

UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE
FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Facteurs pronostiques biopathologiques des lymphomes
Hodgkiniens :
Influence du microenvironnement

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Le 18 juin 2010

Par Monsieur Bruno Chetaille

Né le 30 décembre 1972 à Istres

Pour obtenir le grade de DOCTEUR de L'UNIVERSITÉ de la MÉDITERRANÉE

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé, spécialité : Pathologie Humaine

Membres du Jury de la Thèse :

Professeur Valérie Costes-Martineau
Professeur Jean-François Rossi
Professeur Luc Xerri
Professeur Régis Costello

Abréviations utilisées :

AP-1, Activator protein 1

BTLA, B and T lymphocyte attenuator

Cellule LP, pour « lymphocyte predominant », la cellule tumorale des LHNPL

CMV, cytomégalovirus

CRS, cellule de Reed Sternberg

CSHP, cellules souches hématopoïétiques

CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4

EBV, Epstein Barr Virus

EBER 1 et 2, EBV-encoded RNA 1 et 2

EBNA 1 et 2, Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 et 2

EORTC, european organisation for research and treatment of cancer

Gal-1, galectine 1

ICOS, inducible co-stimulatory molecule

Ig, immunoglobulines

IgS, immunoglobuline de surface

IgVH, gènes codant pour les régions variables des chaînes lourdes des Ig

IL, interleukine

IPS, international prognostic score

LAGC, lymphome anaplasique à grandes cellules

LBGC, lymphome B diffus à grandes cellules

LBGCRLT/H, LBGC riche en lymphocytes T/histiocytes

LF, lymphome folliculaire

LH, lymphome Hodgkinien

LHc, lymphome Hodgkinien classique

LHc-CM, lymphome Hodgkinien classique cellularité mixte

LHc-DL, lymphome Hodgkinien classique déplétion lymphocytaire

LHc-RL, lymphome Hodgkinien classique riche en lymphocytes

LHc-SN, lymphome Hodgkinien classique scléronodulaire

LHNPL, lymphome Hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire

LLC, leucémie lymphoïde chronique

LMP-1 et LMP-2, Latent Membrane Protein-1 et 2

LNH, lymphome non Hodgkinien

LTP, lymphome T périphérique
MAP kinases, Mitogen Activated Protein kinases
MNI, mononucléose infectieuse
NFκB, Nuclear Factor κ B
NK, natural killer
OMS, Organisation Mondiale de la Santé
pDC, cellule dendritique plasmocytoïde
PD-1, programmed death-1
pi3 kinase, phosphatidyl-inositide 3 kinase
REAL, Revised European-American lymphoma (classification)
RTK, récepteur tyrosine kinase
SLPT, syndrome lymphoprolifératif post-transplantation.
TCR, T-cell receptor (récepteur des lymphocytes T)
T_{FH}, lymphocyte T « follicular helper »
TIL, tumor infiltrating lymphocytes
TMA, Tissu Micro Array
TNF, Tumour Necrosis Factor
TNF α, tumour necrosis factor α
TPCG, transformation progressive des centres germinatifs
VIH, virus de l'immunodéficience humaine

PLAN

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

1 Les lymphomes : généralités, principes de classification

2 Les lymphomes Hodgkiniens (LH) : généralités, classification

3 Les lymphomes Hodgkiniens classiques (LHc) : clinique, diagnostic, caractéristiques anatomopathologiques

4 Particularités de chacun des sous-types histologiques de LHc

5 Diagnostics différentiels histologiques des LHc

6 Le lymphome Hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire (LHNPL) : présentation clinique, diagnostic anatomopathologique

7 Origine des cellules de Reed Sternberg (CRS) et des cellules LP

7.1 Les CRS ont pour origine une cellule B du centre germinatif

7.2 Les cellules LP dérivent de cellules B du centre germinatif qui ont été sélectionnées par l'antigène

7.3 La perte du phénotype B des CRS est sous-tendue par un dérèglement du réseau des facteurs de transcription contrôlant la différenciation lymphocytaire B

8 La survie des CRS est sous-tendue par le dérèglement de nombreuses voies de signalisation intracellulaires

8.1 Activation constitutive de NFκB

8.2 Activation constitutive de la voie Akt/ phosphatidyl-inositide 3 kinase (pi3 kinase)

8.3 Rôle de la voie MEK/ERK

8.4 Rôle de la voie JAK-STAT

8.5 Activation constitutive de AP-1

8.6 Activation aberrante de récepteurs tyrosine kinase (RTK)

8.7 Altérations des voies de l'apoptose

9 Le microenvironnement Hodgkinien : sa composition, son rôle dans la survie des cellules tumorales

9.1 L'anergie qui règne au sein du microenvironnement Hodgkinien est sous-tendue par les lymphocytes T régulateurs (Treg)

9.2 Les cytokines : moyen de communication privilégié entre les CRS et leur microenvironnement

9.3 Programmed Death factor-1 (PD-1) : une molécule immunomodulatrice importante dans les mécanismes qui sous-tendent l'immunodépression Hodgkinienne

9.4 Certains LHc présentent-ils au sein de leur microenvironnement une réaction de type Th1 ?

10 Le virus d'Epstein Barr (EBV) : son rôle dans la maladie Hodgkinienne

11 Facteurs pronostiques classiques des lymphomes Hodgkiniens

11.1 La classification d'ANN ARBOR

11.2 La classification de l'EORTC

11.3 Le score pronostique international (IPS)

11.4 Le TEP scanner

11.5 Les facteurs pronostiques biopathologiques issus d'études d'immunohistochimie

11.6 Le grade du British Lymphoma Investigation group

11.7 Dosage des cytokines plasmatiques

11.8 Impact pronostique du sous-type histologique

12 Apport des études d'expression génomique (puces à ADN) dans l'étude des lymphomes Hodgkiniens

13 Traitement des LHc

13.1 Bilan initial avant traitement

13.2 Traitement des stades précoces

13.3 Traitement des stades avancés

13.4 Evaluation de la réponse : l'apport récent du TEP scanner

14 Lymphomes hodgkiniens : les enjeux en 2010

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL DE THESE

Une étude d'expression génique sur tissu total d'une série de 63 LHc avec validation sur Tissu Microarray (TMA) d'une série indépendante de 146 LHc

1 Objectifs du travail

2 Matériel et méthode

3 Résultats

3.1 L'analyse non supervisée souligne l'hétérogénéité moléculaire des LHc ainsi que leur profil d'expression génique distinct de celui des lymphomes B à grandes cellules riches en lymphocytes T/histiocytes (LBGCRLT/H)

3.2 L'analyse supervisée met en évidence un profil d'expression génique enrichi en gènes lymphocytaires B corrélé à un meilleur pronostic

3.3 L'étude sur TMA confirme le lien entre la richesse du microenvironnement en cellules B et un meilleur pronostic

3.4 La signature moléculaire des LHc liés à l'EBV est enrichie en gènes caractéristiques d'une réponse immunitaire antivirale de type Th1

3.5 Les sous-types histologiques « sclérose nodulaire » et « cellularité mixte » ont des profils d'expression génique différents

3.7 Le microenvironnement des LBGCRLT/H est riche en lymphocytes T PD-1+, au contraire de celui des LHc

4 Article : B Chetaille *et al.* Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome. *Blood*. 2009;113: 2765-75

5 Discussion

6 Conclusion

Références

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION

1 Les lymphomes : généralités, principes de classification

Les lymphomes sont des tumeurs malignes développées à partir des cellules centrales de l'immunité, les lymphocytes. Ils se développent préférentiellement dans les ganglions lymphatiques (90% des cas), mais également en situation extra-ganglionnaire (10% des cas environ) notamment dans les tissus physiologiquement riches en lymphocytes tel que le tractus digestif. Dans la plupart des cas ces maladies se traduisent par un syndrome tumoral d'importance variable, d'apparition plus ou moins rapide, éventuellement associé à des signes généraux voire à des signes d'insuffisance médullaire lorsque la moelle hématopoïétique est envahie.

Les lymphomes constituent un groupe très hétérogène de maladies tant d'un point de vue :

- Epidémiologique : existence ou non de prédispositions héréditaires, âge d'apparition, variations ethniques et géographiques, incidence.
- De la présentation clinique et de l'évolutivité : on oppose notamment les lymphomes de bas grade (qualifiés également d'indolents) et les lymphomes de haut grade (lymphomes agressifs).
- Des aspects histologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires.
- Du pronostic et de la prise en charge thérapeutique.

Comme dans les autres domaines médicaux et notamment oncologiques, la compréhension de ces maladies protéiformes ainsi que leur prise en charge nécessite leur classification.

Les lymphomes sont aujourd'hui classés selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes publiée pour la première fois en 2001 (1) et réactualisée en 2008 (2).

Le principe de cette classification est de décrire des entités cliniquement relevantes et identifiables à l'aide de techniques histologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires. Ces techniques sont mises en œuvre, dans l'idéal,

sur une pièce chirurgicale d'exérèse ganglionnaire, parfois sur une biopsie médullaire ou sur tout autre tissu susceptible d'être atteint par le lymphome.

L'importance relative de chaque technique est variable d'une entité à l'autre mais les caractéristiques cytologiques et histologiques conventionnelles -sur un étalement cytologique coloré au May Grunwald Giemsa, ou sur une coupe histologique colorée à l'hématéine éosine- sont toujours prépondérantes, chaque entité étant *avant tout* définie par l'aspect de ses cellules et leur agencement entre elles tel qu'on le voit en microscopie conventionnelle. Ainsi décrit-on notamment des lymphomes « à petites cellules » (majoritairement de bas grade), des lymphomes « à grandes cellules » (correspondant à des lymphomes de haut grade), des lymphomes d'architectures diffuse ou folliculaire.

L'étude immunophénotypique en immunohistochimie et/ou cytométrie de flux permet de caractériser les antigènes exprimés par les cellules lymphomateuses et constitue le deuxième niveau d'investigation. Elle permet de confirmer un diagnostic fortement suspecté à l'étape morphologique, de départager des entités d'aspects histologiques proches -par exemple au sein du groupe des lymphomes B à petites cellules-, de caractériser des cellules dont la morphologie est peu spécifique. Pour certaines entités le critère immunophénotypique est indispensable à l'établissement du diagnostic, comme par exemple la mise en évidence de l'expression du CD30, constamment présente dans les lymphomes Hodgkiniens classiques (LHc) ou les lymphomes anaplasiques, ou celle du CD5 constamment exprimé par les lymphomes lymphocytiques et les lymphomes du manteau.

Enfin certaines entités comportent une anomalie cytogénétique très spécifique telle que la translocation (14 ; 18) IgH-BCL2 des lymphomes folliculaires, la translocation (11 ; 14) IgH-CCND1 des lymphomes du manteau ou les translocations impliquant ALK des lymphomes anaplasiques. La mise en évidence de ces anomalies cytogénétiques n'est pas systématiquement réalisée en pratique diagnostique quotidienne, mais elle permet, dans des cas complexes où le phénotype histologique et immunohistochimique est ambigu, de confirmer un diagnostic ou d'accumuler des arguments en sa faveur. Dans certains cas, comme les lymphomes de Burkitt, la

mise en évidence d'une anomalie cytogénétique (en l'occurrence un réarrangement isolé de myc) peut être indispensable à l'affirmation du diagnostic.

La plupart des entités sont ainsi définies par rapport à une « contre partie » bénigne, c'est à dire le type de cellule « d'origine », son stade de maturation ou le compartiment cellulaire à partir duquel survient le lymphome. La référence à cette « cellule d'origine » peut être particulièrement explicite dans l'appellation de l'entité comme par exemple « lymphome à cellules du manteau », « lymphome de la zone marginale ».

Bien sûr les critères cliniques -notamment la localisation ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, le caractère localisé ou étendu et l'épidémiologie- sont également pris en compte, certaines entités se rencontrant plus volontiers, voire exclusivement, dans certains contextes : citons par exemple les lymphomes de l'immunodéprimé ou les lymphomes du sujet âgé reliés à l'Epstein Barr Virus (EBV) (2). Un comité clinique regroupant une quarantaine d'oncologues et onco-hématologues a pris part à l'élaboration de la classification afin de garantir sa pertinence et son utilité clinique (1).

La classification reconnaît trois grands groupes d'hémopathies lymphoïdes :

- les hémopathies lymphoïdes B,
- les hémopathies lymphoïdes T et NK,
- et les lymphomes Hodgkiniens (LH) qui font l'objet de notre étude, les seuls à être abordés ici.

2 Les lymphomes Hodgkiniens : généralités, classification

La « maladie de Hodgkin » a été décrite pour la première fois en 1832 par Sir Thomas Hodgkin dans un article intitulé « A propos de certains aspects pathologiques des ganglions lymphatiques et de la rate » (3). Il y décrivait des patients présentant une importante augmentation progressive de volume d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques, associés ou non à des signes généraux. En 1898 et en 1902 Carl Sternberg et Dorothy Reed décrivent chacun la cellule à l'origine de la maladie, depuis classiquement dénommée cellule de Reed Sternberg (CRS).

La première classification de la maladie a été proposée en 1944 par Jackson et Parker (séparant paragrulome/granulome et sarcome). En 1956 Smetana et Cohen décrivent la forme scléronodulaire qui sera incluse en 1964 dans la classification de Lukes, Butler et Hicks, puis en 1965 dans la classification simplifiée de Rye qui reconnaît 4 types de LH :

- type 1, riche en lymphocytes
- type 2, scléronodulaire
- type 3, cellularité mixte
- type 4, déplétion lymphocytaire.

C'est en 1994 que deux grands groupes de LH sont reconnus au sein de la classification REAL (Revised European-American lymphoma):

- *Le lymphome Hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire* (LHNPL, également appelé paragrulome de Poppema Lennert) qui représente 5% des lymphomes Hodgkiniens.
- *et les lymphomes Hodgkiniens classiques* (LHc) dont les quatre sous-types sont repris de la classification de Rye et qui représentent 95% des lymphomes Hodgkiniens. La classification REAL intègre alors une entité provisoire, le LHc riche en lymphocytes.

En 2002 **la classification OMS** reprend intégralement la classification des LH de la REAL en intégrant la forme classique riche en lymphocytes comme une entité à part entière (4). Cette classification est intégralement reprise dans la classification OMS 2008 :

- **LHc, 4 sous-types :**
 - LHc, riche en lymphocytes (LHc-RL), nodulaire ou diffus
 - LHc, scléronodulaire (LHc-SN)
 - LHc, cellularité mixte (LHc-CM)
 - LHc, déplétion lymphocytaire (LHc-DL)
- **LHNPL** (paragrulome de Poppema Lennert).

Les LH représentent environ 30% de l'ensemble des lymphomes (2). Leur incidence dans les pays occidentaux est de l'ordre de 3 cas pour 100 000 habitants/an, soit environ 1500 à 2000 nouveaux cas par an en France. Ils représentent ainsi l'un des trois lymphomes les plus fréquents avec les lymphomes B diffus à grandes cellules (LBGC) et les lymphomes folliculaires (LF) (5).

Contrairement aux lymphomes non Hodgkiniens (LNH) dont l'incidence est en augmentation constante depuis 30 ans, l'incidence des LH est stable (2), suggérant que cette dichotomie LNH/LH est fondée sur une physiopathologie et des étiologies clairement distincts.

Tous les LH partagent 4 points communs (2):

- Il s'agit de maladies très préférentiellement ganglionnaires (avec éventuelle dissémination aux autres compartiments hématologiques tels que la rate et la moelle). Les disséminations extra-ganglionnaires, autres que par contiguïté, sont rares, contrairement aux LNH. Les ganglions atteints sont préférentiellement ceux situés dans la partie supérieure du corps : ganglions cervicaux, sus claviculaires et axillaires. Le mode de révélation est donc dans la très grande majorité des cas un syndrome tumoral ganglionnaire.
- Ils atteignent préférentiellement les adolescents et les jeunes adultes, avec un pic d'incidence entre 15 et 35 ans pour les LHc. Ce pic est un peu plus tardif pour les LHNPL, plutôt entre 30-50 ans. Il existe un deuxième pic d'incidence, moins bien documenté, en fin de vie, vers 70 ans, correspondant à des maladies de pronostic plus péjoratif. Nous verrons que cette épidémiologie est un peu différente en fonction du sous-type de LHc considéré.
- Les LH sont constitués d'une minorité de grandes cellules tumorales qui représentent seulement 1 à 5 % de la cellularité ganglionnaire totale. Les 95% restant sont des cellules réactionnelles : lymphocytes B et T, plasmocytes, polynucléaires, macrophages. Comme nous le reverront, ce contingent réactionnel est attiré à proximité des cellules tumorales par les CRS elles même et médié par les synthèses de cytokines comme l'interleukine (IL) 2, 5, 7, 9, 10, 13, Tumor Necrosis Factor (TNF) alpha. La synthèse de ces cytokines est responsable des signes généraux souvent présents.
- Les LH sont aujourd'hui des maladies curables dans l'immense majorité des cas, 80 à 90 % des patients étant guéris par les traitements modernes.

3 Les LHc : présentation clinique, diagnostic, caractéristiques anatomopathologiques

Ils représentent 95% des LH et touchent essentiellement des adolescents et des adultes jeunes (80 à 90% des cas).

Lors du diagnostic il s'agit d'une maladie localisée dans plus de 50% des cas, se manifestant par une augmentation progressive de volume d'un ou de plusieurs ganglions cervicaux, sus claviculaires ou axillaires. L'atteinte médiastinale, isolée ou accompagnant des adénopathies cervicales, est volontiers associée au sous-type scléronodulaire. 25% des patients présentent des signes généraux (fièvre, amaigrissement, sueurs nocturnes).

Spontanément la maladie évolue sur un mode modérément agressif, la symptomatologie dépendant des conséquences du syndrome tumoral, notamment en rapport avec une compression vasculaire dans les atteintes médiastinales.

Le diagnostic de la maladie est histologique. Il est porté idéalement sur une exérèse ganglionnaire prise en charge de façon classique au laboratoire d'anatomie pathologique.

Les techniques biopsiques mini-invasives, telles que les microbiopsies guidées par scanner, par échographie ou sous écho-endoscopie, peuvent permettre de porter le diagnostic mais leur rentabilité est faible (30 à 50% pour les microbiopsies sous échoendoscopie dans notre expérience).

Dans le cas d'une localisation médiastinale exclusive le diagnostic peut être obtenu sur des fragments tissulaires prélevés sous médiatinoscopie. Dans ce cas le diagnostic peut être gêné par d'importants artéfacts d'écrasement, voire totalement impossible dans les cas où le matériel prélevé est entièrement fibreux, ne contenant pas de cellules tumorales. Cette éventualité n'est malheureusement pas rare, les LH médiastinaux étant quasi-exclusivement du sous-type histologique scléronodulaire. Dans de tels cas de nouveaux prélèvements sont nécessaires.

Rarement le diagnostic est porté sur biopsie ostéomédullaire.

Dans tous les cas, le diagnostic repose sur la mise en évidence des cellules tumorales de la maladie : la cellule de Reed Sternberg ou sa variante mononuclée, la cellule de Hodgkin.

La cellule de Reed Sternberg (CRS), ou cellule « diagnostique » (dénomination qu'elle doit à son aspect morphologique particulièrement évocateur du diagnostic), est une grande cellule lymphoïde qui mesure 60 à 80 µm de diamètre, à cytoplasme amphophile abondant, comportant au moins deux noyaux fortement nucléolés entourés d'une clarification périnucléolaire. Les nucléoles proéminents sont éosinophiles réalisant un aspect en « œil d'oiseau ». La binucléation est en fait le plus souvent artéfactuelle, rendant compte d'une lobulation du noyau (6).

La cellule de Hodgkin est la variante mononucléée de la CRS. Les cellules lacunaires sont des CRS retrouvées très préférentiellement dans les LHc scléronodulaires (LHc-SN). Leur rétraction cytoplasmique leur donne un aspect « en araignée ». Il s'agit d'un artéfact reproductible lié à la fixation au formol.

A ces caractéristiques morphologiques originales s'associe un environnement tumoral non moins inhabituel comprenant, de façon variable selon les sous-types histologiques, des lymphocytes B et T, des polynucléaires, dont des polynucléaires éosinophiles, des macrophages, réalisant le « granulome » Hodgkinien très caractéristique.

Malgré le terme de « cellule diagnostique », des éléments cellulaires de morphologie très proche de celle des CRS peuvent se rencontrer dans d'autres situations pathologiques, néoplasiques ou non : infections virales telles que la mononucléose infectieuse ou l'infection par le cytomégalo virus (CMV), ou d'autres tumeurs tels que les lymphomes T, notamment les lymphomes anaplasiques, voire les carcinomes et les mélanomes (voir également « diagnostic différentiel »).

En plus de sa morphologie très particulière, la CRS présente un profil d'expression antigénique unique, mis en évidence en pratique courante en immunohistochimie.

Il s'agit d'un phénotype lymphocytaire B « incomplet » ou « altéré » associé à l'expression aberrante de marqueurs d'autres lignées (2) :

- **CD45-**, mais en pratique cette négativité est souvent difficile à prouver en immunohistochimie, les CRS étant entourées de cellules CD45+.
- **CD30+**. La positivité du CD30 est rapportée dans plus de 98% des cas de LHc, cependant avec des intensités variables d'un cas à l'autre, cet antigène semblant très sensible au masquage par des protéines présentes au sein du milieu de fixation, nécessitant alors la mise en œuvre de techniques de démasquage antigéniques efficaces pour mettre en évidence son expression (7). Le CD30 est un récepteur de la famille des TNF récepteurs. Il est présent sur des lymphocytes activés, notamment suite à une infection virale comme la mononucléose infectieuse (MNI), comme sur des cellules tumorales non hématologiques (carcinome embryonnaire, mélanome, carcinome indifférencié du cavum notamment). Il est également présent sur les cellules tumorales des lymphomes anaplasiques, dans certains lymphomes T périphériques et LBGC (notamment thymiques). Ainsi, en pratique diagnostique courante la présence du CD30 sur les cellules tumorales est obligatoire au diagnostic de LHc mais nullement spécifique à elle seule de ce diagnostic.
- **CD15+** dans 85% des cas. Il s'agit d'un marqueur de cellules de la lignée myéloïde, exprimé de façon aberrante par les CRS. La positivité du CD15 est argument diagnostique très fort pour le diagnostic de LHc lorsque cette positivité se fait sur une cellule de morphologie évocatrice. Cependant une positivité du CD15 peut être observée dans de rares cas de lymphomes B et T et bien sûr sur des cellules tumorales myéloïdes. Un autre marqueur myéloïde est exprimé par les CRS : la chémokine TARC (caractéristique des cellules dendritiques) mais ce signe est peu utilisé en pratique diagnostique courante.
- **CD20 -/+**. Les CRS sont classiquement CD20-, mais dans 30 à 40% des cas une positivité hétérogène du CD20 peut être observée. Une positivité forte et homogène du CD20 peut poser un redoutable problème de diagnostic différentiel avec un LBGC. Probablement que la plupart de ces cas de morphologie Hodgkinienne mais fortement CD20+ méritent d'être classés

dans la catégorie OMS 2008 des « lymphomes présentant des caractéristiques intermédiaires entre LBGC et LHc ».

De la même façon le **CD 79a** peut être exprimé de façon faible et hétérogène. Les marqueurs B tels que **PAX5** et **MUM1/IRF4** sont exprimés dans l'immense majorité des cas (plus de 95%), alors que les facteurs de transcription **BOB1**, **OCT2** et **PU1** sont négatifs dans plus de 90% des LHc et constituent ainsi un des arguments du diagnostic différentiel avec un LHNPL qui exprime toujours ces 3 facteurs de transcription. Le marqueur de différenciation plasmocytaire **CD138** est constamment négatif sur les CRS.

- **La négativité des marqueurs T est la règle.** Cependant l'expression d'un ou plusieurs marqueurs T est décrite, bien que très rare (de l'ordre de 5% des cas). Tous les marqueurs T ont été décrits comme pouvant être exprimés : CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8 ainsi que les marqueurs de cytotoxicité TIA1 et granzyme B. Par contre le **CD43**, marqueur des lignées lymphocytaire T et myéloïde, n'est pas exprimé par les CRS, cette caractéristique pouvant être utile au diagnostic différentiel avec un lymphome anaplasique qui exprime le CD43.

Certains des cas exprimant un marqueur T présentent également un génotype T, mais la plupart ont un génotype B et il s'agit alors d'une expression aberrante (8, 9).

- **EMA -.** Une faible positivité de l'EMA peut être observée sur les CRS mais elle reste faible, jamais aussi forte que dans le contexte d'un lymphome anaplasique.
- Le marqueur de prolifération **KI67** est positif sur la quasi totalité des CRS, prouvant que celles ci sont en cycle. Malgré cet avantage prolifératif elles restent minoritaires au sein du tissu tumoral, peu d'entre elles se divisant de façon effective. Un grand nombre meurt par apoptose, mécanisme impliquant **BCL2** et **P53**, également exprimés par les CRS (10, 11).
- **Le génome de l'EBV** peut être retrouvé dans les CRS dans 20 à 80% des cas selon le sous-type histologique, fréquemment dans le sous-type cellularité

mixte (50-75%), plus rarement dans le sous-type scléronodulaire (20-40%). Il s'agit d'un profil de latence virale de type II, c'est à dire avec une expression de LMP-1 et/ou EBER, mais sans expression de EBNA2. Seuls LMP-1 et EBER sont recherchés en pratique diagnostique courante, respectivement en immunohistochimie et en hybridation in situ (12,13).

