN M, LACHANCE C., GLOSTER A., ALOYZ R., ZEINDLER C., BAMJI S., BHAKAR A., BELLIVEAU D., FAWCETT J., MILLER F.D., BARKER P.A.
Transgenic mice expressing the intracellular domain of the p75 neurotrophin receptor undergo neuronal apoptosis.
J. Neurosci., 1997, 17, 6988-6998.

- 121 - MALGRANGE B., RIGO J.M., VAN de WATER T.R., STAECKER H., MOONEN G., LEFEBVRE P.P.
Growth factor therapy to the damaged inner ear: clinical prospects.
Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol., 1999, 49, 1, S19-25.
- 122 - MALONEY D., GRILLO-LOPEZ A.J., WHITE C.A., BODKIN D., SCHILDER R.J., NEIDHART J.A., JANAKIRAMAN N., FOON K.A., LILES T-M., DALLAIRE B.K., WEY K., ROYSTON I., DAVIS T., LEVY R.
IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-hodgkin's lymphoma.
Blood 1997, 90, 2188-2195.
- 123 - MALONEY D.G., LILES T.M., CZERWINSKI D.K. et al.
Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma.
Blood 1994, 84, 2457-2466.
- 124 - MARINELLI L., CAMMARATA S., NOBBIO L., SCHENONE A., ZACCHEO D., ANGELINI G., TABATON M.
Tyrosine kinase A-nerve growth factor receptor is antigenically present in dystrophic neurites from a variety of conditions but not in Alzheimer's disease.
Neurosci. Lett., 1999, 273, (1), 67-71.

- 125 - MARTIN-ZANCA D., BARBACID M., PARADA L.F.
Expression of the trk proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development.
Genes Dev., 1990, 4, 683-694.
- 126 - MARTIN-ZANCA D., HUGHES S.H., BARBACID M.
A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences.
Nature 1986, 319, 743-748.
- 127 - MARTIN-ZANCA D., OSKAM R., MITRA G., COPELAN D.,
BARBACID M.
Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene.
Mol. Cell. Biol., 1989, 9, 24-33.
- 128 - MAZEL S., BURTRUM D., PETRIE H.T.
Regulation of cell division cycle progression by Bcl2 expression : a potential mechanism for inhibition of programmed cell death.
J. Exp. Med., 1996, 183, 2219-2226.
- 129 - MERLIO, Jean-Philippe
Expression des récepteurs de la famille Trk dans le système nerveux central - 226p.
Th. Doctorat de l'Université Victor Segalen : Bordeaux 2 : 1998, 628.

- 130 - MERLIO J.P., ERNFORS P., JABER M., PERSSON H.
Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system.
Neuroscience 1992, 51, 513-532.
- 131 - MISSALE C., SIGALA S., FIORENTINI C., FINARDI A., LOSA M., GIOVANELLI M., SPANO P.
Nerve growth factor suppresses the tumoral phenotype of human prolactinomas.
Horm. Res., 1997, 47, 240-244.
- 132 - MISSALE C., SPANO P.
Nerve growth factor in pituitary development and pituitary tumors.
Front. Neuroendocrinol., 1998, 19, 2, 128-150.
- 133 - MULTANI P.S., GROSSBARD M.L.
Monoclonal Antibody-Based Therapies for Hematologic Malignancies.
J. Clin. Oncol., 1998, 16, (11), 3691-3710.
- 134 - NELSON E.L., LI X., HSU F.J., KWAK L.W., LEVY R., CLAYBERGER C., KRENSKY A.M.
Tumor-specific, cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma.
Blood 1996, 88, (2), 580-589.

