



UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ - LILLE 2
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2015

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**ÉTUDE MOLÉCULAIRE DU LYMPHOME DE HODGKIN
PAR TECHNIQUE ONCOSCAN™ APRÈS MICRODISSECTION**

Présentée et soutenue publiquement le Mardi 21 Avril 2015 à 18h
au Pôle Recherche de la Faculté de Médecine

Par Romain DUBOIS

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME

Monsieur le Professeur Franck MORSCHHAUSER

Directeur de Thèse :

Madame le Professeur Marie-Christine COPIN

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Liste des abréviations

ABVD	Adriamycine-Bléomycine-vinblastine-dacarbazine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AE/ATE	Tampons d'éluion
AFA	Alcool, Formol, Acide Acétique
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATL/AL	Tampons de lyse
AW1 AW2	Tampons de lavage
BAFF	B cell activating factor
BEACOPP	Bléomycine, Etoposide, Adriamycine, Cyclophosphamide, Oncovin, Procarbazine, Prednisone
BCL-XL	B Cell Lymphoma extra large
BOB-1	B cell specific Octamen Binding protein 1
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
CCND1	Cycline D1
CD79a	Cluster of Differentiation 79a
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CGH	Comparative Genomic Hybridization
cHL	Classical Hodgkin Lymphoma
CHRU	Centre Hospitalier Universitaire de Lille
DAB	DiaminoBenzidine
EBER	Epstein Barr Encoded RNA
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EBNA	Epstein Barr Nuclear Antigen
EBV	Epstein Barr Virus
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	Epithelial Membrane Antigen
EORTC	European Organization for Research and Treatment of Cancer
ETV6	ETS variant Gene 6
FDA	U.S. Food and Drug Administration

FFPE	Formaldehyde fixed and paraffin embedded
FISH	Hybridation in situ en fluorescence
GHSG	German Hodgkin Study Group
HAS	Haute autorité de Santé
HES	Hématéine Eosine Safran
IHC	Immunohistochimie
IKK	I κ B kinase
IKK α	I κ B alpha kinase
I κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IPS	International Prognostic Score
JAK2	Janus Kinase 2
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LDH	Lactate Deshydrogénase
LMD	Laser Microdissection
LMP1	Latent Membrane protein 1
LOH	Loss of Heterozygosity
LP	Lymphocyte Predominant
MSL	Milieu séparation des leucocytes
MYC	c-Myc
NF κ B	Nuclear factor-kappa B
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
MUM1/IRF4	Multiple Myeloma-1 / Interferon regulatory Factor-4
OCT-2	Octamer Transcription Factor-2
PAX5	Paired box protein Pax-5
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PEN	polyéthylène naphthalate
PET	polyéthylène téréphthalate
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTPN2	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
REL	gène REL codant pour la protéine Proto-oncogene c-Rel
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

SNP	single-nucleotide polymorphism, polymorphisme nucléotidique
SOCS-1	Suppressor of cytokine signaling 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SVF	serum de veau foetal
TCR	T cell Receptor
TE	Tris EDTA
TEP FDG	Tomographie par émission de positons au FDG (fluoro-désoxy-glucose)
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TP 53	Tumor protein p53
UV	Ultraviolet
VAPEC-B	vincristine, doxorubicin (Adriamycin), prednisone, etoposide, cyclophosphamide, bleomycin
VIH	Virus immunodéficience humaine

Table des matières

Résumé	1
Introduction	2
I. Définition.....	2
A. Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire	2
B. Lymphome de Hodgkin classique.....	3
II. Historique	4
III. Épidémiologie	5
IV. Facteurs de risque	6
V. Clinique.....	7
VI. Classifications.....	9
VII. Pronostic	10
VIII. Traitements	12
IX. Les patients réfractaires	13
A. Pronostic	13
B. Autogreffe.....	14
C. Allogreffe	15
D. Thérapies ciblées	16
1. Anti CD30.....	16
2. Inhibiteurs d'histone désacétylases.....	16
3. Inhibiteurs de JAK/STAT.....	17
E. Micro-environnement.....	17
X. Caractéristiques pathologiques.....	19
A. Macroscopie.....	19
B. Microscopie commune	19
C. Immunohistochimie	20
D. Sous-types	22
1. Scléro-nodulaire	22
a) Définition	22
b) Épidémiologie.....	22
c) Morphologie.....	23
d) Immunohistochimie.....	25
e) Pronostic	25
f) Diagnostic différentiel	25
2. Cellularité mixte.....	26
a) Définition	26
b) Épidémiologie.....	26
c) Morphologie.....	27
d) Immunohistochimie.....	28
e) Diagnostic différentiel	28
3. Riche en lymphocytes	28
a) Définition	28
b) Épidémiologie.....	29
c) Morphologie.....	29
d) Immunohistochimie.....	30
e) Diagnostics différentiels.....	30
4. Déplétion lymphocytaire	31
a) Définition	31

b) Épidémiologie.....	31
c) Morphologie.....	32
d) Immunohistochimie.....	33
e) Diagnostic différentiel	33
XI. Biologie.....	35
A. Origine de la cellule de Hodgkin.....	35
B. Cytogénétique	37
C. Voies de signalisation.....	38
1. Voie NF-kB	38
2. Voie JAK/STAT	39
Objectifs de l'étude	43
I. Objectif principal	43
II. Justification du déroulement de l'étude.....	43
A. Microdissection.....	43
B. Étude moléculaire.....	44
III. Mise au point de la phase pré-analytique	48
Matériels et Méthodes.....	49
I. Sélection des cas.....	49
II. Mise au point de la microdissection	50
A. Choix des lames de microdissection	50
B. Sélection des zones tumorales.....	51
1. Sur l'HES.....	51
a) Épaisseur de coupe.....	51
b) Coloration standard.....	52
2. Après immunomarquage	52
a) Épaisseur de coupe.....	52
b) Immunohistochimie.....	53
III. Tests de quantité d'ADN	54
A. Sur blocs de paraffine d'années différentes	54
B. Sur 1000 cellules issues de prélèvements sanguins.....	55
C. Sur coupes de paraffine d'épaisseur variable.....	55
IV. Microdissection.....	56
V. Macrodissection.....	60
VI. Extractions.....	60
A. Extraction des échantillons issus de la microdissection	60
B. Extraction des échantillons issus de la macrodissection	62
1. Déparaffinage et lyse	62
2. Extraction	62
VII. Dosage de l'ADN.....	63
VIII. Analyse moléculaire	64
A. Hybridation du panel de sondes.....	64
B. De la ligation de la sonde jusqu'à la première PCR	65
C. Gel de contrôle et 2 ^{ème} PCR.....	66
D. Digestion enzymatique et 2 ^{ème} gel de contrôle	66
E. Hybridation à la puce.....	67
IX. Analyse des données moléculaires	67
Résultats	68
I. Phase pré-analytique.....	68
A. Mise au point de la microdissection.....	68
1. Choix des lames de microdissection	68
2. Épaisseurs de coupe.....	68
3. Prétraitement des lames de microdissection.....	68

4.	Choix de la méthode de sélection des cellules tumorales	69
a)	Sur HES	69
b)	Après immunomarquage	70
B.	Quantités d'ADN extrait	73
1.	Influence de l'ancienneté des blocs de paraffine	73
2.	Influence du nombre de cellules dans l'échantillon	74
3.	Influence de l'épaisseur de coupe et de l'immunohistochimie	74
C.	Dosage des ADN issus de la microdissection	75
D.	Dosage des ADN issus de la macrodissection	76
II.	Étude moléculaire	78
A.	Gains et pertes chromosomiques	78
1.	Gain de la région 9p24	80
a)	Cas n°4	80
b)	Cas n°6	80
c)	Cas n°9	80
2.	Gain de la région 2p16	81
3.	Gain de la région 12p13	81
a)	Cas n°3	82
b)	Cas n°6	82
c)	Cas n°9	82
d)	Cas n°12	82
e)	Cas n°14	82
f)	Cas n° 18	82
4.	Perte de la région 1p36	83
a)	Cas n°10	83
b)	Cas n°15	83
B.	Mutations somatiques	84
1.	<i>TP53</i>	84
2.	<i>EGFR</i>	84
3.	<i>KRAS</i>	84
4.	<i>NRAS</i>	84
5.	<i>PTEN/IDH1/IDH2/BRAF/PIK3CA</i>	85
C.	Résultats du cas n°12 avec et sans microdissection	88
	Discussion	89
I.	Méthodologie	89
A.	Sélection des cas	89
B.	Choix du matériel à étudier	89
C.	Quantités d'ADN	90
1.	Influence de la durée de conservation du bloc	90
2.	Influence du nombre de cellules	91
3.	Influence de l'épaisseur de coupe	91
4.	Choix du kit d'extraction d'ADN	92
D.	Choix de la méthode de recueil et de repérage des cellules tumorales	93
1.	Microdissection	93
2.	Macrodissection	95
3.	Microdissection du cas n°12	96
II.	Étude moléculaire	98
A.	Gain de la région 9p24	98
B.	Voie NF-kB	101
1.	Gain de 2p16	101
2.	Perte de 1p36	102
3.	Gain de 12p13	103

C. Mutations somatiques	104
Conclusion et Perspectives.....	106
Références bibliographiques	108
Annexe 1 : Protocole OncoScan™ FFPE	120
Annexe 2 : Vue caryotypique du cas n°1.....	132
Annexe 3 : Vue caryotypique du cas n°3.....	133
Annexe 4 : Vue caryotypique du cas n°4.....	134
Annexe 5 : Vue caryotypique du cas n°6.....	135
Annexe 6 : Vue caryotypique du cas n°9.....	136
Annexe 7 : Vue caryotypique du cas n°10.....	137
Annexe 8 : Vue caryotypique du cas 12 après microdissection	138
Annexe 9 : Vue caryotypique du cas n°14.....	139
Annexe 10 : Vue caryotypique du cas n°15.....	140
Annexe 11 : Vue caryotypique du cas n°18.....	141

RESUME

Contexte : Le lymphome de Hodgkin est un cancer de bon pronostic avec une survie relative tous stades confondus de 84% à 5 ans. Cependant, 15 à 20% des patients au stade localisé de la maladie au diagnostic et 30 à 40% des patients au stade disséminé de la maladie au diagnostic sont réfractaires au traitement. La recherche d'une signature moléculaire spécifique de ce groupe pronostique défavorable est donc un enjeu thérapeutique majeur.

Méthode : Nous avons réalisé l'analyse moléculaire par technique OncoScan™ FFPE de 18 patients atteints d'un lymphome de Hodgkin, répondeurs ou réfractaires au traitement, par macrodissection ou microdissection après repérage par immunohistochimie avec l'anticorps anti CD30 des cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg, sur échantillons conservés en paraffine après fixation formolée.

Résultats : L'analyse moléculaire a mis en évidence un gain du nombre de copies de la région chromosomique 9p24 incluant les gènes *JAK2*, *CD274* et *PDCD1LG2* chez trois patients du groupe réfractaire, impliquant la voie de signalisation JAK/STAT. Nous avons mis en évidence un gain du nombre de copies de la région chromosomique 12p13 incluant *CCDN2* et *TEL/ETV6*, de la région chromosomique 2p16 incluant *REL*, et une perte du nombre de copies de la région chromosomique 1p36 incluant *TNFRSF14*, impliquant la voie de signalisation NF-kappaB. Des mutations somatiques des gènes *TP53*, *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *PTEN*, *PIK3CA*, *BRAF*, *IDH1* et *IDH2* ont été mises en évidence dans les deux groupes.

La mise au point de la technique de microdissection laser des cellules de Hodgkin et de Reed Sternberg immunomarquées par l'anticorps anti CD30 sur échantillons inclus en paraffine a permis d'obtenir un enrichissement suffisant en cellules tumorales pour réaliser l'analyse moléculaire. Nous avons montré la faisabilité et l'utilité de cette méthode pour l'étude moléculaire du lymphome de Hodgkin.

Conclusion : Notre étude a mis en évidence des anomalies moléculaires dans une série de 18 patients atteints d'un lymphome de Hodgkin, concordantes avec la littérature et ouvrant des perspectives de recherche ciblant les voies de signalisation JAK/STAT et NF-kB.

INTRODUCTION

I. Définition

Le lymphome de Hodgkin est aujourd'hui considéré comme un lymphome B d'un type particulier, se différenciant des autres lymphomes (appelés lymphomes non hodgkiniens) par la présence de cellules tumorales (cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg) en faible nombre, dispersées dans une abondante population inflammatoire polymorphe réactionnelle.

Les données cliniques et biologiques des trente dernières années ont permis de distinguer deux grandes entités dans le lymphome de Hodgkin : le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire (historiquement dénommé paragranelome nodulaire de Poppema et Lennert), et le lymphome de Hodgkin classique.

A. Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire

Le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire est caractérisé par une prolifération d'architecture nodulaire ou diffuse de cellules tumorales de grande taille appelées cellules « pop corn » ou cellules « LP (*lymphocyte predominant*) », dispersées au sein d'un infiltrat inflammatoire composé d'histiocytes et de lymphocytes. Cette entité représente seulement 5% des lymphomes de Hodgkin.

B. Lymphome de Hodgkin classique

Le lymphome de Hodgkin classique est une lymphoprolifération monoclonale de type B, composée de cellules mononuclées dénommées cellules de « Hodgkin » et de cellules plurinuclées dénommées cellules de « Reed-Sternberg », dans un fond de cellules non tumorales constitué de petits lymphocytes, de polynucléaires éosinophiles, neutrophiles, d'histiocytes et de plasmocytes, associés à des fibroblastes et des fibres de collagène.

En se basant sur les caractéristiques de l'infiltrat inflammatoire réactionnel et sur la morphologie des cellules tumorales, quatre sous-types histologiques ont été distingués :

- scléro-nodulaire
- riche en lymphocytes
- à cellularité mixte
- à déplétion lymphocytaire

II. Historique

En 1832, Thomas Hodgkin, médecin anglais, rapportait les observations autopsiques de sept patients atteints d'adénopathies et de splénomégalie (1).

Bien que certains de ces patients fussent atteints également de tuberculose ou de syphilis, Hodgkin pensait qu'il pouvait s'agir là de manifestations d'une même entité, responsable de leur décès.

En 1865, Samuel Wilks publia les mêmes observations que son prédécesseur du St. Guy's Hospital londonien et décrivit pour la première fois la « maladie de Hodgkin ».

Il n'y avait cependant toujours pas de description microscopique de cette pathologie, et ce n'est qu'en 1898 et 1902 que Sternberg et Dorothy Reed mirent en évidence les cellules caractéristiques.

La cellule géante bilobée ou multinucléée prit alors le nom de cellule de « Reed Sternberg », dénomination qu'elle garde encore aujourd'hui.

L'étiologie de cette maladie fût longuement controversée au début du 20^{ème} siècle, et la tuberculose y fût largement rattachée.

Les descriptions de Rosenthal, Parker et Jakson pour la classification histologique des sous-types de cette maladie, ainsi que les travaux de Peters dans son traitement par radiothérapie, ont permis de faire avancer les connaissances sur cette pathologie (2).

Depuis qu'il a été montré que la cellule de Reed-Sternberg est une cellule lymphoïde de type B (3), le terme de lymphome de Hodgkin est devenu plus approprié pour qualifier cette maladie.

III. Épidémiologie

Le lymphome de Hodgkin est une pathologie peu fréquente.

L'incidence de la maladie est globalement stable. En 2011 en France, il a été diagnostiqué 1840 nouveaux cas de lymphome de Hodgkin, représentant seulement 0,5% de l'ensemble des cancers (4,5).

Le lymphome de Hodgkin classique représente 95% des lymphomes hodgkiniens.

Son incidence se répartit selon une courbe bimodale dans les pays économiquement développés, comportant un pic d'incidence entre 15 – 35 ans et un deuxième pic plus tardif entre 70 – 80 ans.

Cette incidence en double pic évoque que cette pathologie découlerait de deux processus pathogéniques distincts : un agent infectieux pour les adultes jeunes (l'EBV : Epstein Barr Virus) (6) et un mécanisme partagé avec les autres lymphomes pour les patients plus âgés (7–9) qui ont un mode de révélation plus bruyant et une maladie de plus mauvais pronostic.

Dans les pays en voie de développement, l'incidence est plus faible et touche plus fréquemment les enfants de moins de 15 ans (10).

Le lymphome de Hodgkin est un cancer ayant un bon pronostic. Son taux de survie relative à 5 ans est de 84% toutes formes confondues (11). En France en 2011, il a entraîné le décès d'un peu moins de 300 patients, soit 0,2% des décès par cancer (4).

IV. Facteurs de risque

Le virus d'Epstein Barr (EBV) joue un rôle important dans le développement du lymphome de Hodgkin. La prévalence de l'infection à EBV dans les cellules de Hodgkin ou Reed Sternberg varie selon le type histologique (7).

La prévalence la plus élevée concerne le sous-type « à cellularité mixte » (75%) alors que la prévalence la plus faible (10 à 40%) concerne le sous-type « scléro-nodulaire ».

Dans les pays pauvres ou dans la population de patients infectés par le VIH, cette fréquence est proche de 100% (12).

Le virus d'Epstein Barr est détecté chez 30 à 50% des patients atteints du lymphome de Hodgkin sans immunodéficience, avec l'expression d'une protéine de membrane latente (LMP1 ou LMP2), des ARN EBER (Epstein Barr encoded RNA), et de l'antigène nucléaire d'EBV (EBNA1 : Epstein Barr nuclear antigen) (13,14).

Les autres causes d'immunodéficience telles que l'infection par le VIH, les traitements immunosuppresseurs post-transplantation, ou les maladies auto-immunes acquises ou familiales sont associées à un risque accru de développer un lymphome de Hodgkin (15,16). L'EBV y est également identifié plus fréquemment que dans la population générale.

V. Clinique

La présentation clinique se résume à la présence d'adénopathies périphériques révélatrices de la maladie dans 80% des cas, plus souvent localisées à une ou deux aires ganglionnaires (17), dans 10% des cas par des adénopathies médiastinales et dans 10 à 20% des cas par des signes généraux (signes dits « B » : fièvre, sueurs nocturnes, amaigrissement, prurit ou douleur à l'ingestion d'alcool).

Ces adénopathies sont d'allure tumorale (indolores, non inflammatoires, fermes et douloureuses après ingestion d'alcool). Elles peuvent entraîner des tableaux d'urgence: syndrome cave supérieur, adénopathies abdominales compressives, compression médullaire, occlusion intestinale.

La forme classique du lymphome de Hodgkin touche préférentiellement les ganglions cervicaux (75%), suivi en fréquence par les ganglions médiastinaux, axillaires, et de la région para-aortique. Les ganglions des chaînes extra-axiales sont rarement touchés.

Plus de 60% des patients ont une maladie au stade localisé (stade 1 ou 2) au diagnostic. Environ 60% des patients ont une atteinte médiastinale. L'envahissement splénique n'est pas rare (20%) et est associé à un risque augmenté de dissémination extra ganglionnaire.

En revanche, l'envahissement médullaire est plus rarement décrit (seulement 5% des patients).

Le bilan d'extension comprend une évaluation clinique des territoires ganglionnaires atteints, la taille du foie et de la rate, et la recherche de signes généraux.

Le bilan biologique est effectué à la recherche de signes inflammatoires, d'une évolutivité de la maladie (cytopénies, augmentation des LDH).

Le bilan d'imagerie comprend une radiographie thoracique, un scanner thoraco-abdomino-pelvien, et une TEP-FDG puisque celle-ci a une sensibilité plus élevée que le scanner pour évaluer l'atteinte extra-nodale (18).

La réalisation d'une biopsie ostéo-médullaire est justifiée en présence de signes généraux, d'une forme disséminée ou en cas de déficit immunitaire, pour rechercher un envahissement médullaire.

VI. Classifications

La classification de Ann Arbor est basée sur une évaluation clinique du patient et définit les stades I à IV en fonction de l'extension de la maladie (19).

Cette classification est restée une référence pendant 20 ans jusqu'aux modifications de Cotswolds qui font intervenir une évaluation radiologique (20).

La lettre X désigne la présence d'une atteinte ganglionnaire volumineuse, périphérique, médiastinale ou abdominale. La classification distingue aussi les stades III limités ou étendus (21)

Stade	Description
Stade I	Atteinte d'un seul groupe ganglionnaire ou d'une seule structure lymphoïde (médiastin = 1 ; cervical gauche = 1 ; rate = 1 ; anneau de Waldeyer = 1)
Stade II	Atteinte de deux ou plusieurs groupes ganglionnaires d'un seul côté du diaphragme (le médiastin représente un seul territoire, les deux hiles sont considérés indépendamment du médiastin comme des « régions » ganglionnaires). Le nombre de territoires ganglionnaires est indiqué en indice (II _n)
Stade III	Atteinte ganglionnaire des deux côtés du diaphragme
III1	Atteinte sous-diaphragmatique limitée à la rate, aux ganglions du hile splénique, aux ganglions coeliaques ou du tronc porte
III2	Atteinte des ganglions latéro-aortiques, iliaques, mésentériques s'associant ou non à l'atteinte détaillée dans le stade III1
Stade IV	Atteinte extra-ganglionnaire distincte d'une localisation viscérale contiguë, ou atteinte du foie ou de la moelle osseuse
A	Absence de signes généraux
B	Présence de fièvre, sueurs, ou amaigrissement
X	Importante masse tumorale : <ul style="list-style-type: none"> • masse médiastinale de diamètre égal ou supérieur au tiers du diamètre transverse thoracique au niveau du disque intervertébral T5-T6 (sur un cliché thoracique de face) • masse ganglionnaire égale ou supérieure à 10 cm dans son diamètre maximum
E	Atteinte d'un seul viscère contigu ou à proximité d'un territoire ganglionnaire atteint

Figure 1: Classification d'Ann Arbor - Modifications dites « de Cotswolds ».

Extrait de HAS : Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique, Lymphome de Hodgkin classique de l'adulte, Guide de parcours de soin, 2013

VII. Pronostic

Le sexe masculin, l'âge avancé et la présence de signes cliniques d'évolutivité sont associés à un plus mauvais pronostic (22,23).

L'European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) a combiné la mesure de la vitesse de sédimentation aux signes généraux pour définir un critère pronostique significatif de la survie sans rechute (23).

	Critères de l'EORTC	Critères du GHSG
Facteurs de risque	<ul style="list-style-type: none"> Masse ganglionnaire volumineuse (≥ 10 cm ou rapport MT $\geq 0,33$) Symptômes B et VS ≥ 30 mm 1^{re} heure ou absence de symptômes et VS ≥ 50 Aires ganglionnaires envahies ≥ 4 Âge ≥ 50 ans 	<ul style="list-style-type: none"> Masse médiastinale volumineuse (M/T $> 0,33$) Symptômes B et VS ≥ 30 mm 1^{re} heure ou absence de symptômes et VS ≥ 50 Aires ganglionnaires envahies ≥ 3 Atteinte extra-ganglionnaire
FORMES LOCALISÉES		
Groupe favorable	<ul style="list-style-type: none"> Stade I ou II sus-diaphragmatique sans FP 	<ul style="list-style-type: none"> Stade I ou II sans FP
Groupe intermédiaire ou défavorable	<ul style="list-style-type: none"> Stade I ou II sus-diaphragmatique ≥ 1 FP 	<ul style="list-style-type: none"> Stade I ou IIA ≥ 1 FP Stade IIB ≥ 1 FP mais sans masse médiastinale volumineuse, ni atteinte extra-ganglionnaire
FORMES DISSEMINÉES (OU AVANCÉES)		
	<ul style="list-style-type: none"> Stade I ou II sous-diaphragmatique Stade III ou IV 	<ul style="list-style-type: none"> Stade IIB avec masse médiastinale volumineuse et/ou atteinte extra-ganglionnaire Stades III ou IV

Figure 2 : Critères de l'EORTC et du GHSG. Extrait de HAS : Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Lymphome de Hodgkin classique de l'adulte. Guide de parcours de soin; 2013

Pour les stades disséminés, le score pronostic international (IPS) est le score le plus largement utilisé pour définir la stratégie de traitement (24).

Facteurs de risque (FR)	Groupes pronostiques
Albuminémie < 4 g/dL ²⁵ Hémoglobinémie < 10,5 g/dL Sexe masculin Âge ≥ 45 ans Stade IV d'Ann Arbor Leucocytose (≥ 15 000/mm ³) Lymphocytopénie (< 8 % et/ou < 600/mm ³)	<ul style="list-style-type: none">• Favorable si ≤ 2 FR• Défavorable si ≥ 3 FR

Figure 3 : Score international IPS. Extrait de HAS : Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique. Lymphome de Hodgkin classique de l'adulte. Guide de parcours de soin; 2013

VIII. Traitements

Le traitement est différent selon qu'il s'agit d'une forme localisée ou d'une forme disséminée.

Dans les stades localisés, la chimiothérapie par le protocole ABVD (Doxorubicine, Bléomycine, Vinblastine, Dacarbazine) en 3 ou 4 cycles, associée à la radiothérapie des territoires atteints est la référence. Ce traitement donne un taux de survie à 5 ans de l'ordre de 95-98%, et un taux de survie sans rechute à 5 ans de l'ordre de 90-95% (25,26).

Pour les patients comportant des critères de mauvais pronostic (syndrome inflammatoire intense, masse tumorale volumineuse, âge avancé etc.), ce schéma thérapeutique peut comporter un plus grand nombre de cures d'ABVD associées à une radiothérapie.

Pour les formes disséminées (stades IIIb et IV), la chimiothérapie exclusive suivant le protocole ABVD avec un total de 8 cycles est le traitement de référence.

Dans ces formes, la survie sans rechute est moyenne ; 30 à 40% des patients en rémission rechutent dans les 5 ans (27). C'est pourquoi d'autres protocoles de chimiothérapie renforcés, hebdomadaires, ont été développés pour tenter d'améliorer ce pronostic : le protocole Stanford V, le BEACOPP renforcé, le VAPEC-B.

IX. Les patients réfractaires

A. Pronostic

Tous sous-types histologiques confondus, plus de 80% des patients atteints d'un lymphome de Hodgkin parviennent à une rémission complète après un traitement associant une chimiothérapie et une radiothérapie (28).

Cependant, 15 à 20% des patients avec une maladie au stade localisé et 30 à 40% des patients avec une maladie au stade disséminé ne parviennent pas à la rémission complète ou rechutent dans les 5 ans (29,30).

Les patients considérés comme réfractaires primaires sont définis par la régression inférieure à 50% des masses tumorales après 4 à 6 cycles de chimiothérapie contenant la doxorubicine, ou par la survenue d'une progression du lymphome pendant le traitement en phase d'induction ou dans les 3 mois après la fin de la dernière chimiothérapie de 1ère ligne (31).

La durée de survie sans progression est une donnée pronostique majeure puisque les patients réfractaires primaires ont une survie globale à 5 ans de 26% alors que cette survie globale à 5 ans s'élève à 46% pour les patients rechutant précocement (entre 3 et 12 mois après la fin du traitement initial) et à 71% pour les patients en rechute tardive (après 12 mois) (31).

Le groupe d'étude allemand des lymphomes de Hodgkin a mis en évidence des facteurs de mauvais pronostic dans une série de patients réfractaires : le mauvais score du Performance Status (31); l'âge supérieur à 50 ans ; l'absence de réponse

même temporaire au traitement ; la présence de signes « B » (32) et le stade III ou IV selon Ann Arbor (33).

Néanmoins, il existe un manque de concordance entre ces différentes études pour mettre en évidence un facteur pronostique fort, mis à part l'âge ou les signes « B ». Cela confirme la grande hétérogénéité des mécanismes biologiques de la maladie.

Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour déterminer des facteurs pronostiques clés.

La documentation de ces facteurs pourrait permettre de pronostiquer l'évolution du malade et donc de choisir un traitement plus adapté à la maladie du patient.

B. Autogreffe

L'intensification thérapeutique suivie d'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez ces patients réfractaires ou en rechute apporte 50 à 60% de chance d'obtenir une survie sans maladie sur le long terme (34,35).

Il s'agit du traitement de choix pour les patients réfractaires ou en rechute après échec de l'association chimiothérapie +/- radiothérapie (36).

Le schéma actuel comporte une chimiothérapie de rattrapage suivie d'une intensification thérapeutique et d'une autogreffe (37).

Néanmoins, les 3 groupes de patients suivants nécessitent une autre approche : les patients chimio-réfractaires, les patients sans rémission complète après leur autogreffe et les patients ne pouvant tolérer l'intensification thérapeutique à cause de leurs comorbidités.

La double autogreffe a montré un bénéfice pour environ 50% des patients à risque élevé (réfractaire primaire ou deux facteurs de risque parmi les suivants :

rechute précoce, rechute en territoire irradié ou rechute avec un stade III/IV selon Ann Arbor), si tant est qu'ils soient chimio-réfractaires ou répondeurs partiels (38).

C. Allogreffe

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques semble être une arme supplémentaire pour traiter les patients réfractaires. En effet, les risques liés à l'allogreffe sont de nos jours mieux traités (risque septique, mortalité liée à la greffe...) (39).

À ce jour, la mortalité liée à l'allogreffe est d'environ 20% (40), et le groupe EBMT (European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation) a démontré une efficacité clinique de cette procédure dans le lymphome de Hodgkin avec une survie globale à 2 ans de 47% et une mortalité liée à la greffe de 15% (41).

D. Thérapies ciblées

1. Anti CD30

Les progrès dans la compréhension de la biologie du lymphome de Hodgkin ont conduit au développement de la première thérapie ciblée anti CD30 : le *brentuximab vedotin*, anticorps monoclonal.

Le CD30 appartient à la famille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) et est exprimé à la surface des cellules de Hodgkin (42). Il joue un rôle dans la prolifération cellulaire et dans l'apoptose (43).

Le *Brentuximab vedotin* (BV) est un agent ciblant le CD30. Il a reçu l'approbation de la FDA (*U.S. Food Drug Administration*) en 2011 pour le traitement du lymphome de Hodgkin en rechute après l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques ou après 2 lignes de chimiothérapie chez des patients n'étant pas éligibles à l'autogreffe (44).

L'essai de phase II a rapporté une réponse globale (réduction de la masse tumorale) chez 75% des patients réfractaires ou en rechute après autogreffe, ainsi qu'un taux de rémission complète de 34% (45).

2. Inhibiteurs d'histone désacétylases

Les inhibiteurs d'histone désacétylases sont un nouveau traitement régulant un certain nombre de fonctions cellulaires impliquées dans la survie, le cycle cellulaire, l'angiogenèse et l'immunité. La molécule a un effet direct antiprolifératif sur la cellule de Hodgkin et une action modulatrice sur la stimulation des cytokines provenant du microenvironnement tumoral (46).

3. Inhibiteurs de JAK/STAT

La voie JAK/STAT est impliquée dans la survie de la cellule de Hodgkin. Des aberrations de cette voie ont été rapportées dans cette pathologie (47).

Dans cette hypothèse, un inhibiteur de JAK/STAT (lestaurtinib) a montré un effet pro-apoptotique sur les cellules de Hodgkin (48) et un inhibiteur oral de *JAK2* (pacritinib) a montré un effet clinique sur le lymphome de Hodgkin réfractaire dans un essai de phase I (49).

E. Micro-environnement

Même si les possibilités thérapeutiques augmentent, l'enjeu actuel est de pouvoir prédire le statut réfractaire du patient au diagnostic.

Comme souligné par la corrélation entre l'évolution du patient et son taux de cytokines plasmatiques (50), l'évolution de la maladie pourrait dépendre de l'interaction des voies de signalisation et de l'environnement tumoral. En effet les cellules inflammatoires du micro-environnement tumoral du lymphome de Hodgkin auraient un rôle de stimulation de la prolifération sur les cellules de Reed Sternberg par sécrétion de cytokines et de chémokines, agissant comme une boucle paracrine (51) dans le but de maintenir une immunosuppression vis-à-vis de ces cellules tumorales.

Il a été rapporté que les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules T PD-1+ interagissaient avec les cellules de Reed Sternberg qui sécrètent les ligands PD-L1 et T-reg attractant galectin-1 (52,53).

L'EBV semble jouer un rôle sur le micro-environnement tumoral. Les cellules de Hodgkin infectées par l'EBV stimulent la production de chémokines comme CXCL10 et CCL20, attirant les cellules T régulatrices (54,55).

Une étude plus récente a montré qu'un taux plasmatique élevé d'ADN de l'EBV était corrélé à une résistance au traitement (56).

Certaines équipes ont mis en évidence des critères de mauvais pronostic en étudiant l'expression immunohistochimique des cellules T régulatrices de l'environnement tumoral. Ainsi, la faible infiltration de cellules T FOXP3+ ou au contraire la présence de nombreux lymphocytes T exprimant TIA-1 et Granzyme B sont associées à une mauvaise évolution (57).

Chetaille *et al.* ont montré que la surexpression de gènes spécifiques des cellules de type B dans le micro-environnement tumoral était corrélé à un meilleur pronostic, notamment pour BCL11A lorsqu'il était exprimé dans les cellules dendritiques ou les cellules B (58). Le pronostic est meilleur lorsque le microenvironnement contient de nombreuses cellules B, ce qui est concordant avec l'excellent pronostic du lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire, variant riche en cellules lymphoïdes B.

Plus récemment, l'équipe de Greaves *et al.* a confirmé la valeur de trois marqueurs prédictifs de la survie, par étude immunohistochimique : le CD20, le CD68 et FOXP3.