4 Particularités cliniques et histopathologiques de chacun des sous-types de LHc (4)

- **LHc-RL :**

Ce sous-type est rare puisqu'il représente 6% des lymphomes Hodgkiniens (14). Il s'agit du sous-type le plus récemment reconnu, initialement intégré comme entité provisoire dans la classification REAL, puis comme entité à part entière dans la classification OMS (2). Historiquement ces cas ont été confondus avec des LHNPL dont l'aspect histologique est très proche : le diagnostic différentiel entre les deux entités ne peut se faire que par l'étude immunohistochimique. Deux formes de LHc-RL sont reconnues : une forme nodulaire (la plus fréquente), et une forme diffuse (15).

Histologiquement (15) ces tumeurs sont donc le plus souvent nodulaires, constituées d'un fond abondant de petits lymphocytes B du manteau englobant des cellules tumorales de morphologie variable, le plus souvent de type CRS ou Hodgkin, parfois de type LP (pour « Lymphocyte Predominant », le type cellulaire le plus souvent retrouvé dans les LHNPL). Certains nodules comportent un petit centre germinatif résiduel, les cellules tumorales se retrouvant en plus grand nombre en périphérie des nodules, dans la zone du manteau. Les polynucléaires sont absents au sein des nodules, rares en dehors. Il peut exister une ébauche de fibrose mais jamais de sclérose nodulaire vraie. Le phénotype des cellules tumorales est de type « LHc ». Elles peuvent exprimer le CD20 dans près d'un tiers des cas et sont EBV+ dans 50% des cas (15).

Cliniquement il a été montré que ce sous-type se comporte différemment des autres LHc : il s'agit d'une maladie d'excellent pronostic, le plus souvent de stade I ou II, survenant plus tard que les LHc scléronodulaire et de cellularité mixte (le plus souvent après 50 ans). Elle atteint plus volontiers des ganglions sous diaphragmatiques, jamais le médiastin et ne comporte que très rarement à des

signes B ou une forte masse tumorale. Ce sous type donnerait plus de récurrences tardives que les autres LHc, mais ces récurrences ne sont jamais agressives.

L'ensemble de ces caractéristiques cliniques en font une maladie dont le comportement est plus proche du LHNPL que de celui des autres LHc (15, 16).

- **LHc-SN :**

Il s'agit du sous-type le plus fréquent dans les pays occidentaux où il représente 75-80% des LH. Il se distingue des autres sous-types, et notamment du LHc-CM mixte par : sa survenue très préférentielle chez les jeunes adultes (peu chez les enfants, peu chez les sujets âgés) et chez la femme ; sa plus grande fréquence dans les pays développés ; sa prédisposition pour la localisation médiastinale et sa moindre association à l'EBV (6). La majorité des patients présentent une maladie stade II, et 40% des symptômes B (2).

L'aspect histologique est volontiers caractéristique : le parenchyme ganglionnaire est détruit par des bandes de fibrose pauvre en fibroblastes, émanant d'une capsule épaissie, et isolant des nodules de tissu lymphoïde, réalisant ainsi une architecture scléronodulaire souvent bien visible même macroscopiquement. La composition des nodules lymphoïdes associe en proportion variable des lymphocytes, des macrophages, des polynucléaires et des cellules tumorales. Celles-ci correspondent souvent à des cellules lacunaires : lors de la fixation formolée le cytoplasme se rétracte au noyau donnant l'impression d'une cellule reposant dans une lacune optiquement vide. Le phénotype des cellules lacunaires est identique à celui des cellules tumorales des autres LHc mais moins fréquemment EBV+ que dans le sous-type cellularité mixte (10-40% des cas).

Certains ont décrit une variante cellulaire et une variante syncytiale (4). **La variante cellulaire** correspondrait à une forme précoce de la maladie, dans laquelle il existe une nodularité nette mais pas encore de production de collagène. Les cellules tumorales sont de type lacunaire et se répartissent autour de follicules lymphoïdes B qui comportent parfois un centre germinatif. **La variante syncytiale** a été décrite en 1983 et serait associée à un plus mauvais pronostic (4) : une forte masse tumorale médiastinale et un stade III/IV sont plus fréquemment associés à ce tableau

histologique. Histologiquement elle est caractérisée par l'abondance des cellules tumorale qui forment des nappes cohésives volontiers associée à de la nécrose (17).

Certains ont proposé de grader les LHc-SN en deux grades pronostiques. Le grade II (de mauvais pronostic) se définit par la présence de très nombreuses cellules tumorales, volontiers atypiques (pléomorphes) associées à une nécrose extensive et une importante fibrose (4,6).

- **LHc-CM :**

Les deux derniers sous-types (LHc-CM et LHc-DL) ont de nombreux points communs : association à des conditions socio-économiques moins favorables, prévalence accrue chez l'homme, association forte à l'EBV, pas ou très peu de localisation médiastinale, moins bon pronostic que les autres LHc (6). Ces deux sous-types sont également ceux qui sont retrouvés chez les sujets infectés par le VIH. Ainsi, tout comme certains proposent deux grades dans les LHc-SN, les sous-types CM et DL pourraient représenter des grades différents d'une même maladie.

Le LHc-CM représente 20-25% des LHc. Il est caractérisé histologiquement par une architecture diffuse, ou très vaguement nodulaire, sans fibrose. Les cellules tumorales sont des CRS dispersées au sein d'un contingent réactionnel associant des lymphocytes, plasmocytes, polynucléaires et macrophages. Contrairement au LHc-RL, les CRS sont en nombre suffisant pour être aisément identifiables. En fait, tous les LHc ne présentant pas les caractéristiques décrites pour les LHc-RL, -SN ou -DL sont classés en LHc-CM. Ce sous-type qui constitue à cet égard une catégorie « par défaut ». Deux variantes histologiques sont décrites : la variante « interfolliculaire » où les CRS sont visibles entre des follicules lymphoïdes secondaires volontiers hyalinisés de type Castleman ; et une variante « riche en histiocytes épithélioïdes » pouvant poser un problème de diagnostic différentiel avec un lymphome T de type Lennert (lympho-épithélioïde) (4)

- **LHc-DL :**

Il s'agit de la forme la plus rare de LH (1% des cas) et celle qui est associée au moins bon pronostic : la plupart des patients se présentent avec une maladie stade III-IV et un envahissement médullaire dans 50% des cas (4). Elle se défini

histologiquement par une grande pauvreté du contingent lymphocytaire réactionnel, et une grande richesse absolue ou relative en cellules tumorales. Là aussi deux variantes histologiques sont décrites : **la forme fibrosante** dans laquelle la fibrose est prépondérante, le nombre de CRS pouvant être très faible. Ce collagène est différent de celui du LHc-SN car il ne présente pas la biréfringence caractéristique lorsqu'il est examiné en lumière polarisée. **La forme sarcomatoïde**, dans laquelle les CRS constituent les éléments cellulaires quasi-exclusifs, les éléments réactionnels étant particulièrement rares (2,4).

5 Diagnostics différentiels histologiques des LHc

- **Etats réactionnels**

La MNI pose plutôt un problème de diagnostic différentiel avec un LNH, principalement un LBGC, voire un lymphome de Burkitt. Rarement il peut exister au sein d'une adénite de MNI des cellules Sternbergoïdes pouvant poser un problème de diagnostic différentiel avec un LHc, mais ces cellules ont alors un phénotype B « complet » et sont présentes au sein d'une très importante hyperplasie B et T. Bien sûr le contexte clinique et sérologique est également à prendre en compte pour rétablir le diagnostic.

Les adénites lors d'une infection par le CMV peuvent comporter des cellules dont l'effet cytopathogène viral est proche de l'aspect d'une CRS (volumineux nucléole éosinophile et hyalin, clarification périnucléolaire). L'immunohistochimie anti-CMV et, là encore, le contexte clinique et sérologique permettent de poser le diagnostic.

Les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (SLPT), aussi bien après une greffe d'organe solide qu'après une allogreffe de moelle, peuvent comporter des images évocatrices de LHc.

Les SLPT sont classés en 4 catégories dans la classification OMS : les lésions précoces (hyperplasie plasmocytaire et tableaux MNI-like), les SLPT

polymorphophes, les SLPT monomorphes et les SLPT de type LHc (2). Cette dernière catégorie est de loin la plus rare puisqu'elle constitue 1,8 à 3,4% des SLPT (18,19). Cependant une série a retrouvé un risque augmenté de 6 fois de faire un LHc chez les patients allogreffés de moelle (20).

Au sein des SLPT de type LHc il semble que deux cadres nosologiques soient à distinguer : d'une part d'authentiques LHc EBV+, dont les CRS ont un phénotype classique CD30+, CD15+, CD20-, CD45- ; et d'autre part des SLPT « Hodgkin-like » dans lesquels les cellules tumorales ont une morphologie de CRS mais un phénotype B complet CD20+, CD45+, EBV+ et sont associées à un contingent de plus petites cellules transformées également EBV+. Dans les deux cas la prise en charge de ces patients consiste en une baisse de l'immunosuppression iatrogène à chaque fois qu'elle est possible, certains cas pouvant régresser par cette seule action. Les SLPT « Hodgkin-like » sont probablement des maladies plus proches d'un SLPT B monomorphes que des LHc, donc plutôt susceptibles de bénéficier de traitements de type LNH B incluant une immunothérapie anti-CD20 (19).

Il faut également souligner que des cellules ressemblant à des CRS peuvent se rencontrer occasionnellement dans des SLPT polymorphes.

- **LBGC**

Le problème se pose notamment avec un **LBGC médiastinal (thymique)**. Il a été montré que le LHc-SN médiastinal et le LBGC médiastinal (thymique) sont des entités très proches (2).

D'un point de vue épidémiologique les deux maladies atteignent principalement l'adulte jeune avec une nette prédominance féminine, alors que tous les autres LBGC atteignent plus volontiers l'adulte d'âge mûr avec une nette prédominance masculine.

Histologiquement les LBGC médiastinaux contiennent souvent un contingent de cellules sternbergoïdes et peuvent exprimer, parfois fortement, le CD30. Dans les deux cas il existe un stroma fibreux, mais il est fait de fines bandes de collagène enrobant des petits groupes de cellules tumorales dans le LBGC médiastinal alors que la fibrose du LHc réalise d'épaisses bandes sclérosantes. Le diagnostic différentiel repose par ailleurs sur le phénotype B complet des cellules

lymphomateuses du LBGC thymique comparé au phénotype Hodgkinien classique des CRS et des cellules lacunaires du LHc-SN médiastinal.

Les LBGC médiastinaux (thymique) se distinguent des autres LBGC par l'absence d'expression d'immunoglobulines de surface (IgS) (21) et par l'expression de MAL, une molécule impliquée dans la stabilisation de microdomaines membranaires et qui semble spécifiquement exprimé par ce sous-type de LBGC (22).

Dans les LBGC médiastinaux (thymiques) comme dans les LHc-SN thymiques la cellule « d'origine » correspond vraisemblablement à une cellule B thymique (23).

Il a également été montré que les signatures d'expression génomique des LBGC médiastinaux (thymiques) et celle des LHc-SN sont très proches (24) : les LBGC médiastinaux ont notamment une expression élevée du récepteur de l'IL13, de JAK2, de STAT1, de TRAF1 et une localisation nucléaire de c-REL en faveur d'une activation constitutionnelle de NFκB, autant de caractéristiques qui les rapprochent des LHc et suggère un lien entre ces deux maladies.

Cette proximité nosologique entre LHc-SN et LBGC médiastinaux (thymiques) est également suggérée par l'existence de lymphomes B décrits dans la classification OMS 2008 sous le terme de « **lymphomes B, inclassables, présentant des caractéristiques intermédiaires entre LBGC et LHc** » (2). Ils ont volontiers été également rapportés dans la littérature sous le terme de « lymphomes de la zone grise ».

Ces lymphomes se rencontrent essentiellement dans le médiastin mais des localisations périphériques sont possibles. Ils ont une épidémiologie différente des LBGC médiastinaux (thymiques) et des LHc-SN médiastinaux puisqu'ils atteignent préférentiellement l'homme jeune (20-40 ans). Leur aspect histologique est variable mais deux situations peuvent se rencontrer : soit une cytologie de type LHc (CRS, cellules lacunaires) mais un phénotype B conservé avec expression forte et diffuse des marqueurs B. Soit une morphologie de LBGC mais avec une expression forte du CD30 et du CD15.

La prise en charge de ces lymphomes n'est pas consensuelle et leur pronostic est moins bon que celui des LBGC thymiques et des LHc-SN médiastinaux (2).

L'existence d'authentiques lymphomes composites associant des zones de LBGC et de LHc-SN, et l'association dans le temps, chez un même malade, de ces deux histologies (récidive d'un LHc-SN en un LBGC thymique le plus souvent) sont

également des indices en faveur d'un certains « chevauchement » entre les deux entités (2).

Les LBGC riches en lymphocytes T/histiocytes (LBGCRLT/H) peuvent poser un problème de diagnostic différentiel avec un LHc-CM.

En effet, ces deux entités présentent des similitudes histologiques : peu de cellules tumorales, microenvironnement très abondant, morphologie volontiers « sternbergoïde » des cellules tumorales.

Par ailleurs un LBGCRLT/H peut survenir dans l'évolution d'un LHNPL dans 5% des cas (2), suggérant là aussi une relation entre ces deux maladies.

Longtemps il a été considéré que la recherche d'un clone lymphocytaire B pouvait constituer une aide au diagnostic différentiel entre LHc et LBGC (1). En effet le faible nombre de cellules tumorales au sein d'un ganglion de LHc (entre 1 et 5%) ne permettait pas, par manque de sensibilité des techniques de biologie moléculaire, de mettre en évidence un clone B sur tissu total, alors qu'une clonalité peut être mise en évidence dans l'immense majorité des LBGC. Ainsi la mise en évidence d'un clone lymphocytaire B était considérée comme un argument en faveur d'un LBGC et en défaveur d'un LHc (25, 26).

Cet argument n'est probablement plus vrai à l'heure actuelle puisque les techniques modernes de PCR sont plus sensibles et que le protocole standard BIOMED-2 semble capable de mettre en évidence un réarrangement clonal B dans la majorité des LHc (27). Dans ce travail les auteurs détectent un clone B dans 79% des LHc sur 24 cas testés, soit une proportion assez comparable (bien qu'un peu plus faible) à ce qui est classiquement retrouvé dans les séries de LNH B et ce à condition d'étudier non seulement les réarrangements des gènes codant pour les chaînes lourdes mais également les réarrangements des gènes codant pour les chaînes légères des immunoglobulines.

- **Lymphomes anaplasiques à grandes cellules (LAGC) :**

Ils peuvent représenter un des diagnostics différentiels les plus difficiles avec un LHc, notamment avec les LHc-SN très riches en cellules tumorales (forme syncytiale, grade 2). Environ 3% des LAGC peuvent prendre un aspect « Hodgkin-like » avec

abondante sclérose nodulaire et cellules « pseudo-lacunaires » (28). Les LAGC comportent des cellules caractéristiques (hallmark cells) : cellules à noyau réniforme, en « fer à cheval ». Ces cellules sont en quantité variable d'un cas à l'autre, mais toujours présentes. L'expression d'ALK en immunohistochimie est un critère diagnostique formel de LAGC ALK+. Pour les LAGC ALK-, on retiendra comme critère en faveur du diagnostic de LAGC : l'expression par les cellules tumorales de marqueurs T et cytotoxiques, du CD43, de l'EMA (avec un marquage fort) et l'absence d'expression du CD15. Au contraire l'expression de marqueurs B (CD20, CD79a), de l'EBV (LMP-1 et EBER) et du CD15 doit orienter vers un LHc. Dans l'immense majorité des cas les LAGC présentent des réarrangements clonaux des gènes codant pour le TCR alors que ceci est un phénomène exceptionnel dans les LHc (2).

- **Lymphomes T périphériques (LTP)**

Les LTP peuvent présenter des similitudes avec les LHc, essentiellement les LHc-CM : l'abondance du contingent réactionnel (notamment les nombreux polynucléaires éosinophiles), l'impression globale de grand polymorphisme cytologique, la présence de grandes cellules tumorales nucléolées de morphologie proche des CRS, l'expression possible du CD30, l'association fréquente à l'EBV (notamment pour les LTP angioimmunoblastiques). Ces similitudes sont particulièrement importantes avec le LTP de type limpo-épithélioïde (type Lennert) dans lequel le contingent réactionnel, notamment macrophagique, est très abondant. Les arguments en faveur d'un LTP sont : les atypies au sein de la population de phénotype T (qui est réactionnelle dans le LHc mais tumorale dans le LTP), la présence d'un « trou phénotypique » sur la population de phénotype T (les lymphocytes T tumoraux perdent l'expression d'un ou plusieurs marqueurs T), un index de prolifération élevé sur la population T (4).

6 Le lymphome Hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire (LHNPL) : présentation clinique, diagnostic anatomopathologique

Il représente 5% des LH (2). Il partage avec les LHc les 4 points communs énumérés plus haut - notamment le faible nombre de cellules tumorales entourées d'un important contingent réactionnel - mais s'en distingue par des caractéristiques morphologiques, immunophénotypiques, physiopathologiques et pronostiques différentes.

Cliniquement il se présente dans l'immense majorité des cas comme un lymphome indolent. Les stades I sont les plus fréquents, atteignant un ganglion cervical, axillaire ou inguinal. L'atteinte médiastinale est rarissime et il s'agirait du seul LH atteignant les ganglions mésentériques (6). Les disséminations médullaires sont rares. Il survient un peu plus tard dans la vie que les LHc, avec un pic d'incidence entre 30 et 40 ans.

Leur pronostic est bon, avec une rémission complète obtenue par l'exérèse chirurgicale éventuellement associée à un traitement médical. La survie globale est supérieure à 80% à 10 ans. Le pronostic est significativement meilleur que celui des LHc. Des récives sont possibles, également de bon pronostic. Il existe de rares formes disséminées (5 à 25% des cas selon les séries) qui ont un mauvais pronostic. Rarement (moins de 5% des cas) un LBGC peut survenir (voir ci-dessous). Celui ci est de meilleur pronostic que les LBGC « de novo » (2,29).

Leur prise en charge n'est pas codifiée, notamment l'intérêt d'un traitement médical adjuvant après exérèse d'un stade 1 chez l'enfant.

Le diagnostic du LHNPL est histologique et se fait sur une pièce d'exérèse ganglionnaire. Comme nous allons le voir ce diagnostic requiert des arguments histologiques architecturaux et il est illusoire de vouloir en porter le diagnostic de certitude sur une microbiopsie.

Histologiquement l'architecture est nodulaire ou nodulaire et diffuse. L'existence d'une forme purement diffuse est controversée. L'aspect histologique est très proche de celui d'un LHc-RL mais les cellules tumorales ont une morphologie particulière : plus petites que des CRS, à chromatine clarifiée finement nucléolée et surtout à contour nucléaire polylobé. Elles ont été successivement dénommées « variante

lymphocytaire/histiocytaire des CRS » (L&H cells), « cellules pop-corn », et plus récemment « LP cells » pour « lymphocyte predominant cells ».

Au contraire des CRS, les cellules LP présentent un phénotype B complet : CD45+, CD20+, CD79a+, CD22+, EMA+/- et surtout elles n'expriment pas CD30, ni CD15 ni l'EBV (LMP-1 et EBER). Dans 25% des cas l'EBV peut être retrouvé dans des immunoblastes réactionnels, mais pas dans les cellules tumorales. Par ailleurs, les cellules LP expriment constamment le marqueur centrogerminatif BCL6, le marqueur de prolifération KI67 et les facteurs de transcription OCT-2 et BOB.1 (au contraire des CRS de LHC qui ne les expriment pas dans 90% des cas) (2).

Comme dans les LHC les cellules tumorales sont peu nombreuses au sein d'un abondant microenvironnement, mais la composition de celui-ci est très différente de celui des LHC-SN et des LHC-CM, et très proche de celui du LHC-RL : les cellules LP sont présentes au sein de volumineux nodules formés d'un dense réseau de cellules dendritiques folliculaires et d'une majorité de petits lymphocytes B. Cependant les cellules directement en contact avec les cellules tumorales sont des lymphocytes T de type « follicular Helper » (T_{FH}) exprimant CD4, CD57, Bcl6, CD10, CXCL13 et PD-1 et réalisant des « rosettes péritumorales ».

Dans 5% des cas un LHNPL peut évoluer vers un LBGC, le plus souvent de type LBGCRLT/H.

Le LBGCRLT/H est un lymphome très agressif qui se manifeste par une polyadénopathie et une dissémination médullaire constante. Lors de la transformation d'un LHNPL vers un LBGCRLT/H on observe un enrichissement progressif en cellules tumorales -dont l'aspect et le phénotype demeure inchangé- qui vont coloniser les espaces internodulaires, mais aussi et surtout une modification profonde du microenvironnement : disparition progressive des petits lymphocytes B s'accompagnant d'un enrichissement en lymphocytes T et d'une disparition de lymphocytes T CD4+/CD57+ au profit de lymphocytes T CD8+/TIA1+ (2,4). Ce phénomène souligne l'importance du rôle du microenvironnement dans le comportement de la tumeur puisque cette évolution agressive ne s'accompagne que d'une modification de la composition du microenvironnement, le phénotype des cellules tumorales étant inchangé.

Il semble exister une relation entre transformation progressive des centres germinatifs (TPCG) et LHNPL mais la nature exacte du lien entre ces deux entités n'est pas clairement établi (2, 4, 6).

La TPCG est une forme particulière d'adénite chronique qui s'observe chez l'enfant et l'adulte jeune. Elle se caractérise par de très volumineux follicules lymphoïdes primaires (3 ou 4 fois plus volumineux que des follicules lymphoïdes primaires normaux) constitués d'une majorité de petits lymphocytes B de la zone du manteau associés à quelques éléments centrogerminatifs résiduels, mais sans cellules atypiques de type cellules LP. Ces volumineux follicules en transformation progressive sont formés par recouvrement du centre germinatif par les cellules de la zone du manteau.

L'association d'une TPCG et d'un LHNPL est décrite, de façon synchrone ou asynchrone, suggérant une relation entre les deux.

Le diagnostic différentiel entre LHNPL et LHc-RL requiert obligatoirement une étude immunohistochimique (15).

Dans le LHNPL les cellules tumorales (LP-cells) ont un phénotype B conservé CD20+, CD79a+, J chain+, EMA+ (50% des cas), CD30-, CD15- et EBV-. Certains immunoblastes réactionnels expriment le CD30 et ne doivent pas être confondus avec des cellules tumorales. Par ailleurs les cellules tumorales peuvent exprimer le CD30 de façon faible et hétérogène, mais jamais de façon aussi forte que dans un LHc. Les cellules T directement au contact des cellules LP sont des T_{FH}, CD57+/PD-1+/CXCL13+.

Dans le LHc-RL, l'aspect morphologique est très proche mais les cellules tumorales sont volontiers plus volumineuses et fortement nucléolées (de type CRS ou Hodgkin) et présentent au sein de l'expansion des zones du manteau (de façon excentrée par rapport à un centre germinatif atrophique). Surtout elles présentent un phénotype B « altéré » de LHc : CD30+, CD15+, CD20+/-, EBV +/- . Les lymphocytes T présents au contact des cellules tumorales sont CD57-.

7 Les lymphomes Hodgkiniens : nature des CRS et des cellules LP

7.1 Les CRS ont pour origine une cellule B du centre germinatif

La nature des CRS est longtemps restée mystérieuse. En effet leur morphologie et leur profil immunophénotypique « aberrant » ne renvoient à aucune ligne de différenciation clairement définie. Longtemps une origine macrophagique, dendritique ou lymphocytaire a été discutée.

Depuis une quinzaine d'années il est établi que, dans l'immense majorité des cas, les CRS sont de génotype B puisqu'elles comportent des réarrangements clonaux des gènes codant pour les immunoglobulines (30, 31, 32, 33, 34). Dans de très rares cas les CRS comportent des réarrangements clonaux de gènes codant pour le TCR (35) mais l'existence d'authentiques LHc de génotype T est débattue, certains auteurs argumentant qu'il pourrait plus probablement s'agir de lymphomes T dont les cellules présentent un phénotype aberrant avec expression du CD30 et du CD15 notamment (6, 36). Pourtant, l'étude du profil transcriptomique de ces LHc de génotype T montre qu'ils se groupent avec les autres LHc, et non pas avec les lymphomes T. Ainsi, peut-on faire l'hypothèse de l'existence de LHc qui, malgré une possible origine lymphocytaire T, subiraient les mêmes événements transformant que les LHc d'origine B aboutissant à un phénotype et un profil transcriptomique identique (37).