- 135 - NGAN B., WARNKE A., CLEARY M.L.
Variability of immunoglobulin expression in follicular lymphoma. An immunohistologic and molecular genetic study.
Am J. Pathol., 1989, 135, 1139-1144.
- 136 - NGAN B.Y., CHEN-LEVY Z., WEISS L.M. et al.
Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the Bcl2 protein associated with the t(14 ;18) chromosomal translocation.
N. Engl. J. Med., 1988, 318, 1638-1643.
- 137 - NGUYEN P.L., ZUKERBERG L.R., BENEDICT W.F., HARRIS N.L.
Immunohistochemical detection of P53, Bcl2 and retinoblastoma proteins in follicular lymphoma.
Am J. Clin. Pathol., 1996, 105, 538-543.
- 138 - NUNEZ G., LONDON L., HOCKENBERY D., ALEXANDER M., McKEARN J., KORSMEYER S.J.
Deregulated Bcl2 gene expression selectively prolongs survival of growth-factor deprived hematopoietic cell lines.
Immunol., 1990, 144, 3602.
- 139 - OELMANN E., SRETER L., SCHULLER I., SERVE H., KOENIGSMANN M., WIEDENMANN B., OBERBERG D., REUFI B., THIEL E., BERDEL W.E.
Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling.
Cancer Res., 1995, 55 (10), 2212-2219.

- 140 - PAPADOPOULOS K.P., BAGG A., BEZWODA W.R., MENDELOW B.V.
The routine diagnostic utility of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in lymphoproliferative disorders.
Am J. Clin. Pathol., 1989, 91, 633-638.
- 141 - PARRENS M., DUBUS P., GROPPA A., VELY J.F., LABOUYRIE E., de MASCAREL A., MERLIO J.P.
Differential expression of NGF receptors in human thymic epithelial tumors.
Pathol. Res. Pract., 1999, 195 (8), 549-553.
- 142 - PESCARMONA E., PISACANE A., PIGNATELLI E., BARONI C.D.
Expression of epidermal and nerve growth factor receptors in human thymus and thymomas.
Histopathology 1993, 23, 39-44.
- 143 - PEZZELLA F., GATTER K.C., MASON D.Y. et al.
Bcl2 protein expression in follicular lymphomas in absence of (14 ; 18) translocation.
Lancet 1990, ii, 1510-1511.
- 144 - PEZZELLA F., JONES M., RALFKIAER E. et al.
Evaluation of Bcl2 expression and 14 ;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma.
Br. J. Cancer 1992, 65, 87-91.
- 145 - PEZZELLA F., MORRISON H., JONES M. et al.
Immunohistochemical detection of p53 and Bcl2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma.
Histopathology 1993, 22, 39-44.

- 146 - PIEROTTI M.A., BONGARZONE I., BORRELLO M.G., MARIANI C., MIRANDA C., SOZZI G., GRECO A.
Rearrangements of TRK proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas.
J. Endocrinol. Invest., 1995, 18, 130-133.
- 147 - PINCELLI C., MARCONI A.
Autocrine nerve growth factor in human keratinocytes.
J. Dermatol. Sci., 2000, 22, 2, 71-79.
- 148 - PLENAT F., PICARD E., ANTUNES L., VIGNAUD J.-M. , MARIE B., CHALABREYSSE P., MUHALE F.
Amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de dérivés de la tyramine. Un gain décisif de sensibilité en immunohistochimie et en hybridation *in situ*.
Ann. Pathol., 1997, 17(1), 17-23.
- 149 - PRICE C.G.A., MEERABUX J., COTTER F.E., ROHATINER A.Z.S., YOUNG B.D., LISTER T.A.
The significance of circulating cells carrying (14 ;18) in long remission from follicular lymphoma.
J. Clin. Oncol., 1991, 9, 1527.
- 150 - RABIZADEH S., OH J., ZHONG L.T., YOUNG J., BITLER C.M., BUTCHER L.L., BREDESEN D.E.
Induction of apoptosis by the low affinity NGF receptor.
Science 1993, 261, 345-348.