Un nombre important de cellules exprimant le CD20 dans les zones inter-folliculaires était associé à une survie globale meilleure. Un score combinant l'expression du CD68 et de FOXP3 permettait de séparer les patients en stade précoce ou tardif de la maladie en deux groupes, à faible ou haut risque de rechute (59).

La composition du micro-environnement du lymphome de Hodgkin semble donc jouer un rôle pronostique, d'autres études sont nécessaires afin de pouvoir prédire

l'évolution de la maladie notamment par technique immunohistochimique au diagnostic (60).

X. Caractéristiques pathologiques

La classification OMS 2008 (61) décrit 4 sous-types distincts dans le lymphome de Hodgkin classique, dont la caractérisation, se basant sur l'architecture tumorale et la composition de la population inflammatoire réactionnelle, peut être impossible sur biopsies à l'aiguille ou sur matériel biopsique fragmenté.

A. Macroscopie

Les ganglions sont augmentés de taille, encapsulés, homogénéisés à la tranche de section, de couleur beige et de consistance ferme.

Le sous-type scléro-nodulaire peut apparaître, dès la macroscopie, nodulaire et sous-tendu par un réseau fibreux et une épaisse capsule ganglionnaire.

L'envahissement splénique peut se faire sous forme de nodules dispersés au sein de la pulpe blanche, voire plus rarement sous forme de masses tumorales.

Lorsque le lymphome de Hodgkin envahit le thymus, il peut être associé à une dégénérescence kystique.

B. Microscopie commune

L'architecture ganglionnaire est effacée et infiltrée par un nombre variable de cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg dans un fond inflammatoire dense.

Les cellules de Reed Sternberg sont grandes, avec un cytoplasme légèrement basophile et ont au moins deux lobes nucléaires ou deux noyaux, ce qui les différencie des cellules de Hodgkin.

Ces noyaux sont grands, souvent entourés d'une membrane nucléaire irrégulière mais néanmoins bien visible. La chromatine est fine et pâle, un nucléole éosinophile proéminent est entouré régulièrement d'un halo clair ressemblant à celui d'une inclusion virale.

Certaines cellules de Reed Sternberg peuvent comporter un cytoplasme condensé et un noyau pycnotique rougeâtre, et portent le nom de « cellules momifiées ».

Néanmoins, bon nombre des cellules de Reed Sternberg ne sont pas aussi typiques, et peuvent ne représenter que 0,1 à 10% de l'infiltrat cellulaire, ce qui rend parfois difficile leur identification morphologique.

C. Immunohistochimie

Le CD 30 (membre de la famille des récepteurs aux cytokines « TNF-nerve growth factor ») est exprimé par les cellules de Reed Sternberg dans la majorité des cas et au moins partiellement. Le marquage est membranaire et cytoplasmique avec une accentuation « en dot » péri-nucléaire, correspondant au marquage de l'appareil de Golgi.

Le CD 15 (marqueur de la lignée granuleuse mature) est détecté par l'anticorps anti Leu-M1 et est exprimé dans 75 à 80% des cas. Ce marquage par l'anticorps anti-CD15 permet de différencier les cellules tumorales des immunoblastes exprimant aussi le CD 30.

Compte tenu de l'origine B des cellules de Hodgkin et de Reed Sternberg, l'expression de marqueurs pan-B tel que le CD20 est rencontrée dans 20 à 40 % des cas. En revanche, l'antigène associé aux cellules B, le CD 79a, est moins souvent exprimé.

Le marqueur de différenciation de la lignée B, IRF4/MUM1, est fréquemment exprimé par les cellules tumorales.

Le facteur de transcription PAX5 est exprimé faiblement par le noyau dans 90% des lymphomes de Hodgkin classiques, alors que le facteur de transcription de la lignée B OCT-2 et son coactivateur BOB 1, ainsi que le facteur de transcription PU 1 ne sont pas ou partiellement exprimés.

Une positivité d'OCT-2 et BOB 1 orienterait vers les diagnostics différentiels du lymphome B riche en T, du lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire, ou vers un lymphome « grey zone ».

Plusieurs antigènes de la famille des cellules folliculaires dendritiques sont exprimés par les cellules de Hodgkin comme le CD 21.

L'absence d'expression de l'EMA, d'ALK, et du CD45 est utile pour faire le diagnostic différentiel avec le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire ou le lymphome anaplasique.

Les cellules de Hodgkin n'expriment pas non plus l'antigène HLA de classe 1, expliquant potentiellement un mécanisme d'évasion immune.

Le phénotype centro-germinatif BCL6+/CD10+ n'est pas rencontré dans le lymphome de Hodgkin classique. Néanmoins une expression de BCL6 est possible dans un contexte de différenciation intermédiaire entre le phénotype centro-germinatif et le phénotype post centro-germinatif, et serait donc accompagné d'une expression de MUM 1 et +/- de CD 138/syndecan-1 (62).

Dans certains cas, il est possible d'observer une expression aberrante ou artéfactuelle, faible, granulaire et cytoplasmique des marqueurs de la lignée lymphoïde T.

Les lymphocytes réactionnels ont un phénotype T de façon prédominante et expriment le CD4. Leur phénotype et les cytokines qu'ils produisent sont en faveur d'une action immunosuppressive, tout comme l'expression du CD40-L contribuant à la survie des cellules tumorales. Les lymphocytes T CD3+ ne s'arrangent que rarement en rosettes péri-tumorales contrairement au lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire (63).

D. Sous-types

1. Scléro-nodulaire

a) Définition

Ce sous-type est représenté par des bandes de collagène encerclant au moins un nodule tumoral, associées à des cellules de type Reed Sternberg ou Hodgkin, de morphologie lacunaire.

b) Épidémiologie

Le sous-type scléro-nodulaire représente à lui seul 70% des lymphomes de Hodgkin classiques. Il est plus fréquemment observé dans les pays riches que dans les pays pauvres (64).

L'incidence est identique chez les hommes ou les femmes et comporte deux pics à 15 et 34 ans (65).

L'envahissement médiastinal est fréquent dans ce sous-type, réalisant une masse dite « bulky » dans 54 % des cas lorsque sur le cliché standard du thorax, l'élargissement du médiastin est mesuré à plus du tiers du diamètre de la partie la plus large du thorax sur ce même cliché. Il s'agit alors d'un critère pronostique péjoratif indépendant (66).

c) Morphologie

Le ganglion présente une architecture nodulaire. Les nodules sont entourés de bandes de collagène, présentant typiquement une biréfringence en lumière polarisée. Ce processus fibrosant s'accompagne généralement d'une capsule ganglionnaire épaissie. La coloration de Gordon Sweet permet de confirmer l'architecture nodulaire (cf. figure 5).

Les cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg ont un noyau lobulé, un nucléole moins proéminent que pour les autres types, et ont un cytoplasme en revanche plus abondant. Ce cytoplasme peut apparaître rétracté après fixation par le formol et la cellule prend un aspect dit « lacunaire ».

Ces cellules tumorales peuvent se regrouper, prenant même un aspect « syncitial ». Elles sont accompagnées de nombreux polynucléaires éosinophiles et histiocytes.

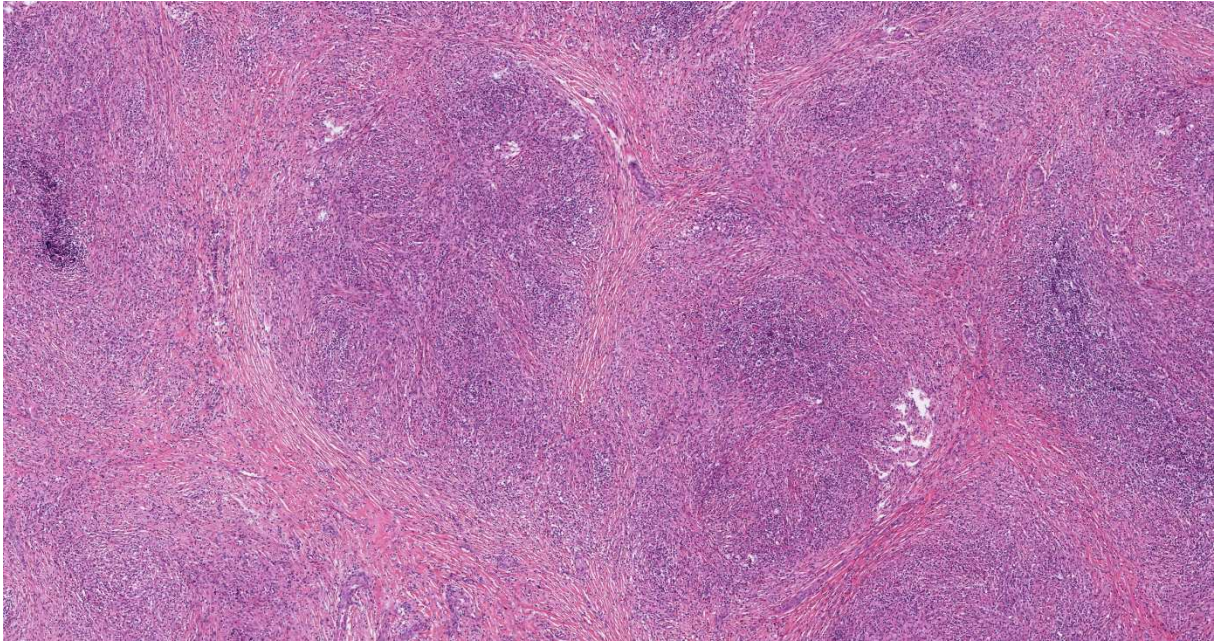


Figure 4 : Lymphome de Hodgkin scléro-nodulaire, HES x 4, lame scannée du cas 18

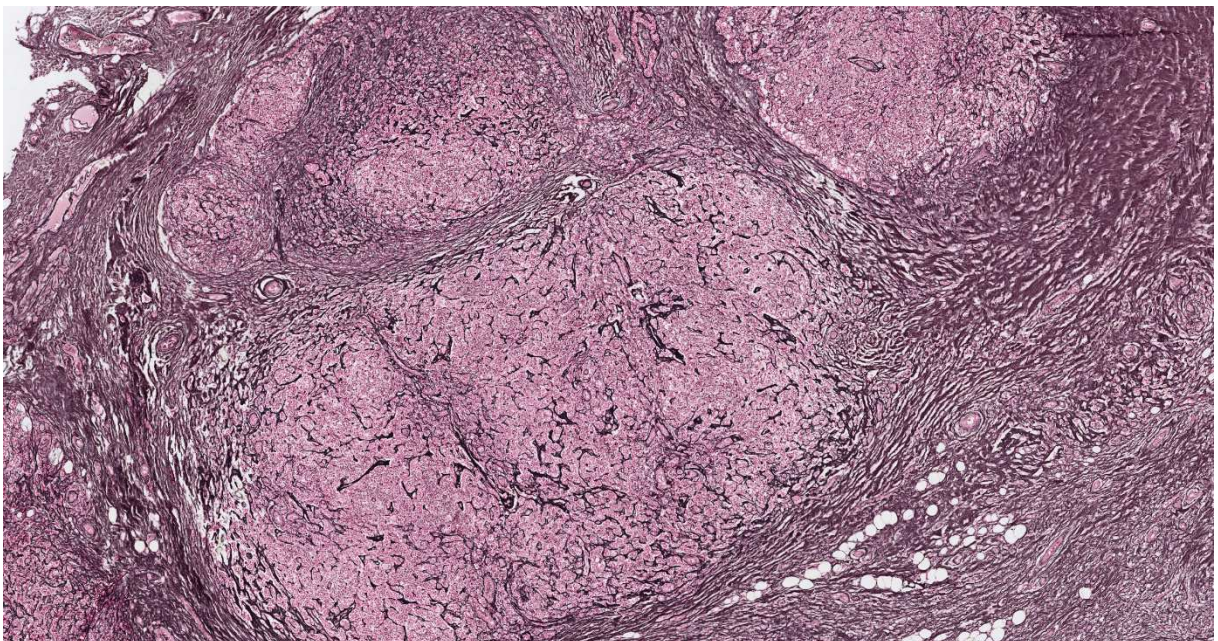


Figure 5 : Lymphome de Hodgkin scléro-nodulaire, Coloration du Gordon Sweet, x 4, lame scannée du cas 18

d) Immunohistochimie

Ce sous-type possède le phénotype du lymphome de Hodgkin classique. Néanmoins l'association avec l'EBV est moins fréquente que pour le sous-type à cellularité mixte.

e) Pronostic

Le sous-type scléro-nodulaire présente un meilleur pronostic que tous les autres sous-types de Hodgkin classique (67).

f) Diagnostic différentiel

La présentation médiastinale fréquente de ce sous-type pose le problème du diagnostic différentiel avec le lymphome à grandes cellules B primitif du médiastin. En effet, ce dernier se présente fréquemment par une masse médiastinale dite « bulky » et les biopsies de la masse peuvent comporter des artéfacts d'écrasement cellulaire ou ne représenter que des zones fibreuses, compliquant sérieusement le diagnostic.

Néanmoins, le lymphome B primitif du médiastin comporte plutôt une fibrose de type collagène interstitielle différente de la fibrose nodulaire rencontrée dans le lymphome de Hodgkin. Même si les cellules tumorales qui peuvent parfois être « Reed Sternberg like » expriment le CD30 et parfois le CD15, elles expriment également les marqueurs B matures tels que CD79a, CD20, BOB1, OCT-2 et PAX5, et parfois BCL6.

Dans certains cas, le chevauchement de critères morphologiques et phénotypiques conduit le pathologiste à porter le diagnostic de lymphome B inclassable comportant des critères intermédiaires entre le lymphome B à grandes cellules et le lymphome de Hodgkin classique. Cette catégorie de lymphomes inclassables comporte également des similarités moléculaires, notamment une amplification commune de *REL* (68).

La lymphadénite de type « maladie des griffes du chat » et la lymphadénite de « Kikuchi » peuvent présenter une nécrose ganglionnaire rencontrée aussi dans le lymphome de Hodgkin de type scléro-nodulaire. Cependant, l'immunohistochimie fait la différence avec ce diagnostic.

2. Cellularité mixte

a) Définition

Ce sous-type comporte des cellules de Hodgkin et de Reed Sternberg dispersées dans un fond inflammatoire, d'architecture diffuse ou vaguement nodulaire et sans fibrose.

Les cas n'étant pas classés dans les autres catégories sont classés dans celle-ci.

b) Épidémiologie

Ce sous-type représente environ 20 à 25% des lymphomes de Hodgkin classiques. Il est plus fréquemment rencontré chez les patients infectés par le VIH.

Les hommes sont préférentiellement touchés, dans 70% des cas, à un âge moyen de 38 ans.

Le stade est généralement plus avancé que pour le sous-type scléro-nodulaire, avec un envahissement des ganglions, de la rate, du foie et de la moelle osseuse (39).

c) Morphologie

L'envahissement ganglionnaire est généralement diffus ou parfois inter folliculaire. Il peut exister une fibrose interstitielle mais sans épaissement de la capsule ganglionnaire. Les cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg ont une morphologie classique. Le fond est mixte, composé de polynucléaires éosinophiles, neutrophiles, histiocytes et plasmocytes. Les histiocytes peuvent former des granulomes, notamment dans les cas avec expression de l'EBV.

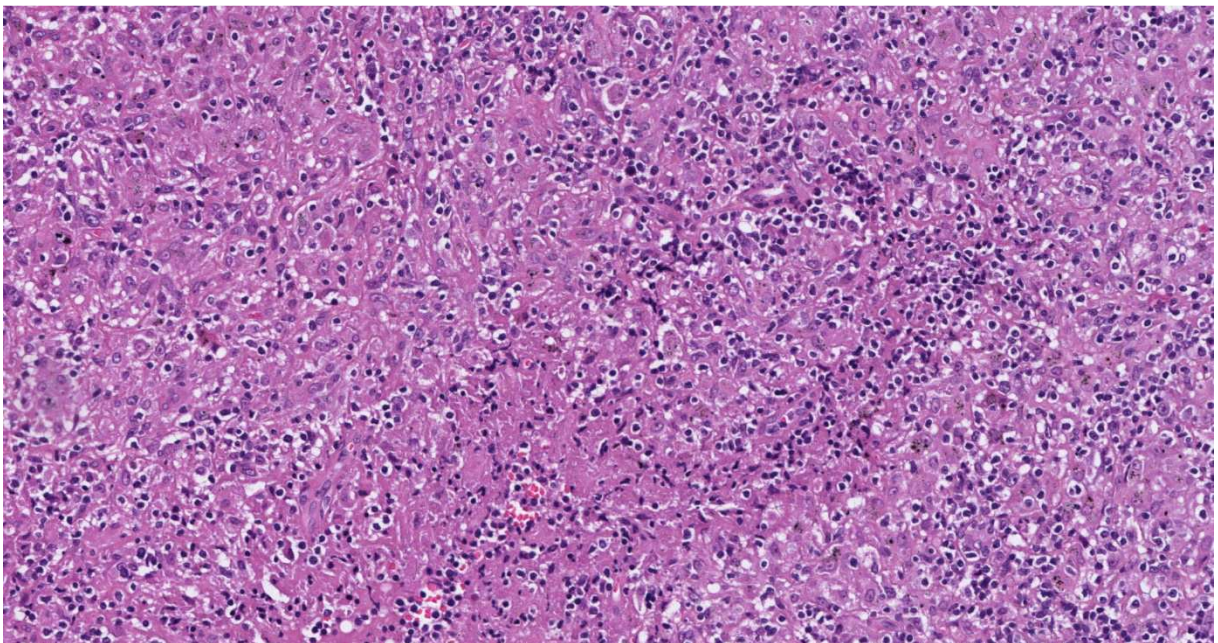


Figure 6 : Lymphome de Hodgkin à cellularité mixte, lame scannée HES x 20

d) Immunohistochimie

Le profil immuno-histochimique est classique. L'EBV est plus fréquemment associé que dans les autres sous-types (69).

e) Diagnostic différentiel

Dans certains cas, les histiocytes de type épithélioïde sont abondants et regroupés en amas, donnant le terme de « variant riche en histiocytes, du sous-type à cellularité mixte » et posant le problème du diagnostic différentiel avec le lymphome B non hodgkinien riche en T/histiocytes.

Ces histiocytes peuvent faire évoquer également des pathologies inflammatoires ou granulomateuses et l'immunohistochimie est nécessaire afin de mettre en évidence les cellules néoplasiques.

3. Riche en lymphocytes

a) Définition

Les cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg sont dispersées dans un fond nodulaire ou diffus, composé de petits lymphocytes, sans polynucléaires éosinophiles ou neutrophiles.

b) Épidémiologie

Ce sous-type représente environ 5% des lymphomes de Hodgkin classiques, avec une prédominance masculine, et une population plus âgée. Le diagnostic est fait à un stade plus précoce. L'invasion des sites sous-diaphragmatiques est plus fréquente (70).

c) Morphologie

Il existe deux types architecturaux : le type nodulaire le plus fréquent, et le type diffus plus rare.

Dans le variant nodulaire, les nodules sont composés de petits lymphocytes et peuvent contenir des centres germinatifs résiduels. Les cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg peuvent être visibles dans ces nodules, en dehors des centres germinatifs. Une proportion de ces cellules peut prendre l'aspect des cellules « LP » ou de cellules « lacunaires ». Cet aspect peut conduire à le confondre avec le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire. Les polynucléaires éosinophiles et/ou neutrophiles sont absents.

Dans le variant diffus, les lymphocytes peuvent coexister avec des histiocytes plus ou moins de morphologie épithélioïde.

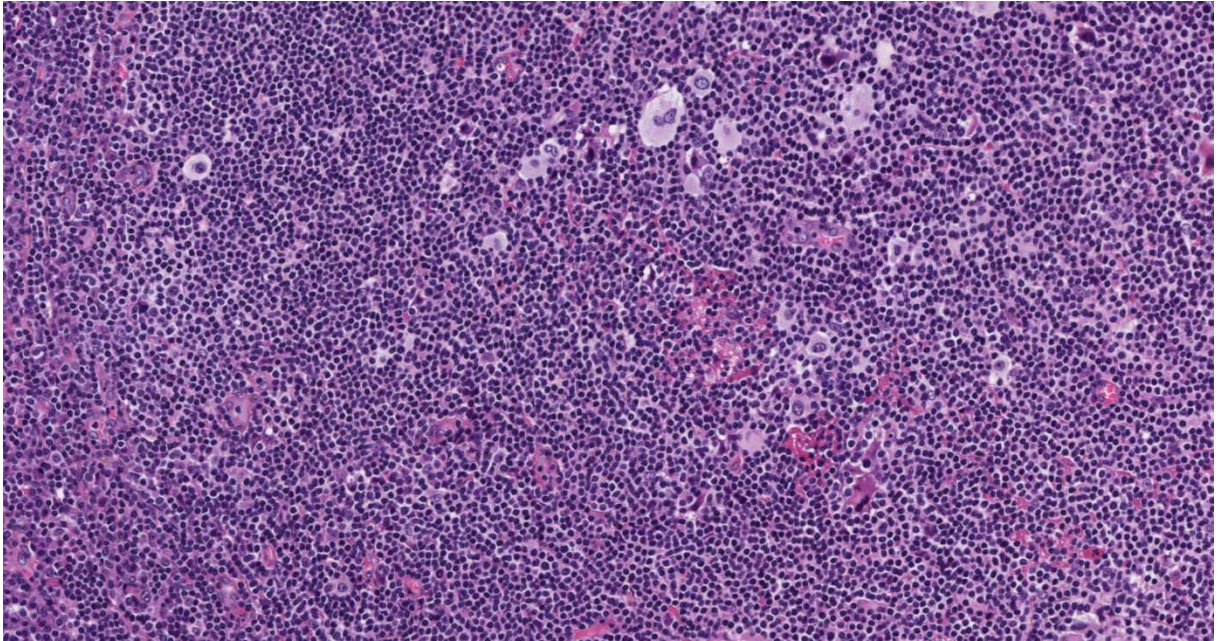


Figure 7 : Lymphome de Hodgkin riche en lymphocytes, lame scannée, HES x 20

d) Immunohistochimie

Les lymphocytes réactionnels présentent un phénotype de lymphocytes du manteau. Les centres germinatifs résiduels sont sous-tendus par un réseau folliculaire dendritique marqué par l'anticorps anti-CD21.

L'association à l'EBV est moins fréquente que dans le sous-type à cellularité mixte.

e) Diagnostics différentiels

La morphologie de ce sous-type, riche en lymphocytes, amène le problème du diagnostic différentiel avec le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire et avec le lymphome B à grandes cellules riche en T/histiocytes.

Le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire présente de nombreux nodules correspondant à des centres germinatifs transformés, expansifs, et contenant des cellules tumorales de type « LP », alors que le lymphome de

Hodgkin classique riche en lymphocytes comporte des centres germinatifs atrophiques, refoulés par une volumineuse couche du manteau.

Les cellules tumorales de type « LP » expriment le CD45, l'EMA, ainsi que les marqueurs B tels que le CD20, le CD79a, BCL6, OCT2 et BOB1, et n'expriment pas le CD30 ou le CD15.

Les deux entités comportent de nombreux lymphocytes B réactionnels, mais le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire comporte un nombre augmenté de lymphocytes T CD57+ et PD1+ s'agencant en couronne péri-tumorale.

Le lymphome B riche en T/histiocytes, peut être un diagnostic différentiel discuté, surtout sur biopsies à l'aiguille. Les cellules tumorales peuvent être « Reed Sternberg like » mais expriment alors le CD20, BCL6, +/- EMA, et n'expriment pas le CD30 et le CD15.

4. Déplétion lymphocytaire

a) Définition

Sous-type d'architecture diffuse, riche en cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg et/ou déplété en lymphocytes.

b) Épidémiologie

C'est le plus rare des sous-types (inférieur à 1% des cas). Soixante à soixante-quinze pour cent des patients sont des hommes et l'âge médian est de 30 – 37 ans (61).

Le mode de révélation le plus fréquent se fait par un envahissement des ganglions mésentériques ou une extension extra ganglionnaire comme la rate, le foie ou la moelle osseuse. Le stade de la maladie au diagnostic est souvent avancé et la réponse au traitement est moindre par rapport aux autres sous-types (71).

Ce sous-type est souvent associé au VIH.

c) Morphologie

L'apparence est très variable, mais un aspect commun est la prédominance de cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg par rapport au fond lymphocytaire.

Ces cellules peuvent prendre un aspect pléomorphe, et devenir difficile à distinguer des cellules tumorales du lymphome anaplasique.

La fibrose est dense et diffuse avec ou sans fibroblastes et sans collagène.

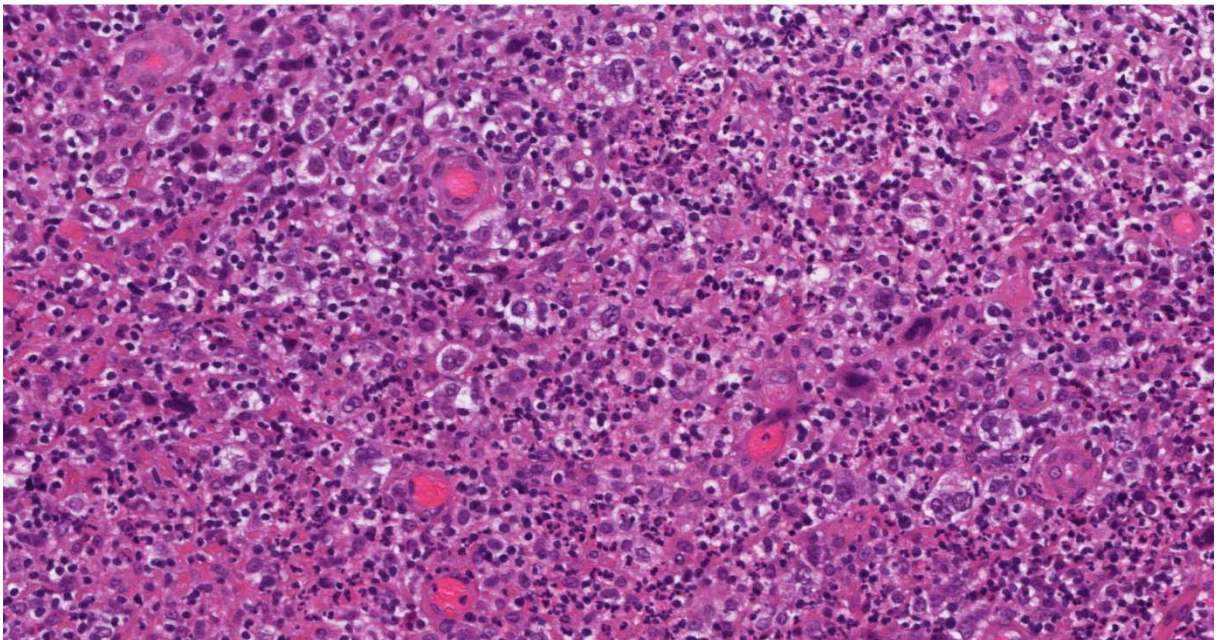


Figure 8 : Lymphome de Hodgkin à déplétion lymphocytaire, lame scannée, HES x 20

d) Immunohistochimie

La plupart des cas chez les patients VIH+ sont liés à l'EBV et les cellules tumorales expriment LMP1.

Les cellules de Reed Sternberg ont un phénotype commun aux autres sous-types.

e) Diagnostic différentiel

La déplétion lymphocytaire occasionne des aspects morphologiques communs avec le lymphome anaplasique. Néanmoins les cellules tumorales du lymphome anaplasique, même si elles peuvent apparaître « Reed Sternberg ou Hodgkin like », sont généralement plus petites et en forme de fer à cheval, dénommées cellules « hallmark ». La prolifération lymphomateuse s'étend aux sinus ganglionnaires et se présente sous forme de plages cohésives. L'étude immunohistochimique permet de faire le diagnostic différentiel car ces cellules expriment les marqueurs de la lignée T, les marqueurs cytotoxiques, l'EMA, ALK, le CD45 et présentent un réarrangement clonal du TCR.

Critères	cHL NS	cHL CM	cHL LR	cHL DL	LHPLN	LBRT/H	ALCL/ALK-	ALCL/ALK+	PMBL
CD45	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	+
CD20	--/+	--/+	--/+	--/+	+	+	-	-	+
CD79a	-	-	-	-	+	+	-	-	+
OCT2	--/+	--/+	--/+	--/+	+	+	-	-	+
PAX5	Faible	Faible	Faible	Faible	Fort	Fort	-	-	+
CD30	+	+	+	+	-	-	+	+	+
CD15	+/-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	+/-
MUM1	+	+	+	+	-	-	-	-	+
BCL6	-/+	-/+	-/+	-/+	+	+/-	-	-	+/-
EMA	-	-	-	-	+	-/+	+/-	+/-	-
EBV	+/-	++	+/-	+/-	-	-	-	-	-
CD3	-	-	-	-	-	-	-/+	-/+	-
ALK	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Figure 9 : Tableau récapitulatif du phénotype des diagnostics différentiels du lymphome de Hodgkin classique. (cHL : lymphome de Hodgkin classique, NS : scléro-nodulaire, CM : cellularité mixte, LR : riche en lymphocytes, DL : déplétion lymphocytaire, LHPLN : lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire, LBRT/H : lymphome B riche en T/Histiocytes, ALCL : lymphome anaplasique, PMBL : lymphome B primitif du médiastin.)

XI. Biologie

A. Origine de la cellule de Hodgkin

L'origine des cellules tumorales du lymphome de Hodgkin a été prouvée grâce à la microdissection de ces cellules au sein du tissu tumoral.

Les réarrangements des gènes de la partie variable des immunoglobulines ne sont présents que dans les cellules B et sont spécifiques à chaque cellule (72).

Les cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg présentent également des mutations somatiques sur les gènes des chaînes lourdes ou légères des immunoglobulines (73).

Ces mutations somatiques entraînent dans un quart des cas un réarrangement non fonctionnel des immunoglobulines (mutation non-sens ou décalage du cadre de lecture). Dans les cellules B normales, cette perte de fonctionnalité entraînerait l'apoptose. Ces données démontrent que la cellule de Hodgkin dérive d'une cellule B du centre germinatif pré-apoptotique (74).

Les cellules de Hodgkin ont un phénotype hétérogène. Carbone *et al.* ont montré que dans certains cas, elles exprimaient un phénotype de type centro-germinatif (GC) tardif ou post centro-germinatif précoce (BCL6- / CD10- / MUM1+ / CD138-) et dans d'autres cas, un phénotype post centro-germinatif (BCL6- / CD10- / MUM1+ / CD138+). Une faible proportion exprime un phénotype intermédiaire (BCL6+ / CD10- / MUM1+ / CD138+/-).

Cette hétérogénéité d'expression phénotypique, entre un phénotype GC tardif / post GC précoce / post GC suggère que, dans une partie des lymphomes de

Hodgkin classiques, la différenciation de ces cellules tumorales n'est pas complète ou qu'elle est en cours au moment du diagnostic.

Carbone *et al.* rapportent que le phénotype BCL6⁻ / CD138⁺ est exprimé dans les cellules de Hodgkin CD40⁺ entourées de lymphocytes T CD40-L⁺. Il a été montré *in vitro* que l'interaction entre le CD40 et son ligand CD40-L inhibait BCL6 dans les cellules B centro-germinatives. Ces données suggèrent donc que les lymphocytes T CD40-L⁺ induiraient la différenciation des cellules de Hodgkin et l'acquisition d'un phénotype post centro-germinatif en perdant l'expression de BCL6.

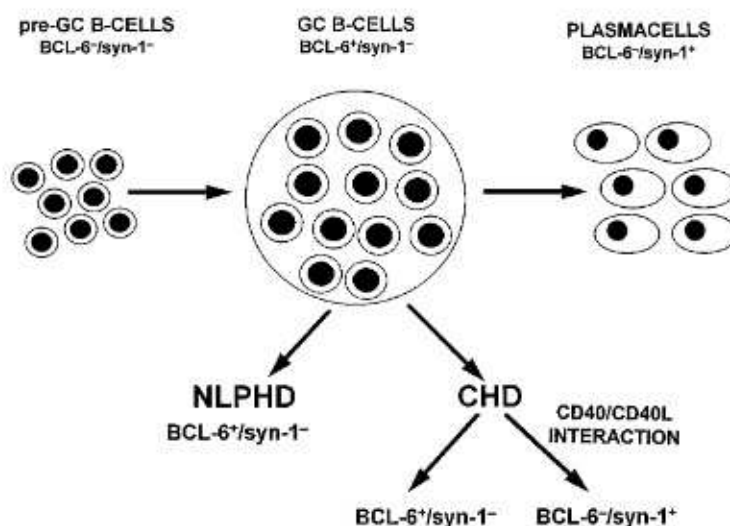


Figure 10 : Modèle de l'histogénèse du lymphome de Hodgkin basé sur l'expression de BCL6 et Syn1 (CD138) dans la différenciation phénotypique des cellules B. Le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire possède un phénotype de type GC, alors que le lymphome de Hodgkin classique peut à la fois exprimer un phénotype de type GC tardif ou post GC selon le stade de sa différenciation.

Extrait de « Expression Status of BCL-6 and Syndecan-1 Identifies Distinct Histogenetic Subtypes of Hodgkin's Disease », Carbone *et al.*

Indépendamment de ces données, en analysant les lymphomes composites (lymphome B non hodgkinien et lymphome de Hodgkin), il a été montré que la cellule de Hodgkin partageait un certain nombre de mutations sur le gène des

immunoglobulines avec la cellule lymphomateuse non hodgkinienne. Ceci suggère que ces cellules dérivent d'un précurseur commun B du centre germinatif (75).