Les CRS sont porteuses d'hypermutations des gènes codant pour les régions variables chaînes lourdes des immunoglobulines (IgVH), ce profil mutationnel témoignant de leur passage dans le centre germinatif (6, 34). Dans 25% des cas elles sont également porteuses de « crippling mutations » (mutation « paralysantes ») qui empêchent la synthèse d'immunoglobulines (30, 38). Ces mutations très délétères existent physiologiquement dans le centre germinatif où elles sont responsables de l'apoptose des cellules atteintes. Les CRS seraient donc, dans ces cas présentant des « crippling mutations », des cellules centrogerminatives préapoptotiques, « sauvées » de l'apoptose. Les 75% restant présentent possiblement également des mutations délétères plus difficiles à mettre en évidence par séquençage, telles que des remplacements de simples paires de bases pouvant néanmoins être responsables d'une diminution d'affinité pour l'antigène. Dans les cas ne présentant réellement pas de « crippling mutations » l'absence de synthèse

d'immunoglobulines pourrait être mise sur le compte de l'absence des facteurs de transcription OCT2, BOB1, PU1 (voir également ci dessous).

L'origine B centrogerminative des CRS est également attestée par l'existence de rares cas de lymphomes composites associant notamment un lymphome folliculaire et un LHc, les deux types de cellules tumorales présentant les mêmes réarrangements monoclonaux, observation en faveur d'un « progéniteur » centrogerminatif commun aux deux lymphomes (39, 40).

Récemment une autre donnée importante concernant l'origine des CRS a été rapportée : Jones et al (41) ont décrit, au sein des lignées de CRS L428 et KM-H2 et dans le sang circulant de patients atteints de LHc, une population très minoritaire (de l'ordre de 0,2% des cellules) de petits lymphocytes CD30-, CD15-, de phénotype B mémoire CD27+, et ALDH1^{high} (un marqueur de cellules souches).

Lorsqu'ils isolent ces cellules et les mettent en culture, elles sont capables de donner naissance à des cellules B et à des CRS. Par ailleurs ces cellules, présentes dans le sang périphérique des patients, sont porteuses des mêmes réarrangements IgVH que les CRS issues de leur tumeur, suggérant que les CRS sont issues de ces cellules « souches » circulantes.

L'existence de ces cellules souches pourrait expliquer l'agressivité de la maladie malgré la faible activité proliférative des CRS : elles serviraient de pool de réserve à la population de CRS (42).

La signification clinique de ces cellules souches circulantes n'est pas claire, notamment leur corrélation au pronostic, mais leur présence pourrait au moins en partie expliquer l'efficacité thérapeutique du Rituximab (anti-CD20) rapportée par certains, alors que les CRS elles mêmes n'expriment pas ou très peu le CD20 (43).

Ainsi, si il semble acquis que les CRS dérivent d'une cellule B du centre germinatif, cela n'exclut pas que le premier évènement transformant puisse avoir lieu au sein d'une population cellulaire très indifférenciée, bien avant le stade de cellule B centrogerminative.

7.2 Les cellules LP dérivent de cellules B du centre germinatif qui ont été sélectionnées par l'antigène

L'observation histologique des LHNPL suggère une origine centrogerminative des cellules LP : elles sont présentes au sein de nodules de lymphocytes B associées à des cellules dendritiques folliculaires et à des T_{FH}. Cette organisation est assez semblable à celle que reproduisent les lymphomes folliculaires, prototype de néoplasie développée à partir de cellules du centre germinatif.

Par ailleurs, la présence fréquente d'images de TPCG au sein d'un authentique LHNPL suggère que les cellules LP se développent à partir de cellules Sternberg résiduelles présentes au sein de nodules de transformation progressive.

Les cellules LP expriment des marqueurs lymphocytaires B (CD20, CD79a) et souvent des marqueurs centrogerminatifs : CD10, BCL6 et l'« activation-induced cytidine deaminase » une enzyme clé pour la mise en œuvre du processus d'hypermutations somatiques et de « class switching » (2, 44, 45).

L'hypothèse de l'origine centrogerminative de la cellule LP a été définitivement validée par la mise en évidence, sur des cellules LP isolées par microdissection, de réarrangements clonaux des IgVH et surtout de mutations somatiques « en cours » (*ongoing mutations*) présentes sur des gènes d'immunoglobulines fonctionnels, indiquant que les cellules LP ont été soumises au processus de sélection par l'antigène (32, 46).

Une étude de transcriptome sur cellules LP isolées a mis en évidence qu'elles ont un profil d'expression génique intermédiaire entre des cellules de Sternberg et des cellules mémoires. Par ailleurs leur profil d'expression génique est proche de celui des CRS et des cellules tumorales de LBGCRLT/H (et plus éloigné des lymphomes folliculaires), et montre une activation constitutive de NFκB et de la voie ERK (47). De façon intéressante cette étude montre également que bien que les cellules LP présentent un phénotype B complet et conservé lorsqu'elles sont étudiées en immunohistochimie, d'un point de vue transcriptomique elles perdent l'expression d'un grand nombre de gènes de différenciation B, une analogie forte avec les CRS des LHc.

Il n'y a pas de réarrangements chromosomiques spécifiques au sein des cellules LP mais BCL6 est réarrangé dans près de 50% des cas, au contraire des CRS,

suggérant que ce gène joue un rôle dans la genèse des LHNPL mais pas dans celle des LHc (48).

7.3 La perte du phénotype B des CRS est sous-tendue par un dérèglement du réseau des facteurs de transcription contrôlant la différenciation lymphocytaire B

Bien qu'étant issue d'une cellule B du centre germinatif, la CRS acquiert un phénotype aberrant associant :

- une perte des marqueurs de différenciation lymphocytaire B -perte du CD45, du CD79a, du CD22, du CD20, incapacité à produire des immunoglobulines- ;
- et l'acquisition de marqueurs de différenciation d'autres lignées -notamment le CD15 et la chémokine TARC, habituellement exprimés par les cellules de la lignée myéloïde, plus rarement des marqueurs T ou cytotoxiques- (2, 42).

Ce phénomène est sous-tendu par l'inhibition de tous les gènes impliqués dans la différenciation lymphocytaire B.

Schwering et al ont montré que la synthèse des ARNm de tous les gènes codant pour des protéines de différenciation lymphocytaire B est abolie ou drastiquement diminuée au sein des CRS (49).

De façon intéressante les marqueurs B conservés par la CRS sont essentiellement ceux impliqués dans ses échanges avec les lymphocytes T CD4 environnant, notamment CD40 (50) et CD86 (51) soulignant l'importance pour la CRS de ses interactions avec son microenvironnement.

Ce phénomène de transformation phénotypique d'une cellule B vers une CRS est qualifié dans la littérature de « reprogrammation de la CRS ». Il est sous-tendu par l'inhibition de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphocytaire B et par une dérépression de facteurs de transcription capables d'engager la cellule vers une autre lignée (42).

OCT2 et son co-activateur **BOB1** sont des facteurs de transcription impliqués dans la synthèse des immunoglobulines. Dans l'immense majorité des cas ils ne sont pas exprimés par les CRS (2, 52). Stein et al (53) ont montré que les CRS ne comportent

ni chaînes légères ni chaînes lourdes ni même d'ARNm d'immunoglobulines et que ceci est corrélé à l'absence de OCT 2 et/ou de BOB 1 dans la quasi-totalité des cas de LHc. Aucun cas de LHc de leur série ne comportait d'expression en immunohistochimie de ces deux facteurs de transcriptions, les rares cas qui exprimaient l'un des deux (OCT 2 ou BOB 1) ne l'exprimaient que faiblement et sur un nombre restreint de cellules.

Au contraire, dans les cellules LP de LHNPL ces deux facteurs de transcription sont toujours présents et ceci est corrélé à une abondante production d'immunoglobulines. Ces données constituent non seulement un bon outil de diagnostic différentiel entre LHc et LHNPL mais permettent d'expliquer l'absence de synthèse d'immunoglobulines dans les LHc ne présentant pas de « crippling mutations ».

PU.1 est également un facteur de transcription impliqué dans la différenciation lymphocytaire B et notamment dans la régulation des gènes codant pour les immunoglobulines, CD79a et CD20. Comme OCT 2 et BOB 1 il n'est pas exprimé par les CRS, mais présent au sein des cellules LP (54).

De la même façon, de nombreux gènes jouant un rôle clé dans la différenciation lymphocytaire B ont été décrits comme inhibés ou fonctionnellement altérés dans les CRS (42). Il s'agit notamment d'**EBF** (55), **TCF3/E2A** (55) et **PAX5** (49).

ID2 est un gène responsable de l'inhibition de nombreux facteurs de transcription impliqués dans la différenciation B, et notamment d'E2A et de PAX5. Une amplification ou un gain génomique du locus d>ID2 est rapporté dans 50% des LHc (56).

Notch 1 est un récepteur transmembranaire fortement exprimé par les CRS. Il est activé par son ligand jagged 1 qui est produit par les cellules du microenvironnement. Notch 1 induit physiologiquement une différenciation lymphocytaire T et inhibe la différenciation lymphocytaire B. Dans les CRS Notch 1 agit en perturbant le réseau de facteurs de transcription normalement exprimés dans les lymphocytes B en antagonisant EBF et E2A. Par ailleurs l'expression de Notch 1 induit l'expression aberrante de gènes NON lymphocytaires B, notamment TCF-1 et T-bet connu comme étant impliqués dans la différenciation lymphocytaire T (57, 58).

Des phénomènes épigénétiques sont également impliqués dans l'inhibition de la différenciation lymphocytaire B. En effet plusieurs équipes ont montré sur des CRS microdisséquées que l'inhibition de gènes jouant un rôle clé dans la différenciation lymphocytaire B est sous la dépendance de la méthylation de leurs promoteurs (59, 60).

8 La survie des CRS est sous-tendue par le dérèglement de nombreuses voies de signalisation intracellulaires

Les CRS sont des cellules B incapables de synthétiser des immunoglobulines. Ce paradoxe devrait normalement aboutir à leur mort par apoptose.

La survie et la prolifération des CRS s'expliquent en grande partie par l'activation permanente des principales voies de signalisation intracellulaires, au premier rang desquelles la voie NF κ B.

8.1 Activation constitutive de NF κ B

Depuis longtemps on connaît le lien entre inflammation et cancer. Les modèles de cancers survenant dans un contexte d'inflammation chronique concernent essentiellement des carcinomes. Le modèle le mieux documenté est celui des cancers coliques survenant après des années d'évolution d'une maladie intestinale inflammatoire chronique (maladie de Crohn et rectocolite ulcérohémorragique) (61).

L'aspect histologique des LH, associant de rares cellules tumorales dans un abondant microenvironnement inflammatoire, en fait également un membre potentiel du groupe des cancers liés à l'inflammation.

Longtemps le lien entre inflammation et cancer est resté mystérieux.

Aujourd'hui il est très largement reconnu que ce lien est, au moins en grande partie, représenté par la voie du Nuclear Factor κ B (NF κ B) et que son activation constitutionnelle constitue le cœur de la physiopathologie des LH. C'est en effet vers cette voie que convergent de nombreuses stimulations qui jouent un rôle dans la lymphomagenèse Hodgkinienne. Ce sont également très souvent des effecteurs de cette voie qui sont responsables des mécanismes transformant des CRS (42).

NF κ B est un facteur de transcription physiologiquement présent dans le cytoplasme de la plupart des cellules. A l'état inactif il est associé à sa protéine inhibitrice I κ B. Son activation se fait par phosphorylation de I κ B par les kinases I κ K α et I κ K β . Cette phosphorylation entraîne la dégradation de I κ B et la libération de NF κ B ainsi activé. Dans le noyau NF κ B va activer la transcription de très nombreux gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, l'inflammation, la réaction immunitaire, l'angiogenèse, l'invasion, la migration métastatique (62). NF κ B joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire aux agents pathogènes, la prolifération et la transformation cellulaire, le développement des tumeurs. (63, 64). La plupart des cytokines et des facteurs de croissance sécrétés par les CRS le sont via des mécanismes qui mettent en jeu la voie NF κ B (65). L'activation de NF κ B peut se faire par plus de 150 stimuli extérieurs actuellement répertoriés (62).

Dans les LHC, les principaux facteurs connus comme pouvant activer NF κ B sont:

- l'induction par le TNF α (62), par le CD30 (66), par le CD40 ou LMP-1 (qui réalise une stimulation CD40-like) (67) et par le Receptor Activator of NF κ B (RANK) (68) ;
- par mutation inhibitrice du gène de son inhibiteur I κ B (69) ;
- par activation constitutive de la I κ K (62).

Par ailleurs nous verrons que NF κ B interagit avec d'autres voies de signalisation intracellulaires, soit en aval soit en amont de celles-ci.

8.2 Activation constitutive de la voie Akt/ phosphatidyl-inositide 3 kinase (pi3 kinase) (70)

La voie de la pi3 kinase peut être activée par un grand nombre de stimuli extracellulaires et aboutit à la synthèse de lipides inositols qui sont des médiateurs clés dans de nombreuses voies intracellulaires. La pi3 kinase consiste en une unité catalytique de 110 KDa associée à une sous-unité régulatrice p85. Elle est impliquée dans des voies de transduction clés au sein des cellules B, notamment celles liées à l'engagement du BCR et de CD40. La plupart des effets survenant en aval de la pi3

kinase sont médiés par une autre kinase, akt. Un des rôles majeurs d'akt est de promouvoir la survie cellulaire et son implication est maintenant bien connue dans de nombreux cancers (71). Son activité anti-apoptotique se fait notamment par phosphorylation de Bad, inhibition de la caspase 9 et activation de NF κ B (72, 73). Akt augmente également la survie cellulaire en inhibant GSK-3 par phosphorylation (74). GSK-3 est une kinase qui, quand elle est activée, maintient inactives des protéines telles que les cyclines D ou c-myc. Une autre cible d'Akt est mTOR (mammalian target of rapamycin) qui régule la synthèse protéique via la phosphorylation de ses substrats, la kinase S6 et le facteur d'élongation 4E-BP1. Il a été montré que dans des CRS de culture, comme dans les CRS issues de tumeurs, akt est constitutionnellement activée par phosphorylation par la pi3 kinase et que l'inhibition de la pi3 kinase entraîne une diminution de la survie des CRS (70).

Il a également été montré que les substrats de mTOR, la kinase S6 et le facteur d'élongation 4E-BP1, sont phosphorylés dans les CRS et ce sous la dépendance de mTOR et de la pi3 kinase. De façon intéressante l'inhibition de mTOR par la rapamycine entraîne une baisse significative de la survie des CRS, mais cette baisse est beaucoup plus importante en présence de Doxorubicine (en plus de la rapamycine), suggérant une synergie entre les deux molécules.

8.3 Rôle de la voie MEK/ERK

Les Mitogen Activated Protein kinases (MAP kinases) sont des sérines/Thréonines kinases qui sont activées par des signaux extracellulaires dont elles assurent la transmission jusqu'au noyau.

Chez les mammifères 3 grandes voies de MAP kinases ont été décrites : extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 MAPK, Jun N-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinase (SAPK) kinase, et p38 kinase.

Dans la voie ERK, l'activation du récepteur tyrosine kinase par un facteur de croissance entraîne la translocation sur la membrane cellulaire de Son of Sevenless (SOS) et la phosphorylation et l'activation d'une cascade de kinases incluant Ras, Raf, MAP/ERK kinase (MEK) et ERK. La forme activée, phosphorylée de ERK passe

alors dans le noyau et phosphoryle des facteurs de transcription qui agissent sur la prolifération cellulaire et la différenciation (75).

L'activation constitutive des kinases MEK/ERK est rapportée dans de nombreuses lignées cellulaires, ainsi que dans des cancers du sein et certaines leucémies (76, 77). Cette activation constitutive serait à l'origine de certaines résistances aux agents anti-cancéreux et il a été démontré que des agents anti-MEK/ERK sont capables de potentialiser certaines chimiothérapies et le Glivec (78, 79, 80).

L'inhibition de la voie Ras/MEK/ERK entraîne un arrêt du cycle cellulaire et une mort cellulaire (81).

Il a été montré en western blot sur des CRS de culture et en immunohistochimie sur des CRS de tumeurs, que la forme active de ERK est fortement exprimée par les CRS (82). L'inhibition de MEK (la kinase située au dessus de ERK dans la cascade de phosphorylations) par la petite molécule UO126 inhibe la phosphorylation de ERK et a une action antiproliférative temps et dose dépendante sur des CRS en culture. UO126 a un effet sur la concentration intracellulaire de bcl2, mcl-1 et c-FLIP et entraîne un arrêt du cycle cellulaire ou une mort par scanner Enfin la stimulation dans les CRS de CD30, CD40 et RANK par leurs ligands respectifs entraîne une augmentation de la survie cellulaire et une augmentation de ERK phosphorylé suggérant une interaction forte entre ces différentes voies.

8.4 Rôle de la voie JAK-STAT

Cette voie d'oncogenèse peut être stimulée par de nombreuses cytokines et facteurs de croissance.

Elle comprend des récepteurs transmembranaires (JAK1, JAK2, JAK 3, TYK2) qui possèdent une activité tyrosine kinase intracytoplasmique. Les molécules STAT sont présentes dans le cytoplasme et sont phosphorylées par les récepteurs JAK activés. Les STAT phosphorylées dimérisent et migrent dans le noyau où elles agissent comme des facteurs de transcription activant des gènes impliqués dans la survie, la différenciation, la prolifération.

Kube et al ont montré que STAT3 est constitutionnellement activée dans les CRS (83), de même que STAT 6 et STAT5a (84).

SOCS-1 est un gène cible de la voie JAK/STAT et a un effet suppresseur de tumeur par rétrocontrôle négatif sur la voie. Weniger et al ont montré sur des CRS microdisséquées et sur différentes lignées de CRS que l'activation constitutionnelle de la voie JAK/STAT (accumulation nucléaire de phospho-STAT5) est corrélée à la présence de mutations délétères du gène SOCS-1 (85).

De la même façon Mottock et al ont montré dans des LHNPL une corrélation entre des mutations de SOCS-1 et la forte expression/activation de JAK2 et STAT6 (86).

Enfin, des altérations géniques à type de gain ou d'amplification de JAK2 sont retrouvées dans 40% dans cas de LHc (87).

8.5 Activation constitutive de AP-1 (88)

L'activator Protein-1 (AP-1) est formé d'homo et d'hétérodimères des familles Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) et ATF. Ces facteurs de transcription sont exprimés à l'état basal dans la plupart des cellules de mammifères. Leur niveau d'expression augmente rapidement sous l'effet de signaux extracellulaires et ils activent à leur tour les grandes voies de signalisation intracellulaires telles que les voies JUNK, MAP Kinases et ERK. L'activation d'AP-1 est régulée au niveau de l'expression et de modifications post-translationnelles des différentes sous-unités du complexe. Cette régulation nécessite un ajustement très fin de l'activité de chaque sous-unité, puisque chacun des facteurs de transcription peut avoir des fonctionnalités différentes voire antagonistes tel que cela a été démontré pour c-Jun et JunB.

L'action d'AP-1 est en général induite par des signaux de stress, tels que les UV, mais aussi par des facteurs de croissance. Elle aboutit à une stimulation de la division cellulaire et une régulation de l'apoptose, notamment par une modulation de l'expression de la cycline D1 et de p53. Bien que des travaux sur des modèles murins et des lignées cellulaires suggèrent un rôle oncogène des protéines jun, leur capacité oncogénique n'est pas clairement démontrée et comprise.

Mathas et al ont mis en évidence une très forte activation constitutionnelle de c-Jun et JunB dans les CRS et, à un moindre degré dans les lymphomes anaplasiques, mais pas dans les autres types de lymphomes, suggérant que ces deux facteurs de transcription jouent un rôle très important, constant et spécifique dans la lymphomagenèse Hodgkinienne. Leur activation est indépendante de la voie des MAPkinases. L'activation de c-jun est également indépendante de NFκB, alors que celle de junB est NFκB-dépendante, NFκB ayant donc une action sur la composition et donc la fonctionnalité du complexe AP-1.

Par ailleurs l'action d'AP-1 est synergique de celle de NFκB, notamment dans l'activation de CCR7 (une molécule de homing lymphocytaire) et de la cycline D2, soulignant l'intrication complexe de ces différentes voies intracellulaires dans la biologie du lymphome.

8.6 Activation aberrante de récepteurs tyrosine kinase (RTK)

L'activité exagérée d'un récepteur tyrosine kinase, notamment suite à une mutation ponctuelle activatrice, est un mécanisme oncogénique bien connu dans de très nombreux cancers et peut constituer une cible thérapeutique : mutations du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGFR) dans le cancer du poumon, de kit, de PDGFRA et B dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) pour ne citer que les exemples les plus emblématiques (89).

Dans les cellules B matures, bien que certaines tyrosines kinases aient un rôle essentiel dans la signalisation intracellulaire en aval du BCR, peu de récepteurs tyrosine kinase ont été décrits. Seuls ont été décrits l'expression de TKRA (tyrosine kinase receptor A), essentiel dans la survie des cellules B mémoires (90), et de MET dans les cellules B du centre germinatif où il joue un rôle dans les interactions entre les lymphocytes B et les cellules du stroma (91).

Malgré cette absence d'expression de RTK dans leur contrepartie physiologique, il a été rapporté que les CRS présentent une expression et une activation aberrante de 6 récepteurs tyrosine kinase: PDGFRA, DDR2, EPHB1, RON, TRKB, et TRKA (92). Dans cette étude la plupart des tumeurs étudiées présentaient une expression

aberrante d'au moins un récepteur tyrosine kinase et la majorité en présentaient plusieurs, le sous-type histologique scléronodulaire étant plus volontiers associé à cette expression aberrante.

La recherche en immunohistochimie des ligands de ces récepteurs dans le microenvironnement des CRS a montré que DDR2 et TRKA sont activés sur un mode paracrine, alors que PDGFRA et EPHB1 semblent plutôt activés selon une boucle autocrine.

Enfin, ces auteurs ne mettent pas en évidence de mutation des gènes de ces différents RTK et l'action de l'imatinib (un antityrosine kinase ayant une activité anti-PDGFRA notamment) sur des CRS de culture (KMH2) reste très limitée, suggérant que l'effet oncogène de l'activité autocrine de PDGFRA est peu important dans la lymphomagenèse Hodgkinienne, ou que l'inhibition de cette activité PDGFRA aberrante peut facilement être compensée par d'autres mécanismes (notamment la mise en jeu des autres RTK sur lesquels l'imatinib n'a pas d'effet).

Récemment la même équipe a rapporté que ces activations constitutionnelles de RTK sont plus fréquentes dans les cas EBV-, suggérant que ce mécanisme pourrait constituer un mécanisme alternatif permettant à la CRS de « palier » l'absence de l'EBV (93).

8.7 Altérations des voies de l'apoptose

Les CRS sont des cellules d'origine centrogerminative caractérisées par leur absence d'expression d'immunoglobulines de surface et qui, dans certains cas, présentent des mutations délétères des IgVH (*crippling mutations*). Toutes les cellules centrogerminatives qui présentent l'une ou l'autre de ces caractéristiques sont vouées à l'apoptose. La survie des CRS témoigne donc d'une altération de leurs mécanismes apoptotiques.

L'insensibilité des CRS à l'apoptose n'est pas due à une absence ou à une mutation de CD95/Fas (le récepteur qui, lorsqu'il est engagé par Fas Ligand va déclencher les voies de signalisation intracellulaires, notamment la cascade des caspases, aboutissant à la mort par apoptose) puisque les CRS expriment un CD95 fonctionnel (94).

L'un des mécanismes permettant la survie des CRS dans le centre germinatif puis dans la tumeur implique une surexpression de c-FLIP (cellular FLICE-inhibitory protein), une protéine antiapoptotique (95).

Lorsque CD95/Fas est engagé par FasL il s'associe au Fas-associated death domain-containing protein (FADD). FADD va à son tour se lier à la caspase 8 (FLICE), formant ainsi le death-inducing signaling complex (DISC). c-FLIP est une protéine qui ressemble structurellement à la caspase 8 mais qui est dépourvue de son activité protéolytique. L'incorporation de c-FLIP au DISC a donc pour conséquence une interruption de la mise en œuvre de l'apoptose. En physiologie c-FLIP permet de contrôler l'apoptose et son expression est sous la dépendance de NFκB.

Il a été montré en immunohistochimie que les CRS expriment fortement CD95 mais également c-FLIP et tous les constituants du DISC. Les cellules réactionnelles présentes au contact des CRS expriment FAS Ligand et en microscopie confocale on peut visualiser c-FLIP recruté sous la membrane cytoplasmique des CRS, suggérant un engagement de la voie FAS/FAS Ligand et un recrutement de c-FLIP au sein du DISC.

Par ailleurs le traitement des CRS de culture avec un inhibiteur de NFκB entraîne l'inhibition de c-FLIP et une restauration de leur sensibilité à l'apoptose.

De même une inhibition de c-FLIP par des siARN (connus pour être de puissants inhibiteurs de c-FLIP) restaure également la sensibilité des CRS à l'apoptose.