- 151 - RETTIG W., THOMSON T., SPENGLER B., BIEDLER J., OLD L.
Assignment of human nerve growth factor receptor gene to
chromosome 17 and regulation of receptor expression in
somatic cell hybrids.
Somat. Cell. Mol. Genet., 1986, 12, 441-447.
- 152 - RIETHMULLER G., SCHNEIDER-GADICKE E., JOHNSON J.P.
Monoclonal antibodies in cancer therapy.
Curr. Opin. Immunol., 1993, 5, 732-739.
- 153 - RIESS L.A.G., KOSARY C.L., HANKEY B.F. et al.
Eds. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1994. NIH Pub Nr
97-2789. Bethesda, MD : National Cancer Institute, 1997.
- 154 - ROHATINER A.Z.S. JOHNSON P.W.N., PRICE C.G.A., ARNOTT
S.J., AMESS J.A.L., NORTON A.J., DOREY E., ADAMS K.,
WHELAN J.S., MATTHEWS J., McCALLUM P.K, OZA A.M.,
LISTER T.A.
Myeloablative therapy with ABMT as consolidation therapy for
recurrent follicular lymphoma.
J Clin Oncol., 1994, 12, 1177.
- 155 - ROSENBERG A.Z.S., LISTER T.A.
New approaches to the treatment of follicular lymphoma.
Br J. Haematol., 1991, 79, 349.
- 156 - ROSS G.M., SHAMOVSKY I.L, LAWRENCE G., SOLC M.,
DOSTALER S.M., WEAVER D.F., RIOPELLE R.J.
Reciprocal modulation of TrkA and p75^{NTR} affinity states is
mediated by direct receptor interactions.
Eur. J. Neurosci., 1998, 10, 890-898.

- 157 - RUBERTI F., BERRETTA N., CATTANEO A., CHERUBINI E.
NGF antibodies impair long-term depression at the mossy fibre-
CA3 synapse in the developing hippocampus.
Brain Res. Dev. Brain Des., 1997, 101, (1-2), 295-297.
- 158 - SALLES G.
Le rituximab dans les lymphomes folliculaires.
Hématol., 2000, 6, 11-16.
- 159 - SANDER C.A., YANO T., CLARK H.M. et al.
P53 mutation is associated with progression of follicular
lymphomas.
Blood 1993, 82, 1994-2004.
- 160 - SARIOLO H., SAARMA M., SAINIO K., ARUMËE U., PALGI J.
Dependence of kidney morphogenesis on the expression of nerve
growth factor receptor.
Science 1991, 254, 571-573.
- 161 - SCHROFF R.W., FOON K.A., BEATTY S.M. et al.
Human anti-murine immunoglobulin responses in patients
receiving monoclonal antibody therapy.
Cancer Res., 1985, 45, 879-885.
- 162 - SEMKOVA I., KRIEGLSTEIN J.
Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and
induction of neurotrophic factors.
Brain. Res. Brain Res. Rev, 1999, 30, 2, 176-188.

- 163 - SHELTON D.J., REICHARDT L.F.
Expression of the nerve growth factor gene correlates with the density of sympathetic innervation in effector organs.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984, 81, 7951-7955.
- 164 - SHELTON D.L., REICHARDT L.F.
Studies on the expression of β nerve growth factor (NGF) in the central nervous system : level and regional distribution of NGF mRNA suggests that NGF function as atrophic factor for several distinct populations of neurons.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 2714-2718.
- 165 - SHELTON D., SUTHERLAND J., GRIPP J., CAMERATO T., ARMANINI M., PHILLIPS H., CARROLL K., SPENCER S., LEVINSON A.
Human trks : Molecular cloning, tissue distribution, and expression of extracellular domain immunoadhesins.
J. Neuroscience 1995, 15, 477-491.
- 166 - SMALLEY R.V., ANDERSEN J.W., HAWKINS M.J. et al.
Interferon- α combined with cytotoxic chemotherapy for patients with non-Hodgkin's lymphomas.
N. Engl. J. Med., 1992, 327, 1336-1341.
- 167 - SOBUE G., YAMAMOTO M., DOYU M., LI M., YASUDA T., MITSUMA T.
Expression of mRNAs for neurotrophins (NGF, BDNF, and NT-3) and their receptors (p75^{NGFR}, trk, trkB, and trkC) in human peripheral neuropathies.
Neurochem. Res., 1998, 23 (6), 821-829.