Une équipe a montré que le réarrangement de la partie variable de la chaîne lourde des immunoglobulines détecté au diagnostic, et spécifique au clone tumoral du patient pouvait servir de cible pour une sonde complémentaire qui permettait de le suivre au fil de la maladie. Ainsi, il a été montré que ce clone était persistant et se disséminait à chaque rechute du patient. Ce réarrangement spécifique permettait l'analyse de la maladie résiduelle, ou de la progression tumorale et de la dissémination (76).

B. Cytogénétique

A cause de leur faible nombre au sein du tissu tumoral, de leur faible index mitotique, l'analyse cytogénétique des lymphomes de Hodgkin est difficile (77). Néanmoins, elle révèle des anomalies numériques ou structurales, même si elles ne semblent pas spécifiques de la maladie (78,79).

Les anomalies les plus fréquemment rencontrées sont les triploïdies 5, 9, 15, 18, 22 et X, 60% des cellules tumorales étant aneuploïdes.

Les anomalies de structures touchent les chromosomes 1, 3q, 4q, 6q, 7q, 8q, 11q, 14q, 12p, 13p, 15p (80,81).

C. Voies de signalisation

1. Voie NF-kB

Les voies de signalisation sont fréquemment dérégulées dans la cellule de Hodgkin. Les mécanismes conduisant à cette dérégulation ne sont pas entièrement connus mais ils incluent des boucles d'auto-régulation paracrine et autocrine.

Ces anomalies de régulation ont été étudiées majoritairement sur des lignées cellulaires, mais ces lignées ont probablement perdu leur dépendance aux cellules constituant leur micro-environnement tumoral et il est nécessaire d'étudier aussi ces anomalies sur des cellules primaires.

Parmi ces voies de signalisation, la voie NF-kB joue un rôle central.

L'étude des anomalies génétiques récurrentes touchant les facteurs de transcription essentiels au développement de la cellule de Hodgkin a permis de découvrir que l'activation constitutive de la voie NF-kB était essentielle à sa survie et à sa prolifération (47).

Le complexe NF-kB regroupe des facteurs de transcription qui sont impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire, la croissance cellulaire et l'apoptose, ou des processus pathologiques tels que le cancer, l'arthrite ou l'asthme (82).

Ce complexe regroupe 5 membres : p50 et son précurseur p105 (NF-kB1), p52 et son précurseur p100 (NF-kB2), Rel A (p65), Rel B et c-Rel.

A l'état inactif, le complexe NF-kB est inhibé par I κ B qui le séquestre dans le cytoplasme.

L'activité des facteurs de transcription de NF-kB est stimulée par deux voies : la voie canonique classique, et la voie alternative dite non canonique.

Dans la voie canonique, la stimulation d'un membre de la famille du TNFR ou du BCR (par exemple CD30 ou CD40) active un complexe I κ B kinase (IKK), qui phosphoryle I κ B, permettant la libération des hétérodimères p65/p50 (ou p65/cREL) afin qu'ils puissent migrer vers le noyau.

Dans la voie alternative, l'activation de récepteur tels que les facteurs activateurs des cellules B (CD30, CD40, TACI, BAFF-R) ou du récepteur activateur de NF- κ B (RANK), entraîne l'activation de IKK α . Ce facteur induit la transformation de p100 en sa forme active p52. p52 et RelB peuvent alors migrer vers le noyau.

Le complexe NF- κ B activé par l'une ou l'autre de ces voies engendre la transcription de ses gènes cibles tels que des cytokines pro-inflammatoires (IL6, IL13, TNF α , CCL5) et des facteurs anti-apoptotiques (Bcl-xL, cIAP2, FLIP) (83).

L'importance du rôle de ces gènes cibles est mise en évidence par des études montrant que l'inhibition de NF- κ B diminue la prolifération et la survie des lignées de cellules de Hodgkin (84).

2. Voie JAK/STAT

Les cellules de Hodgkin recrutent les cellules réactionnelles de leur environnement et autorégulent leur propre stimulation via l'expression de cytokines, de chemokines et de récepteurs.

La plupart des signaux engendrés par ces cytokines transitent via la voie JAK/STAT. La fixation d'une cytokine induit la phosphorylation des protéines STAT, permettant leur translocation dans le noyau où elles induisent l'expression de gènes cibles. Les études moléculaires récentes ont montré que la voie de signalisation

JAK/STAT était dérégulée dans certaines lignées de lymphome de Hodgkin donnant un signal de prolifération et un signal anti apoptotique aux cellules tumorales (85).

Les cellules de Hodgkin comportent une activation de STAT3, STAT5, STAT6, médiée par des cytokines comme IL13 ou IL21 (86). Ces cytokines sont produites par les cellules tumorales elles-mêmes ou par le micro-environnement, suggérant une stimulation autocrine.

JAK 2 est une protéine à activité tyrosine kinase, jouant le rôle de médiateur dans la signalisation des cytokines. L'activation de JAK2 par la liaison avec son ligand active les protéines STAT (facteurs de transcription latents résidant dans le cytoplasme jusqu'à leur activation) qui régulent l'expression de gènes cibles de la survie cellulaire, de la prolifération et de la différenciation cellulaire, comme *SOCS*, *BCL-XL*, *CDKN1A*, *CCND1* et *MYC* (87).

Le gène *JAK2* est souvent touché par une mutation activatrice ou des translocations dans les pathologies hématologiques.

L'activation aberrante de ces tyrosine kinases est importante pour la survie des cellules tumorales, elles sont donc des cibles pour les thérapies ciblées. Ainsi, la découverte de mutations de *JAK2* dans les syndromes myélo-prolifératifs a conduit au développement d'inhibiteurs de *JAK2*.

La voie JAK/STAT est une voie comportant des anomalies génétiques dans les cellules de Hodgkin.

Le gain de copies de la région 9p24.1 contenant le gène *JAK2* est une anomalie récurrente dans le lymphome de Hodgkin, mise en évidence dans 30 à 40% des cas par plusieurs études (88,89), et semble être le mécanisme prédominant de la dérégulation de *JAK2* dans le lymphome de Hodgkin.

D'autres altérations ont toutefois été décrites, notamment de rares réarrangements de *JAK2* incluant deux translocations SEC31A - *JAK2*, et deux translocations de *JAK2* avec des partenaires non connus (90).

La mutation de l'exon 12 du gène *JAK2* conduisant à la substitution de la valine par la phénylalanine en position 617 (V617F), n'est pas mise en évidence dans le lymphome de Hodgkin (91).

Des altérations de régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT comme *SOCS1* et *PTPN2* ont été décrits.

SOCS-1 codant pour un inhibiteur de la voie JAK/STAT est inactivé par mutation dans environ 40% des lymphomes classiques de Hodgkin (47,92).

Ces mutations inactivent la protéine *SOCS-1* et engendrent l'accumulation de pSTAT5 dans le noyau. L'activation des protéines STAT3, STAT5 et STAT6 indiquent une altération dans la voie de signalisation JAK/STAT (93,94).

Ces données suggèrent une voie oncogénique médiée par l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *SOCS-1*.

La mutation de *PTPN2* n'a été détectée que dans une seule lignée cellulaire de lymphome de Hodgkin (95).

Hao *et al.* ont montré récemment *in vitro* et *in vivo* que l'inhibiteur de *JAK2* (fedratinib) ralentissait la prolifération des cellules de Hodgkin. De plus, l'effet du fedratinib était dépendant du nombre de copies de la région 9p24.1 contenant le gène *JAK2* (96).

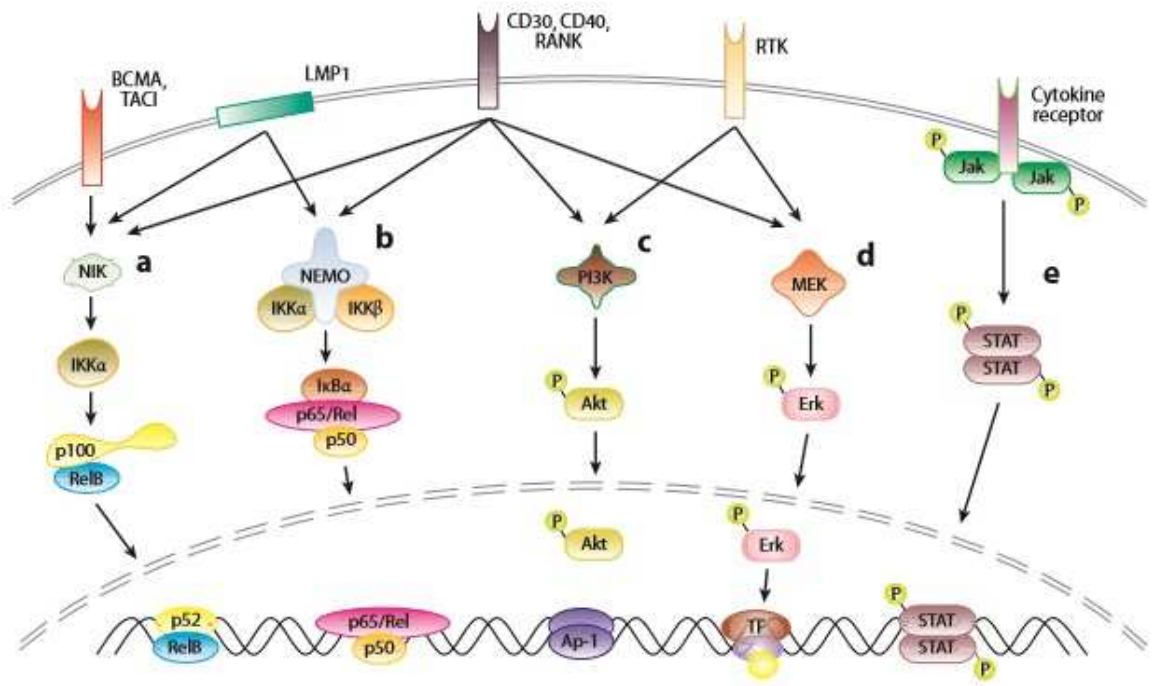


Figure 11 : Voies de signalisation dans le lymphome de Hodgkin. La voie "a" représente la voie alternative de NF-κB, la voie "b" représente la voie canonique de NF-κB et la voie "e" représente la voie JAK/STAT.

Schmitz et al. "Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma". *Annu Rev Pathol.* 2009;4:151-74

OBJECTIFS DE L'ETUDE

I. Objectif principal

L'objectif principal de notre étude était d'identifier les anomalies moléculaires du lymphome de Hodgkin associées au statut réfractaire au traitement, lors du diagnostic initial de la maladie.

II. Justification du déroulement de l'étude

Pour parvenir à répondre à notre objectif principal, il était nécessaire de choisir une méthodologie adaptée au conditionnement de nos échantillons et au tissu étudié afin d'obtenir des données moléculaires exploitables.

A. Microdissection

L'analyse moléculaire de l'ADN, de l'ARN ou des protéines dérivées d'un échantillon diagnostique a révolutionné la pratique de l'Anatomie Pathologique ces dernières années, en permettant la mise en évidence de marqueurs diagnostiques et pronostiques.

Néanmoins, ces analyses moléculaires dépendent toujours de la quantité de cellules tumorales présentes au sein du prélèvement. Ainsi, un trop grand nombre de cellules non tumorales considérées comme « contaminantes » du fait de leur ADN non tumoral, peut conduire à de faux négatifs.

Ceci est particulièrement le cas pour l'analyse moléculaire des lésions précancéreuses (dysplasie, carcinome in situ), ou les analyses portant sur des échantillons pauvres en cellules tumorales, comme par exemple dans le lymphome de Hodgkin.

Pour pallier à cette limite et enrichir le prélèvement à étudier, il existe plusieurs méthodes plus ou moins précises, allant de la macrodissection du prélèvement aux techniques de microdissection.

L'objectif méthodologique principal de notre étude était d'obtenir un enrichissement en cellules tumorales de Hodgkin ou de Reed Sternberg suffisamment élevé pour dépasser le seuil de détection des anomalies moléculaires.

Compte tenu de la pauvreté en cellules tumorales dans le lymphome de Hodgkin et de la richesse, au contraire, des cellules réactionnelles du micro-environnement tumoral, le recours à la microdissection laser est apparu comme une nécessité.

B. Étude moléculaire

La fixation par le formol est une méthode employée depuis une centaine d'années, mise au point bien avant que les pathologistes ne se préoccupent de la qualité de l'ADN contenu dans leurs échantillons. Cependant, ces échantillons d'ADN sont fréquemment endommagés par l'exposition au formaldéhyde et à un environnement très acide du fixateur (97,98).

Cette dégradation crée une fragmentation de l'ADN, le rendant le plus souvent inexploitable pour les techniques moléculaires habituelles. De plus, les dommages

chimiques et les modifications qui en découlent peuvent inhiber les mécanismes enzymatiques nécessaires à ces différentes techniques. Ces dommages causent en effet des artéfacts souvent rencontrés lors de l'analyse des ADN extraits de tissus inclus dans la paraffine après fixation formolée (FFPE) (99,100).

Il est estimé que un billion de blocs inclus en paraffine après fixation formolée sont archivés à travers le monde (101), représentant une richesse de données moléculaires inestimable. Malgré tout, ceux-ci sont difficiles à exploiter par les techniques actuelles (puces à ADN, séquençage haut débit, CGH etc.), car elles nécessitent souvent une quantité et une qualité d'ADN non négligeable.

Notre intérêt était donc d'utiliser une technique d'analyse moléculaire très sensible pour détecter des anomalies moléculaires sur des petites quantités d'ADN dégradé et fragmenté.

La technologie OncoScan™ FFPE, développée par Affymetrix, permet d'analyser cet ADN dégradé et en très petites quantités.

Il s'agit d'une technologie développée pour détecter les polymorphismes nucléotidiques grâce à une puce ADN (SNP microarray). L'évolution de la technique a permis secondairement d'identifier d'autres variations génétiques comme les insertions/délétions, les pertes d'hétérozygoties (LOH), et plus récemment les mutations somatiques ponctuelles.

OncoScan™ FFPE permet d'analyser des faibles quantités d'ADN (75 ng recommandés), ce qui permet de réaliser la technique sur des prélèvements pauvres en cellules d'intérêt comme des prélèvements issus de biopsies ou de lignées cellulaires.

Schématiquement, cette technique utilise une sonde constituée d'acides nucléiques, dont les 2 extrémités vont s'hybrider sur une cible située sur l'ADN génomique, à 2 endroits distants d'environ 40 paires de base. Une fois hybridées, les deux extrémités forment une sonde circulaire, appelée aussi « sonde cadenas », résistante aux exonucléases qui serviront à dégrader les autres nucléotides au cours de la technique.

La sonde ainsi fermée va pouvoir être amplifiée par PCR, puis taguée et détectée par hybridation sur une puce à ADN composée de sondes complémentaires.

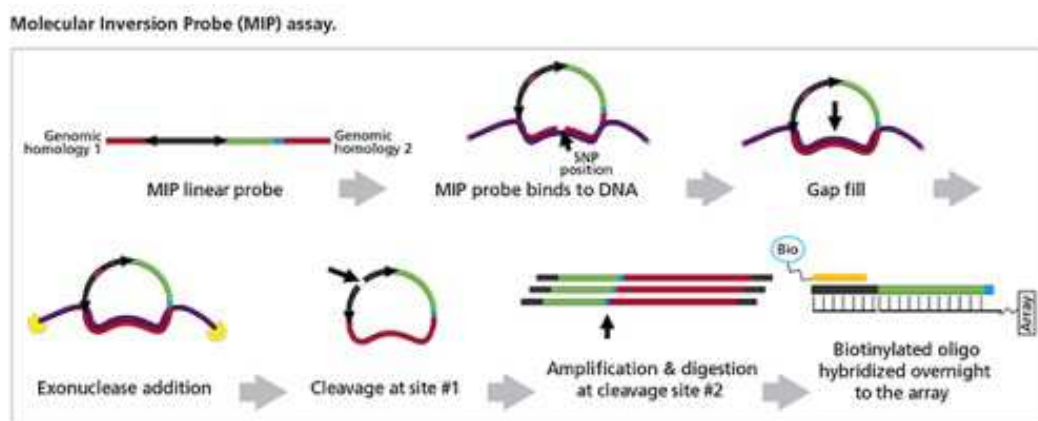


Figure 12 : Molecular Inversion Probe (MIP) assay. Affymetrix.

La technique OncoScan™ FFPE pallie au problème de dégradation de l'ADN puisque ce n'est pas l'ADN génomique dégradé qui est amplifié, mais la sonde qui reconnaît le SNP sur l'ADN génomique (102).

La technologie a rapidement évolué et les puces permettent d'interroger 335000 marqueurs de variation de copies génomiques, pertes d'hétérozygoties et 541 mutations somatiques spécifiques du cancer.

La dernière version d'OncoScan™ FFPE offre une couverture sur plus de 200 oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur avec une sonde complémentaire toutes les 500 bases dans ces régions clés.

En introduisant le concept de ratio allélique, l'analyse différencie les vraies variations de copies génomiques par rapport aux polymorphismes nucléotidiques à l'état hétérozygote. Cette technique permet aussi de détecter les pertes d'hétérozygoties (LOH) sans nécessité d'une comparaison avec le tissu sain, et pallie également à l'hétérogénéité de l'échantillon.

L'utilisation de cette technologie pour notre étude était donc idéale puisqu'elle allait nous permettre d'avoir une vision très large du génome tumoral, afin de mettre en évidence des anomalies moléculaires représentatives de nos deux groupes pronostiques, tout en étant adaptée à la qualité et à la quantité de notre matériel à analyser.

III. Mise au point de la phase pré-analytique

La microdissection n'est pas une technique employée en routine diagnostique, principalement parce qu'elle est chronophage et que la phase pré-analytique est délicate.

La mise au point a donc nécessité l'évaluation successive de plusieurs paramètres lors d'une phase pré-analytique :

- Choix des lames adéquates pour la microdissection de nos échantillons
- Prétraitement des lames de microdissection
- Choix du mode de repérage des cellules tumorales pour la microdissection
- Mise au point des paramètres du microdissecteur laser
- Influence de l'ancienneté des blocs sur la quantité d'ADN extractible
- Quantité d'ADN mobilisable après microdissection laser
- Influence de l'épaisseur des coupes sur la quantité d'ADN extractible
- Quantité de cellules tumorales mobilisables par lame
- Quantité d'ADN mobilisable pour 1000 cellules issues de prélèvement sanguin

MATERIELS ET METHODES

I. Sélection des cas

Les patients inclus dans notre étude étaient sélectionnés par le Professeur Franck Morschhauser parmi les patients traités dans le service des Maladies du sang du CHRU de Lille, pour un lymphome de Hodgkin.

Le premier groupe regroupait 19 patients inclus dans le protocole « H 3 - 4 », comparant un traitement par ABVD à un traitement par BEACOPP chez des patients en stade III ou IV au diagnostic, considérés comme en rémission complète avec un suivi prolongé sur au moins 5 ans.

Le second groupe regroupait 10 patients atteints d'un lymphome de Hodgkin, considérés comme réfractaires au traitement (ce groupe incluait des patients réfractaires primaires ou réfractaires à au moins deux lignes de chimiothérapie).

Onze patients étaient exclus lors de la sélection anatomopathologique :

- pour 2 patients, la seule biopsie disponible était une biopsie ostéo-médullaire, ne permettant pas l'analyse moléculaire compte tenu de l'effet délétère de la décalcification sur l'ADN.
- pour 2 patients, la biopsie ganglionnaire était fixée exclusivement par l'AFA, ce fixateur excluant la possibilité d'une étude moléculaire.
- pour 3 patients, aucune biopsie n'était disponible au CHRU de Lille.
- pour 1 patient, le désarchivage n'était pas possible (bloc de 2004).

- pour 3 patients, le matériel biopsique était insuffisant pour l'étude moléculaire.

Au total, 18 patients étaient inclus dans notre étude.

Les prélèvements ganglionnaires dataient de novembre 2006 à décembre 2013 et correspondaient à une biopsie-exérèse d'un ganglion tumoral ou à une biopsie ganglionnaire.

Pour chacun des patients, au moins un bloc d'inclusion en paraffine était disponible, issu d'une fixation au formol tamponné.

La recherche des prélèvements des patients sélectionnés, la sélection des blocs d'intérêt et leur désarchivage étaient réalisés grâce au logiciel DIAMIC®.

II. Mise au point de la microdissection

A. Choix des lames de microdissection

Les lames utilisées étaient des lames comportant une membrane centrale et un cadre en acier (« FrameSlide ») du fournisseur LEICA. Le cadre entourait une membrane en PET (polyéthylène téréphthalate) de 1,4 microns d'épaisseur permettant une microdissection jusqu'à l'objectif x 63.

Les lames comportaient une aire microdissécable d'approximativement 16 mm sur 45 mm.

Les lames pouvaient s'équiper d'un support (« Frame Support ») permettant de déposer les coupes paraffine sans endommager la membrane.

Un test était également réalisé sur des lames de verre recouvertes d'une membrane de type PEN (polyéthylène naphthalate) du fournisseur LEICA.

Les tests de microdissection laser étaient réalisés sur des coupes de 5 et 7 microns d'épaisseur.

Les lames de membrane étaient dans un second temps enduites d'une solution de 20µL de poly-L-Lysine 0,1%, diluée au 1/10^{ème}, étalée grâce à une pipette Pasteur et séchées à température ambiante à plat pendant environ une heure. Cette étape additionnelle avait pour but de garantir une meilleure adhésion de la coupe paraffine sur la membrane pendant la technique d'immunomarquage ou pendant la coloration standard.

B. Sélection des zones tumorales

1. Sur l'HES

a) Épaisseur de coupe

Des coupes de 5 microns puis de 7 microns d'épaisseur étaient préparées à l'aide d'un microtome dont la lame était préalablement nettoyée soigneusement et stérilisée entre chaque patient afin de garantir l'absence de contamination pour l'analyse moléculaire.

Les coupes étaient ensuite montées sur la lame de membrane, sans y ajouter de lamelle.

b) Coloration standard

Pour tester la faisabilité d'une microdissection laser sans passer par l'étape immunohistochimique, plusieurs lames étaient colorées par l'Hemalun-Eosine-Safran (HES).

Les coupes paraffinées montées sur lame de membrane étaient déparaffinées et réhydratées par bains successifs de Xylène, d'alcool, puis d'eau. Elles étaient ensuite plongées successivement dans les bains de colorants, différenciateur, puis déshydratées par des bains d'alcool et de xylène successifs.

2. Après immunomarquage

a) Épaisseur de coupe

Des coupes de 4 microns, 5 microns puis de 7 microns d'épaisseur étaient préparées à l'aide d'un microtome dont la lame était préalablement soigneusement nettoyée et stérilisée entre chaque patient afin de garantir l'absence de contamination pour l'analyse moléculaire.

Les coupes étaient ensuite montées sur la lame de membrane, sans y ajouter de lamelle.

Après le montage, la lame était placée à l'étuve à 60°C pendant au minimum 2 heures pour assurer une meilleure adhérence de la coupe à la membrane.

b) Immunohistochimie

L'étape d'immunohistochimie était réalisée dans l'automate d'immunohistochimie du service, de type : Benchmark XT (Ventana Roche).

Les lames étaient déposées dans l'automate, et suivaient le protocole n°11 correspondant à l'anticorps anti-CD30 pour le déparaffinage, le prétraitement, l'incubation, la révélation et la contre-coloration.

Cet anticorps anti-CD30 était un anticorps monoclonal de souris (clone Ber-H2, du fournisseur DAKO), dilué au 1/40^{ème}.

Le déparaffinage était réalisé par l'action simultanée de la chaleur à 75°C et d'une solution détergente (EZ Prep, Ventana).

Le prétraitement visait à hydrolyser les liaisons covalentes formées par la fixation formolée et à démasquer les sites antigéniques. Il était réalisé par l'action de la chaleur à 95°C et d'un tampon acide CC1 Ventana pendant 30 minutes.

L'activité peroxydase endogène était bloquée à l'aide d'eau oxygénée, puis les lames étaient incubées avec l'anticorps primaire anti-CD30 (DAKO) pendant 32 minutes.

Les anticorps primaires étaient détectés par la suite par des anticorps secondaires multimères (Ultra View marqués à la peroxydase).

La révélation s'effectuait grâce au chromogène diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB + H₂O₂) qui, hydrolysé par la peroxydase pendant 8 minutes, conférait une couleur marron aux cellules de Hodgkin marquées, par formation d'un précipité (DABO₂).

La contre-coloration était réalisée à l'aide de l'hématoxyline associée à une solution de Bluing Reagent comportant du carbonate de lithium et du carbonate de sodium, conférant une contre-coloration bleue claire aux cellules non marquées.

Les lames étaient ensuite lavées à l'eau savonneuse manuellement afin d'éliminer toute trace d'huile de paraffine servant d'interface pendant la technique automatisée.

Une déshydratation à l'alcool absolu était également réalisée manuellement juste avant la microdissection pour faciliter l'action du laser.

III. Tests de quantité d'ADN

A. Sur blocs de paraffine d'années différentes

Cinq échantillons de lymphome de Hodgkin étaient sélectionnés, en choisissant 5 blocs datant d'années différentes (2007, 2008, 2010, 2013, 2014) afin de tester l'influence du temps de conservation sur la dégradation de l'ADN.

Environ une dizaine de copeaux de 10 microns d'épaisseur étaient préparés sans macrodissection préalable, et étaient recueillis dans des tubes Eppendorf® de 2 ml.

Ces 5 ADN étaient ensuite extraits en suivant le protocole d'extraction FFPE décrit, puis dosés grâce à la méthode du picogreen/SAFAS.

B. Sur 1000 cellules issues de prélèvements sanguins

Afin d'objectiver la quantité d'ADN contenue dans 1000 cellules (correspondant environ au nombre de cellules pouvant être microdisséquées sur une lame), trois échantillons provenant de trois prélèvements sanguins de trois patients extérieurs à notre étude étaient préparés selon la méthode d'isolement des cellules mononucléées sur milieu de séparation des lymphocytes (103).

L'échantillon sanguin était dilué par moitié par un mélange RPMI – sérum de veau foetal 10 %, puis déposé délicatement à la surface d'une même quantité de MSL (Milieu de Séparation des Lymphocytes). Après centrifugation, un anneau opalescent correspondant aux cellules mononucléées se formait entre la couche de plasma et la couche de MSL et globules rouges.

Ces cellules mononucléées étaient lavées par plusieurs étapes de mélange au RMPI-SVF et de centrifugation.

La concentration en cellules était mesurée sur automate et l'échantillon était alors dilué en fonction du résultat pour ne conserver que 1000 cellules dans le tube final.

Une extraction d'ADN était réalisée en suivant le protocole d'extraction du kit Qiagen et la quantité d'ADN était mesurée par méthode picogreen/SAFAS.

C. Sur coupes de paraffine d'épaisseur variable

Deux lames blanches comportant respectivement une coupe paraffine de 5 microns et une coupe de 7 microns d'épaisseur étaient préparées afin d'évaluer la quantité d'ADN contenue sur l'ensemble d'une coupe en fonction de son épaisseur.

Ces lames étaient grattées manuellement à l'aide d'un bistouri stérile et les copeaux ainsi obtenus étaient récupérés dans des tubes de 2ml.

Le même principe était appliqué à deux coupes de 5 et 7 microns qui avaient subi la technique d'immunohistochimie avec l'anticorps anti CD30 dans l'automate Benchmark XT, afin de comparer la quantité d'ADN avant et après immunohistochimie.

IV. Microdissection

Le microdissecteur utilisé était le microdissecteur laser AS LMD Leica, situé sur la Plate-forme d'Imagerie Cellulaire du Pôle Recherche de la Faculté de Médecine de Lille, sous la responsabilité de Meryem Tardivel.

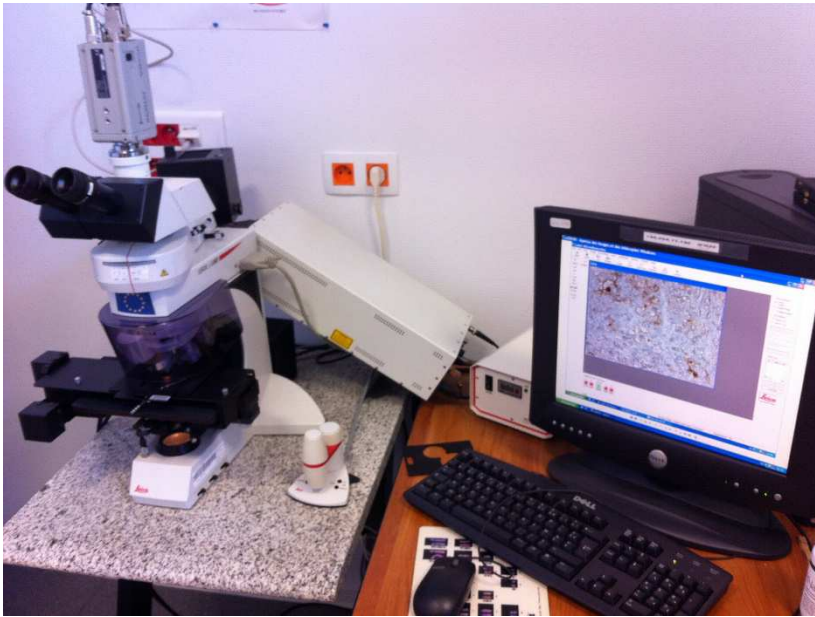


Figure 13 : Vue de la plateforme de microdissection

Le microscope était relié à une caméra qui retransmettait l'image en direct sur l'écran d'ordinateur. Un joystick permettait de piloter la platine, de mettre au point l'image, de régler la puissance de l'éclairage et de changer d'objectif. La lame et les objectifs étaient protégés derrière un écran en plastique pendant la technique.

Avant son utilisation, les surfaces pouvant être en contact pendant la technique avec les échantillons étaient décontaminées grâce à une solution DNase free.

La lame de membrane entourée de son cadre métallique était positionnée sur un support s'adaptant sur la platine du microscope.

Un microtube de 0,2 ml était placé sur son support, en positionnant le capuchon du tube de façon à ce qu'il puisse recueillir les cellules disséquées par gravité.

Ce capuchon était préalablement rempli par 34 microlitres de tampon de lyse utilisé ultérieurement lors de la première étape d'extraction (tampon ATL fourni par le microkit FFPE extraction Qiagen).

La réalisation de la calibration du faisceau laser permettait pour chaque échantillon, d'obtenir une dissection précise et permettait de régler l'intensité du

laser. La vitesse du laser et la compensation était prédéfinies et n'étaient pas modifiées durant l'expérience.

L'objectif x 20 semblait offrir un bon compromis entre la précision du laser, la vitesse de coupe et la reconnaissance visuelle des cellules tumorales immuno-marquées.

Les cellules tumorales immuno-marquées par l'anticorps anti-CD30 étaient repérées sur l'écran et étaient disséquées par groupe lorsque cela était possible, ou une à une pour les échantillons où elles étaient plus dispersées dans l'environnement lymphoïde.

Dans ce système Leica, c'est le faisceau laser qui se déplaçait sur la zone à découper, alors que la coupe tissulaire restait en place sur la platine du microscope.

Le système permettait d'utiliser l'option « draw and cut ». La zone d'intérêt était sélectionnée sur l'écran d'ordinateur en dessinant un cercle, un rectangle ou un trait libre. Une fois dessinée, cette zone était coupée par le faisceau laser et la cellule tombait par gravité dans le capuchon du microtube.

Lorsque la zone était incomplètement disséquée ou lorsqu'elle se recollait à proximité sur la lame par un phénomène d'électricité statique, une fonction « move and cut » permettait avec une puissance plus ou moins grande, de terminer la dissection ou de faire tomber la cellule dans le microtube en donnant une impulsion supplémentaire.

Lorsque la microdissection de l'échantillon était terminée, celui-ci était stocké à -80°C jusqu'à son extraction.

La microdissection minutieuse d'une lame, après screening de toute sa surface durait environ entre 1h30 et 2 heures selon la taille de l'échantillon.

Une seule lame était techniquée pour les sept premiers échantillons testés, mais compte tenu de l'échec d'extraction d'une quantité suffisante d'ADN pour ces

premiers essais, six lames étaient alors techniques pour le dernier échantillon testé (soit environ 12 heures cumulées de microdissection pour ce cas).

V. Macrodissection

Pour chacun des cas inclus dans l'étude, la zone la plus riche en cellules tumorales, généralement la zone comportant des nodules tumoraux, était sélectionnée au microscope.

Cette zone était cerclée sur lame à l'aide d'un marqueur afin de pouvoir procéder à la macrodissection sur le bloc de paraffine correspondant.

Environ une dizaine de copeaux de 10 microns d'épaisseur étaient coupés à l'aide du microtome dont la lame était soigneusement nettoyée et stérilisée entre chaque échantillon.

Ces copeaux de paraffine étaient récupérés dans des tubes Eppendorf de 2mL pour procéder ultérieurement à leur extraction.

VI. Extractions

A. Extraction des échantillons issus de la microdissection

Le protocole d'extraction correspondait à celui du kit d'extraction : Microkit FFPE QIAamp DNA du fournisseur QIAGEN.

Les échantillons avaient déjà subi le déparaffinage pendant l'étape d'immunohistochimie, cette étape n'était donc pas réitérée avant l'extraction.