Il ressort de l'ensemble de ces données que la voie FAS/FAS Ligand est bien exprimée par les CRS, mais qu'elle est fonctionnellement inhibée par l'hyperexpression de son inhibiteur c-FLIP selon un mécanisme NFκB dépendant.

D'autres mécanismes ont été rapportés comme pouvant expliquer la dérégulation de la machinerie de l'apoptose dans les CRS : Kashard et al (96) ont montré que des CRS de culture ont un déficit constitutionnel en caspase 3 secondaire à une hyperexpression de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), un des inhibiteurs physiologiques de la caspase 3.

9 Le microenvironnement Hodgkinien : sa composition, son rôle dans la survie des cellules tumorales

9.1 L'anergie qui règne au sein du microenvironnement Hodgkinien est sous-tendue par les lymphocytes T régulateurs (Treg)

On sait depuis longtemps que les patients atteints de LHc présentent un déficit d'immunité cellulaire. Dès 1902 Dorothy Reed avait mis en évidence une baisse de l'hypersensibilité de type I chez les patients atteints de LHc, avec comme conséquence une grande sensibilité aux infections, notamment à la tuberculose (97). Depuis d'autres signes suggérant un déficit d'immunité cellulaire de ces patients ont été rapportés, notamment le faible taux de rejet de greffe cutanée, la prédisposition à faire une GVH après transfusion, la faible réponse de leurs leucocytes aux agents mitogènes in vitro (98, 99, 100).

Cette anergie constatée à l'échelle de l'organisme du patient se retrouve au sein du microenvironnement autour des CRS. En effet les lymphocytes extraits d'un ganglion de LHc répondent anormalement peu à une stimulation par un mitogène tel que la concanavaline A ou à un antigène mycobactérien (PPD) (101).

Par ailleurs lorsque l'on met en contact in vitro les lymphocytes T extraits du microenvironnement d'un ganglion de LHc et les cellules mononuclées du sang périphérique du patient (PBMC) ces dernières ne peuvent à leur tour plus être activées (101).

Ainsi non seulement les lymphocytes T du microenvironnement Hodgkinien sont incapables de répondre à une stimulation, mais ils exercent également une inhibition sur les cellules qui les entourent.

L'intérêt de cette anergie pour les CRS est évident : elle permet leur survie malgré l'abondant contingent de cellules immunitaires qui les entourent et représente un moyen de se mettre à l'abri des défenses anti-tumorales de l'hôte.

Il a longtemps été admis que le microenvironnement des LHc était constitué de cellules T CD4⁺ de type Th2 responsables de cette anergie par inhibition locale de la réponse Th1 cytotoxique (102).

Cependant, si les cellules Th1 cytotoxiques sont effectivement minoritaires dans le microenvironnement des LHc, il n'y a jamais été formellement mis en évidence de

production massive des cytokines clés de la réponse Th2 que sont l'IL4 et l'IL13 (102), suggérant que l'anergie constatée et l'absence d'immunité anti-tumorale efficace sont sous-tendues par des phénomènes plus complexes que le seul maintien d'une réponse Th2 exclusive autour des CRS.

Depuis quelques années il apparaît que la dichotomie classique entre sous-population lymphocytaire T CD4 « Th1 » (qui oriente la réponse immunitaire préférentiellement vers des mécanismes effecteurs cellulaires cytotoxiques) et la sous-population « Th2 » (qui l'oriente vers des mécanismes effecteurs humoraux) est probablement assez simpliste et un grand nombre de travaux se sont focalisés sur une nouvelle sous-population T CD4 : les cellules T CD4 régulatrices (Treg).

Les Treg sont définis par un profil d'expression CD4+/CD25+/CD127-/CTLA4+/FOXP3+ et sont capables, au moins pour certains d'entre eux, de sécréter l'interleukine inhibitrice IL10. Ils sont connus pour leur action d'inhibition des mécanismes effecteurs de la réponse immunitaire. Ils ont un rôle dans le contrôle des mécanismes de défense contre les antigènes du Non Soi. Leur importance a notamment été montrée dans le contrôle des mécanismes de rejet de greffe et dans la protection contre les maladies autoimmunes (103-109).

Ils ont également un rôle dans le contrôle des défenses anti-tumorales comme le suggèrent des expériences sur la souris : lorsque l'on déplete une souris en Treg en lui injectant un anticorps anti-CD25, celle-ci rejette systématiquement les greffes de tumeur syngénique (110, 111) suggérant que les Treg sont capables d'inhiber les cellules T cytotoxiques CD8+ et NK à l'origine de l'activité antitumorale.

Ces constatations expérimentales sont en accord avec la notion qu'un abondant contingent de Treg dans le microenvironnement tumoral est corrélé à un moins bon pronostic dans la plupart des cancers solides : cancer du poumon, cancer du pancréas, de l'estomac, du foie, de l'ovaire et du sein (112-118).

Il a été montré que le microenvironnement des ganglions de LHC contient plus de 50% de lymphocytes T CD4+ avec un phénotype de cellules régulatrices et que celles-ci sont capables d'inhiber les cellules immunitaires effectrices par sécrétion d'IL10, par contact cellule-cellule, ou via l'action de CTLA-4 (une molécule immunomodulatrice de la famille B7/CD28) chacun de ces mécanismes pouvant

intervenir en proportion variable d'un cas à l'autre (42, 101). Il est donc aujourd'hui admis que l'anergie qui règne au sein du microenvironnement Hodgkinien est, au moins en grande partie, sous-tendue par la présence d'un abondant contingent de Treg.

Pourtant le rôle des Treg dans l'échappement tumoral est moins clair. En effet, contrairement à ce qui a été observé dans les tumeurs solides, plusieurs études ont montré qu'un grand nombre de Treg dans le microenvironnement des LHC est corrélé à un meilleur pronostic, qu'un grand nombre de cellules cytotoxiques est corrélé à un moins bon pronostic et qu'un ratio Treg/cellules cytotoxiques bas est associé à un mauvais pronostic (119, 120, 121). Ces constations sont cohérentes avec celles faites dans les lymphomes folliculaires (122).

Plusieurs hypothèses sont avancées dans la littérature pour tenter d'expliquer ce paradoxe.

La présence de nombreux Treg pourrait être malgré tout le reflet d'une réaction immunitaire « active » au sein du microenvironnement tumoral, aboutissant donc plutôt à un bon pronostic. Dans cette hypothèse la présence des Treg serait donc interprétée comme une réaction de la tumeur contre une bonne réponse des défenses anti-tumorales de l'hôte.

La deuxième hypothèse serait que l'action immunosuppressive exercée par les Treg pourrait priver les CRS de sécrétions cytokiniques issues du microenvironnement dont elles ont besoin pour survivre. Enfin, les Treg pourraient avoir un rôle anti-tumoral propre en interagissant directement avec les CRS.

A ce jour ces trois hypothèses restent à valider.

Récemment Schreck et al (123) ont caractérisé les différentes sous-populations de lymphocytes T infiltrant la tumeur (TIL, Tumor Infiltrating Lymphocytes) en immunohistochimie en utilisant un anti-FoxP3 pour marquer les Treg, un anti-T-Bet pour marquer les cellules Th1, un anti-c-Maf pour marquer les Th2, et un anti-Granzyme B pour marquer les cellules cytotoxiques. FoxP3, T-Bet et c-Maf sont des facteurs de transcription qui sont exprimés de façon plus ou moins spécifique respectivement par les Treg, les Th1, les Th2. Autant l'expression de FoxP3 semble assez restreinte aux Treg, autant celles de T-Bet se retrouve également dans des lymphocytes B, et celle de c-Maf dans des macrophages. Les auteurs contournent

en partie ces difficultés par la validation morphologique de leurs immunomarquages (notamment pour différencier l'expression de c-Maf sur les macrophages versus celle des LT) et par des expériences de doubles marquages. Par ces expériences ils confirment que les TIL sont majoritairement constitués de lymphocytes Th2 c-Maf⁺ et de Treg FoxP3⁺ alors que les cellules Th1 t-Bet⁺ et les cellules cytotoxiques granzyme B⁺ sont peu abondantes.

Dans cette étude les auteurs mettent également en évidence qu'un grand nombre de cellules Th2 dans le microenvironnement est corrélé à un bon pronostic. Cette constatation est étonnante au regard des données « classiques » puisqu'il est généralement admis que les Th2 ont un rôle de « support » des cellules tumorales en leur procurant un microenvironnement propice à leur croissance. Cependant certaines expériences chez la souris (124, 125) ont montré que les cellules Th2 sont capables d'activer des cellules de l'immunité innée telles que les polynucléaires éosinophiles et les macrophages. Les auteurs font donc l'hypothèse que dans le cas précis du microenvironnement des LHC les cellules Th2 pourraient être indirectement impliquées dans la réaction anti-tumorale en stimulant l'immunité innée.

Les Treg sont recrutés au sein du microenvironnement par les CRS notamment grâce à l'expression par celles-ci de galectine 1 (Gal-1) (126).

Les galectines sont des molécules capables de créer une immunomodulation et un échappement tumoral. L'un des membres de cette famille, la galectine 1, est exprimé par les CRS. Gal-1 reconnaît d'autres glycoprotéines transmembranaires telles que CD45, CD43 et CD7 et est capable d'inhiber la physiologie lymphocytaire T et d'induire une immunomodulation.

Gal-1 est donc un excellent candidat pour participer à l'immunodépression créée par les CRS autour d'elles.

Dans des modèles murins de maladies inflammatoires chroniques une Gal-1 recombinante est capable de diminuer la réaction inflammatoire Th-1. De la même façon, dans un modèle murin de mélanome, le blocage de Gal-1 augmente le rejet des greffes tumorales syngéniques. Dans les carcinomes épidermoïdes ORL la surexpression de Gal-1 est inversement corrélée au nombre de lymphocytes T infiltrant la tumeur et est un facteur de mauvais pronostic.

Juszcynski et al (126) retrouvent une importante expression de Gal-1 sur les CRS tant au niveau transcrit. Cette forte expression n'est pas retrouvée dans les LBGC

(notamment médiastinaux) qu'ils ont testé. Ils montrent également que l'expression sélective de Gal-1 par les CRS est sous la dépendance d'un promoteur lui-même sous la dépendance d'AP-1, facteur de transcription constitutivement activé dans les CRS. Des expériences de coculture de lymphocytes T et de CRS KO pour Gal-1 mettent en évidence une baisse de la viabilité des lymphocytes T dans les cocultures de CRS sauvages par rapport aux CRS Gal-1 KO. L'expression de Gal-1 par les CRS est donc responsable d'une diminution de la viabilité des lymphocytes T de leur microenvironnement. Cette baisse de viabilité se fait très préférentiellement sur la population Th1 et rend compte du déséquilibre Th1/Th2 constaté dans le microenvironnement tumoral des LHc. Les auteurs mettent enfin en évidence que l'action immunosuppressive de Gal-1 se fait en stimulant la production de cytokines Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) et en augmentant le nombre relatif de Treg dans le microenvironnement.

9.2 Les cytokines : moyen de communication privilégié entre les CRS et leur microenvironnement (127)

Il est aujourd'hui largement admis que les cytokines occupent un rôle central dans la biologie des LH. Ces molécules représentent un mode de communication entre les CRS et les cellules réactionnelles de leur microenvironnement. Elles jouent un rôle majeur dans le recrutement des cellules inflammatoires autour des CRS et dans la survie des CRS.

Une fois encore, NF κ B joue un rôle central puisque la synthèse d'un grand nombre de ces cytokines est sous la dépendance de cette voie de signalisation (128).

Il convient de distinguer les cytokines sécrétées par les CRS d'une part et les cytokines sécrétées par le microenvironnement d'autre part.

Les cytokines sécrétées par les CRS :

Les principales cytokines produites par les CRS sont : IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-13, TNF- α , CCL5 (RANTES), CCL17 (TARC), et CCL28.

L'IL-5 est reconnue depuis longtemps comme étant produite par les CRS (129). Elle est responsable, au moins en partie, de l'attraction dans le microenvironnement des

polynucléaires éosinophiles. Ceux ci sont probablement également attirés par la sécrétion par les CRS de $\text{TNF}\alpha$ et de CCL28 (130, 131).

D'autres cytokines expliquent le recrutement de cellules inflammatoires autour des CRS : CCL17 (TARC) est connue comme pouvant attirer des cellules de type Th2 (132) alors que CCL5 (RANTES) recrute des monocytes, lymphocytes T, mastocytes et polynucléaires éosinophiles (133)

L'IL6 et l'IL7 sont responsables de la croissance et de la différenciation des lymphocytes B (pour l'IL6) et T (pour l'IL7) du microenvironnement mais la présence sur les CRS du récepteur de l'IL6 suggère également qu'il agit sur les CRS comme un facteur de croissance autocrine (134, 135). Le même effet de facteur de croissance autocrine existe probablement pour l'IL9 (136).

La sécrétion de l'IL10 est plus fréquente dans les LHc EBV+. Elle pourrait donc être importante pour inhiber la réponse Th1 cytotoxique et constituer un mécanisme d'échappement mis en œuvre par l'EBV (137). De la même façon, CD30, un membre de la famille des TNF récepteurs, pourrait participer à l'inhibition des lymphocytes T par les CRS (138).

Le rôle de l'IL-13 semble particulièrement important. Cette interleukine est synthétisée par la CRS qui exprime également son récepteur, IL-13R α . Il s'agit d'une cytokine qui a une action sur la survie et la prolifération des cellules B. Cette sécrétion d'IL-13 sur un mode autocrine jouerait donc un rôle dans la survie et la prolifération des CRS (139).

En plus des cytokines, les CRS expriment également un grand nombre de récepteurs aux cytokines : IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL6-R, IL-9R, IL-13R, CCR7, et CXCR4. La plupart des ligands de ces récepteurs sont produits par les cellules inflammatoires du microenvironnement, suggérant un « dialogue » permanent entre les CRS et leur microenvironnement.

Les cytokines sécrétées par le microenvironnement :

En plus des ligands dont les récepteurs sont cités ci dessus, on peut citer l'IL-8, l'IL-12, CCR4, et le TGF- β .

L'IL-8 est un facteur d'attraction des polynucléaires neutrophiles (PNN). Elle agit directement sur les PNN qui possèdent deux récepteurs de l'IL-8 (CXCR1 et CXCR2). Il semble exister une corrélation entre la quantité d'IL-8 produite par le microenvironnement et la densité en PNN (140).

L'IL-12 est responsable d'une réaction de type Th1 et serait surtout présente dans le microenvironnement des LHc EBV+, alors que CCL17 (TARC) est plutôt responsable d'une réaction Th2 (132, 141).

Le TGF- β est produit par les lymphocytes T et les polynucléaires éosinophiles du microenvironnement, mais également par les CRS (142, 143). Il s'agit d'une cytokine anti-inflammatoire capable d'augmenter l'immunosuppression au sein du microenvironnement en inhibant la prolifération des lymphocytes T, ainsi que l'activité des lymphocytes B et NK. Par ailleurs le TGF- β est responsable d'une stimulation des fibroblastes et de la synthèse de collagène pouvant expliquer l'apparition de fibrose dans le sous-type scléronodulaire (144).

9.3 Programmed Death factor-1 (PD-1) : une molécule immunomodulatrice importante dans les mécanismes qui sous-tendent l'immunodépression Hodgkinienne

PD-1 est un membre de la famille B7/CD28. Cette famille regroupe des récepteurs transmembranaires capables de transmettre un second signal après engagement du TCR. Selon le membre de la famille considéré, il s'agira d'un second signal activateur ou inhibiteur. Ces récepteurs agissent comme des immunomodulateurs permettant de réguler finement la réaction immunitaire.

5 membres de cette famille sont décrits. 2 récepteurs co-activateurs : CD28 et ICOS (inducible co-stimulatory molecule); et 3 récepteurs co-inhibiteurs : CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) BTLA (B and T lymphocyte attenuator) et PD-1(145).

PD-1 est une glycoprotéine transmembranaire monomérique de 55 KDa qui appartient à la superfamille des immunoglobulines. Son gène est situé en 2q37.3, à proximité de ceux de CD28 et CTLA4 (146). Son expression est induite par l'activation des lymphocytes T CD4+, CD8+, des macrophages et des lymphocytes B (147-150). L'expression de PD-1 induit une baisse de la prolifération des lymphocytes B et T et une diminution de la production de cytokines par les lymphocytes T (151).

Deux ligands de PD-1 sont connus : PDL-1 (B7H1) et PDL-2 (B7-DC).

PDL-1 est faiblement exprimé par les cellules immunitaires avant leur activation, plus fortement par des cellules de tissus non lymphoïdes tels que le cœur, le placenta, le poumon, les muscles, le pancréas, laissant penser qu'il joue un rôle dans la modulation des réactions immunitaires qui prennent place dans les tissus périphériques. PDL-1 est également exprimé par des cellules tumorales, de cancer du rein notamment, et son expression est reliée à un mauvais pronostic (152). Enfin, chez la souris, le blocage de l'expression de PDL-1 induit une augmentation des défenses anti-tumorales et une élimination des cellules tumorales, suggérant un rôle de PD-1-PDL-1 dans les mécanismes d'échappement tumoral (153).

L'expression de PDL-2 est beaucoup plus restreinte que celle de PDL-1 puisqu'on ne le trouve que sur les macrophages et les cellules dendritiques. Son expression est induite par les cytokines, notamment Th2. Son expression a été décrite dans les lymphomes B à grandes cellules du médiastin et est associée, dans ce contexte, à un meilleur pronostic (154).

Lors de précédents travaux nous avons étudié l'expression de PD-1 et de ses ligands dans le tissu lymphoïde normal et dans une série de lymphomes (155). Dans les ganglions hyperplasiques nous avons montré en immunohistochimie que PD-1 est très essentiellement exprimé par les lymphocytes T intrafolliculaires (T_{FH}). Cette constatation a depuis été faite par d'autres et PD-1 est généralement considéré comme un bon marqueur de T_{FH} (156). Concernant les lymphomes nous avons observé une expression de PD-1 par une quantité variable de lymphocytes T non tumoraux. Les cellules tumorales n'exprimaient PD-1 que dans les Leucémie Lymphoïdes chroniques (LLC)/lymphomes lymphocytiques, et les lymphomes T de type angioimmunoblastique (LAI), beaucoup plus rarement dans les autres types de LNH. L'expression de PD-1 dans les lymphomes T LAI a été décrite par d'autres (156). Concernant les LH nous avons observé une quantité variable de PD-1 au sein du microenvironnement. Les cas les plus riches en lymphocytes T PD-1+ étaient les LHNPL au sein desquels nous trouvions systématiquement des images de « rosettes » de lymphocytes T PD-1+ directement au contact des cellules tumorales. Nous avons également mis en évidence en immunohistochimie que les cellules LP expriment PDL-1 permettant ainsi de visualiser un mécanisme potentiel d'échappement tumoral, la cellule tumorale exprimant PDL-1 et les lymphocytes T CD4+ à son contact exprimant PD-1. Nous n'avons pas observé de positivité de PDL-1 sur les cellules tumorales dans les LHc. Enfin, nous n'avons jamais observé

d'expression de PD-1 par les cellules tumorales que ce soit dans les LHc ou dans les LHNPL.

Muenst et al (157) ont étudié l'impact pronostique de la richesse en PD-1 du microenvironnement des LHc. Ils retrouvent un mauvais pronostic associé à la présence de nombreux lymphocytes T PD-1+. Ils confirment par ailleurs que les rosettes de lymphocytes T autour des cellules tumorales se retrouvent constamment dans les LHNPL, et beaucoup plus rarement (1%) dans les LHc, constatation que nous avons également fait depuis dans notre pratique diagnostique.

Yamamoto et al (158) ont également étudié l'expression de PD-1 et de ses ligands dans des lignées de cellules lymphomateuses et retrouvent une expression des deux ligands dans la plupart des lignées de LHc mais pas dans les lignées de lymphomes B. Ces auteurs ont également réalisé des cultures de tumeurs entières de LHc et mesuré la production d'interféron gamma en présence et en l'absence d'anticorps bloquant anti-PDLs. Ils mettent en évidence une nette augmentation de la sécrétion d'interféron gamma en présence de l'anticorps bloquant, suggérant ainsi que le blocage de l'interaction PD-1/PDLs est capable de restaurer une immunité cellulaire efficace au sein du microenvironnement Hodgkinien.

Au total il existe donc un faisceau de présomptions laissant penser que PD-1 joue un rôle important dans les mécanismes d'échappement tumoral mis en œuvre par les CRS et que le couple PD-1/PDL-1 est une cible thérapeutique prometteuse, le blocage de cette interaction étant susceptible de rétablir une immunité anti-tumorale efficace.

9.4 Certains LHc présentent-ils au sein de leur microenvironnement une réaction de type Th1?

Nous avons vu qu'en l'état actuel des connaissances il est généralement admis que le microenvironnement Hodgkinien est majoritairement constitué de lymphocytes Th2 et de Treg. Cependant, au moins une publication pose la question de la survenue, dans certains cas, notamment ceux liés à EBV, d'une réaction de type Th1 (159).

Dans ce travail les auteurs ont étudié en hybridation in situ l'expression de CXCL10, une interleukine dont l'expression est induite par l'interféron gamma. CXCL10 est connue pour avoir des effets anti-tumoraux médiés par les lymphocytes T exprimant CXCR3. Ils montrent que CXCL10 est exprimée par les CRS et que de nombreux lymphocytes T CXCR3 sont présents dans le microenvironnement. L'expression de CXCL10 par les CRS est corrélée au sous-type « cellularité mixte » et à la présence de l'EBV dans la tumeur.

Ainsi, même si la présence de lymphocytes T CXCR3 n'est pas un signe formel de réponse Th1, ces données suggèrent une possible réponse de type Th1 cytotoxique prédominante dans le microenvironnement de certains LHc, notamment ceux liés à l'EBV.

10 Le virus d'Epstein Barr (EBV) : son rôle dans la maladie Hodgkinienne

L'Epstein Barr Virus (EBV) est un virus à ADN de la famille des Herpes Virus. Il infecte environ 90% de la population adulte. Après une primo infection la personne infectée conserve l'EBV durant toute sa vie.

Le lien entre LHc et EBV a historiquement été suspecté devant l'observation de titres d'anticorps anti-EBV sériques élevés chez les patients atteints de LHc comparés à ceux des patients atteints d'autres lymphomes (160). Le génome de l'EBV a par la suite été mis en évidence dans les cellules tumorales de 20-25% des cas de LHc, d'abord par méthodes de southern blot, puis par hybridation in situ (161, 162).

Aujourd'hui la technique courante la plus sensible pour détecter l'infection latente des CRS par l'EBV repose sur la mise en évidence par hybridation in situ des ARNm viraux, EBER1 et 2 (163). On peut également mettre en évidence en immunohistochimie la protéine de latence LMP-1.

Le profil de latence viral est de type 2, avec expression de LMP-1 (Latent Membrane Protein-1), LMP-2, EBER 1 (EBV-encoded RNA 1) et 2, EBNA 1 (Epstein Barr Nuclear Antigen 1) (EBNA2 n'est pas exprimé). Dans les LHc du sujet HIV la prévalence de l'EBV est proche de 100% des cas (2). L'EBV n'est jamais retrouvé dans les cellules tumorales des LHNPL dont la pathogénie ne semble pas impliquer l'EBV (2).

Dans les LHc EBV+, le génome de l'EBV est présent dans les CRS sous forme clonale, indiquant une infection précoce de la cellule tumorale, avant sa transformation (162). Par ailleurs le génome de l'EBV persiste dans les cellules tumorales durant toute la maladie, ainsi que dans les sites de dissémination (164).

Enfin, il a été montré que le risque de développer un LHc est 2 à 5 fois plus élevé chez les personnes ayant présenté un tableau de mononucléose infectieuse par rapport aux patients qui n'en n'ont pas fait (et qui peuvent avoir contracté l'EBV lors d'une primo-infection asymptomatique ou peu symptomatique) (165). Ce risque supérieur lié à un antécédent de MNI n'est pas retrouvé pour les LHc EBV- (166, 167). Corroborant cette constatation il n'a jamais été mis en évidence de génome de l'EBV

dans les CRS de LHc EBER négatifs, laissant penser que l'EBV ne joue pas de rôle dans les LHc EBV- (168, 169). Ceci n'est pas en faveur de la théorie du « hit and run » envisagée par certains, selon laquelle le virus pourrait initier la lymphomagenèse puis disparaître (expliquant les cas EBV-), ou persister (dans les cas EBV +).

La proportion de cas de LHc EBV+ varie selon l'origine géographique/ethnique, le milieu social et sanitaire, l'âge, le sexe, le sous-type histologique (2, 6).

Ainsi la prévalence des cas EBV+ est plus importante dans les pays en voie de développement, possiblement en raison d'une immunodépression latente et/ou d'un contact plus précoce avec l'EBV. Les Enfants (avant 10 ans notamment) et les sujets âgés font plus souvent des LHc EBV+, de même que les hommes, les asiatiques et les hispaniques (par rapport aux blancs et aux noirs). Le sous-type cellularité mixte est le plus fortement relié à l'EBV (170).