- 168 - SOINI Y., PAAKKO P., ALAVAIKKO M., VAHAKANGAS K.
P53 expression in lymphatic malignancies.
J. Clin. Pathol., 1992, 45, 1011-1014.
- 169 - SOLAL-CELIGNY P., BRICE P., BROUSSE N., CASPARD H.,
BASTION Y., HAIOUN C., BOSLY A., TILLY H., BORDESOUILLE
D., SEBBAN C., HAROUSSEAU J.L., MOREL P., DUPAS B.,
PLASSART F., VASILE N., FORT N., LEPORRIER M.
Phase II trial of Fludarabine Monophosphate as first-line
treatment in patients with advanced follicular lymphoma : a
multicenter study by the Groupe d'Etudes des lymphomes de
l'adulte.
J. Clin. Oncol., 1996, 14, 514.
- 170 - SOLAL-CELIGNY Ph., BROUSSE N., REYES F., GISSELBRECHT
C.
Lymphomes. 3^{ème} édition.
Paris : Frisson-Roche, 1997.
- 171 - SOLAL-CELIGNY P., LEPAGE E., BROUSSE N. et al.
Recombinant interferon- α 2b combined with a regimen
containing doxo rubicin in patients with advanced follicular
lymphomas.
N. Engl. J. Med., 1993, 329, 1608-1613.
- 172 - SOLAL-CELIGNY P., LEPAGE E., BROUSSE N. et al.
A doxo rubicin-containing regimen with or without interferon- α
2b for advanced follicular lymphomas. Final analysis of survival
and toxicity in the GELF 86 trial.
J. Clin. Oncol., 1998, 16, 2332-2338.

- 173 - STANSFELD A.G., DIEBOLD J., KAPANCI Y. et al.
Updated Kiel classification for lymphomas.
Lancet 1988, 1, 292.
- 174 - STRAUS D.J., FILIPPA D.A., LIEBERMAN P.H. et al.
The non-Hodgkin's lymphomas.I. A retrospective clinical and
pathologic analysis of 499 cases diagnosed between 1958 and
1969.
Cancer 1983, 51, 101-113.
- 175 - STROBACH R., NAKAMINE H., MASIH A., LINDER J.,
WEISENBURGER D.
Nerve growth factor receptor expression on dendritic reticulum
cells in follicular lymphoid proliferations.
Human. Pathol. 1991, 22, 481-485.
- 176 - TAM S.Y., TSAI M., YAMAGUCHI M., YANO K., BUTTERFIELD
J.H., GALLI S.J.
Expression of functional TrkA receptor tyrosine kinase in the
HMC-1 human mast cell line and in human mast cells.
Blood 1997, 90, 1807-1820.
- 177 - THEODOROU S.D., KLIMENTOPOULOU A.E., PAPALOUKA E.
Congenital insensitivity to pain with anhidrosis. Report of a case
and review of the literature.
Acta. Orthop. Belg., 2000, 66, 2, 137-145.
- 178 - TEDDER T.F. , ENGEL P.
CD20 : a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes.
Immunol. Today 1994, 15, 450-454.

- 179 - TILLY H., ROSSI A., STAMATOULLAS A. et al.
Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma.
Blood 1994, 84, 1043-1049.
- 180 - TRAWEEK S.T., LIU J., JOHNSON R.M., WINBERG C.D., RAPPAPORT H.
High-grade transformation of chronic lymphocytic leukemia and low-grade non Hodgkin's lymphoma. Genotypic confirmation of clonal identity.
Am. J. Clin. Pathol., 1993, 100, 519-526.
- 181 - TSUJIMOTO Y., COSSMAN J., JAFFE E. et al.
Involvement of the Bcl2 gene in human follicular lymphoma.
Science 1985, 228, 1440-1443.
- 182 - ULRICH A., GRAY A., BERMAN C., DULL T.J.
Human β -nerve growth factor gene highly homologous to that of mouse.
Nature 1983, 303, 821-825.
- 183 - ULRICH E., DUWEL A., KAUFFMANN-ZEH A., GILBERT C., LYON D., RUDKIN B., EVAN G., MARTIN-ZANCA D.
Specific TrkA survival signals interfere with different apoptotic pathways.
Oncogene 1998, 16, 825-832.

- 184 - VALENT A., DANGLLOT G., BERNHEIM A.
Mapping of the tyrosine kinase receptors trkA (NTRK1), trkB (NTRK2) and trkC (NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization.
Eur. J. Hum. Genet., 1997, 5, 102-104.
- 185 - VERDI J., BIRREN S., IBANEZ C., PERSSON H., KAPLAN D., BENEDETTI M., CHAO M., ANDERSON D.
p75 LNGFR regulates trk signal transduction and NG-induced neuronal differentiation in MAH cells.
Neuron., 1994, 13, 733-745.
- 186 - WEISDORF D.J., ANDERSEN J.W., GLICK J.H., OKEN M.M.
Survival after relapse of low-grade non-Hodgkin's lymphoma : implications for bone marrow transplantation.
J. Clin. Oncol., 1992, 942-947.
- 187 - WELCHER A., BITLER C., RADEKE M., SHOOTER E.
Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1991, 88, 159-163.
- 188 - WRIGTH E., VOGEL K., DAVIES A.
Neurotrophic factors promote the maturation of developing sensory neurons before they become dependent on these factors for survival.
Neuron., 1992, 9, 139-150.