Quinze microlitres de tampon ATL et 10 microlitres de protéinase K étaient ajoutés à l'échantillon contenu dans le microtube de 0.2ml, puis mélangés par le vortex pendant 15 secondes.

La solution était incubée pendant 16 heures à 56°C sur un thermoblock avec agitation occasionnelle.

Pour poursuivre la lyse, 25 microlitres de tampon ATL et 50 microlitres de tampon AL étaient ajoutés et mélangés par le vortex pendant 15 secondes.

Cinquante microlitres d'éthanol absolu étaient ajoutés au mélange et incubés pour 5 minutes à température ambiante après vortex.

Le lysat était alors transféré dans une colonne d'extraction QIAamp MinElute préalablement identifiée, puis centrifugé pendant 1 minute à 6000g (8000rpm).

Deux lavages par les tampons AW1 et AW2 étaient réalisés successivement, et la colonne était centrifugée pendant 1 minute à 6000g entre chaque lavage.

Afin de sécher complètement la membrane de la colonne pour éviter que des traces d'éthanol n'interfèrent avec la suite de l'extraction, la colonne était centrifugée à vitesse maximale (20 000g) pendant 3 minutes.

Elle était alors adaptée sur un tube de 1,5ml préalablement identifié pour réaliser l'étape d'élution.

Vingt microlitres de tampon d'élution AE préalablement chauffé à 70°C dans un four étaient déposés délicatement au centre de la membrane et incubés pendant 5 minutes à 70°C, puis centrifugés à 20 000g pendant 1minute. Cette étape était effectuée deux fois afin de récupérer le maximum d'ADN.

B. Extraction des échantillons issus de la macrodissection

1. Déparaffinage et lyse

Les copeaux de paraffine étaient mélangés avec 160 μL de la solution de déparaffinage en vortex pendant 10 secondes.

Le tube était ensuite centrifugé à vitesse maximale (15 000 tours/min) pendant 10 secondes.

La solution obtenue était alors incubée à 56°C pendant 3 minutes, puis laissée à température ambiante jusqu'à son refroidissement.

Cent quatre-vingts μL de tampon ATL fourni par le kit étaient ajoutés à la solution.

Après centrifugation à 10 000 tours/min pendant 1 minute, 20 μL de protéinase K étaient ajoutés dans la phase inférieure de la solution.

La solution était incubée à 56°C pendant 16 heures, avec agitation constante, puis à 90°C pendant 1 heure.

2. Extraction

La phase inférieure de la solution précédemment obtenue était transférée dans un tube de 2 mL dans lequel étaient présents 200 μL d'éthanol et 200 μL de tampon AL fourni dans le kit.

Cette solution, après mélange, était transférée dans une colonne Qiagen® fixée sur un tube de 2 mL. Des lavages successifs avec les tampons AW1, AW2 fournis étaient réalisés.

L'étape d'éluion utilisait deux fois 20 μ L de tampon ATE déposé au centre de la membrane de la colonne pour éluer le maximum d'ADN.

VII. Dosage de l'ADN

Les dosages des quantités d'ADN extraits dans notre étude étaient réalisés à l'aide du spectrophotomètre SAFAS.

Cette technique permettait de s'affranchir des imprécisions de la méthode de mesure de l'absorbance des UV à 260 nm (Nanodrop) puisque cette dernière mesurait également les nucléotides libres, les protéines, les ARN et les simple brins d'ADN pouvant être présent dans la solution même après lavage (104).

La préparation et la dilution des échantillons en vue du dosage étaient effectuées à l'aide d'un programme robotique Hamilton.

Dix-neuf μ L de picogreen (marqueur fluorescent des acides nucléiques servant à quantifier les ADN double brins) préalablement placés à température ambiante et à l'abri de la lumière étaient ajoutés au tampon TE (TrisEDTA) dilué au 1/20^{ème}.

Les échantillons ADN étaient ensuite dilués au 1/5^{ème} par le programme robotique (sauf pour les échantillons issue de la microdissection pour éviter de doser de trop faibles quantités), puis mélangés à la solution TE / picogreen.

Les quantités dosées au spectrophotomètre SAFAS étaient exprimées en nanogrammes par microlitre.

Un contrôle positif (ADN à 100ng) ainsi qu'un contrôle négatif (eau) étaient utilisés.

VIII. Analyse moléculaire

Le protocole d'analyse moléculaire « Oncoscan FFPE » se déroulait sur quatre demi-journées et permettait d'analyser jusqu'à 23 échantillons en même temps.

La première demi-journée consistait en l'hybridation du panel de sondes aux échantillons d'ADN.

La deuxième demi-journée comportait la ligation des sondes à l'ADN génomique au niveau du SNP, l'élimination des sondes non liguées, la linéarisation des sondes circularisées, et la première étape de PCR.

La troisième demi-journée comprenait la seconde étape de PCR, la digestion par l'endonucléase, la dénaturation et l'hybridation à la puce d'analyse.

La dernière demi-journée consistait à recueillir les données dans la station Fluidic.

A. Hybridation du panel de sondes

6,6 μL d'ADN concentrés à 12 ng/ μL étaient distribués dans les puits 1 à 5 de la première ligne d'une plaque PCR à 96 puits.

La même quantité d'un témoin positif et d'un témoin négatif était également distribuée dans les puits 6 et 7 sur cette même ligne.

Un mix préparé séparément contenait un tampon (buffer A fourni), un mélange de sondes « nombre de copies d'un gène », et un mélange de sondes « mutations somatiques ».

3,4 μL de ce mix étaient distribués dans chacun des 7 puits contenant les ADN.

La plaque était placée sur un thermocycleur pendant 5 minutes et chauffée à 95°C.

Après avoir procédé à un refroidissement sur glace de la plaque pendant 1 minute, le programme d'hybridation était lancé pendant 18h à une température constante de 58°C.

B. De la ligation de la sonde jusqu'à la première PCR

Deux mix comportant les dNTPs A/T ou les dNTPs G/C étaient préparés séparément en veillant à ne pas contaminer les tubes respectifs.

Le mix « Gap fill » comportant de l'eau, un tampon A fourni, une SAP recombinante et une enzyme était préparé.

Quatorze μL de ce mix « Gap fill » étaient incorporés dans les puits de la plaque contenant les échantillons ADN.

À partir de la première plaque, une seconde plaque intitulée « première PCR » était réalisée en créant deux lignes : une ligne intitulée A/T et une ligne intitulée G/C.

Dix μL des solutions des premiers puits étaient déposés dans chaque puits des deux lignes de la deuxième plaque.

Quatre μL des mix dNTPs A/T ou G/C étaient ajoutés à leur ligne respective.

Après avoir incubé 10 minutes à 58°C, la température était ramenée à 37°C pour pouvoir ajouter l'Exo-mix contenant l'exonucléase. Celle-ci était activée à 37°C pendant 20 minutes puis à 95°C pendant 10 minutes.

Lorsque la température était redescendue à 37°C, le mix de clivage comportant un tampon et une enzyme de clivage permettant de linéariser les sondes (clivage au

premier site) était ajouté aux échantillons. Ces échantillons étaient de nouveau chauffés à 37°C pendant 15 minutes puis à 95°C pendant 15 minutes.

L'étape de première PCR était alors préparée avec un mix contenant notamment une Taq polymérase et par un programme de PCR sur thermocycleur.

C. Gel de contrôle et 2^{ème} PCR

Un contrôle de la réaction de PCR était effectué sur un gel d'agarose, afin de vérifier que les produits amplifiés faisaient environ 120 paires de bases (taille connue des sondes).

Une nouvelle étape de PCR était alors réalisée avec les mêmes réactifs que précédemment décrits.

D. Digestion enzymatique et 2^{ème} gel de contrôle

L'enzyme de restriction Hae III (endonucléase) était préparée au sein d'un mix contenant également un tampon B fourni et une exonucléase, afin de cliver la sonde à son 2^{ème} site et ne garder que la partie taguée.

Après ajout de ce mix aux échantillons, la température était maintenue à 37°C pendant 85 minutes.

Un second contrôle des produits de PCR était alors effectué sur gel d'agarose. Deux bandes devaient apparaître pour vérifier que la sonde avait été coupée à son point de restriction.

E. Hybridation à la puce

Le four d'hybridation était chauffé pendant une heure à 49°C.

Le mix d'hybridation fourni était ajouté aux échantillons, toujours séparés en 2 lignes A/T ou G/C. Puis une dénaturation de l'ADN était effectuée grâce à un cycle de 10 minutes à 95°C puis 5 minutes à 49°C.

Cent soixante µL des échantillons pouvaient alors être chargés dans chacune des puces d'analyse en séparant les réactions A/T des réactions G/C. L'hybridation était réalisée pendant 16 à 18 heures à 49°C dans le four d'hybridation.

Après cette étape, les puces étaient lavées par différents tampons de lavage fournis puis transférées dans la station d'analyse.

IX. Analyse des données moléculaires

L'analyse des données moléculaires issues de la technique OncoScan® FFPE était réalisée grâce aux logiciels Chromosome Analysis Suite 3.0 (ChAS) et Nexus Express Software for OncoScan FFPE.

RESULTATS

I. Phase pré-analytique

A. Mise au point de la microdissection

1. Choix des lames de microdissection

Les tests de microdissection effectués sur les deux types de lames du fournisseur Leica ont permis de montrer une microdissection laser plus facile sur les lames de membrane de type PET que sur les lames de type PEN, le décollement des zones microdisséquées étant plus difficile sur les lames de type PEN.

2. Épaisseurs de coupe

Les épaisseurs de coupe de 5 μ et 7 μ étaient compatibles avec la technique en ajustant la puissance du laser.

3. Prétraitement des lames de microdissection

Sans prétraitement des lames par la poly-L-Lysine, la coupe montée perdait son adhésion et se décollait lors de l'étape d'immunohistochimie dans 75% des cas pendant l'étape de mise au point.

Cette étape de prétraitement de la membrane par la poly-L-Lysine a permis l'adhésion parfaite de toutes les coupes d'échantillons tissulaires sur la lame.

La technique de microdissection s'avérait plus simple après un lavage à l'eau savonneuse pour éliminer toute trace d'huile de paraffine utilisée lors de la technique d'immunohistochimie, associée une déshydratation de la lame à l'éthanol absolu.

4. Choix de la méthode de sélection des cellules tumorales

a) Sur HES

Les lames de membranes adaptées pour la microdissection laser ne permettaient pas, par définition, d'apposer une lamelle au-dessus du prélèvement à étudier. Une simple coloration par l'HES impactait de façon majeure la résolution optique et la sélection optique des cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg était alors impossible.

Les figures ci-dessous montrent l'aspect de l'image à analyser, aux grossissements x 20 et x 40.

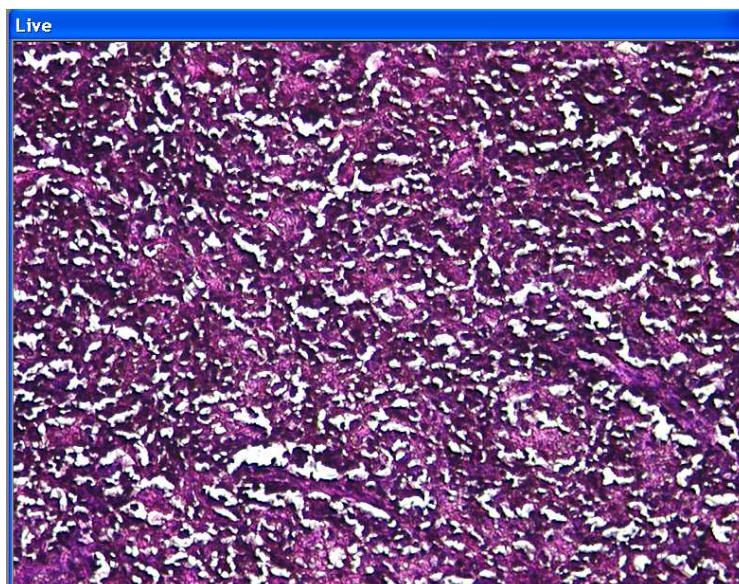


Figure 14 : Vision de la lame colorée par l'HES sur ordinateur, objectif x 20

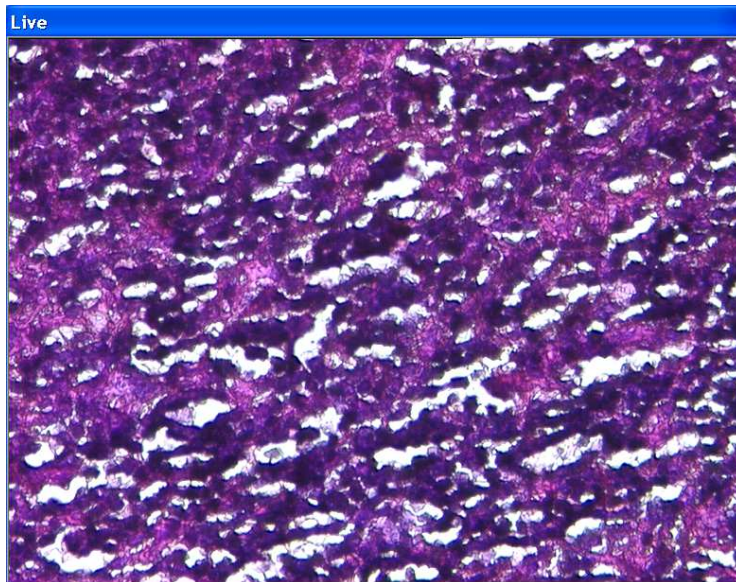


Figure 15 : Vision de la lame colorée par l'HES sur ordinateur, objectif x 40

b) Après immunomarquage

Le marquage des cellules tumorales par l'anticorps anti-CD30 permettait leur repérage de façon plus aisée.

Il s'agissait d'un marquage cytoplasmique intense avec renforcement golgien.

Les cellules étaient dispersées dans certains cas (cf. figures 16 et 17), et pouvaient être disséquées une à une à l'objectif x 40.

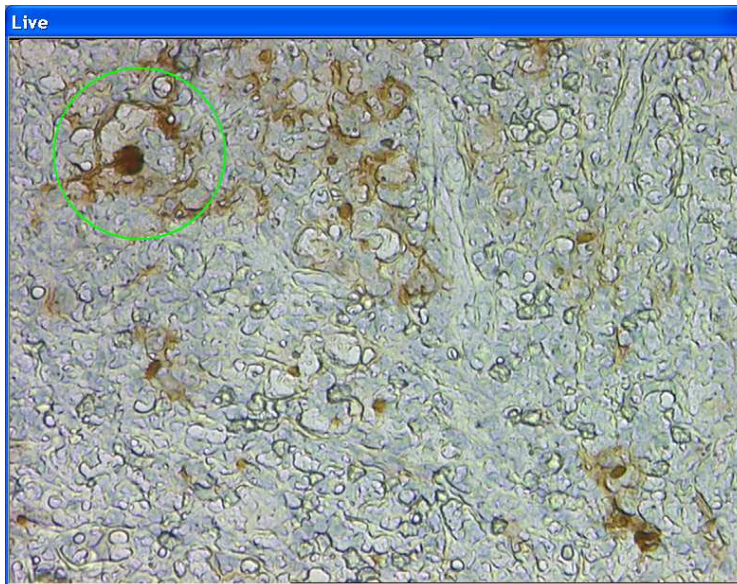


Figure 16 : Sélection d'une cellule de Reed Sternberg pour microdissection. Vision d'une lame immunomarkuée par l'anticorps anti CD30, objectif x 40

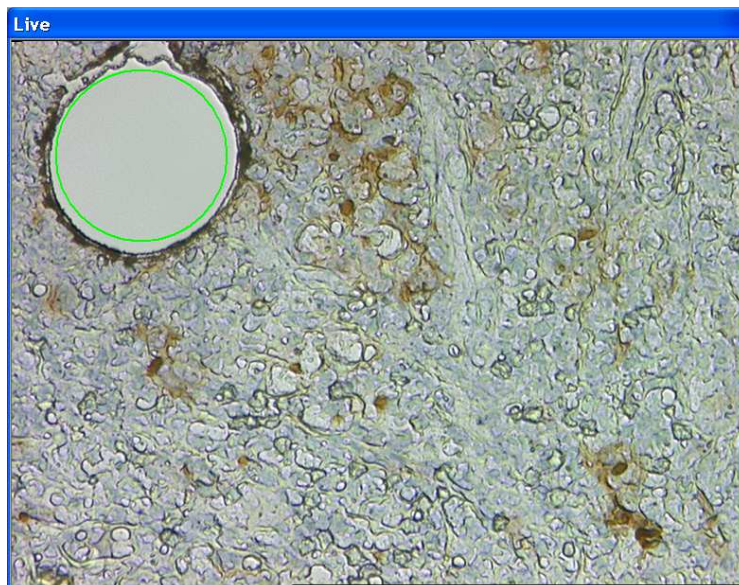


Figure 17 : La cellule de Reed Sternberg a été disséquée par l'action du laser. Vision d'une lame immunomarkuée par l'anticorps anti CD30, objectif x 40

Dans la plupart des cas, les cellules étaient regroupées en nodules tumoraux plus ou moins grands et pouvaient ainsi être disséquées à l'objectif x 20 (cf. figures 18 et 19).

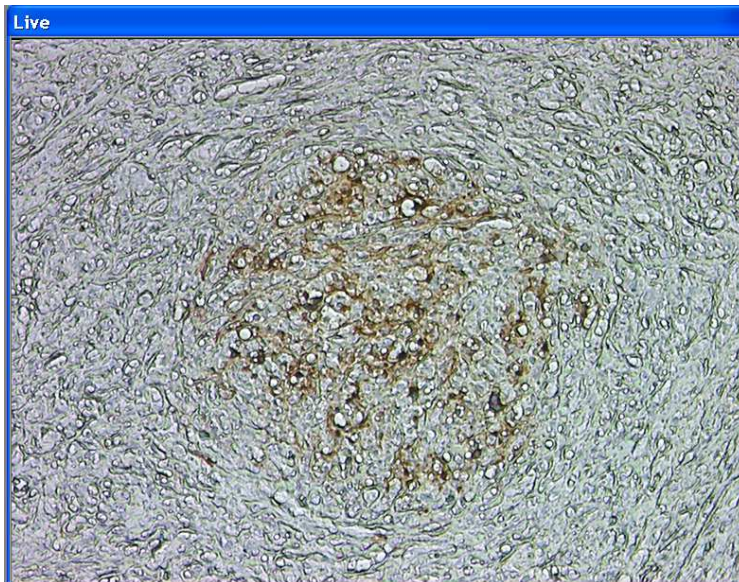


Figure 18 : Nodule tumoral. Vision d'une lame immunomarkée par l'anticorps anti CD30, objectif x 20

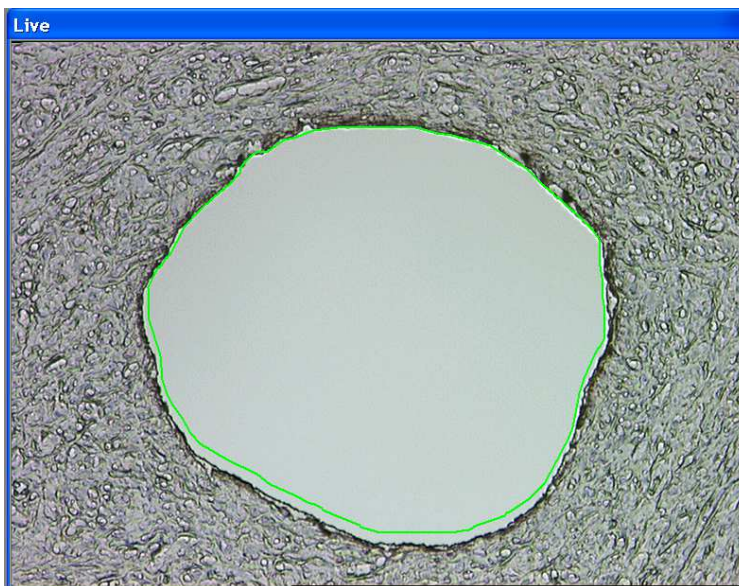


Figure 19 : Nodule tumoral après microdissection. Vision d'une lame immunomarkée par l'anticorps anti CD30, objectif x 20

B. Quantités d'ADN extrait

1. Influence de l'ancienneté des blocs de paraffine

Le résultat du dosage des échantillons provenant de blocs paraffine de différentes années est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1 : Quantités d'ADN en fonction de l'année du bloc de paraffine

Année du bloc	Concentration en ng/ μ L
2007	176,6
2008	103,45
2010	37,46
2013	183,26
2014	236,04

Pour les mêmes quantités de copeaux de paraffine préparées, la concentration variait entre 37,46 ng/ μ L et 236,04 ng/ μ L. Les quantités extraites jusqu'en 2007 étaient suffisantes pour pouvoir être exploitées lors de l'étude moléculaire.

Sur ces cinq tests, il n'était pas possible de mettre en évidence une corrélation stricte entre la durée de conservation du bloc et la quantité d'ADN pouvant en être extraite, même si c'était le bloc le plus récent qui permettait d'obtenir la quantité la plus importante d'ADN.

2. Influence du nombre de cellules dans l'échantillon

Le résultat du dosage des échantillons issus des 1000 cellules mononucléées isolées sur les prélèvements sanguins testés est présenté ci-dessous :

Tableau 2 : Quantités d'ADN pour 1000 cellules extraites de prélèvements sanguins.

Echantillons	Concentration ADN en ng/ μ L
Essai 1 après FICOLL	19,13
Essai 2 après FICOLL	12,72
Essai 3 après FICOLL	16,47

En procédant à une extraction sur seulement 1000 cellules sélectionnées, la quantité d'ADN variait entre 12,72 et 19,13 ng/ μ L.

Ces quantités étaient toutefois issues de prélèvements non fixés par le formol.

3. Influence de l'épaisseur de coupe et de l'immunohistochimie

Nous avons comparés les quantités d'ADN extraites à partir de lames grattées dont l'épaisseur des coupes variait entre 5 et 7 microns.

Les quantités d'ADN extraites à partir des lames préparées avant et après protocole d'immunohistochimie avec l'anticorps anti CD30 sont présentées dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Quantités d'ADN en fonction de l'épaisseur de coupe et de la réalisation d'une immunohistochimie.

	Sans IHC	Après IHC anti CD30	Ratio IHC/non IHC
Coupe de 5 μ	17,74 ng/ μ L	9,87ng/ μ L	56%
Coupe de 7 μ	49,8 ng/ μ L	17,11ng/ μ L	34%
Ratio 5 μ /7 μ	+180%	+73%	

Les quantités d'ADN après protocole d'immunohistochimie étaient plus faibles, et représentaient entre 34 et 56% de la quantité d'ADN extraite sur lame blanche sans immunohistochimie.

La réalisation d'une coupe paraffine plus épaisse de 2 μ permettait d'améliorer la quantité d'ADN de 73% jusqu'à 180%, tout en permettant une bonne réalisation de la technique de microdissection laser.

C. Dosage des ADN issus de la microdissection

Le résultat des dosages des ADN issus de la microdissection est présenté dans le tableau ci-dessous.

Les échantillons disséqués à partir d'une voire de deux lames de 5 microns d'épaisseur ne permettaient jamais d'obtenir une quantité d'ADN détectable après dosage au picogreen/SAFAS.

Seule la microdissection de 6 lames comportant une coupe de 7 μ d'épaisseur a permis d'obtenir une concentration de 2,71ng/ μ L (cas 12).

Tableau 4 : Quantités d'ADN extraites à partir d'échantillons microdisséqués

Numéro Echantillon	Quantité d'ADN en ng/ μ L
Cas 12 (6 lames à 7 μ)	2,71
Cas 3 (2 lames à 5 μ)	0
Cas 4	0
Cas 5	0
Cas 8	0
Cas 9	0
Cas 10	0
Cas 11 (2 lames à 5 μ)	0
Cas 14	0
Cas 16	0
Cas 17	0
Cas 18	0

D. Dosage des ADN issus de la macrodissection

Le résultat des dosages des ADN issus de la macrodissection des blocs de paraffine est présenté dans le tableau ci-dessous.

Tous les échantillons étaient analysés par la technique OncoScan FFPE, même ceux pour qui la quantité d'ADN était très faible et inférieure à la quantité recommandée par le fournisseur (80ng).

Les témoins positif (ADN témoin dosé à 100ng/ μ L) et négatif (eau) étaient considérés comme de bonne qualité.

Tableau 5 : Quantités d'ADN extraites à partir d'échantillons macrodisséqués

Numéro d'échantillon	Concentration ADN en ng/ μ L
Cas 1	1,2
Cas 2	36,8
Cas 3	80
Cas 4	36,5
Cas 5	81,4
Cas 6	1,4
Cas 7	52,3
Cas 8	90
Cas 9	27,7
Cas 10	37,46
Cas 11	146,5
Cas 12	183,26
Cas 13	100
Cas 14	11,4
Cas 15	73,4
Cas 16	167
Cas 17	140
Cas 18	51,2
Contrôle à 100 ng	82
Contrôle négatif eau	0,7

II. Étude moléculaire

A. Gains et pertes chromosomiques

Les résultats des 18 patients étaient analysés grâce à la fonction « test d'agrégation » du logiciel Nexus Express for OncoScan 3, afin de mettre en évidence les variations du nombre de copies génomiques récurrentes dans notre population.

Ainsi, il apparaissait que sur l'ensemble de la population testée, les gains de régions situées sur les chromosomes 3q, 6p, 9p et 12p étaient les gains de nombre de copies génomiques les plus récurrents.

D'autres gains détectés à une fréquence moindre impliquaient les chromosomes 2p, 4p, 5q, 7p, 8q, 12q, 14q, 15q, 17q, 18q, 29q, 22q.

Les pertes de régions situées sur les chromosomes 1p et 13q étaient les plus récurrentes.

Chaque échantillon était ensuite analysé individuellement grâce au logiciel Chromosome Analysis Suite.

Cette analyse permettait de visualiser en détail tous les gènes concernés par les gains ou les pertes de nombre de copies pour chaque échantillon.

Les résultats du test d'agrégation sont résumés dans la figure 20. Les gains du nombre de copies génomiques sont représentés en bleu à droite du chromosome et les pertes du nombre de copies génomiques sont représentées en rouge à gauche du chromosome.

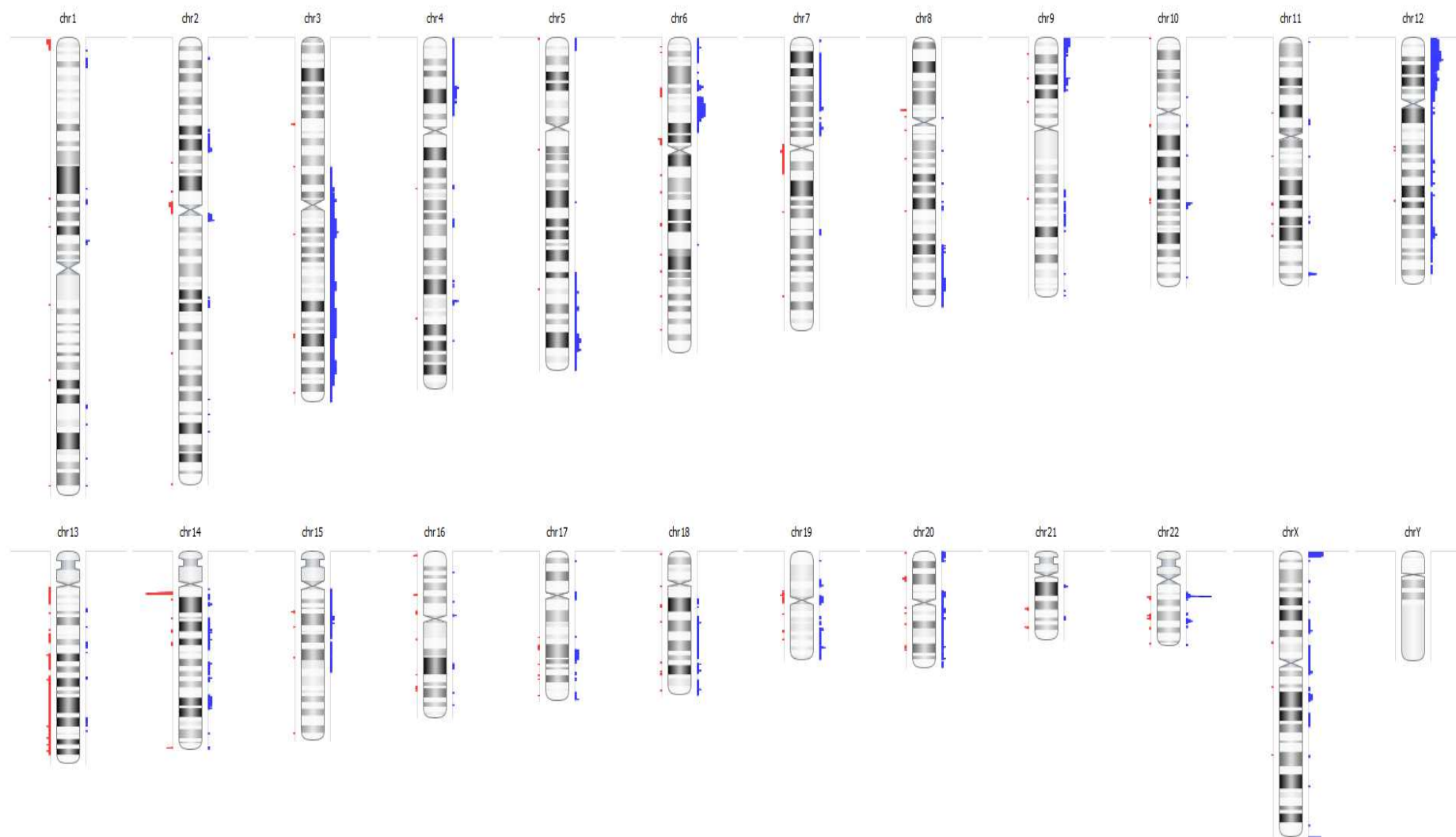


Figure 20 : Vue globale des anomalies du nombre de copies de gènes

1. Gain de la région 9p24

Les lymphomes de trois patients du groupe réfractaire comportaient un gain de la région d'intérêt **9p24.1-3** située sur le bras court du **chromosome 9**.

Pour ces trois patients, on détectait ainsi un gain du gène **JAK2**, et pour deux d'entre eux un gain associé des gènes codant pour les ligands de **PD-1** (PDL1 et PDL2) dénommés respectivement **CD274** et **PDCD1LG2**, situés à proximité de **JAK2** dans cette région d'intérêt.

a) Cas n°4

Le cas n°4 faisait partie du groupe réfractaire et le lymphome comportait un gain de la région du bras court du chromosome 9 (9p24.1-3) (cf. annexe 4).

b) Cas n°6

Le cas n°6 faisait partie du groupe réfractaire. Ce lymphome comportait des gains de régions situées en 3p, 3q, 4p, 4q, 5q, 6p, 7p, 8q, 9p, 10q, 12p, 12q, 14q, 15q, 16q, 17q, 18p, 19p, 19q, 20p, 20q, 22q et X.

Il comportait par ailleurs des pertes de régions chromosomiques en 6p, 13q, 17q et 22q (cf. annexe 5).

c) Cas n°9

Le cas n°9 faisait partie du groupe réfractaire et le lymphome comportait uniquement des gains de régions situées sur les chromosomes 2p, 5q, 6p, 9p, 9q, 11p, 12p, 14q (cf. annexe 6).

2. Gain de la région 2p16

Le lymphome du cas n°9 comportait, outre le gain de la région **9p24** contenant **JAK2**, un gain de la région **2p16.1** intéressant les gènes **REL** et **BCL11A** (cf. annexe 6).

Le lymphome du cas n°12, après microdissection, comportait également un gain de cette région **2p16.1** contenant **REL** et **BCL11A** (Cf. annexe 8).

3. Gain de la région 12p13

Un gain du nombre de copies de la région chromosomique **12p13** était récurrent chez quatre patients du groupe réfractaire et deux patients du groupe répondeur.

Cette région d'intérêt contient notamment les gènes **TEL/ETV6** et **CCND2** codant pour la protéine **Cycline D2**.

Trois de ces patients comportaient un gain de **TEL/ETV6** associé à un gain de **CCND2**, alors que les trois autres comportaient uniquement un gain de **TEL/ETV6**.

a) Cas n°3

Le lymphome du cas n°3 faisait partie du groupe réfractaire et comportait un gain de la région **12p13** intéressant **ETV6** et **CCND2** (Cf. annexe 3).

b) Cas n°6

Le lymphome du cas n°6, outre le gain de la région **9p24** incluant **JAK2**, comportait un gain étendu du chromosome 12 incluant **ETV6** et **CCND2** (Cf. annexe 5).

c) Cas n°9

Le lymphome du cas n°9, du groupe réfractaire, cumulait des gains de **REL**, **JAK2**, **ETV6/TEL** et **CCND2** (Cf. annexe 6).

d) Cas n°12

Le lymphome du cas n°12, après microdissection, comportait un gain de la région **12p13** impliquant uniquement **ETV6** (Cf. annexe 8).

e) Cas n°14

Le lymphome du cas n°14, du groupe répondeur, comportait un gain de la région **12p13** restreinte au gène **ETV6** (Cf. annexe 9).

f) Cas n° 18

Le lymphome du cas n°18, faisait partie du groupe répondeur et comportait un gain de la région **12p13**, comportant uniquement le gène **ETV6** (cf. annexe 11).