L'aspect histopathologique et immunohistochimique des LHc EBV+ est identique à celui des LHc EBV-. Cependant cette ressemblance est vraisemblablement superficielle et les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les cas EBV+ et ceux qui sous-tendent les cas EBV- sont potentiellement différents.

Quels rôles joue l'EBV dans les événements transformant des LHc ?

L'intervention de l'EBV dans la lymphomagenèse pourrait être très précoce, avant la sortie de la cellule du centre germinatif, puisqu'il a été montré que l'EBV pouvait sauver de l'apoptose des cellules centrogerminatives BCR-déficientes d'une part, et qu'il est capable de sauver également des cellules B présentant des mutations délétères (*crippling mutations*) des IgVH (171-173). Par ailleurs, comme nous l'avons vu, l'EBV est retrouvé dans les CRS durant l'évolution de la maladie, suggérant qu'il est nécessaire au maintien du phénotype tumoral.

LMP-1 joue un rôle clé dans la lymphomagenèse des LHc EBV+ en activant différentes voies de signalisation intracellulaire.

LMP-1 est capable d'activer la voie NFκB par l'intermédiaire de ses deux extrémités c-terminales : c-terminal activation region (CTAR) 1 et 2. CTAR1 active la voie NFκB

via TRAF3, NIK, I κ K alpha, alors que CTAR2 l'active via TRAF6, TAK1 et I κ K b β (174). LMP-1 peut activer la voie des MAPkinases r $\acute$ esultant en une activation de ERK, JNK, p38 et peut stimuler la voie JAK/STAT (175-178).

LMP-1 se comporte donc comme un membre de la famille des TNF r $\acute$ cepteurs qui activerait en permanence les voies de signalisation intracellulaires d'une fa $\acute$ on totalement ligand ind $\acute$ pendante.

LMP-1 est capable de prot $\acute$ ger la cellule de l'apoptose en induisant la synth $\acute$ se de mol $\acute$ cules antiapoptotiques telles que Bcl2 et Mcl1 (un autre membre de la famille Bcl2 qui s'h $\acute$ t $\acute$ rodim $\acute$ rise avec Bax, un puissant acc $\acute$ l $\acute$ rateur d'apoptose dont il neutralise ainsi la cytotoxicit $\acute$) (179-182).

Dutton et al ont mis en $\acute$ vidence le r $\acute$ le de **Bmi-1** dans les $\acute$ v $\acute$ nements transformant induits par LMP-1 (183). Bmi-1 appartient $\acute$ l'un des deux complexes r $\acute$ pressifs du groupe de g $\acute$ nes polycomb (Polycomb Repressif Complex 1, PRC1). Les g $\acute$ nes du groupe polycomb sont n $\acute$ cessaires $\acute$ la prolif $\acute$ ration et au maintien des cellules embryonnaires et des cellules souches de l'adulte, $\acute$ l'embryogen $\acute$ se et $\acute$ la r $\acute$ gulation du cycle cellulaire. Les deux complexes r $\acute$ pressifs, dont Bmi-1 fait partie, permettent d'initier et de maintenir l'extinction des g $\acute$ nes polycomb. Chez des souris transg $\acute$ niques Bmi-1 engendre l'apparition de syndromes lymphoprolif $\acute$ ratifs et de lymphomes. Bmi-1 est tr $\acute$ s fortement exprim $\acute$ dans les LBGC, les lymphomes du manteau et les CRS des LHc. Les auteurs montrent que l'expression de Bmi-1 est induite par LMP-1, selon un processus NF κ B d $\acute$ pendant. De fa $\acute$ on int $\acute$ ressante, Bmi-1 est $\acute$ galement up-r $\acute$ gul $\acute$ dans les LHc EBV-, et dans ces cas l $\acute$ son up-r $\acute$ gulation pourrait se faire, en l'absence de LMP-1, via d'autres m $\acute$ canismes d'activation de la voie NF κ B, tel qu'une mutation de I κ B α .

Le fait de r $\acute$ aliser un KO de Bmi-1 diminue consid $\acute$ rablement la survie des CRS, sugg $\acute$ rant que l'action immortalisante de NF κ B est tr $\acute$ s largement d $\acute$ pendante de Bmi-1.

Par ailleurs l'analyse des g $\acute$ nes cibles de Bmi-1 r $\acute$ v $\acute$ le qu'il inhibe l'expression d'un grand nombre de g $\acute$ nes impliqu $\acute$ s dans la diff $\acute$ renciation lymphocytaire B dont CD20, participant donc $\acute$ l'acquisition par la CRS d'un ph $\acute$ notype B aberrant.

LMP-2A est également fortement exprimé par les CRS dans les cas de LHc EBV+. LMP2A se localise à la membrane nucléaire et simule un récepteur B activé (BCR). Cependant l'activation du BCR est inopérante dans les cellules LMP2A+. Il a été montré que LMP2A réalise une interaction compétitive avec le BCR en fixant les protéines tyrosine kinases Src et Syk, indispensables aux phénomènes induits par l'activation de BCR (184). Chez la souris transgénique LMP2A inhibe l'expression de nombreux gènes impliqués dans la différenciation lymphocytaire B tels que PU.1, CD19, CD20 et stimule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (KI67, PCNA) et la protection contre l'apoptose (BCLXL, survivin) (185).

Baumfort et al ont mis en évidence le rôle de la stimulation de **l'autotaxine** par l'EBV dans la croissance et la survie des CRS (186). L'autotaxine est une phospholipase D capable de générer de l'acide lysophosphatidique (ALP). L'ALP joue un rôle dans l'oncogenèse, comme le suggèrent les forts taux retrouvés dans l'ascite des patientes présentant un cancer de l'ovaire. L'autotaxine est connue pour intervenir dans la survie cellulaire, la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse. Dans ce travail les auteurs montrent que la synthèse de l'autotaxine est stimulée par l'EBV dans les CRS, que cette synthèse d'autotaxine s'accompagne d'une synthèse d'ALP. Le KO de l'autotaxine dans des CRS infectée par l'EBV a pour conséquence une baisse de la synthèse d'ALP et une altération de la survie et de la prolifération des CRS.

Dans un autre travail, la même équipe suggère un mécanisme d'échappement de l'EBV aux défenses immunitaires (187). Par une étude d'expression transcriptomique sur tissu total de LHc et de CRS de culture les auteurs mettent en évidence une expression plus importante du gène de la chémokine CCL20 par les CRS des LHc EBV+ par rapport aux LHc EBV- et aux cellules B centrogerminative (EBV-) de culture. Ce résultat était validé en PCR quantitative retrouvant effectivement une production plus importante de CCL20 dans un contexte de LHc EBV+. En immunohistochimie les CRS EBV+ sont fortement marquées par l'anti-CCL20, contrastant avec le peu de cellules positives dans les cas EBV-. Lorsqu'ils transfectent des CRS de culture KM-H2 avec un transgène EBNA1 les auteurs observent une induction de la synthèse de CCL20. Ainsi l'EBV est capable d'induire l'expression de CCL20 par les CRS via l'expression d'EBNA1.

Enfin par des expériences de chémoattraction les auteurs montrent que la synthèse de CCL20 par les CRS EBNA1+ est responsable de l'attraction de Treg CD25+ FoxP3+.

Ainsi l'EBV qui infecte les CRS serait capable, par la production de CCL20, d'induire l'enrichissement du microenvironnement en Treg qui vont inhiber la réaction immunitaire cytotoxique anti-virale et anti-tumorale.

De façon intéressante les auteurs ne retrouvent pas de différence significative de la quantité de Treg dans les LHc EBV+ par rapport aux LHc EBV-, suggérant qu'il existe dans les LHc EBV- des mécanismes alternatifs de recrutement des Treg.

De façon générale il semble que l'ensemble des mécanismes de la lymphomagenèse Hodgkinienne impliquant l'EBV puissent être remplacé, dans les LHc EBV-, par des mécanismes alternatifs mettant en jeu les mêmes voies de signalisation intracellulaire mais avec un stimulus initial alternatif.

L'exemple le plus flagrant est celui de NFκB qui peut être mis en jeu par LMP-1 dans les LHc EBV+, ou par une mutation inactivatrice de son inhibiteur IκB.

11 Facteurs pronostiques classiques des lymphomes Hodgkiniens

En pratique quotidienne les patients atteints de LH sont stratifiés selon leur pronostic en utilisant deux outils : le stade Ann Arbor (et la classification EORTC qui en dérive) et le score pronostique international d'Hasenclever (188-190).

11.1 La classification d'Ann Arbor

Modifiée à la conférence de Cotswolds, elle s'est établie comme suit (189) :

Stade I : atteinte d'une seule aire ganglionnaire (I) ou d'un seul site extralymphatique (IE).

Stade II : atteinte d'au moins deux aires ganglionnaires situées du même côté du diaphragme (II) ou extension extralymphatique contiguë associée à au moins une aire ganglionnaire atteinte du même côté du diaphragme (IIE).

Stade III : atteinte sus et sous diaphragmatique (III), éventuellement associée à une atteinte extralymphatique contiguë (IIIE).

Stade IV : atteinte diffuse d'un ou de plusieurs organes extralymphatiques avec ou sans atteinte ganglionnaire associée.

Au stade on adjoint la lettre « A » en l'absence de signe généraux, ou « B » en présence de signes généraux (perte pondérale inexpliquée >10% sur les 6 derniers mois, fièvre récurrente inexpliquée >38°C, sueurs nocturnes). Le terme de « bulky tumor » est défini par une masse tumorale de plus de 10 cm dans son plus grand axe, ou par une masse médiastinale de plus du tiers du diamètre trans-thoracique mesuré sur une radio du thorax de profil au niveau du disque intervertébral T5-T6 (index cardiothoracique > 0,33).

Les stades I et II sont qualifiés de précoces (ou localisés) et les stades III et IV de stades avancés (disséminés).

11.2 La classification de l'EORTC (190)

Elle reconnaît trois sous-groupes au sein des stades précoces (I et II):

Un groupe pronostic très favorable : femme, moins de 40 ans, sous-type histologique 1 ou 2, stade I, pas de signes généraux, VS<50. Ce groupe n'est plus reconnu dans les dernières études de l'EORTC.

Un groupe de pronostic favorable : stades I et II avec au maximum 3 aires ganglionnaires atteintes, <50 ans, index cardiothoracique <0,33, et VS< 50 sans symptômes B OU VS<30 avec symptômes B.

Un groupe de pronostic défavorable : stade II avec au moins 4 aires ganglionnaires atteintes, ou ≥ 50 ans, ou index cardiothoracique ≥ 0,33, ou VS ≥ 50 sans symptômes B ou VS ≥ 30 avec symptômes B.

11.3 Le score pronostique international (IPS) (188)

Il est issu d'une étude rétrospective de 5141 patients traités pour un LH de stade avancé (stade 3 et 4) dans 25 centres. 19 critères épidémiologiques ou cliniques ont été testés. 7 critères ont été retenus comme ayant une valeur pronostique péjorative indépendante : albuminémie < 4g/dl, hémoglobine<10,5g/dl, sexe masculin, âge> ou égal à 45 ans, stade IV, leucocytose>15000/l, lymphopénie (lymphocytes<0,6 10⁹/l). Le score consiste à comptabiliser le nombre de critères péjoratifs présents.

Dans la série princeps d'Hasenclever et al. Les patients se répartissaient comme suit dans les différentes catégories :

N facteurs de risque	% du total	Survie sans progression à 5 ans
0	7	84
1	22	77
2	29	67
3	23	60
4	12	51
≥5	7	42

Bien qu'il rende de grands services en pratique courante ce score ne permet pas d'identifier les patients de très mauvais pronostic qui pourraient justifier d'un traitement plus agressif d'emblée, et son utilité dans les stades précoces n'est pas démontrée (191).

11.4 Le TEP scanner

Il est aujourd'hui admis que l'évaluation précoce (après deux cures de chimiothérapie) par TEP scanner est un facteur prédictif majeur de réponse au traitement (192, 193). Une normalisation précoce du TEP scanner est significativement corrélée à la survie sans récidence et à la survie globale. Dans ces études le TEP est le meilleur critère prédictif de la survie, avec le stade et l'existence d'une maladie extra-ganglionnaire. Il est supérieur à l'évaluation par scanner.

Actuellement la décision thérapeutique prend donc en compte l'évaluation TEP après deux cures (voir également le chapitre *traitement des LH*) : une réponse TEP complète après deux cures est un argument majeur pour orienter le patient vers une stratégie thérapeutique moins agressive et ainsi minimiser les risques d'effets secondaires à long terme.

11.5 Les facteurs pronostiques biopathologiques issus d'études d'immunohistochimie

L'immunohistochimie sur tissu total ou sur Tissue Micro Array (TMA) a été utilisée par plusieurs équipes pour rechercher des facteurs pronostiques tissulaires des LHc. La limitation commune à tous ces facteurs pronostiques est de ne pas avoir été validés sur des séries prospectives.

Sup *et al* (194) ont étudié en immunohistochimie sur TMA l'expression *par les cellules tumorales* de BCL2 et p53 dans une série de 107 LHc.

Ils retrouvent un effet significatif de l'expression de **BCL2** sur la survie sans progression à 5 ans (80% pour les BCL2- contre 63% pour les BCL2+, $p\ 0,02$), et une tendance sur la survie globale (87% contre 77%, $p\ 0,14$). Ainsi l'expression de BCL2, puissant anti-apoptotique, confère à la CRS un avantage de survie et de prolifération que l'on retrouve en termes de pronostic, les LHc BCL2+ étant de moins bon pronostic. Ce lien n'est cependant statistiquement pas très fort puisqu'il ne ressort pas de façon significative en survie globale. Les auteurs proposent un score pronostique associant l'expression de BCL2 à deux autres paramètres qui ressortent de façon très significative dans leur série (l'âge ≥ 45 ans et le stade III-IV). A l'aide de ces deux paramètres cliniques bien connus (présents dans l'IPS) et de ce paramètre biologique ils stratifient leur population en trois groupes de pronostics différents : bon pronostic (aucun des trois paramètres présent, tous les malades de ce groupe sont vivants avec un recul de 93 mois, un seul a rechuté), pronostic intermédiaire (un paramètre présent, survie globale de 85%), mauvais pronostic (deux paramètres ou plus présents, survie globale de 58%). Ce type de démarche est certainement un bon exemple de score associant un paramètre biologique et des paramètres cliniques connus pour stratifier une population de LHc selon le pronostic.

Le mauvais pronostic associé à l'expression de BCL2 par les CRS a été retrouvé par certains (195, 196) mais pas par d'autres (197-199), très vraisemblablement en raison des méthodes très disparates de quantification selon les études (194).

Il en va de même de la valeur de **p53** (196, 200) dont l'expression par les CRS est très variable d'un cas à l'autre sans que l'on puisse lui associer une signification claire. Par ailleurs, la détection d'une surexpression de p53 en immunohistochimie n'est certainement pas le reflet d'une mutation du gène, celui-ci n'étant muté que de

façon très sporadique dans les LHc, la détection d'un haut niveau d'expression de p53 étant plutôt liée à une accumulation de la protéine sauvage (194).

Doussis-Anagnostopoulos *et al* ont étudié en immunohistochimie sur tissu total l'expression de la **topoisomérase II alpha (topoII α)** et du marqueur de prolifération **KI67** par les CRS sur une série de 238 LHc (201). Les topoisomérases sont des enzymes qui interviennent dans le déenroulement de l'ADN lors de la réplication. Elles agissent en créant des simples brins transitoires d'ADN (dans le cas des topoisomérases I) ou doubles brins transitoires d'ADN (dans le cas des topoisomérases II). Il existe deux formes de topoisomérases II, topoII α et topoII β . La topoII α est une cible pour de nombreux médicaments cytotoxiques utilisés en onc-hématologie (notamment la doxorubicine, l'épirubicine, la mitoxantrone et l'étoposide). Ces médicaments agissent en stabilisant le complexe topoII α -ADN double brins créant ainsi des cassures d'ADN létales. L'expression de topoII α est associée à une chimiosensibilité dans de nombreuses hémopathies. Mais l'expression de topoII α est également corrélée à une forte activité de prolifération, faisant d'elle une molécule ambivalente dont la signification pronostique n'est pas claire puisque reliée d'une part à un avantage prolifératif pour la cellule, et d'autre part à une chimiosensibilité. Dans cette étude les auteurs retrouvent une expression de topoII α corrélée au KI67 (un marqueur de prolifération) et significativement corrélée à une moins bonne survie, les patients exprimant fortement topoII α ayant une survie sans progression significativement moins bonne que les autres (68% à 10 ans vs 82%, p 0,02). En analyse multivariée l'expression de topoII α reste significativement associée à une moins bonne survie sans progression et est indépendante des facteurs pronostiques classiques de l'IPS.

Natkunam *et al* ont étudié l'expression de **HGAL (human germinal center-associated lymphoma)** dans une série de lymphomes comprenant des LHc (202). HGAL est une molécule exprimée très spécifiquement dans le centre germinatif et par les tumeurs qui en dérivent. Dans leur série HGAL est exprimée par 70% des LHNPL et par 73% des LHc. Leur TMA comportait 145 LHc, dont 75% exprimaient HGAL. En analyse univariée l'expression de HGAL est reliée à une meilleure survie globale (p 0,01) et à une meilleure survie sans récidence (p 0,05), mais cet avantage ne ressort pas en analyse multivariée.

Diepstra *et al* ont étudié l'expression de **HLA classe II** (HLA II) par les CRS en immunohistochimie (203). Leur série comportait 292 LHc. Ils retrouvent une perte d'expression de HLA II par les CRS dans 41,4% de leurs tumeurs. Cette perte d'expression est plus fréquente dans les cas présentant une extension extra-ganglionnaire, une maladie EBV négative, et une perte associée de HLA classe I. Enfin la perte d'expression de HLA II par les CRS est associée à un moins bon pronostic en termes de survie sans récurrence à 5 ans et de survie relative à 5 ans (appariement à l'âge et au sexe), aussi bien en analyse univariée que multivariée. Les auteurs font l'hypothèse que la perte d'expression de HLA II est au moins en partie responsable de la réaction Th2 prédominante classiquement décrite au sein du microenvironnement des LHc. En effet HLA II, lorsqu'il est présent, est responsable d'une stimulation de la réaction de type Th1, qui à son tour va inhiber la réaction de type Th2. L'absence de HLA II se traduirait donc par une « non inhibition » de la réaction Th2. Cette hypothèse est en partie confirmée par nos résultats (voir résultats et discussion), puisque nous mettons en évidence une réaction de type Th1 prédominante dans les cas EBV+.

Ces auteurs font une autre hypothèse pour expliquer le moins bon pronostic associé à la perte d'expression de HLA II : aux stades initiaux de la maladie les CRS seraient très dépendantes de facteurs trophiques issus du microenvironnement T, très possiblement médiés en retour par une stimulation de ce microenvironnement via HLA II. Dans les stades plus avancés de la maladie les CRS seraient moins dépendantes de ces facteurs trophiques et développeraient des mécanismes d'autosuffisance, au premier rang desquels l'activation constitutionnelle de NFκB. La disparition de HLA II serait alors le reflet de cette autonomisation vis à vis du microenvironnement.

Dukers *et al* ont étudié en immunohistochimie l'expression de **la caspase 3** par les CRS (204). Leur hypothèse de départ était que la sensibilité à la chimiothérapie nécessite des mécanismes apoptotiques intacts, incluant une caspase 3 présente. Ils ont quantifié le pourcentage de CRS marquées par un anti-caspase 3 à l'aide d'un logiciel de reconnaissance visuelle. Au sein des 63 LHc étudiés 0 à 13% des CRS présentaient une expression forte de la caspase 3. Le groupe de patients dont la tumeur comportait plus de 5% de CRS exprimant la caspase 3 présentait un

excellent pronostic puisque aucun d'entre eux n'est décédé (0/22, avec un recul moyen de 65 mois). Au contraire, sur les 41 patients dont les tumeurs comportaient moins de 5% de CRS caspase 3+, 11 sont décédés, ce résultat sur la survie globale étant significatif (p 0,007).

Le rôle de la composition du microenvironnement tumoral sur le pronostic a été abondamment étudié en immunohistochimie (voir également le chapitre « microenvironnement tumoral »). Nous ne reviendrons pas sur ce qui a été discuté dans le chapitre « microenvironnement tumoral ». Rappelons simplement que celui ci est majoritairement constitué de lymphocytes Th2 et Treg. Il a par ailleurs été montré que la richesse en cellules cytotoxiques TIA1+ ou Granzyme B + est corrélée à un mauvais pronostic alors que la richesse en cellules Treg FoxP3+ est corrélée à un bon pronostic (119-123).

11.6 Grading du British lymphoma investigation group (4)

Depuis 1983 le groupe britannique soutient qu'il existe deux grades histologiques de pronostics distincts au sein des LHc-SN.

Ainsi, la richesse en cellules tumorales réalisant des nappes syncytiales, l'importance des atypies cytonucléaires, et l'importance de la fibrose définiraient un grade II associé à un pronostic péjoratif. Ce schéma n'a jamais fait consensus mais la classification OMS 2008 en fait encore mention, suggérant son évaluation sur de grandes séries prospectives (2).

Comme beaucoup de grades histologiques, le principal frein à l'application de ce système réside dans son manque de reproductibilité inter-observateurs.

11.7 Dosage des cytokines plasmatiques (205)

Une étude du GELA a mesuré le taux plasmatique du TNF α , de ses deux récepteurs solubles TNF-R1 et TNF-R2, de l'IL10, de l'IL6, du CD30 soluble (CD30s) et de l'IL1-RA (un inhibiteur compétitif naturel de l'IL1) sur une cohorte de 519 patients. Les mesures étaient réalisées avant tout traitement. Les taux plasmatiques de toutes ces cytokines sont corrélés au pronostic.

En retenant les trois cytokines les plus discriminantes (IL1-RA > 668 pg/mL, IL-6 > 30 pg/mL, sCD30 > 80 U/m) les auteurs proposent un score pronostique allant de 0 à 3.

Le groupe de score 0 correspond à des patients ayant un excellent pronostic avec une survie sans progression de plus de 90% à 5 ans. Au contraire un score à 3 permet d'identifier un groupe de patients réfractaires au traitement à très fort risque de rechute précoce.

11.8 Impact pronostique du type histologique

Comme nous l'avons déjà vu, deux formes histologiques sont associées à un excellent pronostic : les LHNPL et le LHc-RL sont des maladies dont le comportement clinique est proche. Volontiers localisées, évoluant dans l'immense majorité des cas de façon indolente, il est rare que le patient ne soit pas guéri par le traitement, parfois même uniquement par la chirurgie (2, 4, 6).

De la même façon, deux formes histologiques sont significativement associées à un plus mauvais pronostic : les LHc-CM, et les LHc-DL (206).

Ainsi, malgré les pistes évoquées ci dessus, l'évaluation pronostique d'un LH au diagnostic en 2010 prend en compte de façon consensuelle : l'IPS, le stade Anne Arbor, la présence de signes B et de facteurs de risques associés comme notamment une maladie VIH concomitante. L'évaluation précoce de la réponse thérapeutique par TEP scanner est également prise en compte comme facteur prédictif majeur de la survie globale et de la survie sans récive.

12 Apport des études d'expression génomique (puces à ADN) dans l'étude des lymphomes Hodgkiniens

Ces techniques ont déjà été utilisées pour l'étude des lymphomes non Hodgkiniens, notamment des lymphomes B diffus à grandes cellules, des lymphomes du manteau, des lymphomes folliculaires et des lymphomes T (207, 208). Elles se sont révélées utiles pour mettre en évidence de nouveaux facteurs pronostiques et de nouvelles caractéristiques biologiques pouvant servir de cibles thérapeutiques.

Alizadeh *et al* (209) ont publié en 2000 une étude transcriptomique qui identifiait deux groupes de LBGC présentant des signatures moléculaires et des pronostics différents : d'une part un groupe de meilleur pronostic exprimant des marqueurs de cellules du centre germinatif (CD10, BCL6, BCL7A, LMO2), et d'autre part un groupe de moins bon pronostic exprimant des marqueurs de cellules B activées (notamment IRF4/MUM1). Il s'agit de l'exemple princeps d'une étude permettant de démembrer un groupe de lymphomes très hétérogène en fonction de leurs profils d'expression génique et de corrélérer ces profils au pronostic.

L'étude de Dave *et al* (210) est la première à avoir mis en évidence une signature moléculaire corrélée au pronostic et reliée non pas aux cellules tumorales mais au microenvironnement. Il s'agissait d'une étude d'expression génique de 191 cas de lymphomes folliculaires, retrouvant deux signatures de pronostics distincts : une signature de bon pronostic enrichie en gènes lymphocytaires T, et une signature de moins bon pronostic enrichie en gènes macrophagiques et de cellules dendritiques.

Ces données ont été validées par l'étude en immunohistochimie sur TMA réalisée par Farinha *et al* (211) qui ont montré que les lymphomes folliculaires riches en macrophages CD68+ sont associés à un moins bon pronostic.

De la même manière Monti *et al* (212) ont mis en évidence dans leur série de LBGC 3 signatures moléculaires distinctes, dont une enrichie en gènes de lymphocytes T/NK, macrophages et cellules dendritiques.