- 189 - XERRI L., BROUSSE N.
Arbre décisionnel en hématopathologie : pour une rationalisation du diagnostic histo-phéno-génotypique.
Ann. Pathol., 1998, 18, 343-360.
- 190 - YAMADA K., NITTA A., HASEGAWA T., FUJI K., HIRAMATSU M., KAMEYAMA T., FURUKAWA Y., HAYASHI K., NABESHIMA T.
Orally active NGF synthesis stimulators : potential therapeutic agents in Alzheimer's disease.
Behav. Brain. Res., 1997, 83, 117-122.
- 191 - YUEN A.R., KAMEL O.W., HALPERN J., HORNING S.J.
Long term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma.
J. Clin. Oncol., 1995, 13, 1726-1733.
- 192 - YUNIS J.J., FRIZZERA G., OKEN M.M. et al.
Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma : a possible model for cancer.
N. Engl. J. Med., 1987, 316, 79-86.
- 193 - YUNIS J.J., OKEN M.M., KAPLAN M.E. et al.
Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma.
N. Engl. J. Med., 1982, 307, 1231.

194 - ZUPAN A.A., OSBORNE P.A., SMITH C.E., SIEGEL N.R., LEIMGRUBER R.M., JOHNSON J.E.M.

Identification, purification and characterization of truncated forms of the human nerve growth factor receptor.

J. Biol. Chem., 1989, 264, 11714-11720.



ANNEXES



□ **dNTP à 1% : (v/v)**

- ◆ 10 µL de dATP, dCTP, dTTP, dGTP à 10 mM (Promega).
- ◆ 960 µL d'eau ultra pure.

□ **DPBS (tampon phosphate salé selon DULBECCO)**

(solution de 100 mL)

- ◆ 0,2 g de KCL
- ◆ 8 g de NaCL
- ◆ 0,2 g de KH₂PO₄
- ◆ 1,15 g de NA₂ HPO₄
- ◆ 133 mg de CaCL₂ 2H₂O
- ◆ 492 µL de MgCl₂ 1M

□ **Fast Red**

- | | |
|---------------------|--------|
| ◆ Fast Red | 10 mg |
| ◆ Naphtol AS MX | 2 mg |
| ◆ MR 50X PA | 200 µL |
| ◆ Tris 0,1 M pH 8,2 | 9,8 mL |
| ◆ Levamisole 1M | 1 mL |

□ **Gel d'agarose d'ADN à 2 % (m/v)**

- ↘ 1 g d'agarose dans 50 mL de tampon TAE1X (Tris-Acétate EDTA).
- ↘ Chauffage au micro-onde.
- ↘ 3 µL de Bromure d'Ethidium (BET).
- ↘ Migration des dépôts à 50 Volts pendant 2 heures.

□ **Gel d'agarose d'ARN à 2 % (m/v)**

- ↘ 0,5 g d'agarose dans 49 mL de tampon TBE1X (Tris-Borate EDTA).
- ↘ Chauffage au micro-onde pour solubiliser l'agarose.
- ↘ 1 mL d'isothiocyanate de guanidium 1M préparé extemporanément (1,18 g d'isothiocyanate de guanidium dans 10 mL d'eau pure Milli Q).
- ↘ 3 µL de Bromure d'Ethidium (BET).
- ↘ Migration des dépôts à 35 Volts pendant 2 heures.

□ **Gel de polyacrylamide à 15 % (v/v)**

- ↘ 15 mL d'acrylamide (APPLIGENE)
- ↘ 5 mL de tampon TBE10X.
- ↘ Quantité suffisante d'eau pure milliQ pour un volume final de 100 mL.
- ↘ Agents de polymérisation :
 - ◆ 30 µL de TEMED
 - ◆ 350 µL d'ammonium persulfate à 10 %.