4. Perte de la région 1p36

La perte du nombre de copies de la région chromosomique 1p36 entraînait une perte de copies du gène **TNFRSF14**.

Cette perte était présente dans le lymphome d'un patient du groupe réfractaire et d'un patient du groupe répondeur.

a) Cas n°10

Le lymphome du cas n°10 faisait partie du groupe réfractaire et comportait uniquement des pertes de régions situées sur les chromosomes **1p36.33** et 14q (Cf. annexe 7).

b) Cas n°15

Le lymphome du cas n°15 faisait partie du groupe répondeur et comportait des gains de régions situées sur les chromosomes 1p, 6p, 20p, 22q, ainsi que la perte de la région **1p36.33** (Cf. annexe 10).

B. Mutations somatiques

Le tableau 6 récapitule les différentes mutations somatiques présentes dans notre série.

1. *TP53*

Dix échantillons présentaient des mutations somatiques du gène *TP53*. Ces mutations étaient uniquement des substitutions nucléotidiques.

Huit de ces patients étaient dans le groupe réfractaire.

2. *EGFR*

Sept échantillons présentaient des mutations somatiques du gène *EGFR*, représentées par des insertions, délétions ou substitutions nucléotidiques.

Cinq de ces patients appartenaient au groupe réfractaire.

3. *KRAS*

Cinq patients présentaient des mutations somatiques du gène *KRAS*, dont trois patients appartenaient au groupe réfractaire.

4. *NRAS*

Huit patients présentaient des mutations somatiques du gène *NRAS*, dont six appartenaient au groupe réfractaire.

5. **PTEN/IDH1/IDH2/BRAF/PIK3CA**

Un seul patient présentait des mutations somatiques sur les gènes **PTEN**, **IDH2**, **PI3KCA** et **BRAF**.

Ce patient faisait partie du groupe réfractaire.

Un autre patient présentait une mutation du gène **IDH1**.

Tableau 6 : Récapitulatif des mutations somatiques

	EGFR	NRAS	KRAS	PTEN	PIK3CA	TP53	BRAF	IDH1	IDH2
Cas 1		G12D				R196*	G469E		R140Q
Cas 3						R249S, R248Q/L, R248W, G245S/C			R140Q
Cas 4		Q61R							
Cas 5		G12S/C				R282W			
Cas 6	G719S, G719A, L747_E749P/del, V769_D770insASV, H773_V774insNPH, T790M, L858R	Q61R, Q61K, G12V, G12D, G12S/C, Q61L	Q61H, G12A, G12D/V, G12C/S	R130G, K267fs*9, R130*, R130Q/fs*4, R233*	E545K	R282W, R273C/S, R249S, R248Q/L, R248W, G245S/C, Y220C, R196*, C176F, V157F	V600E, G496E		R172K
Cas 7	T790M					R196*			R140Q
Cas 11	T790M					R306*, G245S/C, R196*		R132H	R140Q
Cas 12	L747_E749P/del, V769_D77insASV, H773_V774insNPH, L858R, G719A	G12D, G12V, G12S/C	Q61H, G12A, G12D/V, G12C			R282W, R273C/S, R249S, R248Q/L, R248W, G245S/C, Y220C, R196*, V157F, H179R, C179R			

Tableau 6 : Récapitulatif des mutations somatiques

	EGFR	NRAS	KRAS	PTEN	PIK3CA	TP53	BRAF	IDH1	IDH2
Cas 13	H773_V774insNPH, L747_E749P/del, L858R	G12S, G12D, G12V	Q61H, G13D			R282W, R273C/S, R248Q/L, G245S/C, R249S, R248W, V157F			
Cas 15	H773_V774insNPH, L747_E749P/del, L858R	G12S/C	G12D/V			R248W, G245S/C, R249S			R140Q
Cas 18	L747_E749P/del, V769_D77insASV, H773_V774insNPH, L858R, G719S, T790M	G12V, G12D, G12S/C, Q61R	Q61H, G12A, G12D/V, G12C/S	R130*, R233*, P248fs*, K267fs*		R282W, R273C/S, R249S, R248Q/L, R248W, G245S/C, Y220C, R196*, V157F, Y163C, R273H/L			R140Q

C. Résultats du cas n°12 avec et sans microdissection

En première intention, le cas n°12 était analysé par la technique OncoScan™ FFPE sur un ADN issu de la macrodissection du bloc tumoral, en sélectionnant les zones les plus riches en cellules de Hodgkin et Reed Sternberg. Cette première analyse n'a permis de mettre en évidence aucune anomalie moléculaire significative.

En deuxième intention, ce même cas faisait l'objet d'une sélection des cellules tumorales par microdissection. Six lames immunomarquées par l'anticorps anti-CD30 étaient microdisséquées, permettant de recueillir une quantité exploitable d'ADN de 2,71ng/μL.

L'analyse moléculaire effectuée sur ce nouvel échantillon ADN a mis en évidence 19 mutations somatiques touchant les gènes *TP53*, *NRAS*, *KRAS*, *EGFR*.

Par ailleurs l'analyse a mis en évidence des gains de régions chromosomiques situées en 2p16 incluant *REL*, 3p, 3q, 4p, 7p, 7q, 8q, 12p13 incluant *ETV6/TEL*, 14q, 19q, ainsi que deux pertes des régions chromosomiques situées en 10q et 20p (Cf. annexe 8).

Ces anomalies n'étaient pas mises en évidence par la seule macrodissection, probablement à cause d'un trop faible pourcentage de cellules tumorales au sein de l'échantillon.

DISCUSSION

I. Méthodologie

A. Sélection des cas

Notre série comportait au total 18 patients dont les prélèvements ganglionnaires étaient exploitables pour l'étude moléculaire.

La répartition de ces patients entre les deux groupes n'était pas comparable et la majorité des cas étudiés appartenait au groupe de patients réfractaires.

Les patients du groupe réfractaire étaient pour certains des patients réfractaires primaires et pour d'autres des patients réfractaires après une ou deux lignes de traitement.

Une plus large série constituant des groupes comparables sera nécessaire afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur le plan moléculaire, et afin de comparer les données entre des sous-groupes pronostiques plus précis.

B. Choix du matériel à étudier

La fixation formolée de la plupart des échantillons tumoraux de patients dont on dispose d'un suivi clinique prolongé représente l'un des défis majeurs de l'étude moléculaire de ces tumeurs.

La technologie OncoScan™ FFPE est développée spécialement pour l'étude des échantillons fixés par le formol. Seulement 40 paires de bases constituent la cible de la sonde, permettant de s'affranchir des problèmes de dégradation et de fragmentation de l'ADN après fixation formolée.

Des études ont comparé la concordance des résultats de l'analyse des variations du nombre de copies d'un gène sur tissu congelé ou sur tissu formolé. Ces études rapportent un taux de concordance compris entre 92 et 99,99% (105–109).

Thompson *et al.* ont montré sur une série de cancers ovariens, que l'analyse de 89% des échantillons cryopréservés et 83% des échantillons formolés avait abouti à une analyse génomique interprétable (110).

Ces différentes données nous ont conduits à envisager de réaliser nos analyses moléculaires sur tissu formolé et inclus en paraffine. Cette méthode de conservation des échantillons représentait la meilleure solution quant à la quantité de matériel disponible.

C. Quantités d'ADN

1. Influence de la durée de conservation du bloc

Il n'a pas été montré de corrélation entre la durée de conservation du bloc et la quantité d'ADN extraite de ce bloc dans notre étude.

Cette donnée nous permettait d'envisager d'étudier l'ensemble des blocs de notre série, même ceux issus d'une conservation en paraffine depuis 2006.

2. Influence du nombre de cellules

Dans notre étude, nous avons évalué qu'environ 1000 cellules tumorales pouvaient être disséquées sur une lame.

Nous avons obtenu une concentration comprise entre 12 et 19 ng/ μ L pour l'extraction de l'ADN contenu dans 1000 cellules issues de prélèvements sanguins.

Cette quantité était obtenue sur cellules n'ayant subi ni la fixation formolée, ni la technique d'immunohistochimie, et donc représentait probablement une quantité d'ADN supérieure à celle pouvant être extraite de tissus formolés.

Le résultat de ce test nous permettait d'envisager de disséquer plusieurs lames par patient pour augmenter le nombre de cellules récupérées et pour augmenter cette quantité d'ADN.

3. Influence de l'épaisseur de coupe

Nous nous sommes intéressés à l'influence de l'épaisseur de la coupe montée sur la lame de membrane pour la microdissection sur la quantité d'ADN qui pouvait en être extraite.

Les résultats ont montré qu'en augmentant l'épaisseur de coupe de seulement 2 μ (en passant de 5 μ à 7 μ), nous pouvions améliorer de 73% jusqu'à 180% la quantité d'ADN extractible sur une lame.

Cette épaisseur de coupe de 7 μ ne gênait pas la réalisation de la microdissection laser en adaptant si besoin l'intensité du laser. C'est donc cette épaisseur qui a été retenue pour la préparation des lames du cas n°12.

4. Choix du kit d'extraction d'ADN

En suivant les recommandations du fournisseur QIAGEN®, le kit d'extraction DNA FFPE tissue kit a été utilisé pour extraire l'ADN des échantillons issus de la macrodissection et nécessitant un déparaffinage.

Compte tenu des quantités nulles d'ADN pour les premiers essais de microdissection, plusieurs kits d'extraction étaient testés :

- Kit extraction Qiagen QIAamp DNA FFPE tissue kit
- Kit extraction Qiagen QIAamp DNA minikit
- Kit extraction Qiagen QIAamp DNA microkit

La quantité d'ADN extraite était nulle quel que soit le kit d'extraction employé pour tous les échantillons issus de la microdissection d'une lame montée avec une coupe de 5 μ d'épaisseur. Le type de kit d'extraction ne semblait donc pas être responsable de la quantité nulle d'ADN obtenue.

Selon les recommandations du fournisseur QIAGEN®, le kit d'extraction DNA microkit a été utilisé pour extraire l'échantillon issu de la microdissection du cas n°12.

D. Choix de la méthode de recueil et de repérage des cellules tumorales

1. Microdissection

La microdissection était la méthode idéale choisie pour recueillir nos cellules tumorales dispersées dans un environnement lymphoïde riche. Cette méthode permettait d'obtenir un échantillon ADN ne représentant que l'ADN tumoral.

La mise au point de cette technique nous a amenés à choisir un mode de repérage simple des cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg.

Pour de nombreuses études, la coloration HES de routine apparaît suffisante pour identifier les cellules d'intérêt en vue de réaliser une microdissection laser. Néanmoins, celle-ci est inadéquate pour la sélection des cellules de Hodgkin car ces dernières sont dispersées au sein d'un tissu lymphoïde réactionnel riche.

La technique de microdissection ne permet pas d'apposer une lamelle au-dessus de la lame de membrane, ce qui impacte fortement la résolution optique.

La lamelle empêcherait toute action physique du laser sur le tissu. Sans lamelle, à fort grandissement, le tissu ainsi déshydraté s'obscurcit et les détails cellulaires ne sont plus perceptibles (111).

De ce fait, plusieurs méthodes ont été mises au point pour pallier à ce problème et sont décrites dans la littérature.

L'ajout d'un filtre de diffusion amovible permet de diffracter la lumière passant à travers le capuchon du tube de recueil. L'utilisation du filtre permet d'obtenir une image nette qui servira à définir la zone à microdisséquer sur l'écran.

Le dépôt d'une goutte de xylène sur la lame permet de fournir un bon indice de réfraction pour cibler la zone d'intérêt. Le xylène s'évapore rapidement avant l'action du laser sur le tissu.

Enfin des programmes informatiques développés pour la microdissection permettent à l'utilisateur de retranscrire l'image d'une lame classique sur l'écran d'ordinateur, et de s'en servir pour dessiner la zone d'intérêt qui sera ensuite disséquée par le laser sur la lame de membrane correspondante (111).

Plus simplement, cette limite de résolution optique sur lame colorée par l'HES standard peut être résolue par le recours au marquage cellulaire par immunohistochimie (112,113).

La précision de la microdissection et la surface minimum microdissécable sont limitées par la taille du faisceau laser. Lors de la dissection de cellules uniques, il est nécessaire de devoir disséquer aussi des cellules non tumorales adjacentes afin de ne pas risquer d'endommager la cellule d'intérêt par l'effet thermique du laser.

Cette limite est d'autant plus importante que la dissection de très petites surfaces (surface d'une cellule par exemple) occasionnait un recollement à distance de ces cellules sur la membrane qui ne tombaient pas dans le capuchon de recueil.

Aaltonen *et al.* estiment que le nombre de ces cellules perdues par phénomène de ré adhésion sur la membrane, associé au nombre de cellules non catapultées dans le tube recueil représente une perte d'environ 10% de l'échantillon (105,114).

Dans notre étude, la quantité d'ADN extraite d'une lame colorée par un HES standard était plus importante que sur une lame immunomarquée. Les quantités

obtenues après immunohistochimie ne représentaient plus qu'entre 34% à 56% des quantités obtenues après coloration standard.

Ce résultat est concordant avec les données de la littérature, puisque Eberle *et al.* avaient déjà mis en évidence cette baisse de quantité d'ADN en faisant la comparaison sur 75000 cellules microdisséquées par reconnaissance automatisée, extraites avant et après immunohistochimie (115). La quantité d'ADN obtenue après immunohistochimie ne représentait qu'entre 9% à 64% de la quantité obtenue après coloration standard.

Les auteurs suggèrent que la DAB utilisée durant la technique d'immunohistochimie interfère avec l'isolation et l'extraction de l'ADN.

Cette donnée a également été démontrée sur extraction d'ARN. Ainsi une diminution de 89% de la quantité d'ARN était observée après technique immunohistochimique en comparaison à une coloration standard (116).

2. Macrodissection

Parallèlement à ces essais en microdissection, nous avons jugé nécessaire de sélectionner différemment nos cellules d'intérêt pour pouvoir commencer l'analyse moléculaire de nos échantillons.

La plupart des cas étaient représentés par le sous-type scléro-nodulaire du lymphome de Hodgkin. La macrodissection d'une zone riche en nodules tumoraux était réalisable et permettait d'obtenir une concentration riche en cellules tumorales, évaluée à plus de 20%.

3. Microdissection du cas n°12

Secondairement, les étapes de tests de l'influence de l'épaisseur de coupe et du nombre de cellules sur la concentration en ADN nous ont amenés à réaliser la microdissection d'un cas à partir de 6 lames comportant une coupe de 7 μ d'épaisseur afin de majorer significativement le rendement de la technique.

La microdissection du cas n°12 après repérage immunohistochimique a ainsi permis d'obtenir une concentration finale en ADN de 2,71ng/ μ L.

Ce résultat est bien en dessous des concentrations rapportées par Eberle *et al.*, mais ces derniers utilisaient un logiciel de reconnaissance automatisé des cellules immunomarquées (AutoScan SoftWare Module), et obtenaient ainsi 75000 cellules par échantillon, et une concentration en ADN variant entre 45 et 135 ng/ μ L après repérage des cellules tumorales par immunohistochimie (115).

Les résultats de l'étude moléculaire effectuée sur ce cas n°12 ont montré toute l'utilité de la microdissection des cellules tumorales dans le lymphome de Hodgkin.

En effet, l'analyse moléculaire effectuée sur l'échantillon ADN issu de la macrodissection de ce cas n'a mis en évidence aucune anomalie moléculaire significative, alors que l'analyse moléculaire effectuée sur l'échantillon ADN issu de la microdissection a permis de mettre en évidence des gains et pertes de régions chromosomiques ainsi que plusieurs mutations somatiques (cf. annexe 8).

Ainsi, malgré une concentration d'ADN de 2,71ng/ μ L, la technique OncoScan™ a décelé un gain de la région 2p16 contenant *REL* et un gain de la région 12p13 contenant *TEL/ETV6*.

Cette différence de résultat est probablement dû à un manque de concentration en cellules tumorales dans l'échantillon issu de la macrodissection, dont l'ADN, dosé

à une concentration bien meilleure (183,26ng/μL) représentait en majorité des cellules non tumorales de l'environnement lymphoïde réactionnel.

II. Étude moléculaire

A. Gain de la région 9p24

Trois patients parmi les 13 patients réfractaires de notre série, soit 23%, comportaient un gain plus ou moins étendu de la région d'intérêt 9p21-24 située sur le bras court du chromosome 9.

Cette région contient notamment le gène *JAK2*, impliqué dans la voie de signalisation JAK/STAT (117).

Cette anomalie moléculaire est concordante avec les études précédentes qui ont montré un gain identique dans des séries de lymphome de Hodgkin mais à des fréquences différentes.

Steidl *et al.* ont mis en évidence le gain de cette région chez 40% des patients de leur série (118).

Joos *et al.* ont mis en évidence ce gain chez 1/3 de leurs patients, et ont également montré que ce gain était associé à une amplification du gène *JAK2* qu'ils ont étudié par FISH (119).

Renné *et al.* ont étudié l'expression de la protéine JAK2 dans une série de lymphome de Hodgkin. Chez 14 des 16 patients qui présentaient un gain du gène *JAK2*, la protéine JAK2 était exprimée dans la cellule et détectée par immunohistochimie. En revanche, 6 des 10 cas ne présentant pas d'amplification avaient aussi une expression de la protéine JAK2 augmentée. Ceci montre qu'outre l'amplification du gène, un autre mécanisme intervient dans le niveau d'expression de la protéine JAK2 (120).

Les gènes codant pour les ligands de PD-1 (PDL1 et PDL2) dénommés respectivement *CD274* et *PDCD1LG2* sont situés à proximité de *JAK2* dans la région 9p24.1. L'amplification de *JAK2* est fréquemment associée à une amplification de ces 2 gènes (88).

Deux des trois patients de notre série qui comportent un gain de *JAK2* ont aussi un gain de *CD274* et *PDCD1LG2*.

Green *et al.* ont mis en évidence que cette amplification de la région 9p24.1 avait une action directe sur les ligands de PD-1 puisque leurs gènes inducteurs *CD274* et *PDCD1LG2* étaient co-amplifiés, mais aussi une action indirecte puisque *JAK2* stimule la production des ligands de PD-1 (PDL1 et PDL2).

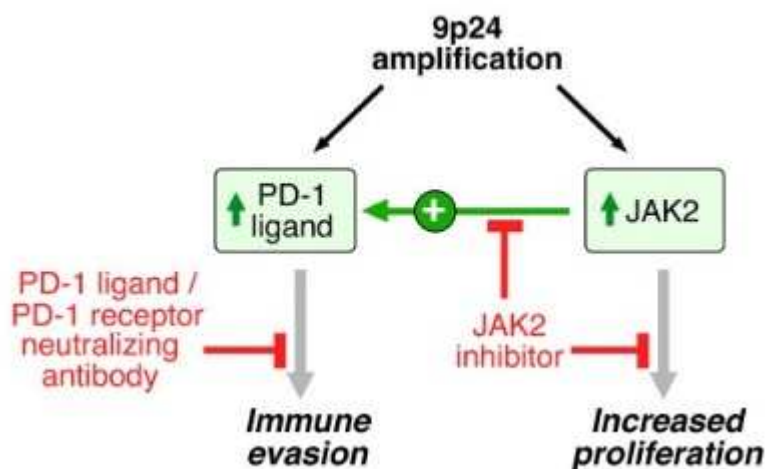


Figure 21 : Cibles de l'amplification de la région 9p24, conséquences, et options thérapeutiques.

Green MR *et al.* Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma, primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010;116(17):3268-77

La voie du PD-1 (programmed death 1) intervient dans l'extinction de l'activité immune médiée par les cellules T. En exprimant les ligands de PD1 à sa surface, la

cellule tumorale peut faire coopérer les cellules immunitaires qui comportent le récepteur PD-1 et ainsi s'affranchir de la réponse immune.

Green *et al.* ont aussi montré que les inhibiteurs de JAK2 avaient un effet accru sur l'activité de PDL1 dans les cellules qui avaient une amplification de la région 9p24.1.

En fonction de son amplification dans la cellule de Hodgkin, *JAK2* est donc une cible thérapeutique, seule ou en association avec des inhibiteurs de PD-1.

Une étude de phase 1 en cours a montré un taux de réponse objective à l'inhibiteur de PD-1 (nivolumab) de 87% chez des patients atteints du lymphome de Hodgkin classique (121,122).

Les patients de cette série, sélectionnés parce que réfractaires ou en rechute, ont tous une amplification de *PDL1* et *PDL2* mise en évidence par FISH, associée à l'expression plus élevée des protéines PDL1 et PDL2 que dans les lymphocytes de l'environnement tumoral.

L'incidence de cette amplification de *PDL1* et *PDL2* chez ces patients réfractaires est supérieure à celle rapportée dans des séries de patients atteints de lymphome de Hodgkin au stade du diagnostic (88,118). Cette donnée suggère que cette altération génomique pourrait avoir une implication pronostique défavorable (122).

B. Voie NF-kB

1. Gain de 2p16

Nous avons mis en évidence un gain de la région 2p16 pour deux patients du groupe réfractaire au traitement, impliquant le gène *REL*.

Le gène *REL* code pour la protéine proto-oncogène RELc, et est situé sur le bras court du chromosome 2 (2p16.1).

Les anomalies du nombre de copies de la région 2p13-16 ont été décrites comme récurrentes dans les cellules tumorales du lymphome de Hodgkin classique (119,123–126).

REL joue un rôle dans la régulation de la prolifération, de la maturation, de la différenciation et dans l'apoptose des lymphocytes B, en interagissant avec les autres membres de la famille NF-kB. En considérant que cette voie NF-kB est activée dans les cellules de Hodgkin (84), nous pouvons suggérer que le gain de nombre de copies du gène *REL* représente une voie d'activation de NF-kB dans la pathogénicité du lymphome de Hodgkin.

Barth *et al.* ont rapporté une corrélation parfaite entre le gain du nombre de copie du gène *REL* et l'expression nucléaire de la protéine c-REL dans leur série.

La fréquence de l'amplification de *REL* détectée dans le lymphome de Hodgkin suggère qu'il s'agirait d'un mécanisme alternatif d'activation de la voie NF-kB, par l'intermédiaire d'une expression accrue du gène *REL* (126).

Cette activité engendre une augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques comme CD40 et CD86 (127).

Il est intéressant de noter qu'un autre patient du groupe réfractaire comporte un gain de la région du bras court du chromosome 11 (11q12.3) comportant le gène *RELA* codant pour le facteur RelA (p65) qui fait partie du complexe NFκB.

Bargou *et al.* ont rapporté que l'activation constitutive du dimère p50-RelA (p50/p65) était caractéristique des cellules de Hodgkin (128). Les cellules tumorales possédaient une forte activité de RelA puisque 90% d'entre elles exprimaient RelA en immunohistochimie ou en hybridation in situ, alors que les cellules B de l'environnement ne l'exprimaient pas. Une telle activation constitutive de RelA, spécifiquement dans la cellule tumorale, suggère qu'il pourrait s'agir d'une caractéristique spécifique à cette pathologie et d'une cible thérapeutique (84).

2. Perte de 1p36

Deux patients de notre série présentaient une perte de la cytobande 1p36 impliquant la perte du gène *TNFRSF14*.

Les délétions ou les pertes d'hétérozygoties de la cytobande 1p36 sont fréquemment rapportées dans le lymphome folliculaire (129) ainsi que dans d'autres cancers (130). Steidl *et al.* ont rapporté dans leur série une fréquence relative de 0,13 pour cette perte de la cytobande 1p36 (118).

Cette région contient le gène *TNFRSF14* codant pour la protéine HVEM (Herpes Virus Entry Mediator), inhibiteur de la voie NF-κB dans les cellules B.

HVEM inhibe la voie NF-κB lorsqu'il se lie avec BTLA (B and T lymphocyte attenuator).

TNFRSF14 est un membre de la famille des récepteurs TNF et est capable d'inhiber la prolifération tumorale dans l'adénocarcinome (131), ainsi que d'induire l'apoptose

via Fas dans les lymphomes non hodgkiniens (132), suggérant un rôle de gène suppresseur de tumeur.

Il a d'ailleurs été rapporté, dans le lymphome folliculaire, que les mutations de *TNFRSF14*, avec ou sans délétion, étaient associées à un plus mauvais pronostic (129).

3. Gain de 12p13

Les cellules de Hodgkin et Reed Sternberg sont caractérisées par une dérégulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. La voie NF- κ B joue un rôle prépondérant dans cette dérégulation.

L'activation constitutive de la voie NF- κ B induit une augmentation de l'expression de la protéine Cycline D2 via STAT5a (83). En effet la voie NF- κ B interagit avec la voie JAK/STAT et augmente l'activité de STAT5a.

Bai *et al.* ont montré qu'il existait une surexpression de la protéine Cycline D2 dans 72% des cas de lymphome de Hodgkin qu'ils ont étudiés (133).

L'interaction entre Cycline D2 et STAT5a peut être expliquée par le fait que le promoteur de Cycline D2 contient un site de fixation pour STAT5a.

Aucune étude n'a mis en évidence de corrélation entre l'amplification du gène *CCND2* et la surexpression de la protéine Cycline D2 (134).

La surexpression de Cycline D2 pourrait néanmoins être un témoin de l'activation des voies de signalisation qui engendrent la prolifération des cellules de Hodgkin.

Dans notre étude, le gain de cette région 12p13 contenant *CCND2* soutient l'hypothèse d'un rôle de Cycline D2 dans la tumorigenèse du lymphome de Hodgkin.

La région 12p13 inclue également le gène *TEL/ETV6*, qui est fréquemment associé à des translocations avec de nombreux partenaires, comme *ABL* dans la leucémie aigüe myéloïde, *AML1* dans la leucémie aigüe lymphoblastique, ou *PDGFRB* dans la leucémie myélomonocytaire chronique (134).

Six patients de notre série présentaient une amplification de la région 12p13 incluant ce gène *TEL/ETV6*.

Il est intéressant de noter que deux patients du groupe réfractaire cumulaient un gain de la région 9p24 contenant *JAK2* avec un gain de la région 12p13 contenant *TEL/ETV6* (cas n°6 et 9).

Deux cas de fusion entre *TEL/ETV6* et *JAK2* par translocation t(9 ;12) ont été rapporté par Peeters *et al.* : un cas de leucémie aigüe lymphoblastique et un cas de leucémie myéloïde chronique (135). Ils proposent un modèle où le domaine de liaison à l'ADN de *TEL/ETV6* fournirait une interface de dimérisation pour *JAK2*, permettant son activation.

Il serait intéressant d'étudier dans ces deux cas de notre série si une translocation est présente de la même façon entre *TEL/ETV6* et *JAK2*, par étude FISH notamment.

C. Mutations somatiques

Les mutations de *TP53* sont généralement responsables de la transformation conformationnelle de la protéine p53 et de son accumulation dans la cellule.

Quelques études ont rapporté la présence de mutations du gène *TP53* dans les cellules de Hodgkin mais à une fréquence peu élevée (136,137). Le faible

pourcentage de mutation du gène *TP53* peut être dû à la paucité des cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg au sein des prélèvements étudiés, conduisant à de nombreux faux négatifs. En général, les taux de mutations de *TP53* les plus élevés étaient rapportés par les études utilisant des méthodes d'enrichissement en cellules tumorales (138).

Maggio *et al.* ont rapporté une fréquence de 11,5% de mutations de *TP53* dans leur série, et ont évoqué un rôle de ces mutations dans la résistance des cellules de Hodgkin à l'apoptose (139).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons rapporté l'analyse moléculaire d'une série de 18 patients atteints d'un lymphome de Hodgkin, répondeurs ou réfractaires au traitement.

L'analyse moléculaire par la technique OncoScan™ FFPE a permis de mettre en évidence des anomalies moléculaires concordantes avec les données de la littérature sur des échantillons issus de la macrodissection de prélèvements ganglionnaires fixés par le formol et inclus en paraffine.

Nous avons mis en évidence un gain de la région chromosomique 9p24 contenant le gène *JAK2* chez trois patients du groupe réfractaire.

Nous avons rapporté des anomalies du nombre de copies de gènes impliqués dans la voie de signalisation NF-κB, représentées par un gain de la région chromosomique 2p16 contenant le gène *REL*, un gain de la région 12p13 impliquant les gènes *CCND2* et *TEL/ETV6*, et une perte de la région chromosomique 1p36 impliquant le gène *TNFRSF14*.

Des mutations somatiques ont été mises en évidence dans les deux groupes, touchant les gènes *TP53*, *NRAS*, *KRAS*, *EGFR*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, *IDH1* et *IDH2*.

Notre étude a permis la mise au point de la technique de microdissection pour les échantillons conservés en paraffine et a souligné son intérêt pour la sélection des cellules tumorales dans le lymphome de Hodgkin. L'échantillon pour lequel la microdissection a abouti à une quantité d'ADN exploitable a révélé des anomalies moléculaires qui n'avaient pas été détectées avec la simple sélection des zones

tumorales par macrodissection, probablement à cause d'une trop faible concentration en cellules tumorales.

Les perspectives de ce travail sont de compléter l'étude par la recherche d'une surexpression de la protéine JAK2 par immunohistochimie, afin d'évaluer sa corrélation avec le gain du nombre de copies du gène *JAK2*.

Afin d'obtenir des différences statistiquement significatives entre les deux groupes pronostiques, la série devra être élargie à un plus grand nombre de patients, permettant l'établissement de sous-groupes pronostiques plus précis parmi les patients réfractaires.

La microdissection après repérage immunohistochimique des cellules CD30+ semble être la méthode de sélection des cellules tumorales la plus efficace et la plus précise pour l'étude moléculaire des lymphomes de Hodgkin. Néanmoins, sa réalisation est chronophage et son rendement pourrait être nettement amélioré par l'apport d'un logiciel de reconnaissance automatisée des cellules immunomarquées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Hodgkin T. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Medico-Chir Trans.* 1832;17:68-114.
2. Stone MJ. Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist. *Proc Bayl Univ Med Cent.* oct 2005;18(4):368-75.
3. Küppers R. Clonotypic B cells in classic Hodgkin lymphoma. *Blood.* 29 oct 2009;114(18):3970-1; author reply 3971-2.
4. HAS. Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Lymphome de Hodgkin classique de l'adulte. Guide de parcours de soin; 2013.
5. Institut national du Cancer. Comprendre le lymphome hodgkinien [Internet]. 2015 [cité 28 mars 2015]. Disponible sur: http://www.e-cancer.fr/component/docman/doc_download/13187-comprendre-le-lyphome-hodgkinien
6. Armstrong AA, Alexander FE, Cartwright R, Angus B, Krajewski AS, Wright DH, et al. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: further evidence for the three disease hypothesis. *Leukemia.* août 1998;12(8):1272-6.
7. Punnett A, Tsang RW, Hodgson DC. Hodgkin lymphoma across the age spectrum: epidemiology, therapy, and late effects. *Semin Radiat Oncol.* janv 2010;20(1):30-44.
8. Hjalgrim H, Engels EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med.* déc 2008;264(6):537-48.
9. Shenoy P, Maggioncalda A, Malik N, Flowers CR. Incidence patterns and outcomes for hodgkin lymphoma patients in the United States. *Adv Hematol.* 2011;2011:725219.
10. Correa P, O'Connor GT. Epidemiologic patterns of Hodgkin's disease. *Int J Cancer J Int Cancer.* 15 sept 1971;8(2):192-201.
11. Institut national du Cancer. *Survie attendue des patients atteints de cancers en France : état des lieux.* 2010.
12. Leoncini L, Spina D, Nyong'o A, Abinya O, Minacci C, Disanto A, et al. Neoplastic cells of Hodgkin's disease show differences in EBV expression between Kenya and Italy. *Int J Cancer J Int Cancer.* 15 mars 1996;65(6):781-4.

13. Levine PH, Pallesen G, Ebbesen P, Harris N, Evans AS, Müller N. Evaluation of Epstein-Barr virus antibody patterns and detection of viral markers in the biopsies of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1 oct 1994;59(1):48-50.
14. Herbst H, Pallesen G, Weiss LM, Delsol G, Jarrett RF, Steinbrecher E, et al. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. sept 1992;3 Suppl 4:27-30.
15. Carbone A, Gloghini A, Serraino D, Spina M. HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Curr Opin HIV AIDS*. janv 2009;4(1):3-10.
16. Bierman PJ, Vose JM, Langnas AN, Rifkin RM, Hauke RJ, Smir BN, et al. Hodgkin's disease following solid organ transplantation. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. mars 1996;7(3):265-70.
17. Teillet F, Weisgerber C, Desprez-Curely JP, Bousquet R, Boiron M, Bernard J. [The spread of Hodgkin's disease. Clinical study]. *Bull Cancer (Paris)*. mars 1971;58(1):45-56.
18. Partridge S, Timothy A, O'Doherty MJ, Hain SF, Rankin S, Mikhaeel G. 2-Fluorine-18-fluoro-2-deoxy-D glucose positron emission tomography in the pretreatment staging of Hodgkin's disease: influence on patient management in a single institution. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. oct 2000;11(10):1273-9.
19. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res*. nov 1971;31(11):1860-1.
20. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. nov 1989;7(11):1630-6.
21. Desser RK, Golomb HM, Ultmann JE, Ferguson DJ, Moran EM, Griem ML, et al. Prognostic classification of Hodgkin disease in pathologic stage III, based on anatomic considerations. *Blood*. juin 1977;49(6):883-93.
22. Cosset JM, Henry-Amar M, Meerwaldt JH, Carde P, Noordijk EM, Thomas J, et al. The EORTC trials for limited stage Hodgkin's disease. The EORTC Lymphoma Cooperative Group. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 1992;28A(11):1847-50.
23. Tubiana M, Henry-Amar M, Carde P, Burgers JM, Hayat M, Van der Schueren E, et al. Toward comprehensive management tailored to prognostic factors of patients with clinical stages I and II in Hodgkin's disease. The EORTC Lymphoma Group controlled clinical trials: 1964-1987. *Blood*. janv 1989;73(1):47-56.
24. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*. 19 nov 1998;339(21):1506-14.

25. Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, Nissen N, Cooper MR, Henderson ES, et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med.* 19 nov 1992;327(21):1478-84.
26. Canellos GP, Rosenberg SA, Friedberg JW, Lister TA, Devita VT. Treatment of Hodgkin lymphoma: a 50-year perspective. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 janv 2014;32(3):163-8.
27. Canellos GP, Anderson JR, Propert KJ, Nissen N, Cooper MR, Henderson ES, et al. Chemotherapy of advanced Hodgkin's disease with MOPP, ABVD, or MOPP alternating with ABVD. *N Engl J Med.* 19 nov 1992;327(21):1478-84.
28. Brenner H, Gondos A, Pulte D. Ongoing improvement in long-term survival of patients with Hodgkin disease at all ages and recent catch-up of older patients. *Blood.* 15 mars 2008;111(6):2977-83.
29. Lohri A, Barnett M, Fairey RN, O'Reilly SE, Phillips GL, Reece D, et al. Outcome of treatment of first relapse of Hodgkin's disease after primary chemotherapy: identification of risk factors from the British Columbia experience 1970 to 1988. *Blood.* 15 mai 1991;77(10):2292-8.
30. Bonadonna G, Viviani S, Bonfante V, Gianni AM, Valagussa P. Survival in Hodgkin's disease patients--report of 25 years of experience at the Milan Cancer Institute. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. mai 2005;41(7):998-1006.
31. Josting A, Rueffer U, Franklin J, Sieber M, Diehl V, Engert A. Prognostic factors and treatment outcome in primary progressive Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood.* 15 août 2000;96(4):1280-6.
32. Moskowitz CH, Nimer SD, Zelenetz AD, Trippett T, Hedrick EE, Filippa DA, et al. A 2-step comprehensive high-dose chemoradiotherapy second-line program for relapsed and refractory Hodgkin disease: analysis by intent to treat and development of a prognostic model. *Blood.* 1 févr 2001;97(3):616-23.
33. Martín A, Fernández-Jiménez MC, Caballero MD, Canales MA, Pérez-Simón JA, García de Bustos J, et al. Long-term follow-up in patients treated with Mini-BEAM as salvage therapy for relapsed or refractory Hodgkin's disease. *Br J Haematol.* avr 2001;113(1):161-71.
34. Colpo A, Hochberg E, Chen Y-B. Current status of autologous stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma. *The Oncologist.* 2012;17(1):80-90.
35. Majhail NS, Weisdorf DJ, Defor TE, Miller JS, McGlave PB, Slungaard A, et al. Long-term results of autologous stem cell transplantation for primary refractory or relapsed Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* oct 2006;12(10):1065-72.
36. André M, Henry-Amar M, Pico JL, Brice P, Blaise D, Kuentz M, et al. Comparison of high-dose therapy and autologous stem-cell transplantation with

- conventional therapy for Hodgkin's disease induction failure: a case-control study. Société Française de Greffe de Moelle. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. janv 1999;17(1):222-9.
37. Coman T. Lymphome de Hodgkin réfractaire ou en rechute: quels traitements pour quels malades? *Hématologie*. 2010;16(3):244-52.
 38. Morschhauser F, Brice P, Fermé C, Diviné M, Salles G, Bouabdallah R, et al. Risk-adapted salvage treatment with single or tandem autologous stem-cell transplantation for first relapse/refractory Hodgkin's lymphoma: results of the prospective multicenter H96 trial by the GELA/SFGM study group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 déc 2008;26(36):5980-7.
 39. Gobbi PG, Ferreri AJM, Ponzoni M, Levis A. Hodgkin lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. févr 2013;85(2):216-37.
 40. Anderlini P, Saliba R, Acholonu S, Okoroji G-J, Donato M, Giralt S, et al. Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin's disease: low transplant-related mortality and impact of intensity of conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant*. mai 2005;35(10):943-51.
 41. Sureda A, Schmitz N, Canals C. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation after a reduced conditioning regimen in refractory or relapsed Hodgkin Lymphoma. *Leukemia and Lymphoma*. 2002;75-8 suppl 2.
 42. Vassilakopoulos TP, Angelopoulou MK. Advanced and relapsed/refractory Hodgkin lymphoma: what has been achieved during the last 50 years. *Semin Hematol*. janv 2013;50(1):4-14.
 43. Falini B, Pileri S, Pizzolo G, Dürkop H, Flenghi L, Stirpe F, et al. CD30 (Ki-1) molecule: a new cytokine receptor of the tumor necrosis factor receptor superfamily as a tool for diagnosis and immunotherapy. *Blood*. 1 janv 1995;85(1):1-14.
 44. Siddiqi T, Thomas SH, Chen R. Role of brentuximab vedotin in the treatment of relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2014;7:79-85.
 45. Younes A, Gopal AK, Smith SE, Ansell SM, Rosenblatt JD, Savage KJ, et al. Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 juin 2012;30(18):2183-9.
 46. Von Tresckow B, Diehl V. An update on emerging drugs for Hodgkin lymphoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. juin 2014;19(2):215-24.
 47. Küppers R. New insights in the biology of Hodgkin lymphoma. *ASH Educ Program Book*. 2012;2012(1):328-34.
 48. Diaz T, Navarro A, Ferrer G, Gel B, Gaya A, Artells R, et al. Lestaurtinib inhibition of the Jak/STAT signaling pathway in hodgkin lymphoma inhibits

- proliferation and induces apoptosis. *PLoS One*. 2011;6(4):e18856.
49. Younes A, Romaguera J, Fanale M, McLaughlin P, Hagemester F, Copeland A, et al. Phase I study of a novel oral Janus kinase 2 inhibitor, SB1518, in patients with relapsed lymphoma: evidence of clinical and biologic activity in multiple lymphoma subtypes. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 nov 2012;30(33):4161-7.
 50. Casasnovas R-O, Mounier N, Brice P, Divine M, Morschhauser F, Gabarre J, et al. Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 mai 2007;25(13):1732-40.
 51. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 juin 2002;99(12):4283-97.
 52. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, Sakai T, Hishizawa M, Tashima M, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 mars 2008;111(6):3220-4.
 53. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, Rodig SJ, Takeyama K, Abramson J, et al. The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 août 2007;104(32):13134-9.
 54. Baumforth KRN, Birgersdotter A, Reynolds GM, Wei W, Kapatai G, Flavell JR, et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol*. juill 2008;173(1):195-204.
 55. Teichmann M, Meyer B, Beck A, Niedobitek G. Expression of the interferon-inducible chemokine IP-10 (CXCL10), a chemokine with proposed anti-neoplastic functions, in Hodgkin lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol*. mai 2005;206(1):68-75.
 56. Kanakry JA, Li H, Gellert LL, Lemas MV, Hsieh W, Hong F, et al. Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American cooperative group trial. *Blood*. 2 mai 2013;121(18):3547-53.
 57. Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. *Am J Clin Pathol*. déc 2007;128(6):958-65.
 58. Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Stamatoullas A, Picquenot JM, et al. Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*. 23 janv 2009;113(12):2765-3775.

59. Greaves P, Clear A, Coutinho R, Wilson A, Matthews J, Owen A, et al. Expression of FOXP3, CD68, and CD20 at diagnosis in the microenvironment of classical Hodgkin lymphoma is predictive of outcome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 janv 2013;31(2):256-62.
60. Scott DW, Steidl C. The classical Hodgkin lymphoma tumor microenvironment: macrophages and gene expression-based modeling. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 5 déc 2014;2014(1):144-50.
61. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. 2008.
62. Bai M, Panoulas V, Papoudou-Bai A, Horianopoulos N, Kitsoulis P, Stefanaki K, et al. B-cell differentiation immunophenotypes in classical Hodgkin lymphomas. *Leuk Lymphoma*. mars 2006;47(3):495-501.
63. Jaffe ES, Vardiman J, Campo E, Harris NL, Arber DA. *Hematopathology*. ELSEVIER. 2011.
64. Clarke CA, Glaser SL, Keegan THM, Stroup A. Neighborhood socioeconomic status and Hodgkin's lymphoma incidence in California. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. juin 2005;14(6):1441-7.
65. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS. Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood*. 1 janv 2006;107(1):265-76.
66. Glimelius I, Molin D, Amini R-M, Gustavsson A, Glimelius B, Enblad G. Bulky disease is the most important prognostic factor in Hodgkin lymphoma stage IIB. *Eur J Haematol*. nov 2003;71(5):327-33.
67. Allemani C, Sant M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Coebergh JW, EURO CARE Working Group. Hodgkin disease survival in Europe and the U.S.: prognostic significance of morphologic groups. *Cancer*. 15 juill 2006;107(2):352-60.
68. Twa DDW, Steidl C. Structural genomic alterations in primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 21 janv 2015;1-12.
69. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, Harris M, Harris NL, Jaffe ES, et al. European Task Force on Lymphoma project on lymphocyte predominance Hodgkin disease: histologic and immunohistologic analysis of submitted cases reveals 2 types of Hodgkin disease with a nodular growth pattern and abundant lymphocytes. *Blood*. 1 sept 2000;96(5):1889-99.
70. Shimabukuro-Vornhagen A, Haverkamp H, Engert A, Balleisen L, Majunke P, Heil G, et al. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: clinical presentation and treatment outcome in 100 patients treated within German Hodgkin's Study Group trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 août 2005;23(24):5739-45.

71. Kant JA, Hubbard SM, Longo DL, Simon RM, DeVita VT, Jaffe ES. The pathologic and clinical heterogeneity of lymphocyte-depleted Hodgkin's disease. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. mars 1986;4(3):284-94.
72. Küppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*. 15 déc 1993;12(13):4955-67.
73. Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 nov 1994;91(23):10962-6.
74. Stein H, Marafioti T, Foss HD, Laumen H, Hummel M, Anagnostopoulos I, et al. Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*. 15 janv 2001;97(2):496-501.
75. Küppers R, Sousa AB, Baur AS, Strickler JG, Rajewsky K, Hansmann ML. Common germinal-center B-cell origin of the malignant cells in two composite lymphomas, involving classical Hodgkin's disease and either follicular lymphoma or B-CLL. *Mol Med Camb Mass*. mai 2001;7(5):285-92.
76. Vockerodt M, Soares M, Kanzler H, Küppers R, Kube D, Hansmann ML, et al. Detection of clonal Hodgkin and Reed-Sternberg cells with identical somatically mutated and rearranged VH genes in different biopsies in relapsed Hodgkin's disease. *Blood*. 15 oct 1998;92(8):2899-907.
77. Schouten HC, Sanger WG, Duggan M, Weisenburger DD, MacLennan KA, Armitage JO. Chromosomal abnormalities in Hodgkin's disease. *Blood*. juin 1989;73(8):2149-54.
78. Deerberg-Wittram J, Weber-Matthiesen K, Schlegelberger B. Cytogenetics and molecular cytogenetics in Hodgkin's disease. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 1996;7 Suppl 4:49-53.
79. Atkin NB. Cytogenetics of Hodgkin's disease. *Cytogenet Cell Genet*. 1998;80(1-4):23-7.
80. Weber-Matthiesen K, Deerberg J, Poetsch M, Grote W, Schlegelberger B. Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood*. 15 août 1995;86(4):1464-8.
81. Cabanillas F. A review and interpretation of cytogenetic abnormalities identified in Hodgkin's disease. *Hematol Oncol*. sept 1988;6(3):271-4.
82. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 30 oct 2006;25(51):6831-43.

83. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, Hacker C, Krappmann D, Mathas S, et al. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med*. 2 sept 2002;196(5):605-17.
84. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W, et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*. 15 déc 1997;100(12):2961-9.
85. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*. janv 2009;9(1):15-27.
86. Schmitz R, Stanelle J, Hansmann M-L, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:151-74.
87. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci*. 15 mars 2004;117(Pt 8):1281-3.
88. Green MR, Monti S, Rodig SJ, Juszczynski P, Currie T, O'Donnell E, et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 28 oct 2010;116(17):3268-77.
89. Meier C, Hoeller S, Bourgau C, Hirschmann P, Schwaller J, Went P, et al. Recurrent numerical aberrations of JAK2 and deregulation of the JAK2-STAT cascade in lymphomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. mars 2009;22(3):476-87.
90. Van Roosbroeck K, Cox L, Tousseyn T, Lahortiga I, Gielen O, Cauwelier B, et al. JAK2 rearrangements, including the novel SEC31A-JAK2 fusion, are recurrent in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 14 avr 2011;117(15):4056-64.
91. Melzner I, Weniger MA, Menz CK, Möller P. Absence of the JAK2 V617F activating mutation in classical Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia*. janv 2006;20(1):157-8.
92. Weniger MA, Melzner I, Menz CK, Wegener S, Bucur AJ, Dorsch K, et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 27 avr 2006;25(18):2679-84.
93. Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, Behrmann I, et al. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*. 1 août 2001;98(3):762-70.
94. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, Patterson B, Trumper L, Kapp U, et al. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 janv 2002;99(2):618-26.

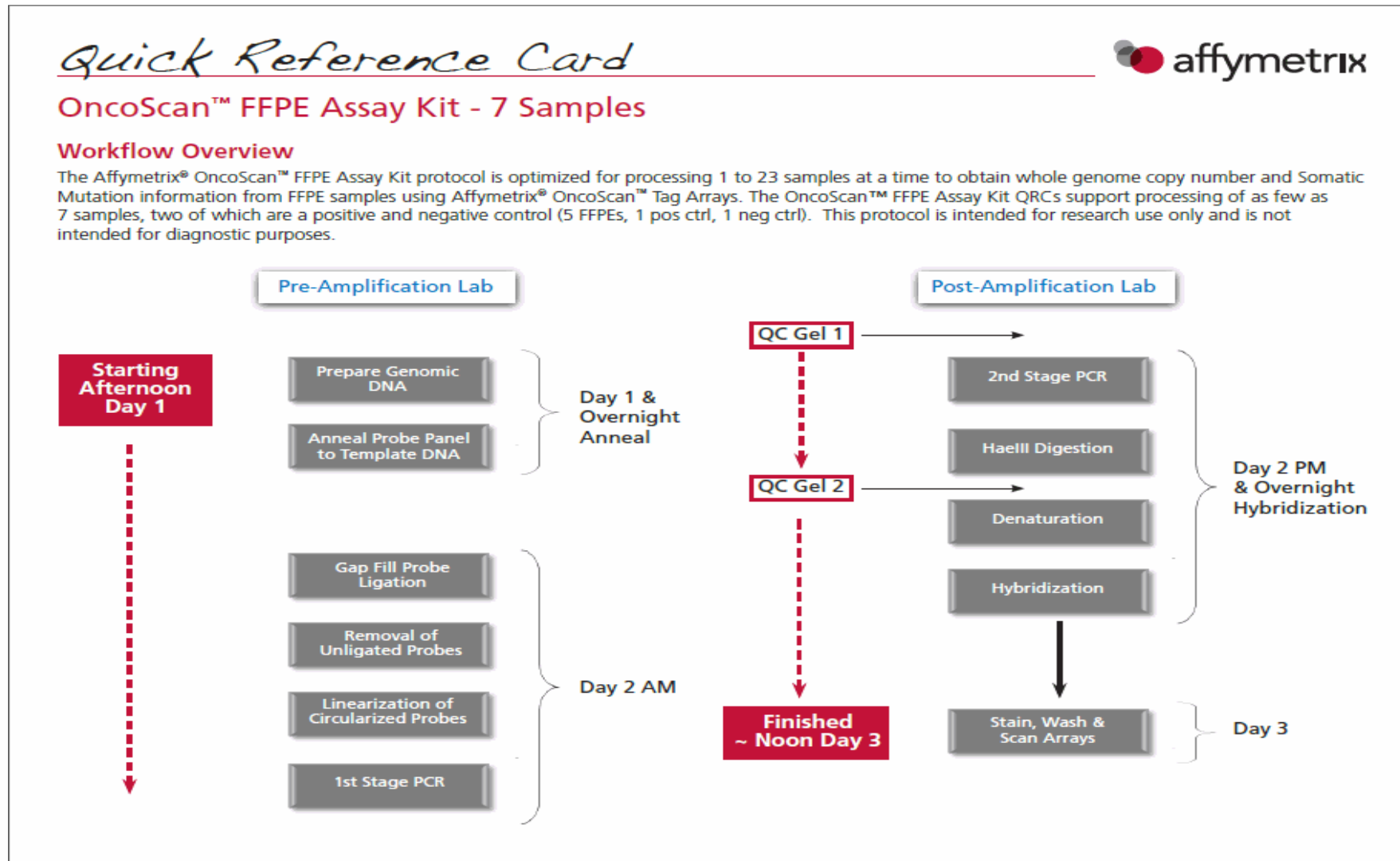
95. Kleppe M, Tousseyn T, Geissinger E, Kalender Atak Z, Aerts S, Rosenwald A, et al. Mutation analysis of the tyrosine phosphatase PTPN2 in Hodgkin's lymphoma and T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. nov 2011;96(11):1723-7.
96. Hao Y, Chapuy B, Monti S, Sun HH, Rodig SJ, Shipp MA. Selective JAK2 inhibition specifically decreases Hodgkin lymphoma and mediastinal large B-cell lymphoma growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mai 2014;20(10):2674-83.
97. Gilbert MTP, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, et al. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues-which methods are useful when? *PloS One*. 2007;2(6):e537.
98. Bonin S, Petrera F, Niccolini B, Stanta G. PCR analysis in archival postmortem tissues. *Mol Pathol MP*. juin 2003;56(3):184-6.
99. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. déc 2002;161(6):1961-71.
100. Sjöholm MIL, Hoffmann G, Lindgren S, Dillner J, Carlson J. Comparison of archival plasma and formalin-fixed paraffin-embedded tissue for genotyping in hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. janv 2005;14(1):251-5.
101. Blow N. Tissue preparation: Tissue issues. *Nature*. 23 août 2007;448(7156):959-63.
102. Pinard R, de Winter A, Sarkis GJ, Gerstein MB, Tartaro KR, Plant RN, et al. Assessment of whole genome amplification-induced bias through high-throughput, massively parallel whole genome sequencing. *BMC Genomics*. 2006;7:216.
103. Bøyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. juin 1976;Suppl 5:9-15.
104. Blotta I, Prestinaci F, Mirante S, Cantafora A. Quantitative assay of total dsDNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent detection. *Ann Dellstituto Super Sanità*. 2005;41(1):119-23.
105. Wang W-Z, Oeschger FM, Lee S, Molnár Z. High quality RNA from multiple brain regions simultaneously acquired by laser capture microdissection. *BMC Mol Biol*. 2009;10:69.
106. Tuefferd M, De Bondt A, Van Den Wyngaert I, Talloen W, Verbeke T, Carvalho B, et al. Genome-wide copy number alterations detection in fresh frozen and matched FFPE samples using SNP 6.0 arrays. *Genes Chromosomes Cancer*. nov 2008;47(11):957-64.
107. Lyons-Weiler M, Hagenkord J, Sciulli C, Dhir R, Monzon FA. Optimization of the Affymetrix GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay for routine clinical use on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B*. mars

- 2008;17(1):3-13.
108. Lips EH, Dierssen JWF, van Eijk R, Oosting J, Eilers PHC, Tollenaar RAEM, et al. Reliable high-throughput genotyping and loss-of-heterozygosity detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumors using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res.* 15 nov 2005;65(22):10188-91.
109. Jacobs S, Thompson ER, Nannya Y, Yamamoto G, Pillai R, Ogawa S, et al. Genome-wide, high-resolution detection of copy number, loss of heterozygosity, and genotypes from formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue using microarrays. *Cancer Res.* 15 mars 2007;67(6):2544-51.
110. Thompson ER, Herbert SC, Forrest SM, Campbell IG. Whole genome SNP arrays using DNA derived from formalin-fixed, paraffin-embedded ovarian tumor tissue. *Hum Mutat.* oct 2005;26(4):384-9.
111. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet TIG.* juill 1998;14(7):272-6.
112. Fend F, Quintanilla-Martinez L, Kumar S, Beaty MW, Blum L, Sorbara L, et al. Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclonal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *Am J Pathol.* juin 1999;154(6):1857-66.
113. Fend F, Emmert-Buck MR, Chuaqui R, Cole K, Lee J, Liotta LA, et al. Immun-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am J Pathol.* janv 1999;154(1):61-6.
114. Aaltonen KE, Ebbesson A, Wigerup C, Hedenfalk I. Laser capture microdissection (LCM) and whole genome amplification (WGA) of DNA from normal breast tissue --- optimization for genome wide array analyses. *BMC Res Notes.* 2011;4:69.
115. Eberle FC, Hanson JC, Killian JK, Wei L, Ylaya K, Hewitt SM, et al. Immunoguided laser assisted microdissection techniques for DNA methylation analysis of archival tissue specimens. *J Mol Diagn JMD.* juill 2010;12(4):394-401.
116. Gjerdrum LM, Abrahamsen HN, Villegas B, Sorensen BS, Schmidt H, Hamilton-Dutoit SJ. The influence of immunohistochemistry on mRNA recovery from microdissected frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B.* déc 2004;13(4):224-33.
117. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet TIG.* févr 1995;11(2):69-74.
118. Steidl C, Telenius A, Shah SP, Farinha P, Barclay L, Boyle M, et al. Genome-wide copy number analysis of Hodgkin Reed-Sternberg cells identifies recurrent imbalances with correlations to treatment outcome. *Blood.* 22 juill 2010;116(3):418-27.

119. Joos S, Küpper M, Ohl S, von Bonin F, Mechttersheimer G, Bentz M, et al. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res.* 1 févr 2000;60(3):549-52.
120. Renné C, Willenbrock K, Martin-Subero JI, Hinsch N, Döring C, Tiacci E, et al. High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* avr 2007;21(4):780-7.
121. PD-1 Inhibitors Effective in Hodgkin Lymphoma. *Cancer Discov.* févr 2015;5(2):102-3.
122. Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 22 janv 2015;372(4):311-9.
123. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, Siebert R, Harder L, Martín-Subero JI, et al. Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer J Int Cancer.* 10 févr 2003;103(4):489-95.
124. Joos S, Menz CK, Wrobel G, Siebert R, Gesk S, Ohl S, et al. Classical Hodgkin lymphoma is characterized by recurrent copy number gains of the short arm of chromosome 2. *Blood.* 15 févr 2002;99(4):1381-7.
125. Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 15 févr 2002;99(4):1474-7.
126. Barth TFE, Martin-Subero JI, Joos S, Menz CK, Hasel C, Mechttersheimer G, et al. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 1 mai 2003;101(9):3681-6.
127. Hinz M, Löser P, Mathas S, Krappmann D, Dörken B, Scheidereit C. Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood.* 1 mai 2001;97(9):2798-807.
128. Bargou RC, Leng C, Krappmann D, Emmerich F, Mapara MY, Bommert K, et al. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood.* 15 mai 1996;87(10):4340-7.
129. Cheung K-JJ, Shah SP, Steidl C, Johnson N, Relander T, Telenius A, et al. Genome-wide profiling of follicular lymphoma by array comparative genomic hybridization reveals prognostically significant DNA copy number imbalances. *Blood.* 1 janv 2009;113(1):137-48.
130. Zahn S, Sievers S, Alemazkour K, Orb S, Harms D, Schulz WA, et al. Imbalances of chromosome arm 1p in pediatric and adult germ cell tumors are caused by true allelic loss: a combined comparative genomic hybridization and

- microsatellite analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. nov 2006;45(11):995-1006.
131. Harrop JA, McDonnell PC, Brigham-Burke M, Lyn SD, Minton J, Tan KB, et al. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *J Biol Chem*. 16 oct 1998;273(42):27548-56.
132. Costello RT, Mallet F, Barbarat B, Schiano De Colella J-M, Sainty D, Sweet RW, et al. Stimulation of non-Hodgkin's lymphoma via HVEM: an alternate and safe way to increase Fas-induced apoptosis and improve tumor immunogenicity. *Leukemia*. déc 2003;17(12):2500-7.
133. Bai M, Tsanou E, Agnantis NJ, Kamina S, Grepic C, Stefanaki K, et al. Proliferation profile of classical Hodgkin's lymphomas. Increased expression of the protein cyclin D2 in Hodgkin's and Reed-Sternberg cells. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. nov 2004;17(11):1338-45.
134. Höglund M, Johansson B, Pedersen-Bjergaard J, Marynen P, Mitelman F. Molecular characterization of 12p abnormalities in hematologic malignancies: deletion of KIP1, rearrangement of TEL, and amplification of CCND2. *Blood*. 1 janv 1996;87(1):324-30.
135. Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, et al. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*. 1 oct 1997;90(7):2535-40.
136. Xerri L, Parc P, Bouabdallah R, Camerlo J, Hassoun J. PCR-mismatch analysis of p53 gene mutation in Hodgkin's disease. *J Pathol*. févr 1995;175(2):189-94.
137. Chen WG, Chen YY, Kamel OW, Koo CH, Weiss LM. p53 mutations in Hodgkin's disease. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. oct 1996;75(4):519-27.
138. Gupta RK, Patel K, Bodmer WF, Bodmer JG. Mutation of p53 in primary biopsy material and cell lines from Hodgkin disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 avr 1993;90(7):2817-21.
139. Maggio EM, Stekelenburg E, Van den Berg A, Poppema S. TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. *Int J Cancer J Int Cancer*. 1 oct 2001;94(1):60-6.

Annexe 1 : Protocole OncoScan™ FFPE



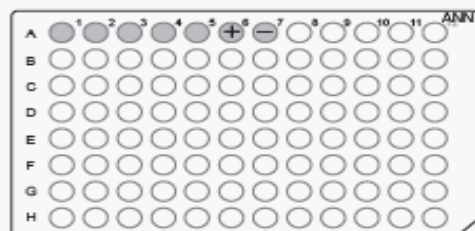
OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

General Procedures

- Vortex plate after reagent addition: Always vortex plates at max speed for 5 seconds using 5-point plate vortexing.
- Spin down plate after reagent addition: Always spin at 2400 rpm for 1 min.
- Spin down plate after 1 min chill step: Always spin at 2400 rpm for 30 sec.
- Vortex enzymes: Always vortex for 1 second at max speed.
- Spin down enzymes: Quick spin down.
- Vortex Master Mix tubes: Vortex at max speed for 3 seconds.
- Spin down Master Mixes: Quick spin down.
- Plate handling before reagent addition: Reagents are always added to chilled plates. Chill the plate on a cold block for 1 min, then spin down at 2400 rpm for 60 sec.
- When pipetting, always pipette up and down 3 times to rinse the tips.
- When removing enzymes from the $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezer, use a cooler to transfer the tube to and from the bench.
- Always remove plate seals slowly and carefully as to not introduce any cross contamination from well-to-well.
- Ensure both plates are at the correct orientation (well A1 at the top left position) during plate-to-plate transfers.
- Program all of the thermal cyclers programs in “9700 Max mode” setting.

Sample Plate (Pre-Amp)

1. Add 6.6 μL FFPE gDNA at 12 ng/ μL to wells marked 1 through 5 in the plate diagram.
2. Add 6.6 μL of the positive control from the OncoScan FFPE Assay Kit to well marked 6.
3. Add 6.6 μL of TE (negative control) to the well marked 7 in the plate diagram.
4. Seal, vortex and spin the plate. Place plate on cold block if continuing assay. Otherwise freeze at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

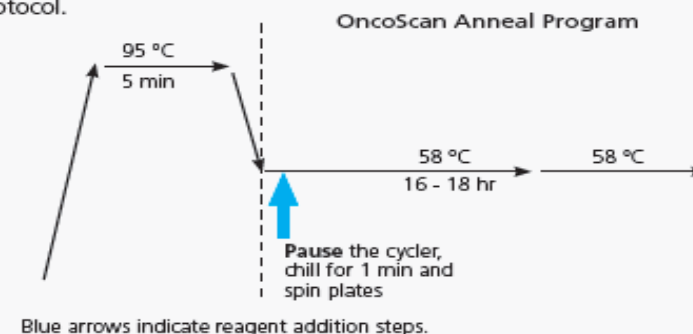


Stage 1 – Anneal (Pre-Amp)

1. Turn on the thermal cycler.
2. Thaw reagents listed in the table at room temperature.
3. Once thawed, vortex, spin down and place on ice.
4. Label a 1.5 mL Eppendorf tube as *Ann* and place on ice.
5. Place 7-tube strip in cold block.
6. To the *Ann* tube, add the reagents listed in the table below.

Reagent	1 Reaction	7 Reactions (~60% coverage)
Buffer A	1.53 μL	17.1 μL
Copy Number Probe Mix 1.0	1.37 μL	15.3 μL
Somatic Mutation Mix 1.0	0.5 μL	5.6 μL
Total Volume	3.40 μL	38.1 μL
Volume per Tube for Tube Strip		5.0 μL 7-Tube Strip

7. Vortex and spin down ANN Master Mix.
8. Aliquot 5.0 μL of ANN Master Mix to each strip tube.
9. Transfer 3.4 μL of ANN Master Mix from the strip tube to wells 1-7. Pipet up and down 3X.
10. Seal, vortex, and spin plate.
11. Place the plate on the thermal cycler and start the *OncoScan Anneal* program.
12. After 6 minutes, **Pause** the program at $58\text{ }^{\circ}\text{C}$.
13. Remove the plate and place on a chilled cold block for 1 minute.
14. Spin down the plate. Place plate back on the thermal cycler and **Resume** the protocol.



Blue arrows indicate reagent addition steps.

OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

Stage 2 — Gap Fill Through 1st PCR (Pre-Amp)

Thaw Buffer A, dNTPs (AT and GC) Cleavage Buffer, Water and PCR Buffer at room temperature. Vortex, Spin down and keep on ice.

Prepare the AT Mix and GC Mix: Always Make 24-Reaction Master Mix

1. Label two 1.5 mL Eppendorf tubes, one **AT** in **blue** and the other **GC** in **red**. Place on ice.
2. Place two 7-tube strips in a cold block, label one **AT** in **blue**, the other **GC** in **red**.
3. To the AT tube, add the reagents listed in the table below. Pipet 3X. Vortex, spin, place on ice.

Reagent	1 Reaction	7 Reactions (~20% overage)
Water	3.93 µL	113 µL
dNTPs (A/T)	0.07 µL	2.1 µL
Total Volume	4.0 µL	115 µL
Volume per Tube for Tube Strip		9.6 µL 7-Tube Strip

4. Aliquot 9.6 µL of the AT Mix to each tube in the strip.
5. Spin down the strip and keep in cold block.
6. Change gloves.
7. Repeat steps 3-5 above for the GC dNTPs.

Reagent	1 Reaction	7 Reactions (~20% overage)
Water	3.93 µL	113 µL
dNTPs (G/C)	0.07 µL	2.1 µL
Total Volume	4.0 µL	115 µL
Volume per Tube for Tube Strip		9.6 µL 7-Tube Strip

8. Change gloves again after completing the GC Master Mix.

Prepare the GAP Fill Mix

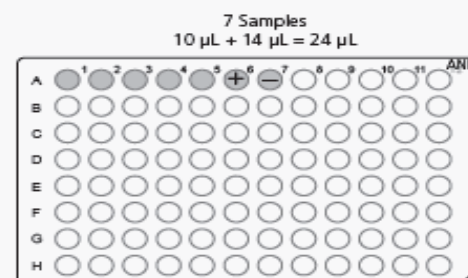
1. Label a 1.5 mL Eppendorf tube and one strip of 7 PCR tubes with the letter G.
2. Place tube on ice and strip tubes in cold block.
3. To the G tube, add the reagents in the table below. Pipet up and down 3X.

Reagent	1 Reaction	7 Reactions (~20% overage)
Water	10.58 µL	89 µL
Buffer A	1.18 µL	9.9 µL
SAP, Recombinant (1U/µL)	0.84 µL	7.1 µL
Gap Fill Enzyme	1.40 µL	11.8 µL
Total Volume	14.0 µL	117.6 µL
Volume per Tube for Tube Strip		16.0 µL 7-Tube Strip

4. Vortex, spin down, and place on ice.
5. Aliquot 16 µL of the G Master Mix to each tube in the strip.
6. Spin down and place on a chilled cold block.

Addition of Gap Fill Mix

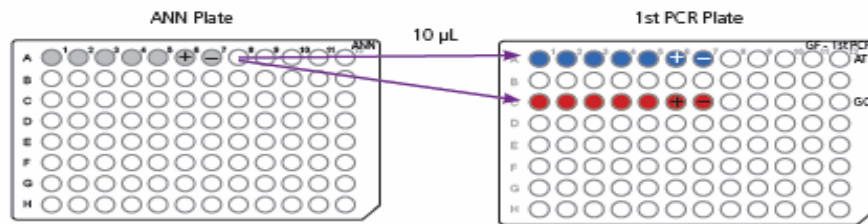
1. Remove the ANNEAL Plate from the thermal cycler, place in a cold block on ice for 1 min.
2. Stop the *OncoScan Anneal* program
3. Start the *OncoScan Gap Fill* program, **Pause** once cycler reaches 58 °C.
4. After the 1 min incubation, spin the ANNEAL Plate and return to cold block.
5. Add 14.0 µL Gap Fill (G) Mix to each well. Pipet up and down 3X.
6. Seal the plate, vortex and spin.
7. Keep the ANNEAL Plate on the cold block.



OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

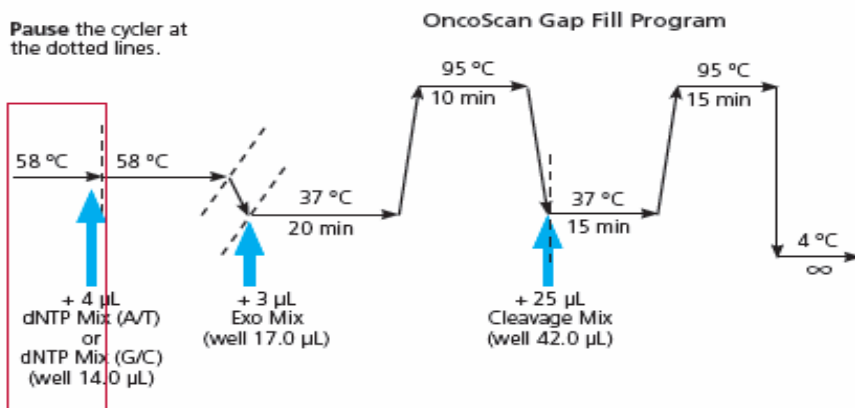
Channel Split

1. Label a new 96-well half-skirt PCR plate as *1st PCR*.
2. Clearly mark the **AT (blue)** and **GC (red)** rows (see figure below).
3. Transfer 10.0 μ L each well from the *ANN* Plate to the *1st PCR* Plate, as shown.



4. Seal and spin down the *1st PCR* Plate.
5. Load the plate on the thermal cycler, close the lid, and **Resume** the *OncoScan Gap Fill* program.
6. After 11 min at 58 °C, press **Pause**.
7. Remove the *1st PCR* Plate and place on a cold block for 1 min.
8. Spin down and return the *1st PCR* Plate to a cold block.
9. Move directly to the next section: **Addition of dNTPs**.

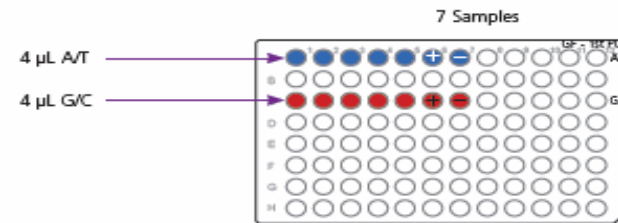
Pause the cycler at the dotted lines.



Blue arrows indicate reagent addition steps.

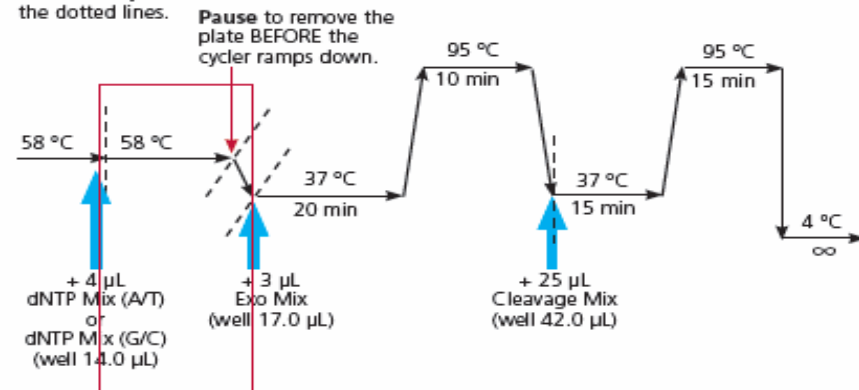
Addition of dNTPs

1. Add 4 μ L of AT Mix to the samples in row A on the *1st PCR* Plate. Pipet up and down 3X.
2. Add 4 μ L of GC Mix to row C on the *1st PCR* Plate. Pipet up and down 3X.
3. Seal, vortex, and spin the plate.
4. Place the *1st PCR* Plate back on the thermal cycler, press **Resume**.
5. Set a timer for 10 min to be back to **Pause** the program at the end of the 58 °C.
6. During this 11 min incubation, prepare the Exo Mix described in the next section: **Aliquot and Add the Exo Mix**.



OncoScan Gap Fill Program

Pause the cycler at the dotted lines.

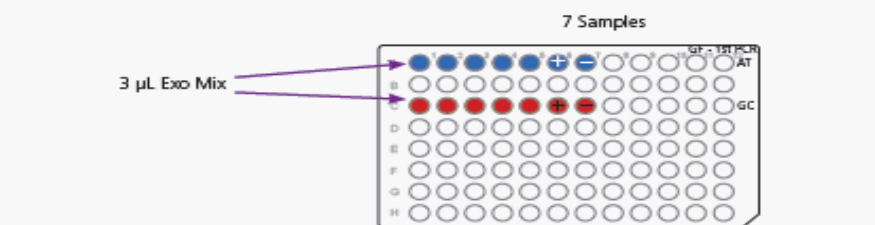


Blue arrows indicate reagent addition steps.

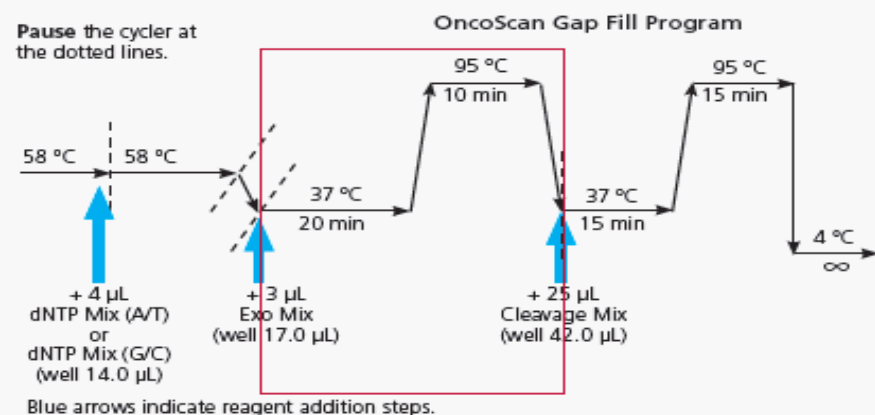
OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

Aliquot and Add the Exo Mix

1. Remove Exo Mix from $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (keep cold). Vortex Exo Mix and keep on ice.
2. Label one strip of 7 tubes with the letter E. Aliquot $7.5\text{ }\mu\text{L}$ of the Exo Mix directly into each strip tube. Spin to remove bubbles.
3. At the end of the $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ incubation, press **Pause** and place the *1st PCR Plate* in a cold block for 1 min.
4. **Resume** the program (no plate) and **Pause** thermal cycler once it has ramped down to $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. After the 1 min on ice, spin down *1st PCR Plate*, return to cold block.
6. Add $3\text{ }\mu\text{L}$ Exo Mix to each reaction. Pipet up and down 3X.
7. Seal, vortex, and spin the *1st PCR Plate*.
8. Place the *1st PCR Plate* back on the thermal cycler.
9. Press **Resume**.
10. Set a timer for 25 min to be back in order to prepare the Cleavage Mix as described in the next section: **Prepare and Add the Cleavage Master Mix**.



Pause the cycler at the dotted lines.

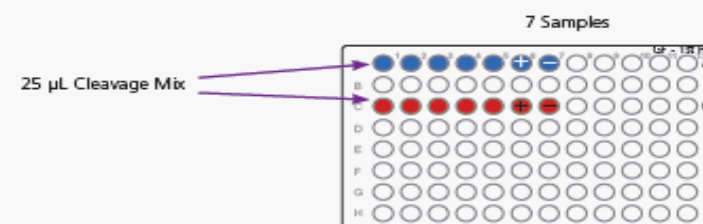


Prepare and Add the Cleavage Master Mix

1. Place 7-tube strip in a cold block and a 1.5 mL Eppendorf tube labeled *CM* on ice.
2. Remove Cleavage Mix from $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (keep cold). Vortex, spin and keep on ice.
3. Vortex and spin down the thawed Cleavage Buffer, return to ice.
4. Add the Cleavage Buffer and Cleavage Enzyme to the *CM* tube. See table below.

Reagent	1 Reaction	14 Reactions (-25% overage)
Cleavage Buffer	25.0 μL	438 μL
Cleavage Enzyme	0.2 μL	3.5 μL
Total	25.2 μL	441.0 μL
Volume per Tube for Tube Strip		60 μL 7-Tube Strip

5. Pipet up and down 3X.
6. Vortex and spin down the *CM* tube briefly. Keep on ice.
7. Aliquot 60 μL Cleavage Master Mix from *CM* tube to 7 tubes of the strip tube.
8. Spin down strip tubes. Place on a cold block.
9. Press **Pause** when cycler reaches $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, remove the *1st PCR Plate* and place a cold block on ice for 1 min.
10. Spin plate and return plate to cold block.
11. Add 25 μL *CM* Mix to each reaction. Pipet up and down 3X.
12. Seal, vortex, and spin down.
13. Place *1st PCR Plate* back on thermal cycler, press **Resume**.
14. Set a timer for 25 min to make the PCR mix described in the next section: **Prepare and Add the 1st PCR Master Mix**.



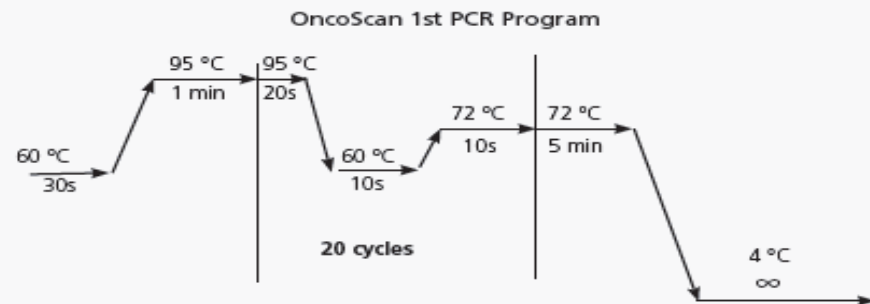
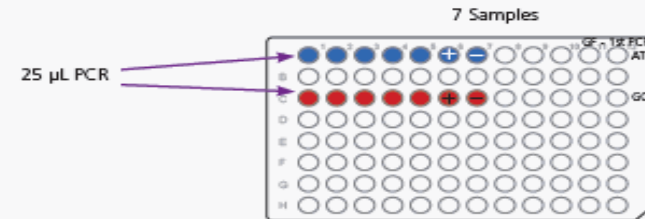
OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

Prepare and Add the 1st PCR Master Mix

1. Label a 7-strip tube, place in a cold block.
2. Label a 1.5 mL Eppendorf tube with the letters PCR and place on ice.
3. Remove the Taq from the -20 °C (keep cold). Vortex, spin and return to ice.
4. Vortex, spin down the thawed PCR Mix. Return to ice.
5. Add reagents according to the table below to the PCR tube. Pipet up and down 3X.

Reagent	1 Reaction	14 Reactions (~25% overage)
PCR Mix	24.4 µL	428 µL
Taq Polymerase	0.56 µL	9.8 µL
Total	25.0 µL	437 µL
Volume per Tube for Tube Strip		60.0 µL 7-Tube Strip

6. Vortex, spin down, and return the PCR tube to ice.
7. Aliquot 60 µL of the PCR Master Mix to each of the 7 tubes in the strip.
8. Spin down strip tube. Place strip tube in cold block.
9. When *OncoScan GAP Fill* program ends, remove the 1st PCR Plate, place on a cold block for 1 min.
10. Vortex, spin down the 1st PCR Plate.
11. Start the *OncoScan 1st PCR* program, **Pause** program when thermal cycler reaches 60 °C.
12. Add 25 µL PCR Master Mix to each reaction. Pipet up and down 3X.
13. Seal, vortex, and spin the 1st PCR Plate.
14. Place on thermal cycler, press **Resume**. At the end of *OncoScan 1st PCR* program, take the plate directly to the Post-Amp Lab.

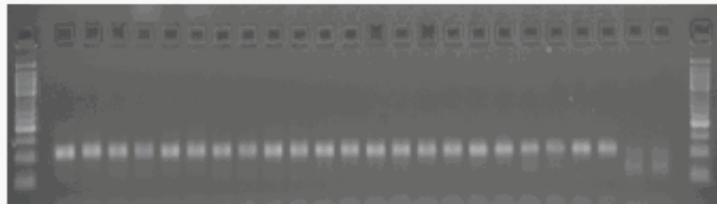


OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

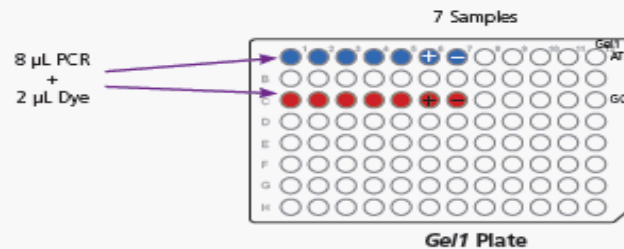
Stage 3 — First QC Gel and 2nd PCR (Post-Amp Lab)

Prepare the QC Gel 1 Plate

1. Label one fresh PCR plate *Gel1*.
2. Prepare diluted gel loading dyes and diluted buffers as instructed on the right.
3. Aliquot 8 μ L of 1st PCR Plate product to wells 1-7.
4. Add 2 μ L of 1:10 gel loading dye. Pipet up and down 3X.
5. Seal 1st PCR Plate and keep in a cold block on ice.
6. Seal, vortex, and spin down.



7. Load 10 μ L of each reaction onto a 3% agarose gel.
8. Add 5.0 μ L of the diluted 50 bp ladder to the lanes marked as "M".
9. Run the gel at 150 V for 15 min.
10. Examine the gel in a gel imager to ensure PCR products are approximately 120 bp.



Reagents for Gel Loading

1. Glycerol-EDTA Buffer (50% Glycerol + 50 mM EDTA).

Reagent	Initial Concentration	Final Concentration	Volume
100% Glycerol	100%	50%	1000.0 μ L
0.5 M EDTA	500 mM	50 mM	200.0 μ L
Nuclease-Free Water	N/A	N/A	800.0 μ L
Total Volume			2000.0 μL

2. 1:10 Dilution of 6X Gel Loading Dye (store at 4 °C for long-term storage).

Reagent	Volume
Glycerol-EDTA Buffer (50% Glycerol + 50 mM EDTA)	900.0 μ L
NEB 6X Loading Dye	100.0 μ L
Total Volume	1000.0 μL

3. Dilution of the 50 bp ladder (1 mL of the diluted ladder can be used in ~200 lanes, Store at -20 °C for long-term storage).

Reagent	Volume
Glycerol-EDTA Buffer (50 % Glycerol + 50 mM EDTA)	830.0 μ L
NEB 6X Loading Dye	100.0 μ L
NEB 50 bp Ladder	70.0 μ L
Total Volume	1000.0 μL

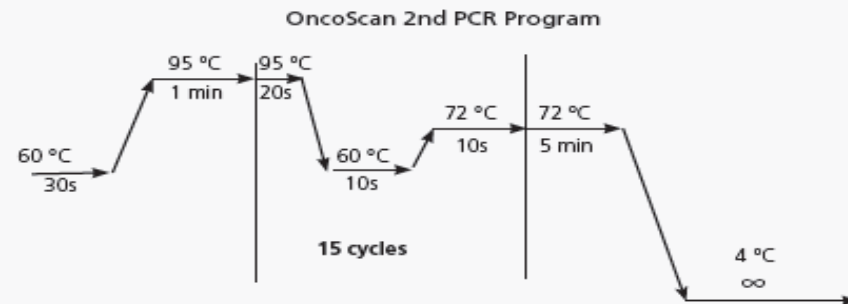
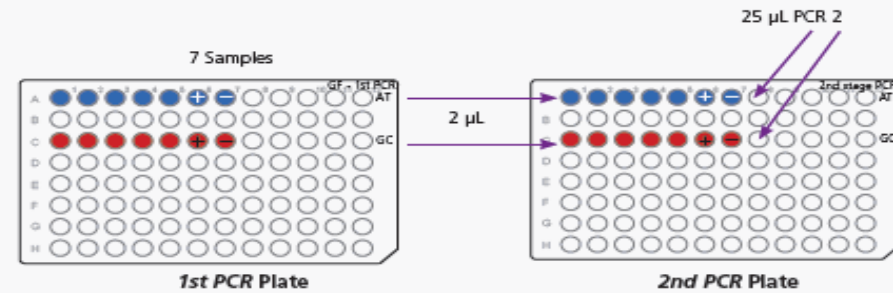
OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

Prepare and Add the 2nd PCR Master Mix

1. Start the *OncoScan 2nd PCR* program and **Pause** cyclyer reaches 60 °C.
2. Thaw the PCR Mix at room temperature.
3. Label a new 96-well half-skirt PCR plate as *2nd PCR* and keep on cold block.
4. Label row A as “AT” in **BLUE** and row C as “GC” in **RED**.
5. Label a 7-tube strip and a 1.5 mL Eppendorf tube as *PCR 2*.
6. Place strip tube in a cold block and the *PCR 2* tube on ice.
7. Remove the Taq from the –20 °C (keep cold).
8. Vortex and spin the Taq. Return to ice. Vortex and spin down the thawed PCR Mix and return to ice.
9. Add the PCR Mix and Taq Enzyme according to the table below to the *PCR 2* tube. Pipet up and down 3X.

Reagent	1 Reaction	14 Reactions (~25% overage)
PCR Mix	24.4 µL	428 µL
Taq Polymerase	0.56 µL	9.8 µL
Total	25.0 µL	437 µL
Volume per Tube for Tube Strip		60.0 µL 7-Tube Strip

10. Vortex and spin down the *PCR 2* tube. Keep on ice.
11. Aliquot 60 µL of the PCR Master Mix to each of the 7 tubes in the strip.
12. Spin down strip and return to cold block.
13. Add 25 µL PCR 2 Master Mix to the wells in the new *2nd PCR* Plate.
14. Add 2 µL from each well of the *1st PCR* Plate to the wells in the *2nd PCR* Plate. Pipet mix 3X.
15. Vortex, spin, and place the *2nd PCR* Plate on the thermal cycler.
16. Run the *OncoScan 2nd PCR* program.



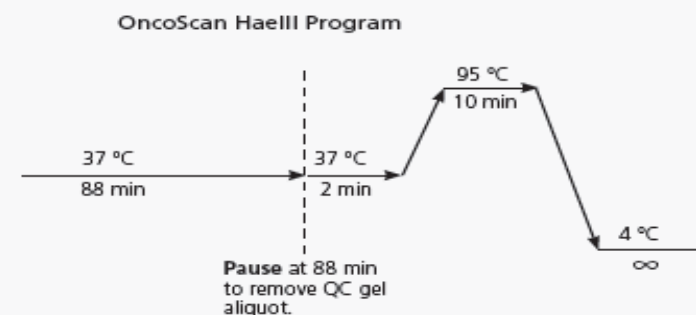
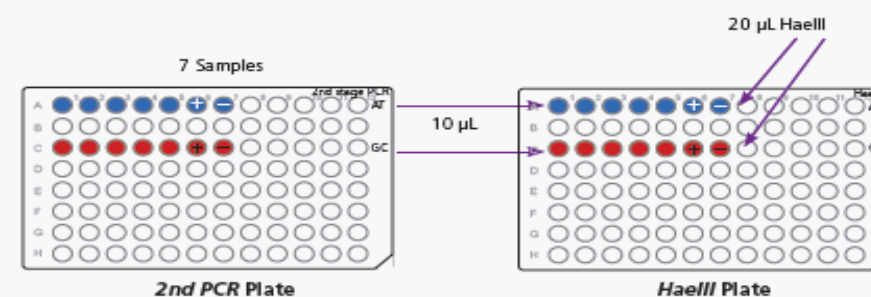
OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

Stage 4 — HaeIII Digest and Second QC Gel (Post-Amp Lab)**Prepare and Add the Hae III Digest**

1. Thaw Buffer B at room temperature. Once thawed, vortex, spin and place on ice.
2. Label one fresh 96-well half-skirt PCR plate *HaeIII*, label row A as "AT" in **Blue** and row C as "GC" in **Red**.
3. Place *HaeIII* Plate in a cold block.
4. Upon completion of *OncoScan 2nd PCR* program, place the *2nd PCR* Plate on a cold block for 1 min. Vortex, spin down, and return to cold block.
5. Label a 7-strip tube and a 1.5 mL Eppendorf tube with *HaeIII* and place on cold block or ice.
6. Remove the Hae III and Exo enzymes from the $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vortex and spin down. Place on ice.
7. Add the reagents according to the table to the *HaeIII* tube. Pipet up and down 3X.

Reagent	1 Reaction	14 Reactions (~20% overage)
Buffer B	19.10 μL	321 μL
HAE III Enzyme	0.40 μL	6.7 μL
Exo Enzyme	0.50 μL	8.4 μL
Total	20.0 μL	336 μL
Volume per Tube for Tube Strip		45.0 μL 7-Tube Strip

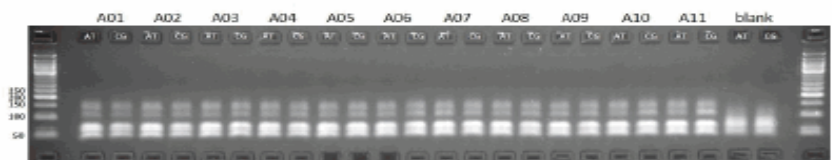
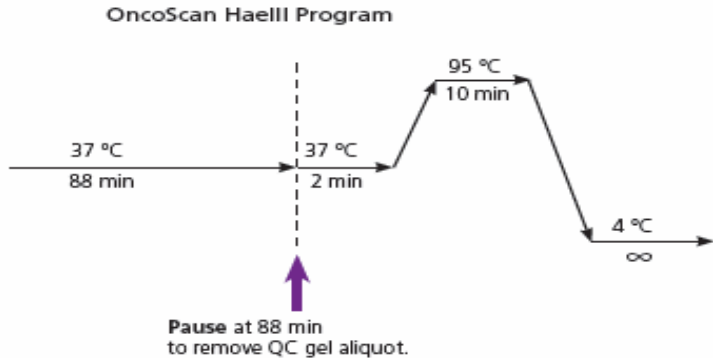
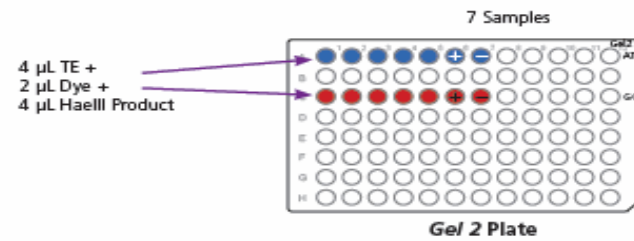
8. Vortex and spin the *HaeIII* tube. Keep on ice.
9. Aliquot 45 μL of the *HaeIII* Master Mix to a 7-tube strip. Spin down and place on a cold block.
10. Add 20 μL of *HaeIII* Master Mix to each well of the *HaeIII* Plate.
11. Add 10 μL of *2nd PCR* Plate wells to the *HaeIII* Plate. Pipet up and down 3X.
12. Seal, vortex, and spin down the *HaeIII* Plate.
13. Place the plate on a thermal cycler and run the *OncoScan HaeIII* program.
14. Set timer for 85 min for Hae III QC Gel.



OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

Prepare and Run the Second Quality Control Gel

1. Label a 96-well PCR plate *Gel2*.
2. Add 4 μ L of 1X TE to the gel plate.
3. Add 2 μ L of 1/10th diluted Gel Loading Dye to each reaction. Pipet up and down 3X.
4. At 88 min at 37 °C during the *OncoScan Haelll* program, **Pause** the cyclor.
5. Remove the *Haelll* Plate, and place it on a cold block for 1 minute.
6. Vortex, spin down, and place on cold block.
7. Remove 4 μ L of *Haelll* digest sample and add it to the *Haelll* QC Gel plate.
8. Seal the *Haelll* Plate and place it back on the thermal cyclor. **Resume** the *OncoScan Haelll* program.
9. Seal the *Gel2* Plate. Vortex and spin down.
10. Load 10 μ L of each reaction and 3.5 μ L of the diluted 50 bp ladder onto a 3% agarose gel.
11. Run the gel at 150 V for 15 min.
12. Examine the gel in a gel imager to ensure that you see a double band.



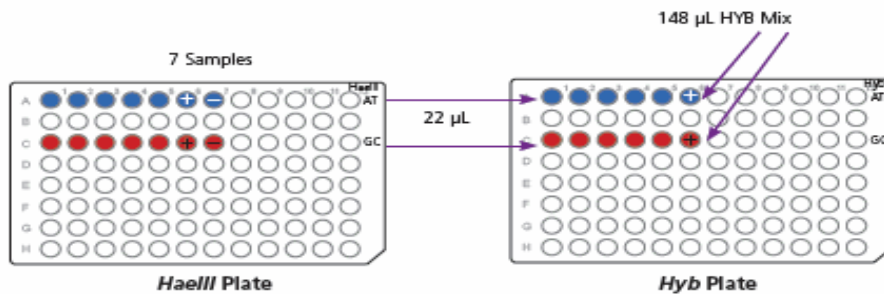
OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

Stage 5 — Hybridization (Post-Amp Lab)

1. Unpack the arrays and equilibrate to room temperature.
2. Preheat the hybridization oven for an 1 hr at 49 °C with rotation.
3. Create a Batch Registration file (AGCC) or Test Requests (AMDS).
4. Prepare the Hybridization Master Mix in a 15 mL conical tube on ice.

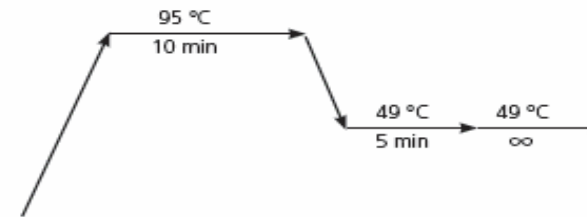
Reagent	For 1 Array	12 Arrays
Water	30.0 µL	0.504 mL
Hybridization Mix	118.0 µL	1.9824 mL
Total	148.0 µL	2.4864 mL

5. Vortex, spin down briefly, and place it on ice.
6. Once *OncoScan HaeIII* program is complete, remove the *HaeIII* Plate. Vortex, spin down, place on ice.
7. Label a fresh 96-well plate as *Hyb*. Label row A "AT" in **Blue**, and row C "GC" in **Red**.
8. Place reagent reservoir on ice and pour Hyb Master Mix into reservoir.
9. Aliquot 148 µL of Hybridization Master Mix to the appropriate wells of the *Hyb* Plate.
10. Transfer 22 µL of each reaction from the *HaeIII* Plate to the *Hyb* Plate. Pipet up and down 3X.



11. Seal, vortex, and spin the *Hyb* Plate.
12. Place the *Hyb* Plate on the thermal cycler.
13. Start the *OncoScan Hybridization* program.

OncoScan Hybridization Program



Load Arrays

Allow the samples to incubate at 49 °C for at least 5 min before loading.

1. Leave the samples on the thermal cycler, load 160 µL of sample onto each array using a single-channel P200 pipette. Only hybridize up to 8 arrays at a time.



2. Clean any excess fluid from around the septa.
3. Apply Tough-Spots® to the septa and press firmly.
4. Immediately load the arrays into the hybridization oven, four at a time.
5. Hybridize the arrays 16 to 18 hrs at 49 °C and 60 rpm.
6. After 16 to 18 hrs of hybridization, move on to the Wash, Stain, and Scan portion of the assay.

OncoScan™ FFPE Assay Kit – 7 Samples Quick Reference Card

Wash, Stain and Scan

1. Aliquot the following reagents into separate 1.5 mL microfuge tubes for each array:
 - 500 μ L Stain Buffer 1 into amber tubes
 - 500 μ L Stain Buffer 2 into clear tubes
 - 1000 μ L Array Holding Buffer 1 into blue tubes



2. Prime the Fluidics Station with the Wash buffers. Load the stain solutions and select the appropriate Fluidics Protocol: **OncoScan_450**
3. Start the Fluidics Protocol and leave the cartridge lever down in the **Eject** position.
4. Remove the Tough-Spots® from each array.
5. Load the arrays onto the Fluidics Station.

Before Scanning

1. Ensure no bubbles are visible through the window.
2. Cover the septa with Tough-Spots®, then load onto the scanner.
3. Scan the arrays as described in the *OncoScan™ FFPE Assay Kit User Manual* (P/N 703175).

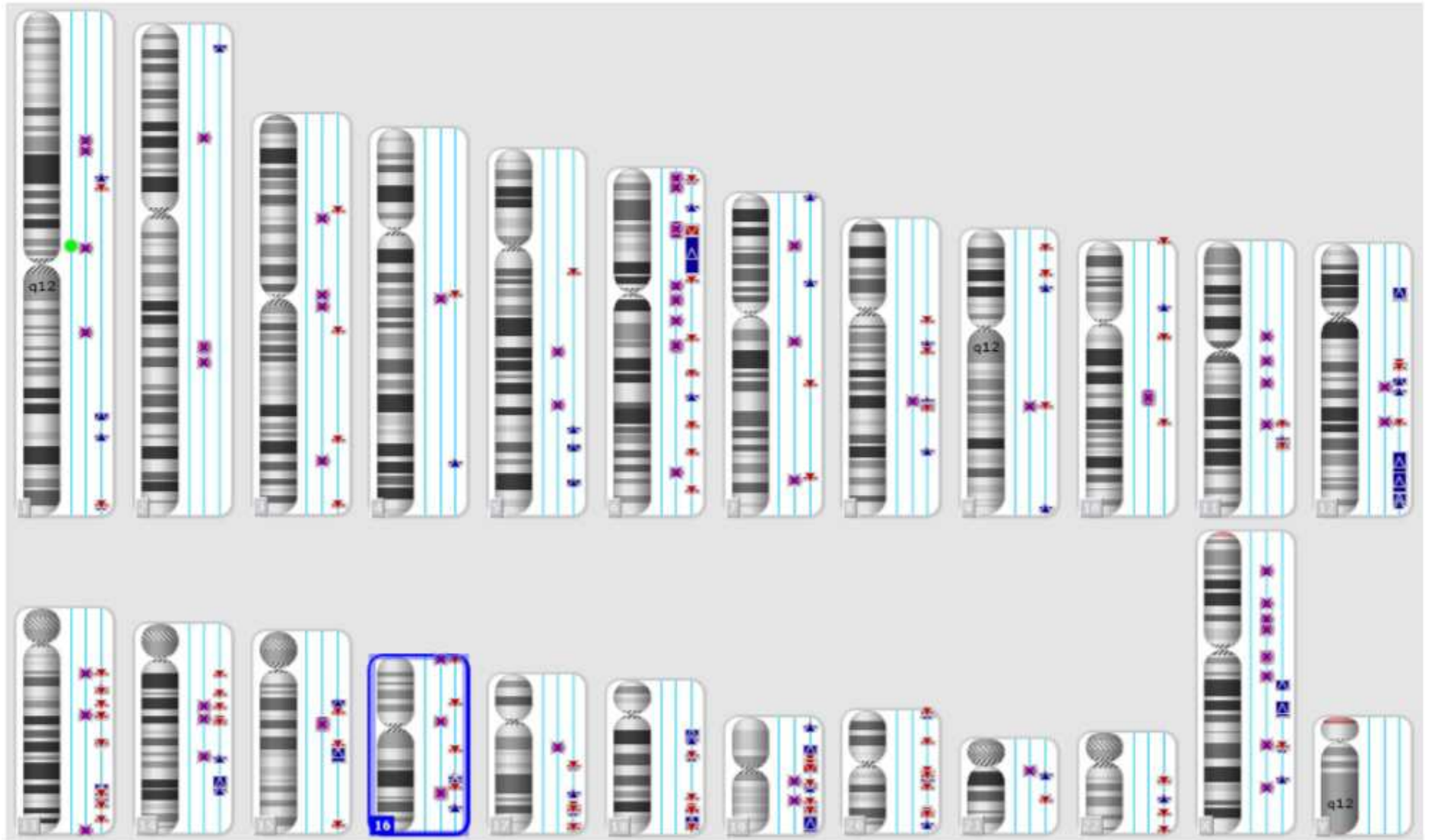
Important Points

- Aliquot Stain 1 Buffer into amber tubes.
- Aliquot Array Holding Buffer into blue tubes.
- Stain Buffer 1 and Array Holding Buffer are light sensitive.
- If there is a delay after aliquoting into the tubes, store the tubes at 4 °C, protected from light.
- Remove the bubbles from the arrays on the Fluidics Station (see the *Affymetrix® GeneChip® Fluidics Station 450/250 User's Guide*, P/N 08-0092) or remove the bubbles manually.