L'étude du profil d'expression génique a également été utilisée dans le domaine des lymphomes T pour démembrer le groupe très hétérogène des LTP. De Leval *et al* notamment (213) on étudié le profil d'expression génique de 16 LTP sans autre indication (SAI), et 18 lymphomes T angioimmunoblastiques (LAI). Ils montrent que les profils d'expression entre ces deux groupes sont différents : les LTP LAI surexpriment des gènes de molécules d'adhésion, de récepteurs membranaires, et surtout de lymphocytes B/plasmocytes et de cellules dendritiques folliculaires, ces données étant très largement corrélées à l'aspect histologique de ces lymphomes qui sont très riches en cellules B réactionnelles. Enfin et surtout ils mettent en évidence que le profil d'expression des LTP LAI est enrichi en gènes de lymphocytes T du

centre germinatif (T_{FH}) fournissant des arguments supplémentaires pour une origine des LTP LAI à partir des T_{FH} .

L'étude du profil d'expression transcriptomique est donc susceptible de fournir des informations sur les mécanismes biologiques et les types cellulaires impliqués dans la formation d'une tumeur.

A notre connaissance il n'existait avant notre travail que deux études d'expression génique sur tissu total de LHc.

En 2002 notre équipe a publié un travail préliminaire sur un petit nombre de cas de LHc (214).

Cette série comportait 34 échantillons : 21 LHc, des LNH B et T et des adénites, analysés sur des puces à ADN de fabrication locale permettant l'analyse de 1045 gènes. Le clustering hiérarchique permettait de définir 3 groupes de signatures moléculaires reliées au pronostic et au sous-type histologique.

Tous les LHc de mauvais pronostic se regroupaient dans un même groupe alors que les deux autres groupes comprenaient les LHc de bon pronostic.

Les LHc-SN de bon pronostic surexprimaient des gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose et la synthèse de cytokines, alors que les cas de mauvais pronostic surexprimaient des gènes impliqués dans l'activation des fibroblastes, l'angiogenèse, le remodelage de la matrice extracellulaire, la prolifération cellulaire et sous-exprimaient des gènes suppresseurs de tumeur.

Cette étude présentait deux limites : le faible nombre de cas analysés, et la limitation des puces à ADN qui ne permettaient d'analyser qu'environ un millier de gènes.

Cependant il s'agissait de la première étude d'expression génique sur tissu total de LHc. Elle démontrait la faisabilité d'appliquer les puces à ADN à l'étude des LHc et suggérait déjà l'existence de corrélations entre le profil d'expression génique et le pronostic.

Sanchez-Aguilera *et al* (215) ont étudié le profil d'expression transcriptomique de 29 LHc de stades avancés (III et IV, ou stade II avec signes B, ou forte masse tumorale), ainsi que différents contrôles incluant des adénites, des lignées de CRS, des cellules B centrogerminatives. L'étude a été réalisée sur des puces OncoChip.v2 permettant l'analyse de 9348 gènes. L'analyse hiérarchisée rapportée au pronostic

(favorable/défavorable) leur a permis d'identifier un groupe de 145 gènes exprimés de façon significativement différente entre les deux groupes pronostiques. Le clustering hiérarchique de ces 145 gènes identifie 4 groupes : les deux premiers groupes correspondent à des gènes de la réponse immune de l'hôte et au microenvironnement. Une première signature, reliée à un mauvais pronostic, est enrichie en gènes lymphocytaires T, macrophagiques et de cellules dendritiques plasmocytoïdes. Une deuxième signature, reliée à un bon pronostic, est enrichie en gènes très hétérogènes comprenant des gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire, des gènes de fibroblastes, de cellules présentatrices d'antigènes ou exprimés par certaines sous-populations lymphocytaires B. Les deux derniers groupes sont tous les deux reliés à un mauvais pronostic, la plupart étant exprimés par les lignées de CRS de culture et les cellules B centrogerminatives. Le groupe 3 comprend des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose, de la transduction du signal dans le métabolisme et la croissance cellulaire. Le dernier groupe comprend des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Parmi eux on retrouve des gènes impliqués dans les résistances aux chimiothérapies, et notamment la topoisomérase IIa déjà décrite comme associée à un mauvais pronostic des LHc.

La validation de leurs données transcriptomiques s'est faite sur une série indépendante de 245 patients dont les tumeurs ont été étudiées en immunohistochimie sur TMA. 8 marqueurs avaient été sélectionnés : 3 marqueurs sensés être représentatifs de la réponse immune microenvironnementale, comprenant des protéines exprimées par les macrophages (*ALDH1A1*, *STAT1*) et une protéine exprimée par des lymphocytes T (*SH2D1A*) ; et 5 protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sensées être majoritairement exprimées par la population tumorale des CRS (*TOP2A*, *RRM2*, *PCNA*, *MAD2L1*, and *CDC2*). De façon similaire aux données transcriptomiques, la forte expression de ces différentes protéines était corrélée à un mauvais pronostic.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail les auteurs s'intéressent à leur groupe 4 de gènes, reliés à un mauvais pronostic et concernant des gènes régulant le cycle cellulaire, impliqués dans le contrôle de l'entrée de la cellule en phase S. Ils valident leurs données transcriptomiques par des expériences fonctionnelles montrant qu'effectivement les lignées de LHc sont moins sensibles à l'action du nocodazole,

un anti-mitotique inhibant la formation du fuseau, comparées à d'autres lignées cellulaires B.

Les principales limitations de cette étude résidaient dans le faible nombre de cas étudiés en transcriptomique, la sélection restreinte à des tumeurs de stades avancés, et à l'utilisation de puces ne permettant d'étudier qu'un peu moins de 10000 gènes. Cependant, ces résultats mettent en avant la faisabilité d'études transcriptomiques sur tissu total dans le domaine des LHc et la capacité de ces techniques à identifier des processus biologiques relevant (en l'occurrence les gènes contrôlant l'entrée en mitose) reliés au pronostic et susceptibles de constituer des marqueurs pronostiques utilisables en pratique courante et/ou des cibles thérapeutiques.

Récemment, Steidl *et al* (216) ont rapporté une étude transcriptomique comparable à la notre et identifié une signature macrophagique significativement reliée à un moins bon pronostic.

Les auteurs ont étudiés une cohorte de 130 LHc congelés sur puces Affimetrix et identifient une signature génique de macrophages intratumoraux (Tumor-associated Macrophages) corrélée à un échec primaire du traitement (p 0,02). Ils valident leurs données sur un groupe indépendant de 166 cas de LHc étudiés en immunohistochimie (anti-CD68 et anti-CD20 notamment) sur TMA. Le CD68 est considéré comme un marqueur de macrophages (il n'est pas exprimé par les CRS). Ils retrouvent également une corrélation entre le nombre de cellules CD68+ et une moins bonne survie sans progression (p 0,03) et à un plus grand risque de récurrence après autogreffe de CSHP (p 0,008) avec pour conséquence une diminution significative de la survie spécifique (p 0,003). En analyse multivariée le critère « richesse en cellules CD68+ » était plus fortement corrélé à la survie spécifique que l'IPS (p 0,003 VS p 0,03). Enfin l'association d'un faible nombre de cellules CD68+ et d'une maladie limitée (stade I et II sans signes B) définissait un groupe de patient de très bon pronostic ayant une survie spécifique de 100% avec un traitement standard. Enfin, de façon intéressante par rapport à nos propres résultats, cette étude retrouvait une corrélation entre un grand nombre de cellules microenvironnementales CD20+ et une meilleure survie sans progression ainsi qu'avec une meilleure survie spécifique.

A nouveau ce type de résultat suggère que l'étude transcriptomique, couplée à une étude immunohistochimique de validation, peut être un bon outil pour mettre en

évidence des caractéristiques biologiques de la tumeur corrélées au pronostic. Les marqueurs biologiques ainsi identifiés peuvent enrichir l'IPS, notamment, comme ici, pour identifier un groupe de patients d'excellent pronostic chez qui l'intérêt d'une « désescalade » thérapeutique pourrait être étudié dans un essai prospectif.

13 Traitement des LHc

Les traitements modernes permettent de guérir 80-85% des patients atteints de LHc (217, 218). Ces bons résultats thérapeutiques sont essentiellement à mettre sur le compte de l'utilisation de chimiothérapies plus efficaces, de techniques de radiothérapie modernes et d'une combinaison rationnelles des différentes modalités thérapeutiques. Malheureusement il persiste d'importants effets secondaires à ces traitements, au premier rang desquels les cancers secondaires à long terme.

13.1 Bilan avant traitement

Depuis les années 80 et les progrès des techniques d'imagerie, les investigations agressives telles que la lymphographie bipédieuse et la laparotomie exploratrice systématique sont obsolètes. Il n'existe pas d'études randomisées étudiant le bilan initial à réaliser chez un patient atteint de LHc, mais des recommandations d'experts ont été émises (218). Ainsi, le bilan doit comprendre :

- Un examen clinique complet avec palpation de toutes les aires ganglionnaires et recherche de signes généraux.

- Numération formule sanguine, albuminémie, LDH sériques, vitesse de sédimentation.

- Recherche de comorbidités : sérologies Hépatites B et C, HIV.

- Radiographie thoracique standard face et de profil avec mesure de l'index cardiothoracique.

- Tomodensitométrie couvrant le cou, le thorax, l'abdomen et le pelvis.

- Evaluation échographique de la fraction d'éjection ventriculaire gauche.

- Test de grossesse chez les femmes en âge de procréer.

- Une biopsie ostéomédullaire chez les patients présentant un stade III/IV, ou des signes B, ou une NFS anormale.

- Un TEP-scanner de référence avant traitement.

Bilan thyroïdien et évaluation de l'état dentaire chez les patients candidats à une radiothérapie cervicale

Une consultation de médecine de la reproduction et, le cas échéant, une conservation de sperme ou d'ovocytes.

13.2 Traitement des stades précoces

Au moins quatre études ont montré la supériorité d'un traitement combiné associant radiothérapie et chimiothérapie sur un traitement par radiothérapie seule.

L'étude SWOG (219) a comparé une irradiation ganglionnaire sub-totale (IGST) seule à l'association d'une chimiothérapie (3 cures de doxorubicine+vinblastine) suivie d'une IGST. La survie sans progression à 5 ans est significativement meilleure avec le traitement combiné (93 vs 70%)

L'étude HD7 du German Hodgkin Study Group (220) a montré que la combinaison de deux cures d'ABVD (doxorubicine, bléomycine, vinblastine, dacarbazine) suivie d'une radiothérapie étendue (Extended Field-RT) est supérieure à la radiothérapie seule.

L'étude H7 (221) de l'EORTC a montré que 6 cures d'EBVP (épirubicine, bléomycine, vinblastine, prédnisone) associées une irradiation « in field » est supérieure à une irradiation ganglionnaire subtotale seule. L'étude H8 (222) a également montré la supériorité d'un traitement combiné associant radiothérapie « in field » et trois cures de MOPP-ABV (méchloréthamine, vincristine, procarbazine, prédnisone, alternée avec doxorubicine, bléomycine, vinblastine) par rapport à une radiothérapie. Dans ces deux études le traitement combiné était supérieur à la radiothérapie seule tant en terme de contrôle de la maladie que de survie globale.

Aujourd'hui il est communément admis que le traitement standard des LHc stade I et II repose sur l'association de 4 cures d'ABVD suivie d'une radiothérapie de type « involved field » délivrant 30 Grays sur les aires ganglionnaires atteintes (218). Les études HD10 et HD11 du German Hodgkin Study Group suggèrent que ces traitements pourraient être réduits, tant en chimiothérapie qu'en radiothérapie, notamment chez les patients du groupe « favorable » au sens des critères de l'EORTC, sans perte significative d'efficacité. Un panel d'experts italiens propose ainsi de réduire le traitement à 2 cycles d'ABVD et 20 grays de RT « involved field »,

dans le cadre d'essais contrôlés, chez des patients réunissant les critères EORTC du groupe favorable (218).

La radiothérapie est source d'effets secondaires à moyen et long terme chez les patients guéris de leur LHc : altération des artères coronaires, fibrose myocardique et péricardique, valvulopathies, troubles du rythme cardiaque, fibrose pulmonaire, syndrome respiratoire restrictif (223-226).

Plusieurs études ont donc posé la question de l'efficacité de la chimiothérapie seule, avec des résultats assez équivalents entre chimiothérapie seule et traitement combiné (227-229). Cependant l'étude H9F de l'EORTC (218) a comparé un traitement par EBVP seul à un traitement par EBVP+IF-RT (à 20 ou 36 Gy) et retrouve un avantage au traitement combiné (survie sans événement à 4 ans de 69% pour l'EBVP seul et de 85 et 87% pour les deux traitements combinés).

Le traitement combiné associant ABVD et radiothérapie est aujourd'hui le traitement standard des LHc stade I et II.

13.3 Traitement des stades avancés

Depuis plusieurs années le traitement standard des LHc stades III et IV repose sur 6 à 8 cycles d'ABVD (218). Il a été montré que l'ABVD est supérieur ou équivalent aux régimes de type MOPP (méchloréthamine, vincristine, procarbazine, prédnisone) ou aux régimes alternant MOPP et ABVD (230).

A ce jour il n'a pas été mis en évidence d'avantage significatif en termes de survie globale de régimes plus agressifs, notamment du BEACOPP (bleomycine, étoposide, adriamycine, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prédnisone) en première ligne de traitement (218).

Le bénéfice d'une radiothérapie adjuvante « de clôture » chez les patients présentant initialement une forte masse tumorale est controversé (218).

13.4 Evaluation de la réponse : l'apport récent du TEP scanner

Il a été récemment démontré que le TEP-scanner est un outil d'une grande sensibilité et spécificité pour évaluer la réponse au traitement (192, 193). Une analyse de 13 études regroupant au total 408 patients retrouve une sensibilité de

84% et une spécificité de 90% pour détecter une tumeur viable après traitement (231). Le timing de réalisation du TEP-scanner est important puisque les remaniements tissulaires inflammatoires post-chimiothérapie et post-radiothérapie peuvent induire des faux positifs, le TEP-scanner devant être réalisé au moins deux semaines après la fin d'une cure de chimiothérapie, et au moins 8 à 12 semaines après la fin de la radiothérapie (232).

Par ailleurs, il a été montré que l'évaluation de la réponse thérapeutique par TEP-scanner après deux cures de chimiothérapie est très fortement prédictive du pronostic et qu'il s'agit d'un critère indépendant des variables de l'IPS (192, 193, 232). A l'avenir il est très vraisemblable que l'évaluation de la réponse par TEP-scanner après deux cures jouera un rôle important dans l'arbre décisionnel thérapeutique.

Le TEP-scanner a aussi une place dans l'évaluation en fin de traitement, puisqu'il est aujourd'hui admis qu'un patient est en réponse complète même s'il présente une masse résiduelle TEP négative (192, 233).

Le protocole H10 de l'EORTC évalue actuellement l'apport décisionnel du TEP-scanner dans les LHc localisés. Dans le groupe favorable les patients sont randomisés entre ABVDx3 + « IN »RT, et un bras expérimental dans lequel le TEP après deux cures d'ABVD est décisionnel : en cas de réponse complète le traitement est complété par 2 ABVD uniquement, en cas de TEP positif les patients reçoivent une escalade par BEACOPPx2 + IN RT (30 gy). Dans le groupe défavorable les patients sont randomisés entre un bras recevant ABVDx4 + IN RT, et un bras où le TEP est décisionnel : si négatif le traitement est complété par 4 ABVD, si positif il est complété par BEACOPPx2 + IN RT (30gy).

13.5 Traitement des maladies réfractaires et des récidives

Place de la chimiothérapie conventionnelle de rattrapage

Environ 20-25% des patients ne sont pas mis en rémission complète par l'ABVD en première ligne (maladie réfractaire) et certains patients mis en rémission complète rechuteront, sous la forme d'une rechute précoce (moins de 12 mois après la fin du

traitement) ou tardive. Il est reconnu que l'efficacité du traitement de rattrapage dépend de l'intervalle entre la fin du traitement de première ligne et la rechute (218).

Ainsi chez les patients présentant une rechute tardive, l'utilisation d'une chimiothérapie conventionnelle identique à celle de la première ligne (type ABVD) peut amener à une deuxième rémission complète (234, 235).

Dans les maladies réfractaires et les rechutes précoces, la chimiothérapie conventionnelle de deuxième ligne n'a virtuellement aucune efficacité curative (236, 237), mais présente deux intérêts : permettre une réduction de la masse tumorale (débulking) avant chimiothérapie intensive, et provoquer une mobilisation vers le sang périphérique des progéniteurs hématopoïétiques en vue de leur collecte pour autogreffe. Les chimiothérapies conventionnelles de rattrapage les plus utilisées sont le DHAP (cisplatine, cytarabine haute dose, dexamétasone), l'ICE (ifosfamide, carboplatine, étoposide), l'IGEV (ifosfamide, gemcitabine, vinorelbine). Aucune étude randomisée n'est disponible pour permettre d'établir la supériorité d'une de ces chimiothérapies sur les autres (218).

Place de la chimiothérapie intensive suivie de transplantation de cellules souches hématopoïétiques autologues

Il est aujourd'hui admis qu'il s'agit du traitement standard des maladies réfractaires primaires et des rechutes précoces. Seuls les patients présentant une rechute très tardive (plus de trois ans après la fin du traitement initial) ou une rechute très localisée sur un seul site (sans autre fixation TEP) peuvent être orientés vers une chimiothérapie conventionnelle (218). Dans toutes les autres situations, chez les patients de moins de 65 ans sans comorbidité limitante, la chimiothérapie intensive de type BEAM (carmustine, étoposide, cytarabine, melphalan) avec autogreffe de CSHP permet de guérir plus de la moitié des patients en première rechute. Son efficacité est d'autant meilleure que la maladie résiduelle est peu importante après chimiothérapie de rattrapage. La mortalité initialement de 10-15% dans les premières séries est tombée à 3% dans les séries les plus récentes (218).

Place de l'allogreffe de moelle

Le rationnel biologique de cette thérapeutique est de combiner l'effet antitumoral de la chimiothérapie et de la radiothérapie de conditionnement à l'effet antitumoral de la réaction immunologique du greffon contre l'hôte, les cellules immunitaires greffées allant détruire les cellules lymphomateuses résiduelles de l'hôte (« *graft versus lymphoma reaction* »).

L'analyse de 4 grandes séries, comportant au total 373 patients atteints de LHc réfractaires ou en rechute ayant fait l'objet d'une greffe de moelle allogénique après traitement myéloablatif, montre une incidence cumulée de mortalité post-greffe de 52%, une survie globale de 44%, une survie sans progression de 20% et un taux de rechute de 57% (218).

Le développement à la fin des années 90 de nouveaux protocoles de conditionnement d'intensité réduite (non myéloablatif) a permis de diminuer significativement la mortalité liée à la transplantation et d'améliorer de l'ordre de 10% la survie sans progression et la survie globale (238). Comme pour la transplantation autologue, les résultats de l'allogreffe sont d'autant meilleurs que le patient est en bon état général et que la maladie est chimiosensible, incitant à ne pas envisager cette thérapeutique trop tard dans le projet thérapeutique (218).

La greffe de moelle allogénique est aujourd'hui proposée selon des protocoles de conditionnement d'intensité réduite aux patients présentant une rechute après chimiothérapie intensive et autogreffe, ou aux patients en échec de collecte de CSHP.

14 Lymphomes Hodgkiniens : les enjeux en 2010.

Avec près 20000 cas diagnostiqués chaque année en Europe et en Amérique du nord, comprenant une majorité de sujets jeunes, les LH restent une préoccupation majeure en oncohématologie.

Les traitements modernes ont fait de grands progrès : le régime de chimiothérapie par ABVD s'est imposé comme le traitement systémique standard de première ligne, la radiothérapie moderne est de plus en plus ciblée pour une efficacité équivalente, les indications de chimiothérapie intensive avec greffe de CSHP se sont clarifiées, l'allogreffe de moelle avec conditionnement atténué est porteuse d'espoir de moindre morbidité/mortalité.

S'ils permettent de guérir une majorité de patients, ces traitements restent inefficaces pour 20 à 30 % d'entre eux, au moins en termes de guérison définitive.

Par ailleurs la survie à long terme des patients guéris reste grevée d'importants effets secondaires à moyen et long terme, notamment la survenue de cancers secondaires et d'effets secondaires cardiovasculaires.

La connaissance biologique des LH a fait d'immenses progrès ces 10 dernières années : la nature lymphocytaire B centrogerminative des cellules tumorales est bien établie ; les mécanismes par lesquels ces cellules survivent sont en partie élucidés, notamment l'activation constitutionnelle des grandes voies de signalisations telles que les voies NF κ B et STAT ; les mécanismes oncogéniques mis en œuvre par l'EBV ainsi que la composition du microenvironnement et ses relations avec les cellules tumorales sont mieux connus. Mais à ce jour, ces connaissances biologiques n'ont pas abouti à une amélioration concrète de la prise en charge des patients.

Tous les critères pronostiques décrits plus haut n'ont pas été validés sur de grandes séries prospectives et l'IPS décrit par Hasenclever reste le meilleur moyen de stratifier les patients selon leur pronostic. Malheureusement ce score ne permet pas d'identifier les patients qui présentent un très mauvais pronostic et son intérêt pour les stades initiaux de la maladie reste à démontrer.

Le TEP-scanner s'est révélé être un outil très puissant de prédiction de la survie et son intégration dans les stratégies thérapeutiques est en cours.

Pour espérer améliorer la prise en charge des patients atteints de LHc en 2010, tant en terme d'amélioration de la survie que de diminution des effets secondaires, deux enjeux se dégagent :

D'une part l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous avons vu le soin que prend la CRS à organiser autour d'elle un microenvironnement propice à sa survie et à son développement. L'identification de cibles thérapeutiques qui permettraient de rompre l'emprise qu'elle exerce sur les cellules réactionnelles alentour est une voie de recherche prometteuse.

D'autre part l'identification de facteurs pronostiques biopathologiques robustes, sur les cellules tumorales ou sur leur microenvironnement, permettraient d'adapter de façon plus pertinente les nombreux traitements à notre disposition en proposant plus rapidement, voire d'emblée, des traitements agressifs aux patients identifiés comme porteurs d'une maladie de mauvais pronostic et, surtout, en réalisant une désescalade thérapeutique chez les patients identifiés comme porteurs d'une maladie de bon pronostic.

DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL DE THESE

Une étude d'expression génique sur tissu total d'une série de 63 LHc avec validation sur Tissu Microarray (TMA) d'une série indépendante de 146 LHc

Ce travail a fait l'objet d'une publication reproduite ci après. Les figures et les tableaux cités dans le texte correspondent aux figures et aux tableaux de l'article.

Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome

Bruno Chetaille, François Bertucci, Pascal Finetti, Benjamin Esterni, Aspasia Stamatoullas, Jean Michel Picquenot, Marie Christine Copin, Frank Morschhauser, Olivier Casasnovas, Tony Petrella, Thierry Molina, Anne Vekhoff, Pierre Feugier, Reda Bouabdallah, Daniel Birnbaum, Daniel Olive, Luc Xerri.

Blood. 2009; 113: 2765-2775

1 Objectifs du travail

L'objectif global de notre travail était d'améliorer la connaissance des mécanismes biologiques impliqués dans la lymphomagenèse Hodgkinienne, afin de fournir des bases rationnelles à l'amélioration de la prise en charge des patients atteints de LHc.

Notre étude biologique transcriptomique et immunohistochimique s'est accompagnée d'une corrélation aux données cliniques et évolutives afin d'identifier des facteurs pronostiques pouvant servir de rationnel à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous souhaitions notamment identifier des marqueurs de bon pronostic qui permettent d'argumenter le bien fondé d'une désescalade thérapeutique au sein de groupes de patients de pronostic particulièrement favorable.

En analysant le tissu tumoral total sur les plans transcriptomique et immunohistochimique, cette étude avait avant tout pour objectif d'étudier le microenvironnement. En effet étant donné la rareté des CRS dans le tissu tumoral, nos résultats peuvent être considérés comme avant tout le reflet des caractéristiques micro environnementales du tissu et peu comme le reflet des caractéristiques des CRS elles mêmes.

Notre objectif principal était donc de mieux comprendre la composition du microenvironnement, son lien avec le statut EBV+ ou EBV- des cellules tumorales et l'influence de sa composition sur le pronostic de la maladie.