□ **Hématoxyline**

Hématoxyline SPECI diluée au 1/3 dans de la solution diluante :

Solution diluante :

- ◆ Eau distillée 1000 mL
- ◆ Alun potassique 100 g

□ **Lévamisole**

(solution 1 M)

- ◆ Lévamisole 0,96 g
- ◆ Tris-Hcl 0,1 M pH 8,2 4 mL

□ Milieu de montage contenant du Polyvinyl

| | |
|--------------------|-------|
| ◆ Polyvinyl alcool | 12 g |
| ◆ Tris-Hcl 1M pH 8 | 5 mL |
| ◆ Eau distillée | 95 mL |

↘ Chauffer un peu sur agitateur (température inférieure à 60°C).
Ajuster le pH à 8,5.

↘ Laisser reposer la nuit à +4°C.

↘ Le lendemain, le placer dans un bain marie à 60°C pendant 45 minutes.

↘ Ajouter 23 mL de glycérol lorsque la température atteint 50°C. Vérifier le pH qui doit être aux environs de 8,7.

↘ Aliquoter et stocker à -20°C.

□ MR 50X Peroxydase

| | |
|---------------|--------|
| ◆ Brij 35 | 2,9 mL |
| ◆ Saponine | 0,1 g |
| ◆ Tween 20 | 0,5 mL |
| ◆ Eau stérile | 6,6 mL |

□ MR 50X Phosphatase Alcaline

| | |
|------------------------|--------|
| ◆ Brij 35 | 2,9 mL |
| ◆ Saponine | 0,1 g |
| ◆ Tween 20 | 0,5 mL |
| ◆ MgCl ₂ 1M | 0,1 mL |
| ◆ Eau stérile | 10 mL |

NAOH 1 N

- ◆ NAOH 40 g
- ◆ Eau distillée 1000 mL

 Naphtol AS-MX

- ◆ Naphtol 100 mg
- ◆ DMF 10 mL

 Paraformaldéhyde à 4 % (m/v)

PBS 1X

- ◆ 10X PBS 50 mL
- ◆ Eau DEPC 450 mL

Sur agitateur : 20 g de paraformaldéhyde dans 500 mL de PBS 1 X.

Ajuster le pH entre 7 et 8.

 Tampon Citrate pH : 6,0

- ◆ 36 mL d'acide citrique à 21,01 g/L
- ◆ 164 mL de citrate de sodium à 29,41 g/L
- ◆ Eau distillée QSP 2 l.

 Tampon PBS-Tween

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

□ **Tampon TRIS IMIDAZOLE**

(TRIS HCl 0,2 M pH 8,8 – IMIDAZOLE 10mM)

- ◆ 20 mL de TRIS HCl 1M pH 7,6 (fourni par le laboratoire du Professeur NABET)
- ◆ 80 mL d'H₂O stérile
- ◆ 0,068 g d'IMIDAZOLE.
- ◆ Ajustement au pH 8,8



□ **TBST**

- ◆ Tris-Hcl 1 M pH 7,6 50 mL
- ◆ NaCl 5 M 30 mL
- ◆ Eau stérile 920 mL

□ **Tris Hcl 0,1 M pH 8,2**

- ◆ Tris-Hcl 1 M pH 8 100 mL
- ◆ Eau stérile 1000 mL
- ◆ Vérifier le pH à 8,2

□ **Tyramide-Biotine**

↘ **Tampon borate (50mM pH 8) :**

Acide Borique : 154 mg dans 50 mL d'H₂O stérile.

↘ **NHS-LC Biotine 8,8 M :**

20 mg dans 500 µL de Diméthylformamide.

↘ **Tyramide HCL 7,4 mM :**

6,4 mg dans 5 mL de tampon Borate.

- ◆ Additionner 5 mL de solution biotine et 5 mL de solution tyramine.
- ◆ Mélanger avec l'agitateur sur la nuit, à l'abri de la lumière.
- ◆ Conserver à 20°C.