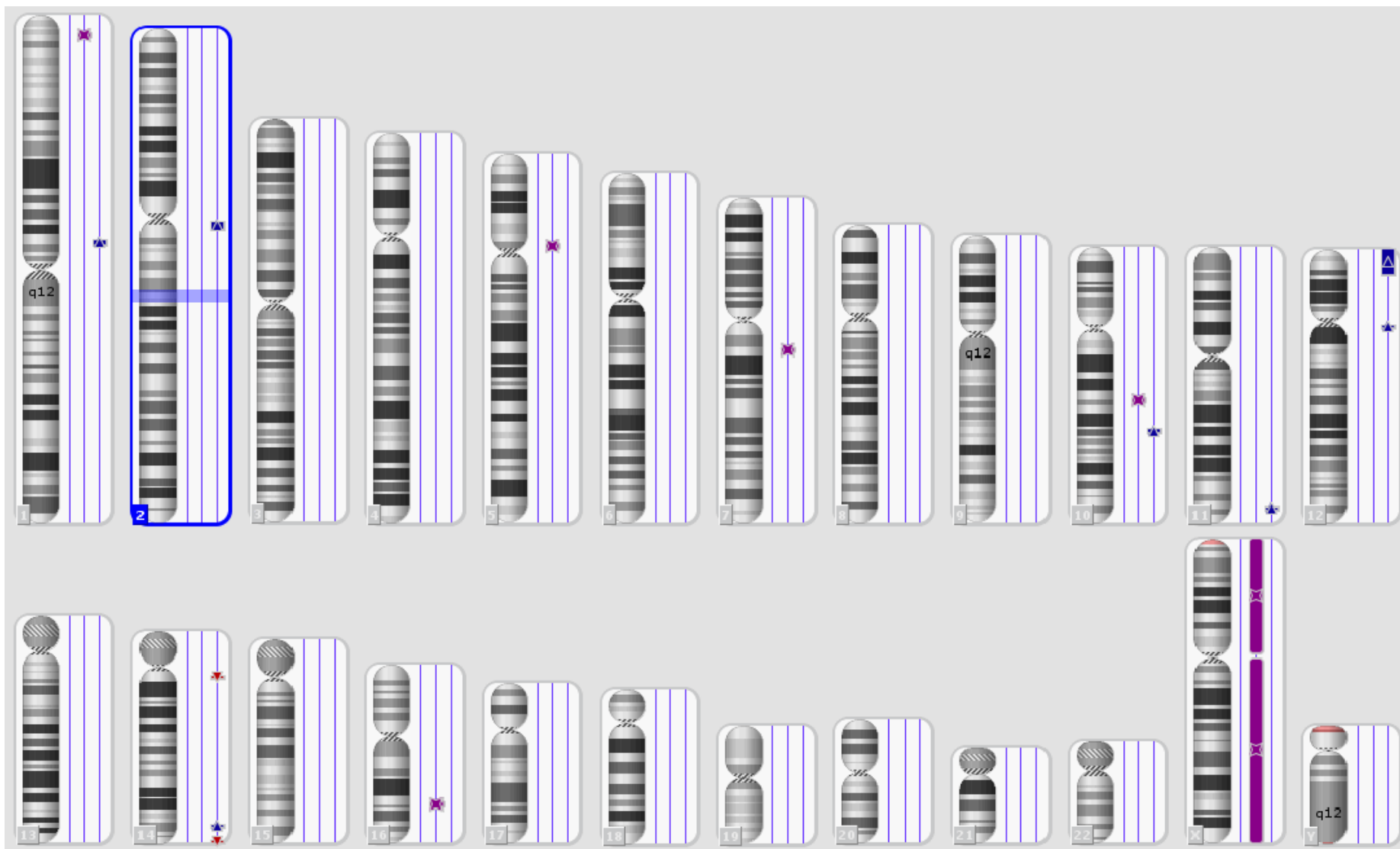
For Research Use Only
Not for use in Diagnostic Procedures.

P/N 703177 Rev. 1
 © 2013 Affymetrix, Inc. All rights reserved. Affymetrix®, Axiom®, Command Console®, CytoScan®, DMET™, GeneAtlas®, GeneChip®, GeneChip-compatible™, GeneTitan®, Genotyping Console™, myDesign™, NetAffx®, OncoScan™, Powered by Affymetrix™, PrimeView™, Procarta®, and QuantiGene® are trademarks or registered trademarks of Affymetrix, Inc. All other trademarks are the property of their respective owners.

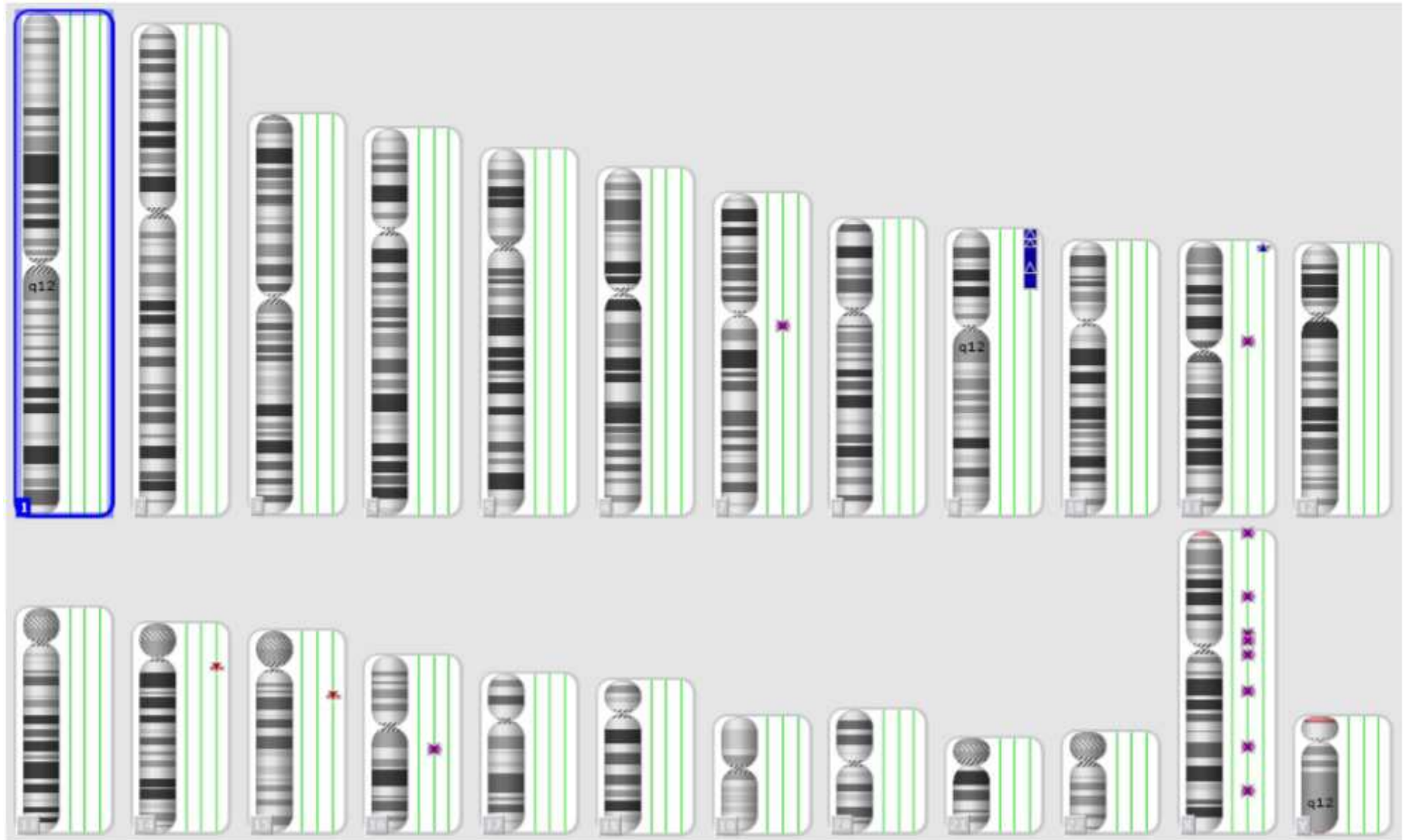
Annexe 2 : Vue caryotypique du cas n°1



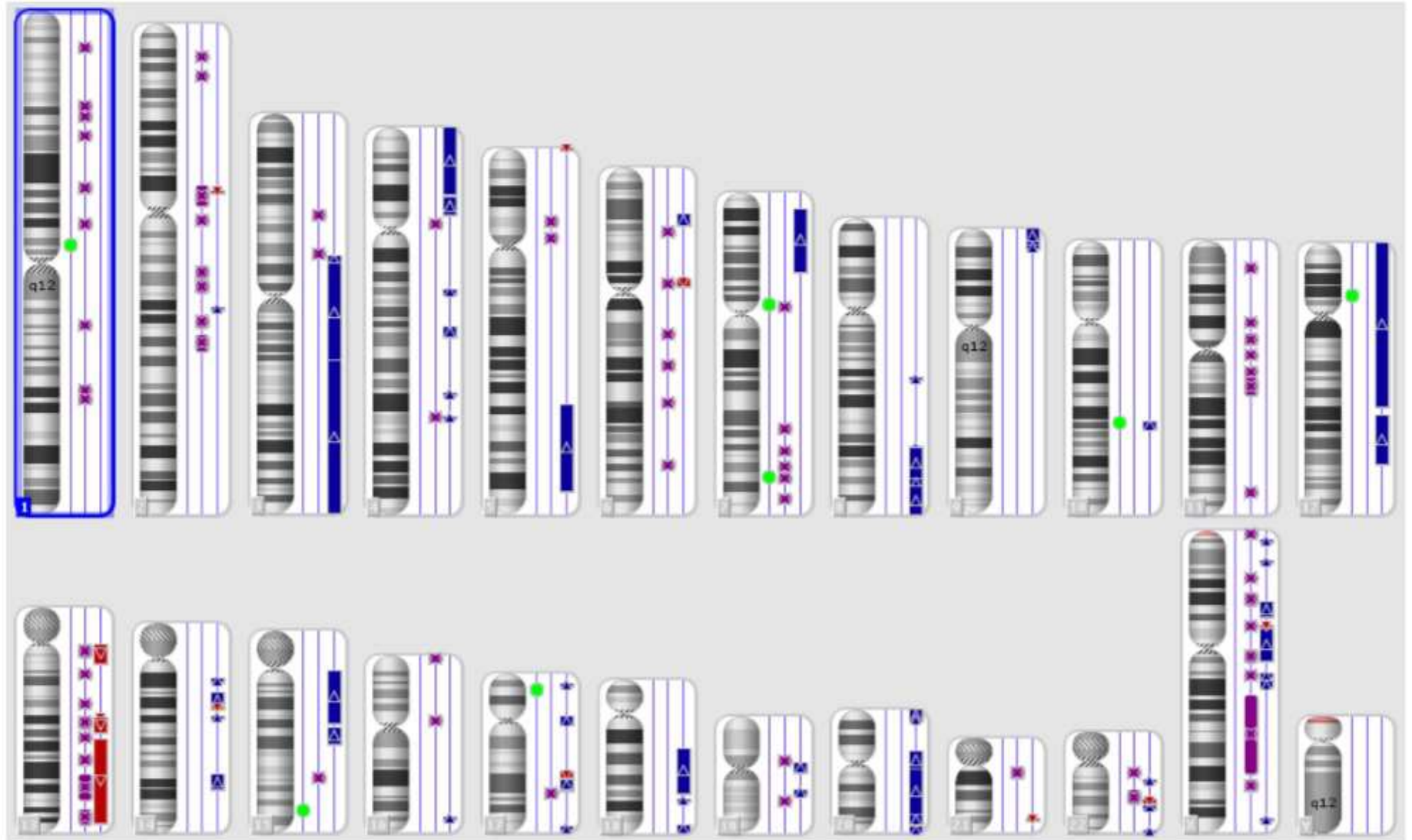
Annexe 3 : Vue caryotypique du cas n°3



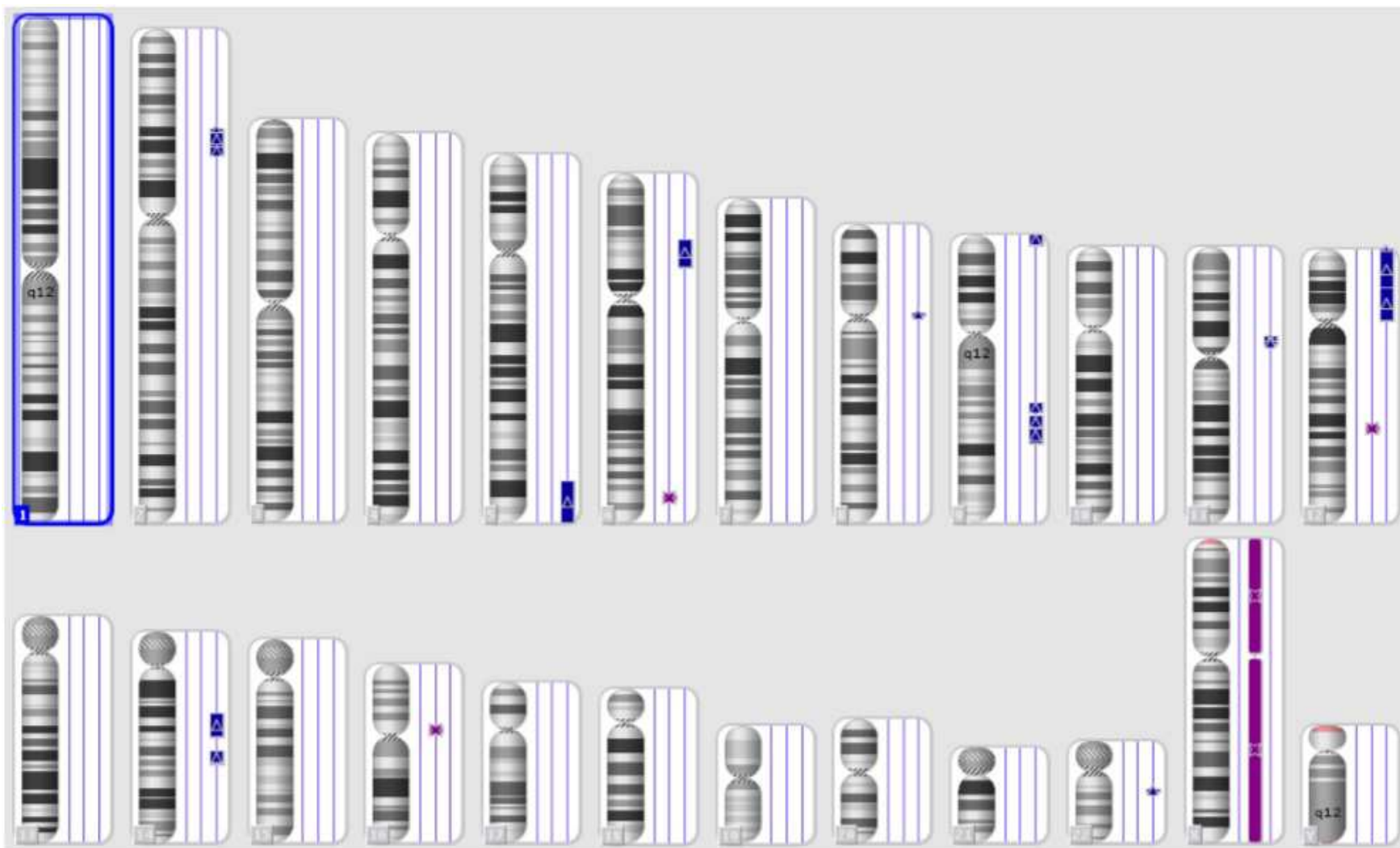
Annexe 4 : Vue caryotypique du cas n°4



Annexe 5 : Vue caryotypique du cas n°6



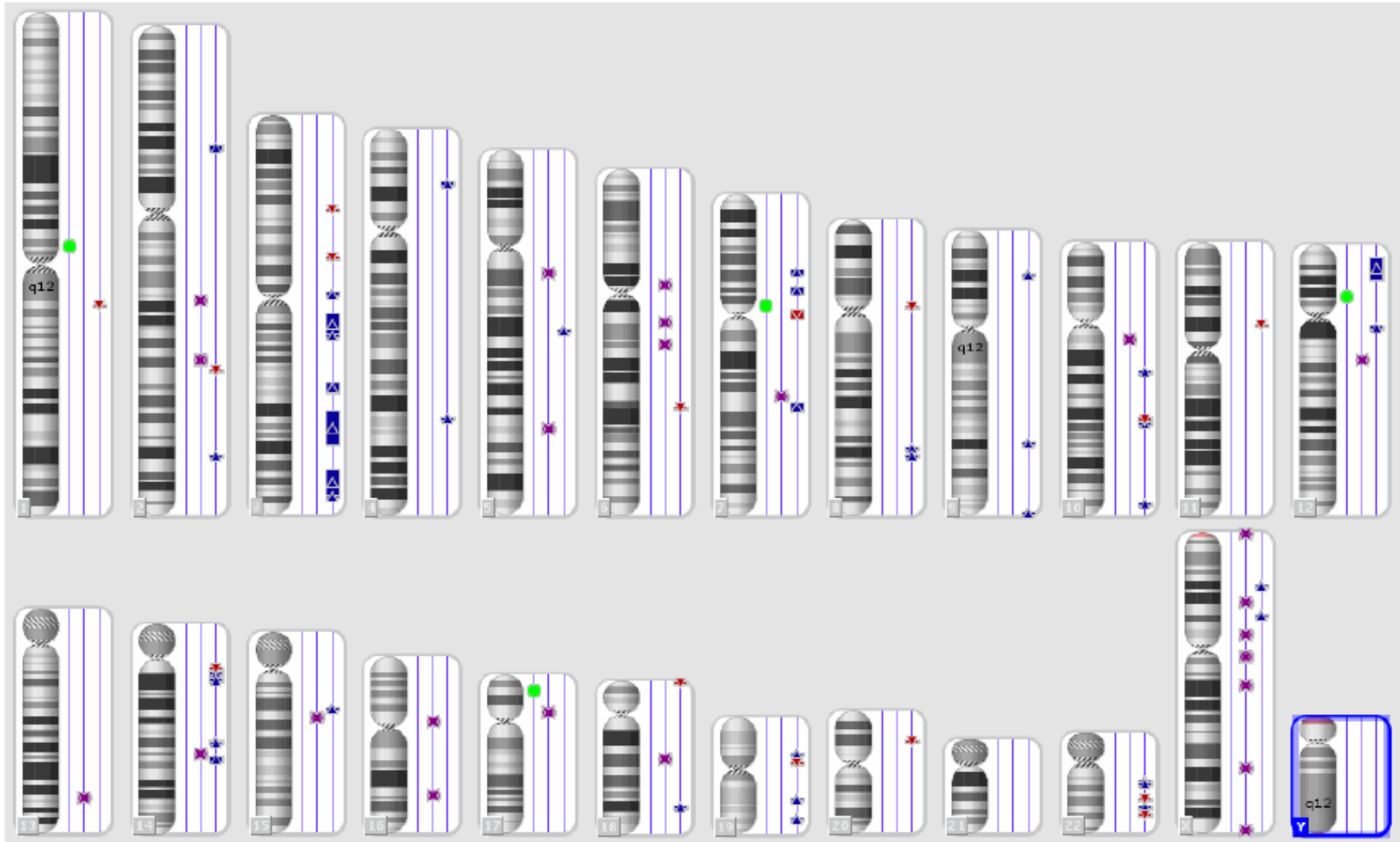
Annexe 6 : Vue caryotypique du cas n°9



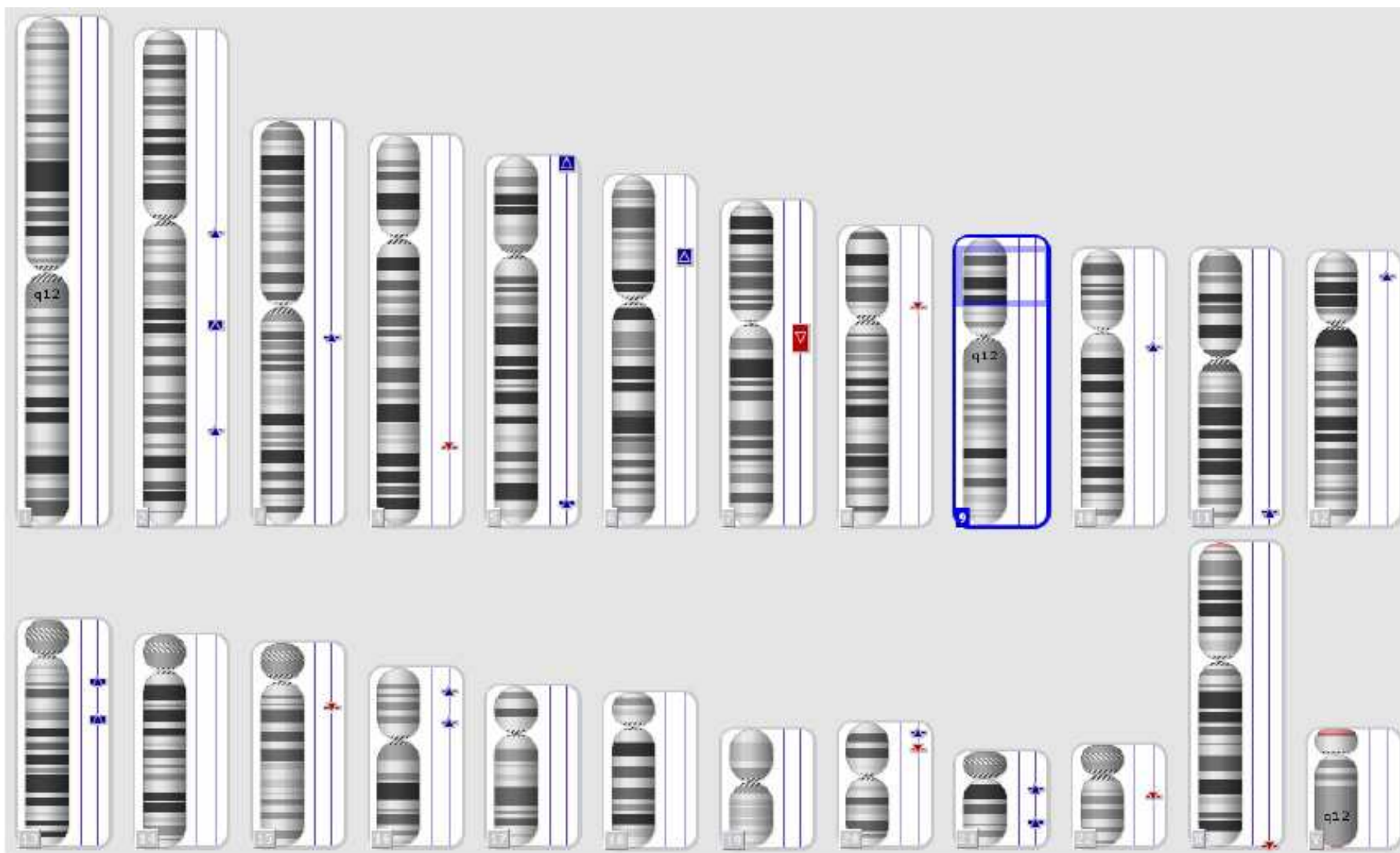
Annexe 7 : Vue caryotypique du cas n°10



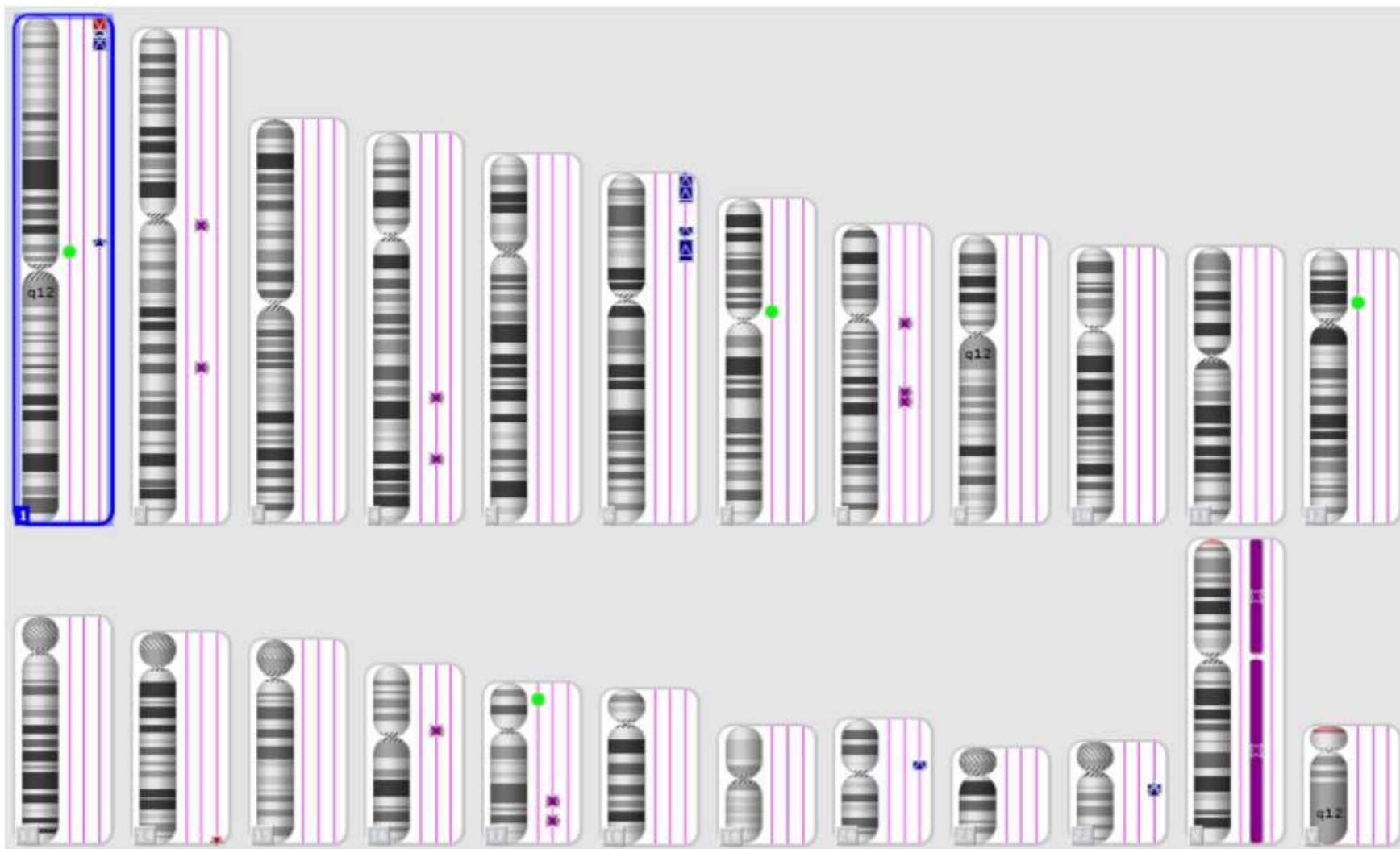
Annexe 8 : Vue caryotypique du cas 12 après microdissection



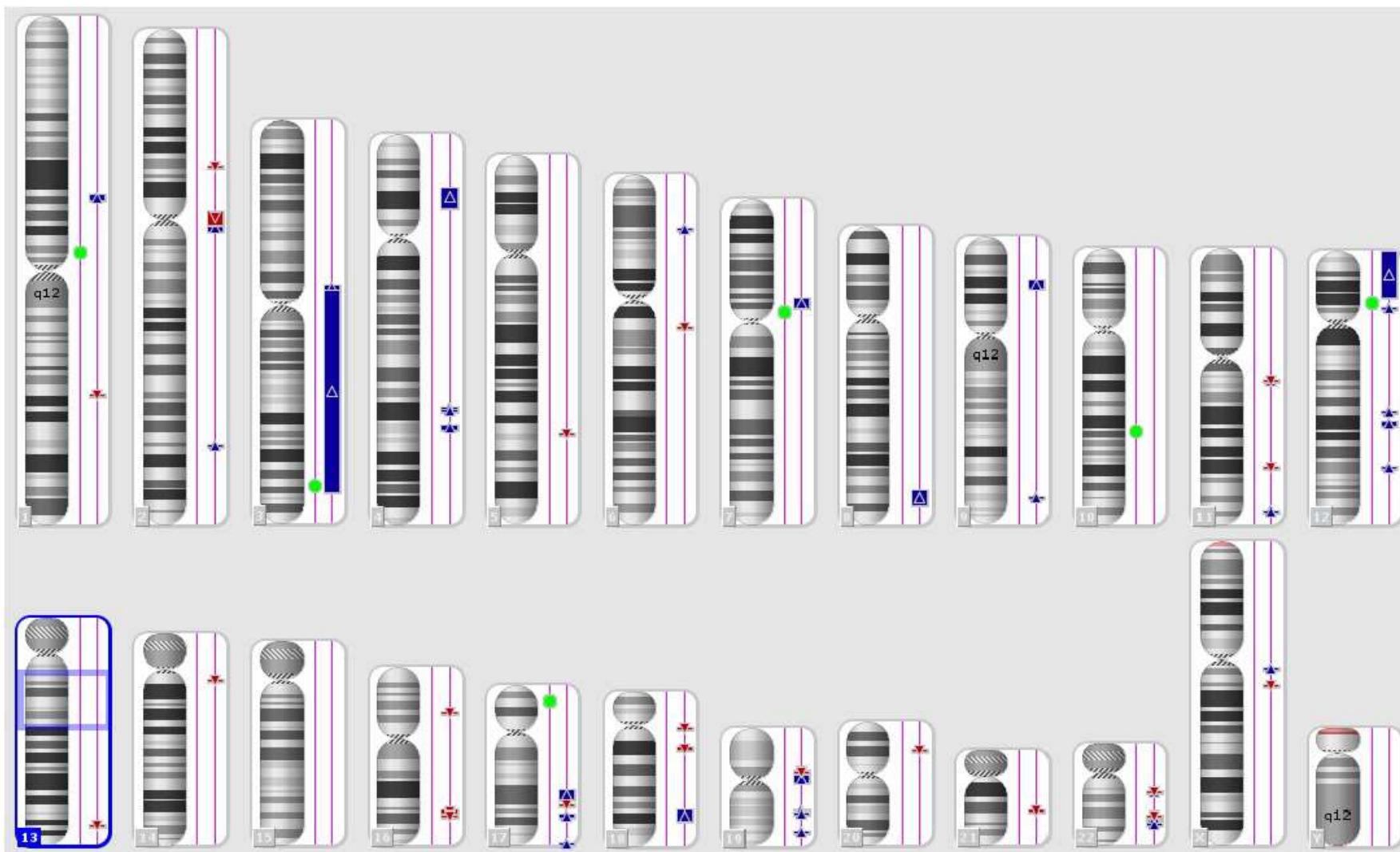
Annexe 9 : Vue caryotypique du cas n°14



Annexe 10 : Vue caryotypique du cas n°15



Annexe 11 : Vue caryotypique du cas n°18



AUTEUR : DUBOIS Romain

Date de Soutenance : Mardi 21 Avril 2015

Titre de la Thèse : Étude moléculaire du lymphome de Hodgkin par technique OncoScan™ après microdissection

Thèse - Médecine - Lille 2015

Cadre de classement : DES Anatomie et Cytologie Pathologiques

Mots-clés : lymphome de Hodgkin classique, réfractaire, microdissection, immunohistochimie, Reed-Sternberg, OncoScan™, analyse moléculaire, JAK2, JAK/STAT, NF-kB

Résumé :

Contexte : Le lymphome de Hodgkin est un cancer de bon pronostic avec une survie relative tous stades confondus de 84% à 5 ans. Cependant, 15 à 20% des patients au stade localisé de la maladie au diagnostic et 30 à 40% des patients au stade disséminé de la maladie au diagnostic sont réfractaires au traitement. La recherche d'une signature moléculaire spécifique de ce groupe pronostique défavorable est donc un enjeu thérapeutique majeur.

Matériels et méthodes : Nous avons réalisé l'analyse moléculaire par technique OncoScan™ FFPE de 18 patients atteints d'un lymphome de Hodgkin, répondeurs ou réfractaires au traitement, par macrodissection ou microdissection après repérage par immunohistochimie avec l'anticorps anti-CD30 des cellules de Hodgkin ou de Reed Sternberg, sur échantillons conservés en paraffine après fixation formolée.

Résultats : L'analyse moléculaire a mis en évidence un gain du nombre de copies de la région chromosomique 9p24 incluant les gènes *JAK2*, *CD274* et *PDCD1LG2* pour trois lymphomes de patients du groupe réfractaire, impliquant la voie de signalisation JAK/STAT. Nous avons mis en évidence un gain du nombre de copies de la région chromosomique 12p13 incluant *CCND2* et *TEL/ETV6*, de la région chromosomique 2p16 incluant *REL*, et une perte du nombre de copies de la région chromosomique 1p36 incluant *TNFRSF14*, impliquant la voie de signalisation NF-kB. Des mutations somatiques des gènes *TP53*, *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *PTEN*, *PIK3CA*, *BRAF*, *IDH1* et *IDH2* ont été mises en évidence dans les deux groupes.

La mise au point de la technique de microdissection laser des cellules de Hodgkin et de Reed Sternberg immunomarquées par l'anticorps anti CD30 sur échantillons inclus en paraffine a permis d'obtenir un enrichissement suffisant en cellules tumorales pour réaliser l'analyse moléculaire. Nous avons montré la faisabilité et l'utilité de cette méthode pour l'étude moléculaire du lymphome de Hodgkin.

Conclusion : Notre étude a mis en évidence des anomalies moléculaires dans une série de 18 patients atteints d'un lymphome de Hodgkin, concordantes avec la littérature et ouvrant des perspectives de recherche ciblant les voies de signalisation JAK/STAT et NF-kB.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE

**Asseseurs : Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME
Monsieur le Professeur Franck MORSCHHAUSER**

Directeur : Madame le Professeur Marie-Christine COPIN