2 Matériel et méthode

Notre série consiste en 63 patients dont les LHc ont fait l'objet d'une étude d'expression transcriptomique sur puces Affimetrix. Pour chacun nous disposons d'une biopsie ganglionnaire pré thérapeutique. Ces échantillons ont été collectés auprès de plusieurs centres du réseau du Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (Marseille IPC et Timone, Lille, Dijon, Paris, Nancy). Pour chaque patient nous disposons d'au moins un fragment tumoral congelé en azote liquide puis conservé dans l'azote ou à -80°C, et d'au moins un bloc d'inclusion de tissu tumoral fixé en formol et inclus en paraffine. Tous ces cas ont été revus histologiquement et classés selon la classification OMS 2008 des néoplasies hématologiques (2) en LHc-SN (42 cas), LHc-CM (17 cas), et LHc-DL (un cas). Trois cas présentaient des images de LHc « interfolliculaire » et ont été considérés comme « inclassables » afin de ne pas biaiser les comparaisons entre les sous-types SN et CM. Pour chaque cas le statut EBV a été déterminé par un immunomarquage anti-LMP-1. Si celui ci était négatif nous avons réalisé une étude en hybridation in situ à l'aide de la sonde EBER. Au final notre série comprenait 35 cas EBV négatifs, 18 cas EBV positifs et 10 cas de statut EBV indéterminé pour diverses raisons techniques.

Pour chaque patient nous avons envoyé au clinicien l'ayant pris en charge une fiche de demande de renseignements cliniques comprenant notamment les données pronostiques préthérapeutiques, le traitement administré et le suivi. Les caractéristiques cliniques des patients de notre série ont été établies à partir de ces fiches. 10 patients étaient des enfants de moins de 15 ans. 30 patients présentaient un stade I ou II Ann Arbor, 29 patients présentaient un stade III ou IV (4 patients pour lesquels le renseignement n'a pu être obtenu). Tous ces patients ont reçu en première ligne un traitement standard homogène de chimiothérapie, essentiellement de type ABVD (Adriamycine, Bleomycine, Vinblastine, Dacarbazine), associé ou non à une radiothérapie.

Concernant l'évolution après traitement, nous avons divisé notre population en deux groupes :

- *Un groupe d'évolution favorable* (31 adultes et les 10 enfants) défini par l'obtention et le maintien d'une rémission complète sur au moins 50 mois après la fin du traitement.

- *Un groupe d'évolution défavorable* (21 patients) défini par une maladie évolutive sous traitement ou l'échec d'obtention d'une rémission complète ou une rechute durant le suivi. Un patient a été exclu de l'analyse car présentant une sarcoïdose rendant difficile l'affirmation d'une rémission complète (masse médiastinale fixant au TEP scanner mais ne retrouvant que des ganglions sarcoïdiques en histologie).

L'étude transcriptomique a été conduite sur puces ADN Affimetrix U133 A2. Les détails de la réalisation et de l'analyse statistique sont donnés dans le matériel et méthode de l'article.

L'étude de l'expression de deux gènes sélectionnés, INFG et IFIH1, a été réalisée en RQ-PCR sur 7 cas de LHc (4 EBV+ et 3 EBV-) afin de valider l'expression différentielle de ces deux gènes en fonction du statut EBV. Le matériel et méthode est détaillé dans l'article.

L'étude immunohistochimique de validation des données issues de l'étude d'expression génique s'est faite sur une autre série (différente de celle étudiée sur puces Affimetrix) de 146 patients pris en charge à l'institut Paoli Calmettes. Pour chacun de ces patients nous disposions d'au moins un bloc de tissu tumoral fixé en formol et inclus en paraffine. Là aussi, chaque cas a été relu et classé en LHc-SN (106 cas), LHc-CM (26 cas), LHc-DL (2 cas) et inclassable (1 cas). Le statut EBV a été déterminé de la même manière que décrit ci dessus, comprenant 115 cas EBV- et 30 cas EBV + (un cas indéterminé). Un Tissu Microarray (TMA) a été construit à partir de ces blocs (voir ci dessous). Les données cliniques ont été extraites des dossiers informatisés des patients à l'aide de la même fiche de renseignements cliniques que celle utilisée pour la série de patients étudiés sur puces Affimetrix. Les principales caractéristiques de nos 146 patients sont résumées dans le **tableau 1** de l'article.

Une série additionnelle de 13 LBGCRLT/H a été étudiée en immunohistochimie sur tissu total fixé en formol et inclus en paraffine afin de valider la signature d'expression génique associée à ces tumeurs.

3 Résultats

3.1 L'analyse non supervisée souligne l'hétérogénéité moléculaire des LHc ainsi que leur profil d'expression génique distinct de celui des LBGCRLT/H (figure 1)

La **figure 1** présente les résultats de l'hybridation de nos 73 échantillons sur puces ADN Affimétrie. La figure rend compte des niveaux d'expression de 10394 ARNm. Les ARNm ayant un très bas niveau d'expression ou des signaux d'expression de mauvaise qualité ont été éliminés de l'analyse par un procédé de filtration ne retenant que des niveaux d'expression supérieurs à 100 unités. Nos échantillons hybridés comprenaient 63 LHc, (**figure 1A**, boîtes blanches) et 10 cas témoins : 5 LBGCRLT/H (boîtes oranges) et 5 adénites (boîtes vertes). Les LBGCRLT/H présentent d'importantes similitudes histopathologiques avec les LH (LHc comme LHNPL) : leurs cellules tumorales sont de phénotype et de génotype B et sont en très faible nombre au sein d'un très abondant microenvironnement. Il nous est donc apparu intéressant de voir si ces similitudes anatomopathologiques étaient corrélées à des similitudes d'expression génique. Les adénites correspondaient à des ganglions prélevés chez des patients présentant des adénopathies cliniquement suspectes de lymphome, mais s'étant révélées être histologiquement des hyperplasies ganglionnaires peu spécifiques d'une étiologie. Ces hyperplasies se font majoritairement au dépend de la zone B dépendante (hyperplasie lymphoïde réactionnelle en réponse à une stimulation antigénique) mais peuvent également porter sur la zone T dépendante, notamment dans des contextes d'infection virale.

Trois groupes d'échantillons apparaissent sur le dendrogramme du clustering hiérarchique (groupes I, II et III) :

- **Les groupes I et II** correspondent à la plupart des cas de LHc (51/63). Leur hétérogénéité d'expression génique est évidente, illustrée par l'étalement des échantillons sur tout le dendrogramme. Cette hétérogénéité est également illustrée par les 12 cas qui se regroupent à proximité des échantillons d'adénites et de LBGCRLT/H.
- **Le groupe III** comprend tous les cas de LBGCRLT/H et toutes les adénites. Ainsi ces deux diagnostics histopathologiques sont plus homogènes en

termes d'expression génique que les LHc. Cette interprétation doit cependant se faire avec prudence, la plus grande homogénéité constatée pouvant être le fait du plus faible nombre d'adénites et de LBGCRLT/H que de LHc. Par ailleurs il est intéressant de constater que le profil d'expression génique des LBGCRLT/H est plus proche de celui des adénites que de celui des LHc.

La figure 1B présente le clustering hiérarchique d'expression génique des 63 échantillons de LHc. La figure ne prend ici en compte que le niveau d'expression de 6229 ARNm sélectionnés pour leur variation d'expression significative au sein du groupe des 63 échantillons. Chaque colonne représente un échantillon, chaque ligne représente un gène. Les deux colonnes séparées à droite correspondent aux 10 échantillons témoins (5 LBGCRLT/H, 5 adénites) et à des lignées cellulaires : HUVEC (cellules endothéliales), HFFB (fibroblastes) et trois lignées de CRS (L-428, KM-H2, L-1236). Le niveau d'expression d'un gène dans un échantillon est représenté selon son expression relative par rapport à l'ensemble du groupe des 63 échantillons (déviations par rapport au niveau d'expression médian de l'ensemble de la population). La représentation utilise une échelle colorimétrique logarithmique, le rouge correspondant à un fort niveau d'expression, le vert à un bas niveau d'expression. L'amplitude de la déviation par rapport à la médiane d'expression est rendue par la saturation en couleur rouge (déviations au dessus de la médiane) ou verte (déviations en dessous de la médiane). Les niveaux d'expression proches de la médiane apparaissent en noir. La construction du dendrogramme des échantillons prend en compte les similitudes d'expression génique des échantillons entre eux : plus deux échantillons sont proches dans le dendrogramme plus leurs profils d'expression géniques sont similaires.

La figure 1C est un zoom de la figure 1B focalisant sur le dendrogramme de répartition des échantillons et sur les groupes de gènes d'intérêt.

Sous le dendrogramme sont représentés les principales caractéristiques cliniques des 63 patients : âge (enfant en noir, adulte en blanc), évolution (défavorable en violet, favorable en blanc), stade Ann Arbor (I-II en blanc, III-IV en noir), type histologique (scléronodulaire en bleu, cellularité mixte en blanc), statut EBV (+ en noir, - en blanc). Les boîtes grisées correspondent aux données manquantes.

Les 63 cas de LHc se répartissent en deux groupes (séparés par une barre orange sur les figures 1A et 1C) corrélés au pronostic : le groupe de gauche comporte 23 patients sur 28 ayant un pronostic favorable (82%) alors que le groupe de droite n'en compte que 18/35 (51%) ($p=0,003$). Cette distribution était indépendante des autres paramètres clinicobiologiques étudiés (âge, stade, type histologique, statut EBV).

La méthode du « Quality Threshold (QT) clustering » utilise un algorithme qui permet de grouper les gènes en fonction de leur similitude d'expression au sein de notre population de 73 échantillons. Le principe de cette méthode consiste à définir un degré de similitude minimum pour que deux gènes soient dans le même groupe (c'est à dire leur éloignement maximum sur le dendrogramme vertical de la figure 1B), et la taille minimale (c'est à dire le nombre de gènes) d'un groupe. Par cette méthode, en utilisant une corrélation minimale de 0.75, nous identifions 17 groupes de gènes dont certains, listés ci dessous, correspondent à des processus biologiques cohérents ou à des types cellulaires :

- *Un groupe « cycle cellulaire »* de gènes fortement surexprimés dans nos lignées cellulaires et comprenant des gènes codant pour PCNA (Proliferating Chain Nuclear Antigen, une protéine auxiliaire de l'ADN polymérase delta, impliquée dans le contrôle de la réplication), les différentes cyclines, les CDC (Cell Division Cycle proteins) et CDKN (Cyclin Dependant Kinase inhibitors), STK6 (Serin/Threonin Kinase 6, impliquée dans la régulation de l'anaphase et/ou de la télophase et dans la formation/stabilisation des microtubules), AURKB (STK12), TOP2A (ADN Topoisomérase 2A impliquée dans la réplication), CENPA (Histone H3-like centromeric protein A, nécessaire au recrutement et à l'assemblage des protéines du kinétochore), TK1 (thymidine kinase 1, impliquée dans la synthèse de l'ADN lors de la réplication), TYMS (thymidylate synthetase)
- *Un groupe « voie de l'interféron et réponse antivirale »* : ce groupe comprend des gènes tels qu'IFI35, IFNGR2, IRF1, STAT1, TAP1. Logiquement ce groupe de gènes est significativement surexprimé dans les cas de LHc EBV+, mais également de façon moins attendue dans les cas de LBGCRTH.
- *Un groupe « métabolisme cellulaire »* incluant de très nombreux gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative, la synthèse protéique, l'ubiquitination des protéines.

- *Deux groupes « apoptose »* comprenant des gènes tels que FAS, DDX3, MAX, TXNIP, HSPD1, HSPA8, HSP90AB1, TANK
- *Un groupe « plasmocytes »* comprenant des gènes d'immunoglobulines et syndecan-1 (SDC1/CD138) très surexprimés de façon cohérente dans nos échantillons témoins d'adénites
- *Un groupe « lymphocytes B »* comprenant des gènes bien connus pour leur implication dans la physiologie lymphocytaire B tels que CD19, CD22, CD79A/B, BANK1, VPREB3, STAP1 (BRDG1), BLNK, BLK, BCL11A
- *Un groupe « matrice extracellulaire »* fortement surexprimé dans les lignées HFFB (dérivés de fibroblastes) et HUVEC mais non exprimés dans les lignées de CRS. Ce groupe comprend des gènes impliqués dans la synthèse du collagène, des MMP, CALD1, PLAU, PDGFR, FN1, SPARC et DCN
- *Un groupe macrophages/lymphocytes T/réponse immune innée »* enrichie en gènes de macrophages, de lymphocytes T ou impliqués dans la réponse innée tels que CD14, CD68, CSF1R, CD163, CTSS/I, C3AR1, FCGR1 (CD64), FCGR3A (CD16a), STAT1, TNFSF10 (TRAIL), MNDA, LILRA/B, GBP1, CXCL9-13, SLAMF7-8, TLR1/2/4/5/8, TCF7L2, LILRA6 (ILT8). De façon cohérente ce groupe de gènes est surexprimé dans les LHc EBV+ et les cas témoins de LBDGCRT/H.

L'examen visuel du profil d'expression de ces groupes de gènes au sein de nos échantillons révèle (**figure 1C**) qu'un petit nombre d'entre eux est responsable de la subdivision de notre population en deux groupes de pronostics distincts : les groupes de gènes « voie de l'interféron et réponse antivirale », « apoptose », « cycle cellulaire et « lymphocytes B » sont surexprimés dans le groupe d'échantillons de LHc associés à un meilleur pronostic (groupe d'échantillons situés à gauche de la barre orange sur la figure 1C).

3.2 L'analyse supervisée met en évidence un profil d'expression génique enrichi en gènes lymphocytaires B corrélé à un meilleur pronostic (figure 2A)

En utilisant un modèle de cox univarié, nous isolons sur notre puce 501 ARNm dont l'expression est significativement reliée au pronostic au sein de notre groupe de 63 patients. Ces ARNm sont matérialisés par des barres noires sur la figure 1B et correspondent à 450 gènes uniques comprenant 403 gènes associés à un bon pronostic et 47 gènes associés à un mauvais pronostic. Afin de définir un profil d'expression génique relié au pronostic nous avons conduit une analyse supervisée basée sur l'expression de ces 501 ARNm « pronostiques ». Notre groupe « test » était constitué par nos 10 échantillons de LHc d'enfants, tous associés à un bon pronostic. Notre groupe de validation était représenté par notre population de 52 échantillons d'adultes (un échantillon aux données inexploitable). Les résultats de cette analyse sont présentés sur la **figure 2A**. Sur cette figure les ARNm sont classés de haut en bas par ordre décroissant de score de discrimination pronostique. Les échantillons de LHc sont classés de gauche à droite selon leur score de discrimination linéaire (Linear Discriminant Analysis, score LDA). Notre population comprenait 31 patients de bon pronostic (Favorable Outcom, FO) et 21 patients de mauvais pronostic (Unfavorable Outcom, UO). La classification de nos 52 patients par le prédicteur moléculaire selon le principe de l'analyse linéaire discriminante (Linear Discriminant Analysis, LDA) permet de classer correctement 90% de nos échantillons en FO ou UO ($p < 0.001$).

Comme nous l'avons vu précédemment, beaucoup de nos 501 ARNm « pronostiques » appartient à des groupes de gènes impliqués dans des processus biologiques cohérents ou cruciaux au sein de types cellulaires donnés. Ainsi 23% de nos gènes d'intérêts appartenant au groupe « lymphocyte B » sont associés à un pronostic favorable, notamment BCL11A, BANK1, STAP1, BLNK, FCER2, CD24, CCL21. 19% des gènes du groupe « apoptose » et 11% du groupe « métabolisme cellulaire » étaient également associés à un pronostic favorable. Par contre 9 % des gènes du groupe « matrice extra cellulaire » étaient associés à un pronostic défavorable.

Afin d'approfondir ces données, une analyse GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) a été menée. L'analyse GSEA est une méthode bio informatique qui permet de déterminer si un groupe prédéfini de gènes présente une expression significativement différente dans deux phénotypes ou situations biologiques différentes (ici LHc de bon pronostic versus LHc de mauvais pronostic). Ce type d'analyse peut ainsi procurer des indices quant aux processus moléculaires qui sous

tendent un phénotype biologique. Ainsi nous trouvons parmi les listes de gènes significativement surexprimés dans les tumeurs de bon pronostic des listes de gènes associés aux lymphocytes B (« Sig_BCR_Signalling_Pathway », « St_B_Cell_Antigen_Receptor »), à l'apoptose (« Apoptosis_Kegg », « St_FAS_Signalling_Pathway », Apoptosis_Genmapp », « Death Pathway », « Apoptosis »), au métabolisme cellulaire (« mRNA_Processing », « RNA.Splicing », RNA.Processing », Protein_amino.Acid.Dephosphorylation », « Oxydative_Phosphorylation »). Parmi les listes de gènes significativement surexprimés dans les cas de mauvais pronostic nous trouvons des listes de gènes associés au remodelage du stroma (« skeletal.Developpement », « Nervous.System.Developpement »).

3.3 L'étude sur TMA confirme le lien entre la richesse du microenvironnement en cellules B et un meilleur pronostic (tableaux 2 et 3, figures 3 et 4)

A la recherche de marqueurs pronostiques à l'échelon protéique, nous avons cherché à valider cette signature moléculaire sur un groupe indépendant de 146 autres échantillons de LHC regroupés sur un TMA pour étude immunohistochimique. Les anticorps utilisés étaient les suivants : BCL11A (gracieusement fourni par le Leukemia Research Fund Monoclonal Antibody Facility, université d'Oxford), BCL2 (Dako), LMP-1 (Dako), CD57 (Novocastra), FOX-P3 (eBiosciences), Tryptase (Dako), TIA-1 (Immunotech), BFAR (gracieusement fourni par Maryla Krajewska, Burnham institute for medical research, La Jolla, Californie), CD20 (DAKO), CD8 (Dako), STAT-1 (Cell signalling), BDCA2 (dendritics), topo-II α (Dako), SMAD4 (Novocastra) et PD-1 (produit dans notre institution).

BCL11A est une protéine exprimée par les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmocytoïdes (plasmacytoid dendritic cells, pDC). Nous l'avons retrouvée exprimée dans le microenvironnement tumoral et, très rarement, par les cellules de Reed-Sternberg.

Nous avons étudié le lien statistique entre l'expression de ces différentes molécules en immunohistochimie et la survie globale d'une part et la survie sans événement

d'autre part, en analyse univariée puis multivariée ajustés aux paramètres pronostiques classiques.

En analyse univariée :

En termes de survie globale (tableau 2) nous trouvons un lien avec un pronostic favorable lorsque de nombreuses cellules réactionnelles sont positives pour CD20 ou BCL11A. Au contraire, nous trouvons un lien avec un pronostic défavorable lorsqu'un nombre élevé de cellules réactionnelles expriment TIA-1 ou que les cellules tumorales expriment topolla.

En termes de survie sans événement (tableau 3) nous trouvons un effet pronostique favorable d'un nombre élevé de cellules réactionnelles BCL11A+, CD20+ ou FOXP3+. Nous trouvons la positivité des cellules tumorales pour topolla comme reliée à un pronostic défavorable.

Le lien pronostique avec BCL11A est fort puisqu'il est présent quel que soit le seuil de positivité choisi, ce qui n'est pas le cas pour FOXP3 et TIA-1.

Enfin nous ne retrouvons pas de lien pronostique de l'expression en immunohistochimie de BCL2, LMP-1, PD-1, CD57, tryptase, granzyme B, BFAR, PS100, CD8, STAT1, SMAD4, BDCA2.

En analyse multivariée ajustée aux facteurs pronostiques classiques de LHc (âge ≥ 45 ans, sexe, stade Ann Arbor, symptômes B, forte masse tumorale, atteinte extra ganglionnaire, nombre de sites ganglionnaires ≥ 3, atteinte inguinale, VS ≥ 50, Hémoglobine < 10,5g/dl, leucocytes ≥ 15 10⁹/l, lymphocytes < 0,6 10⁹/l ou ≥ 8%, albuminémie < 40g/l) nous retrouvons TIA-1, CD20, BCL11A, Topo-IIa, l'âge et le sexe comme significativement corrélés à la survie globale (**tableau 2**). En analyse multivariée de la survie sans événement seuls BCL11A et le taux de leucocytes sont significativement corrélés (**tableau 3**).

Finalement BCL11A est apparu comme le plus puissant marqueur prédictif de la survie sans événement. Il est corrélé à l'IPS et conserve sa valeur pronostique aussi bien dans le groupe IPS ≥ 3 que dans le groupe IPS < 3 (**figure 3**).

3.4 La signature moléculaire des LHc liés à l'EBV est enrichie en gènes caractéristiques d'une réponse immunitaire antivirale de type Th1 (figure 2B)

En plus de la recherche d'une signature moléculaire liée au pronostic, nous avons souhaité rechercher une signature moléculaire liée au statut EBV dans l'espoir de mettre en évidence une réaction immunitaire spécifique au sein des tumeurs EBV+.

L'analyse supervisée a été menée sur 53 échantillons de LHc, 18 EBV+ et 35 EBV-. Elle nous a permis d'isoler 425 ARNm correspondant à 357 gènes uniques, comprenant 422 ARNm (354 gènes) surexprimés dans les cas EBV+ et 3 ARNm (3 gènes) surexprimés dans les cas EBV-. Les résultats sont présentés dans la **figure 2B**, selon une représentation analogue à celle de l'analyse supervisée liée au pronostic. La classification de nos échantillons par le prédicteur moléculaire selon la méthode de l'analyse linéaire discriminante permet un taux de classement exact de 96%.

Les gènes surreprésentés dans les cas EBV+ correspondent à plusieurs catégories fonctionnelles, comportant notamment « immune response » et « defense response ».

Les cas EBV+ présentaient des taux plus élevés d'expression d'IFNG et de plusieurs gènes dont l'expression est induite par l'IFNG, comme GBP1, CXCL9, CXCL10, CXCL11, STAT1, IFIT5, ainsi que de nombreuses molécules antivirales IFN-induites (PLSCR1, IFIH1) ou impliquées dans la réponse antivirale innée comme IFIH1, TLR1, TLR8, OAS1, IVNS1ABP.

Les cas EBV+ étaient également associés à une expression plus élevée de gènes associés aux lymphocytes T activés (SLAMF7, SLAMF8, TRAIL, CD38), aux macrophages (CXCL9, CXCL10, STAT1, CD14, CD68, cathepsins, CASP1, C3AR1, CCL5, CD64, CD163, TNFSF13, CCR1 et des facteurs du complément.

En analyse GSEA nous trouvons que la signature moléculaire des cas EBV+ est significativement enrichie en gènes associés aux lymphocytes Th1 (GS 9, 10 et 11), alors qu'elle n'est pas enrichie en gènes associés aux lymphocytes Th2 (GS12 à GS14).

Cette signature moléculaire significativement différente entre les LHc EBV+ et les LHc EBV- a été validée par RQ-PCR en mettant en évidence une expression différente de deux gènes sélectionnés : INFG et IFIH1. 4 cas de LHc EBV+ présentaient un niveau d'expression plus élevé d'IFIH1 (x 5,1), et d'IFNG (x 2,6) comparé aux niveaux d'expression de ces deux gènes dans 3 cas de LHc EBV-.

3.5 Les sous-types histologiques « sclérose nodulaire » et « cellularité mixte » ont des profils d'expression génique différents

Nous avons comparé les profils d'expression génique de nos échantillons de LHc en fonction de leur type histologique. La population étudiée comprenait 42 LHc scléronodulaires et 17 LHc de cellularité mixte. 76 ARNm correspondant à 67 gènes uniques présentaient une expression significativement différente entre ces deux groupes. 64 ARNm représentant 55 gènes étaient surexprimés dans les cas de LHc scléronodulaires alors que 12 ARNm correspondant à 12 gènes uniques étaient surexprimés dans les cas de LHc de cellularité mixte.

Les gènes surexprimés dans les cas de LHc scléronodulaires sont impliqués dans le modelage de la matrice extracellulaire (CALD1, COL6A3, ITGB1, ITGAV) ainsi que dans des fonctions cellulaires non spécifiques (PDGFRA, THY 1, RHOC).

Les gènes surexprimés dans les cas de LHc de cellularité mixte sont le reflet de l'activation lymphocytaire (TLR8, CD38, SLAMF7)

3.7 Le microenvironnement des LBGCRLT/H est riche en lymphocytes T PD-1+, au contraire de celui des LHc

L'analyse d'expression génique non supervisée (**figure 1**) a mis en évidence une très grande différence de profil d'expression entre LHc et LBGCRLT/H. Pourtant ces tumeurs présentent d'importantes similitudes histologiques, notamment le faible nombre de cellules tumorales et leur génotype B. Etant donné l'importance quantitative du microenvironnement dans ces deux tumeurs, nous avons postulé que ces différences d'expression géniques sont sous-tendues par leurs microenvironnements.

Nous avons mené une nouvelle analyse supervisée afin de définir une signature moléculaire qui permette de différencier nos 63 échantillons de LHc et nos 5

échantillons de LBGCRLT/H. Nous identifions 666 ARNm correspondant à 614 gènes uniques, dont 276 gènes surexprimés dans les LBGCRLT/H.

L'un des gènes les plus fortement surexprimé dans les LBGCRLT/H est le gène codant pour Programmed Death-1 (PD-1). PD-1 est un récepteur inhibiteur de la physiologie lymphocytaire T. Il est notamment exprimé par les lymphocytes T du centre germinatif (T follicular helper, T_{FH}) et les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Nous avons validé cette signature PD-1 à l'échelon protéique sur notre TMA de 146 LHc et une série de 13 LBGCRLT/H. Tous les cas de LBGCRLT/H présentaient un marquage PD-1+ sur la quasi-totalité de leur population lymphocytaire microenvironnementale alors que seuls 8 cas de LHc présentaient une positivité pour PD-1 de niveau 2 ou 3 (**figure 4 F, G, H**).