VU

NANCY, le **25 SEPTEMBRE 2000**

Le Président de Thèse

NANCY, le **25 SEPTEMBRE 2000**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

M le Professeur **A. DUPREZ**

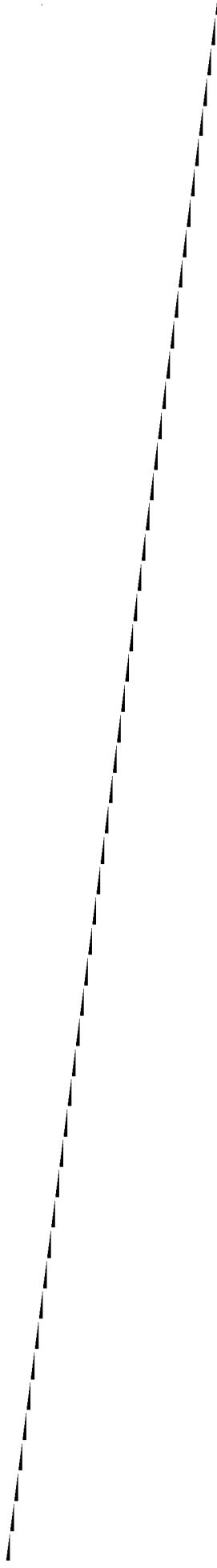
Professeur **J. ROLAND**

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE

NANCY, le **27 SEPTEMBRE 2000**

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY 1

Professeur **C. BURLET**



RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Le Nerve Growth Factor (NGF), chef de file de la famille des neurotrophines, protéine essentielle à la survie, au développement et à la différenciation des neurones se lie à deux récepteurs p75^{NTR} (Neurotrophin Receptor) et TrkA (Tropomyosin-related kinase). Ces molécules ont récemment été identifiées dans le tissu lymphoïde humain normal ou pathologique. Dans une étude anatomo-clinique rétrospective de 25 lymphomes folliculaires (LF), nous avons recherché l'existence et l'intensité d'expression de ces molécules. Les techniques immunohistochimiques (IHC) ont été réalisées sur des tissus congelés ou fixés dans du formol. Elles ont fait appel à des montages en trois couches utilisant la streptavidine-biotine, à des méthodes d'amplification par la tyramine biotinylée ainsi qu'à des systèmes de révélation de l'anticorps primaire par la peroxydase ou la phosphatase alcaline. Les transcrits ont été recherchés par RT-PCR. Avec ces techniques, nous n'avons pu mettre en évidence que les transcrits de NGF. En IHC, le NGF et ses récepteurs étaient exprimés dans les cellules du micro-environnement. L'expression du NGF était observée dans les cellules réticulaires interdigitées ; celle de p75^{NTR} dans les filets nerveux périvasculaires et sous-capsulaires, les cellules endothéliales et les cellules folliculaires dendritiques ; et celle de TrkA dans les cellules réticulaires interdigitées, les cellules endothéliales et les cellules folliculaires dendritiques. En revanche, l'expression de NGF, p75^{NTR} et TrkA a été observée pour la première fois, *in vivo*, dans les cellules tumorales. Aucune corrélation n'a été observée entre le niveau d'expression du NGF avec les critères péjoratifs habituels des LF (le stade d'Ann Arbor au moment du diagnostic, l'élévation sérique du taux de β 2-microglobuline ou des LDH, l'existence de symptômes B, d'une altération de l'état général ou d'une « forte » masse tumorale) ou avec l'immunoréactivité P53, Bcl2, Bcl6 et Ki67. En revanche, l'hyperexpression de p75^{NTR} était corrélée avec le stade d'Ann Arbor élevé au moment du diagnostic ($r=0,45$). Au vu de nos résultats acquis sur une petite série aux caractéristiques superposables à celles des grandes séries de la littérature, p75^{NTR} pourrait constituer un facteur pronostic prédictif dans les LF de stade élevé. Toutefois, ces résultats devraient être vérifiés sur de grandes séries multicentriques.

TITRE EN ANGLAIS :

Expression of Nerve Growth Factor (NGF) and his receptors in follicular lymphoma.
A study of 25 cases.

THÈSE :

MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2000

MOTS CLEFS :

LYMPHOME ANATOMIE PATHOLOGIQUE FACTEUR NEUROTROPE
DERIVE CERVEAU

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'U.F.R. :

Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 – VANDOEUVRE LES NANCY Cédex