Nous avons essayé de déterminer si ces lymphocytes T PD-1+ correspondaient à des T_{FH} ou des Treg. Pour cela nous avons soumis nos 15 cas de LBGCRLT/H à une immunohistochimie anti-CXCL13 (exprimé par les T_{FH}) et anti-FOXP3 (exprimé par les Treg). Malheureusement CXCL13 ne marquait que très peu de cellules dans le microenvironnement de nos 15 LBGCRLT/H, alors que FOXP3 était toujours quasi-totalement négatif. Nous ne sommes donc pas en mesure de conclure quant à la nature des lymphocytes T PD-1+ présents en grand nombre dans le microenvironnement des LBGCRLT/H.

4 Article : B Chetaille et al. Une étude d'expression génique sur tissu total d'une série de 63 LHc avec validation sur Tissu Microarray (TMA) d'une série indépendante de 146 LHc. Blood. 2009;113: 2765-2775

5 Discussion

Notre travail est une des rares études transcriptomiques de LHc réalisée sur tissu total. Les précédents travaux de ce type, dont un de notre équipe (214), avaient déjà suggéré l'apport potentiel des puces à ADN pour l'étude du microenvironnement des LHc mais ces travaux étaient limités par le faible nombre de cas étudiés ou ne s'étaient intéressés qu'à des LHc de stades avancés (215). Par ailleurs cette étude espagnole a utilisé une puce moins performante (étudiant 10 000 gènes contre 16 000 pour la notre) qui n'incluait pas BCL11A.

Notre travail confirme l'intérêt de l'étude transcriptomique des LHc. L'aspect du dendrogramme de l'analyse non supervisée confirme la grande hétérogénéité moléculaire des LH, mais souligne également leur profil moléculaire distinct des LBGCRLT/H.

De nombreux arguments cliniques et biologiques plaident en faveur d'un éloignement nosologique de ces deux pathologies pourtant histologiquement proches: les LHc sont des maladies de moyenne agressivité, localisées, du sujet jeune ; les LBGCRLT/H sont des maladies très agressives, disséminées, touchant des sujets plus âgés ; les LHc peuvent être liés à l'EBV alors que les LBGCRLT/H ne le sont jamais ; enfin 5% des LHNPL peuvent évoluer vers un LBGCRLT/H alors que jamais une telle évolution n'a été décrite à partir d'un LHc (2).

Notre étude comparée des microenvironnements des LHc et des LBGCRLT/H suggère que les mécanismes qui sous-tendent ces deux types de lymphomes sont différents : le microenvironnement des LBGCRLT/H est très riche en lymphocytes T PD-1+, au contraire des LHc qui en contiennent peu. Ceci suggère un rôle important du couple PD-1-PDL-1 dans les mécanismes d'échappement tumoral mis en œuvre par les LBGCRLT/H, alors que son rôle dans les LHc est certainement moindre. Ce résultat présente également un intérêt pour le pathologiste en termes de diagnostic différentiel -parfois difficile- entre LHc et LBGCRLT/H.

Cette constatation est également un argument supplémentaire en faveur d'un lien entre LHNPL et LBGCRLT/H. En effet les LHNPL comportent toujours des « rosettes » de lymphocytes T PD-1+ autour des cellules tumorales, suggérant que les T PD-1+ ont un rôle important dans les mécanismes d'échappement tumoral mis en œuvre par ces lymphomes dont les cellules LP expriment PDL-1. Lors de

l'évolution agressive d'un LHNPL vers un LBGCRLT/H on observe un enrichissement en cellules PD-1+, constatation cohérente avec un renforcement progressif du mécanisme d'échappement tumoral lié au couple PD-1-PDL-1.

Nous n'avons malheureusement pas été en mesure de démontrer si ces cellules PD1+ sont des T_{FH} CXCL13+ ou des Treg FOXP3+. Cependant, il serait étonnant qu'il s'agisse majoritairement de Treg. En effet la grande richesse en Treg est associée, aussi bien dans les LHc que dans les lymphomes folliculaires, à un bon pronostic. Un microenvironnement de LBGCRLT/H très riche en Treg serait donc paradoxal en regard de la grande agressivité de ces lymphomes.

Notre étude immunohistochimique sur TMA confirme la validité de cet outil pour l'étude des LHc, à condition d'étudier pour chaque cas plusieurs carottes prélevées dans des zones différentes de la tumeur. En effet, contrairement à beaucoup de tumeurs dont l'aspect est assez homogène (les carcinomes notamment), les LHc ont un aspect histologique hétérogène selon les champs microscopiques considérés. Ainsi, la richesse relative en cellules tumorales et en cellules du microenvironnement et la composition du microenvironnement peuvent être très différents d'une zone à l'autre. Dans les LHc-SN notamment, les cellules tumorales sont volontiers groupées en amas contrastant avec des champs totalement dépourvus de cellules tumorales et ne comportant que de la fibrose ou des polynucléaires. Afin de réaliser notre étude sur un tissu représentatif nos TMA comportaient pour chaque cas 3 cylindres de tissus de 1mm choisis dans des zones différentes de la tumeur.

Le résultat le plus important de notre travail concerne la richesse en cellules B du microenvironnement, très fortement corrélée à un bon pronostic.

Cette constatation est cohérente avec le fait que les deux sous-types histologiques de LH dont le microenvironnement est le plus riche en lymphocytes B, le LHc-RL et le LHNPL, sont aussi les LH qui ont de très loin le meilleur pronostic. En effet ces deux sous-types histologiques rares représentent chacun environ 5% des LH mais sont quasi-toujours des maladies de stade I ou II, faiblement évolutives, d'excellent pronostic, parfois même guéris par la seule chirurgie d'exérèse.

Il est intéressant de mettre en parallèle le comportement clinique très proche de ces deux maladies et la grande similitude de leurs microenvironnements riches en lymphocytes B, alors que leurs cellules tumorales sont phénotypiquement très

différentes : phénotype B altéré CD30+/CD15+ pour les CRS du LHc-RL, phénotype B complet CD30-/CD15- pour les cellules LP du LHNPL. Cette constatation suggère un rôle prépondérant du microenvironnement Hodgkinien dans le comportement de la maladie, probablement plus important que le phénotype des cellules tumorales lui-même.

La corrélation entre le grand nombre de cellules B réactionnelles et l'agressivité de la maladie se retrouve dans les constatations histologiques faites lors de l'évolution d'un LHNPL vers un LBGCRLT/H. En effet la transformation du lymphome indolent vers un lymphome agressif s'accompagne d'une modification du microenvironnement (le phénotype des cellules tumorales étant inchangé) avec disparition des lymphocytes B et enrichissement progressif en lymphocytes T CD8+.

Le marqueur pronostique le plus significatif que nous retrouvons concerne la richesse en cellules BCL11A. Ce facteur de transcription est exprimé par les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmocytoïdes (pDC) normales, de telle sorte qu'il est difficile d'affirmer que le bon pronostic lié à BCL11A est porté par les lymphocytes B, par les pDC ou par les deux.

Dans notre travail CD20 est également un marqueur de bon pronostic, mais moins puissant que BCL11A, laissant penser que la présence d'un grand nombre de lymphocytes B peut, à elle seule, être responsable d'un bon pronostic, mais que la présence d'un grand nombre de pDC renforce cet effet. Par ailleurs, le nombre de pDC (comptées grâce à un anticorps anti-BDCA2) n'est pas corrélé au pronostic.

Prises globalement ces constatations suggèrent que la mise en œuvre d'une réponse anti-tumorale efficace repose sur une collaboration entre pDC et lymphocytes B.

Ces constatations sont cohérentes avec celles faites par Schreck *et al* (123) qui retrouvaient également un bon pronostic associé à une réponse de type Th2 et qui faisaient l'hypothèse d'une possible action antitumorale directe des cellules Th2.

Nos constatations rejoignent également celles faites récemment par Steidl *et al* (216) dans une étude très comparable à la nôtre où ils identifient l'expression de CD20 dans le microenvironnement comme associée une meilleure survie. Ces auteurs identifient également le grand nombre de macrophages CD68+ comme corrélé à un mauvais pronostic, données que nous sommes en train de tester sur notre TMA.

Le bon pronostic associé à l'expression du CD20 dans le microenvironnement et la notion que la population lymphocytaire B est nécessaire à l'efficacité des défenses anti-tumorales microenvironnementales vont contre un rationnel scientifique pour l'adjonction d'une immunothérapie anti-CD20 (Rituximab) aux traitements classiques par chimiothérapie (type R-ABVD) comme le suggèrent certains auteurs, notamment dans les maladies réfractaires ou en rechute (43). En effet, si les lymphocytes B microenvironnementaux sont nécessaires à une réponse anti-tumorale efficace, les supprimer pourrait avoir un effet néfaste.

Cependant, la découverte récente de cellules B « souches » pouvant servir de pool de régénération aux cellules tumorales (41) pourrait relancer l'intérêt du traitement des LHc par anti-CD20, la destruction de ces cellules souches par l'anticorps humanisé pouvant avoir un effet antitumoral supérieur à l'effet « néfaste » qu'il pourrait avoir sur le microenvironnement B.

En pratique, seuls des essais randomisés pourront statuer quant à l'efficacité de l'anti-CD20 dans le traitement des LHc en adjonction d'une chimiothérapie conventionnelle. Dans la conception de ces essais il sera intéressant que soit inclus d'une part une évaluation histologique de la composition du microenvironnement et de l'expression du CD20 par les CRS, mais également une quantification des cellules « souches » B circulantes afin de pouvoir rapporter l'éventuelle efficacité du Rituximab à l'un ou l'autre de ces mécanismes. En cohérence avec nos résultats il ne serait pas étonnant que les cas les plus riches en lymphocytes B réactionnels ne soient pas ceux qui bénéficient le plus du Rituximab.

Par ailleurs la validation du bon pronostic lié à la richesse en cellules B du microenvironnement nécessitera une étude prospective. Si cette information était validée elle constituerait un argument majeur pour une désescalade thérapeutique dans les cas de LHc riche en lymphocytes B. Nous pensons que ce résultat est d'ores et déjà un argument supplémentaire pour une désescalade thérapeutique dans les LHc-RL et dans les LHNPL.

Notre étude sur TMA confirme d'autres données pronostiques de la littérature.

Nous retrouvons tout d'abord un effet pronostique favorable relié à un grand nombre de cellules FOXP3+ dans le microenvironnement des LHc. Ceci renforce le paradoxe de la richesse microenvironnementale en Treg puisqu'il a déjà été décrit que les Treg

sont porteurs d'un mauvais pronostic dans la plupart des cancers solides, mais sont associés à un bon pronostic dans les LHc et dans les lymphomes folliculaires.

Ce paradoxe pourrait être au moins en partie expliqué par l'existence de différentes populations de Treg dont les effets seraient différents. D'autres explications possibles ont été évoquées dans le chapitre « composition du microenvironnement ». Tout d'abord l'hypothèse selon laquelle la richesse en Treg pourrait être le reflet d'une immunité anti-tumorale active et efficace au sein du microenvironnement Hodgkinien. L'attraction, la différenciation et la multiplication des Treg autour des cellules tumorales, notamment via la galectine 1, serait alors à interpréter comme un mécanisme mis en œuvre par les cellules tumorales pour contrecarrer des défenses anti-tumorales efficaces.

Une deuxième hypothèse est que les Treg pourraient avoir une action suppressive sur les synthèses cytokiniques produites par le microenvironnement. La sécrétion d'IL10 par les Treg pourrait notamment inhiber la synthèse d'IL8, d'IL12 et de TGF- β par le microenvironnement. La richesse en Treg serait alors responsable indirectement de la privation des CRS d'une partie de leur soutien stromal.

Enfin, il ne peut pas être exclu que les Treg puissent avoir une action anti-tumorale propre directement sur les CRS, soit via l'IL10 ou CTLA4, soit par contact direct.

De la même manière, nos résultats concernant Topolla et TIA1 sont cohérents avec ceux de la littérature : ils sont tous les deux reliés à un mauvais pronostic.

Topolla est une molécule ambivalente puisque sa forte expression confère à la CRS un avantage prolifératif, mais l'expose également, au moins en théorie, à une plus grande sensibilité à la chimiothérapie. Notre résultat et ceux de la littérature suggèrent que l'effet « avantage prolifératif » surclasse l'effet « chimiosensibilité ».

Nous avons montré que les LHc-SN ont une signature d'expression génique différente de celle des LHc-CM. De nombreux arguments, notamment épidémiologiques, plaident effectivement pour une grande différence de ces deux maladies (6). Le LHc-SN survient plus souvent dans les pays développés, chez le jeune adulte avec une prédominance féminine, est peu lié à l'EBV et atteint préférentiellement le médiastin. Au contraire, le LHc-CM présente deux pics d'incidences chez l'enfant et l'adulte âgé, atteint peu l'adulte jeune, est plus fréquent chez l'homme et dans les pays en voie de développement, est beaucoup plus

fortement lié à l'EBV, atteint peu le médiastin, l'ensemble de ces caractéristiques le rapprochant du LHc-DL.

Ainsi, le LHc-SN apparaît plus proche des LBGC médiastinaux (thymiques) alors que le LH-CM semble plus proche du LHc-DL dont il pourrait ne constituer qu'une forme moins agressive.

Il apparaît que l'on peut certainement proposer de reclasser les LH comme suit :

- D'une part le LHc-SN, entité très particulière qui constitue plus de 80% des LHc diagnostiqués dans les pays occidentaux et que l'on peut rapprocher, par ses caractéristiques cliniques, épidémiologiques et moléculaires des LBGC médiastinaux (thymiques) ;
- D'autre part les LHc-CM et DL plus fréquents dans les milieux socio-économiques défavorisés, les pays en voie de développement et très reliés à l'EBV (et à un moindre degré au HIV puisque tous les LH des patients HIV appartiennent à ces deux catégories).
- Enfin les LHNPL et les LHc-RL qui sont très proches par leur grandes similitudes de comportement clinique (maladies indolentes, de stade I ou II dans l'immense majorité des cas, d'excellent pronostic) et de microenvironnement (richesse en lymphocytes B).

Peut être faudra-t-il un jour inclure dans cette classification une dichotomie entre les LHc-EBV+ et les LH-EBV-. En effet nous avons montré que les signatures d'expression génique de ces deux grands groupes de LHc sont différentes, suggérant deux groupes de maladies aux mécanismes physiopathologiques initiaux différents.

Ces mécanismes physiopathologiques empruntent très probablement des voies de signalisation communes, telle NF κ B, mais mise en œuvre par des stimuli différents, tels que LMP-1 dans le cas d'un LHc-EBV+, une activation de CD40 ou une activation constitutive de la I κ K dans un LHc-EBV-.

Nos données vont dans le même sens que celles de Teichman *et al* (159) qui mettent en évidence une corrélation entre l'expression par les CRS de CXCL10 (une cytokine Th1 dont la synthèse est induite par l'INF γ), la présence de l'EBV et le sous-type cellularité mixte.

Elles vont également dans le sens des données de Diepstra *et al* (203) qui montrent que l'expression de HLAII par les CRS est corrélée à la présence de l'EBV et au sous-type cellularité mixte suggérant que dans les cas EBV+ les CRS stimulent une réaction Th1 via une plus forte expression de HLA II.

6. Conclusion.

Dans 80 à 90 % des cas un patient qui présente un LH sera guéri par les traitements modernes. Le principal enjeu aujourd'hui consiste à pérenniser ces bons résultats thérapeutiques tout en diminuant les effets secondaires, notamment la survenue à long terme de cancers chimio et/ou radio induits.

Un des moyens d'y parvenir est d'identifier dès le diagnostic les patients dont la tumeur est peu agressive et susceptible d'être éradiquée par un traitement moins lourd.

Nous avons mis en évidence que les LH dont le microenvironnement est riche en lymphocytes B sont associés à un meilleur pronostic et donc susceptibles de bénéficier d'une désescalade thérapeutique. Chez ces patients la réduction du nombre de cycles de chimiothérapie est susceptible d'apporter le même résultat thérapeutique au prix d'effets secondaires moindres.

Nos résultats sont cohérents avec le très bon pronostic lié à certaines formes rares de LH (LHNPL et LHc-RL) dont le microenvironnement est très riche en cellules B. Par ailleurs une étude récente, postérieure à la notre, corrobore nos résultats.

L'évaluation de ce nouveau facteur pronostique est réalisable en pratique courante par immunohistochimie anti-BCL11A et anti-CD20. Elle peut s'intégrer facilement aux cotés des autres facteurs pronostiques reconnus que sont le stade Ann Arbor, l'index pronostique international et l'évaluation précoce de la réponse au traitement par TEP-scanner.

On peut notamment imaginer que les patients stade I/II, sans facteur de risque à l'IPS, en réponse complète au TEP après deux cures de chimiothérapie ET dont le microenvironnement est riche en cellules B soient susceptibles de bénéficier d'une désescalade thérapeutique.

La validation d'une telle attitude requiert à présent des essais prospectifs randomisés en fonction des marqueurs biologiques.

Enfin, la démonstration d'une réaction Th1 dans les LH EBV+ suggère qu'il serait possible de stimuler cette réponse pour la rendre plus efficace. Il s'agit là d'une base pour l'élaboration de nouvelles thérapies immunomodulatrices dans les LH.

Références :

1. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001.
2. Swerdlow S.H, Campo E, Harris N.L, Jaffe E.S, Pileri S.A, Stein H, Thiele J, Vardiman J.W (Eds): WHO classification of Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. IARC : Lyon 2008.
3. Hodgkin T (1832). On some morbid appearances of the adsorbent glands and spleen. *Me Chir Soc Tr.* 1832; 17:68.
4. Pileri SA, Ascani S, Leoncini L, Sabattini E, Zinzani PL, Piccaluga PP, Pileri A Jr, Giunti M, Falini B, Bolis GB, Stein H. Hodgkin's lymphoma, the pathologist's point of view. *J Clin Pathol.* 2002; 55(3):162-76.
5. Diehl V, Thomas R. K., Re D. Part II: Hodgkin's lymphoma -diagnosis and treatment. *Lancet Oncol.* 2004; 5:19–26.
6. Mani H, Jaffe ES. Hodgkin lymphoma: an update on its biology with newer insights into classification. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009; 9(3):206–216.
7. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, *et al.* Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol.* 1997 ;183:116–23.
8. Tzankov A. *et al.* Rare expression of T-cell markers in classical Hodgkin's lymphoma. *Mod. Pathol.* 2005;18: 1542–1549
9. Aguilera N. S. *et al.* Gene rearrangement and comparative genomic hybridization studies of classic Hodgkin lymphoma expressing T-cell antigens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2006;130:1772–1779.
10. Sabattini E, Gerdes J, Gherlinzoni F, *et al.* Comparison between the monoclonal antibodies Ki-67 and PC10 in 125 malignant lymphomas. *J Pathol.* 1993;169:397–403
11. Leoncini L, Close P, Bothur P, *et al.* Apoptosis in Hodgkin's disease: an in situ endlabelling study correlated with proliferation indices and expression of cell death gene, p53 and BCL-2. *Curr Diagn Pathol.* 1995;2:51–2.
12. Vassallo J, Brousset P, Knecht H, *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Applied Immunohistochemistry.* 1993;1:213–19.

13. Weinreb M, Day PJ, Niggli F, *et al.* The consistent association between Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease in children in Kenya. *Blood*.1996;87:3828–36.
14. Von Wasielewski R, Werner M, Fischer R, *et al.* Lymphocyte-predominant Hodgkin's disease: an immunohistochemical analysis of 208 reviewed Hodgkin's disease cases from the German Hodgkin study group. *Am J Pathol*. 1997 ;150 :793–803.
15. Anagnostopoulous I, Hansmann M-L, Fransilla K, *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*.2000 ;96 :1889–99
16. Shimabukuro-Vornhagen A, Haverkamp H, Engert A, *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*. 2005 ;23(24) :5739–45.
17. Ben-Yehuda-Salz D, Ben-Yehuda A, Polliack A, *et al.* Syncytial variant of nodular sclerosing Hodgkin's disease. A new clinicopathologic entity. *Cancer*.1990 ;65 :1167–72.
18. Semakula B, Rittenbach JV, Wang J. Hodgkin Lymphoma–like Posttransplantation Lymphoproliferative Disorder. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: 2006; 130 (4):558-560
19. Pitman SD; Huang, QZ, Craig W.; Rowsell EH.; Cao JD.; Berdeja JG.; Weiss LM.; Wang J. Hodgkin Lymphoma-Like Posttransplant Lymphoproliferative Disorder (HL-Like PTLD) Simulates Monomorphic B-Cell PTLD Both Clinically and Pathologically. *Am Jour Surgical Pathol*. 2006 ;30(4) :470-476.
20. Rowlings PA, Curtis RE, Passweg JR, *et al.* Increased incidence of Hodgkin's disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*.1999;17 :3122–3127.
21. Kanavaros P, Gaulard P, Charlotte F, *et al.* Discordant expression of immunoglobulin and its associated molecule mb-1/CD79a is frequently found in mediastinal large B cell lymphomas. *Am J Pathol*. 1995 ;146 : 735-741.

22. Copie-Bergman C, Plonquet A, Alonso MA, *et al.* MAL expression in lymphoid cells: further evidence for MAL as a distinct molecular marker of primary mediastinal large B-cell lymphomas. *Mod Pathol.* 2002 ;15 : 1172-1180.
23. Barth TF, Leithauser F, Joos S, Bentz M, Moller P. Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma : where do we stand ? *Lancet Oncol.* 2002 ;3 : 229-234.
24. Savage KJ, Monti S, Kutok JL, Cattoretti G, Neuberg D, De Leval L, Kurtin P, Dal Cin P, Ladd C, Feuerhake F, Aguiar RC. T, Li S, Salles G, Berger F, Jing W, Pinkus GS., Habermann T, Dalla-Favera R, Harris NL., Aster JC, Golub TR., Shipp MA. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2003 ;102 (12) :3871-3879.
25. Angel CA, Pringle JH, Primrose L, Lauder I. Detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in Hodgkin's disease using PCR. *J Clin Pathol.* 1993; 46(10);940–2.
26. Angel CA, Pringle JH, Naylor J, West KP, Lauder I. Analysis of antigen receptor genes in Hodgkin's disease. *J Clin Pathol.* 1993;46(4) :337–40.
27. Hebeda KM, Van Altena MC, Rombout P, Van Krieken J, Groenen P. PCR clonality detection in Hodgkin lymphoma. *J Hematop.* 2009;2(1):34-41.
28. Vassallo J, Lamant L, Brugieres L, Gaillard F, Campo E, Brousset P, Delsol G. ALK-Positive Anaplastic Large Cell Lymphoma Mimicking Nodular Sclerosis Hodgkin's Lymphoma : Report of 10 Cases. *Am Jour Surg Pathol.* 2006;30(2) :223-229.
29. Mason DY, Banks PM, Chan J, *et al.* Nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease: a distinct clinicopathologic entity. *Am J Surg Pathol.* 1994;18:526–30.
30. Küppers 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.* 1994;91, 10962–10966.
31. Hummel M, Marafioti T, Stein H. Immunoglobulin V genes in Reed-Sternberg cells. *N Engl J Med.* 1996;334:405–6.
32. Marafioti T, Hummel M, Anagnostopoulos I, *et al.* Origin of nodular lymphocyte predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal center B cells. *N Engl J Med.* 1997;337:453–8.

33. Izban KF, Nawrocki JF, Alkan S, *et al.* Monoclonal IgH gene rearrangement in microdissected nodules from nodular sclerosis Hodgkin's disease. *Am J Clin Pathol.* 1998;110:599–606.
34. Marafioti T, Hummel M, Foss HD, *et al.* Hodgkin and Reed-Sternberg cells represent an expansion of a single clone originating from a germinal center B-cell with functional immunoglobulin gene rearrangement but defective immunoglobulin transcription. *Blood.* 2000;95:1443–50.
35. Seitz V, Hummel M, Marafioti T, *et al.* Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene-rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin's disease. *Blood.* 2000;95:3020–4
36. Barry TS., Jaffe ES, Sorbara L, Raffeld M, Pittaluga S. Peripheral T-cell lymphomas expressing CD30 and CD15. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003;27, 1513–1522.
37. Willenbrock K *et al.* Common features and differences in the transcriptome of large cell anaplastic lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2006;91: 596–604.
38. Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed–Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 1996;184:1495–1505.
39. Bräuninger A *et al.* Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:1239–1247.
40. Marafioti T *et al.* Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J. Clin. Oncol.* 1999 ;17 :3804–3809.
41. Jones RJ, Gocke CD, Kasamon YL, Miller CB, Perkins B, Barber JP, Vala MS, Gerber JM, Gellert LL, Siedner M, Lemas MV, Brennan S, Ambinder RF, Matsui W. Circulating clonotypic B cells in classic Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2009;113:5920-5926.
42. Küppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer.* 2009 ;9:15-27.
43. Younes A, Romaguera J, Hagemester F, *et al.* A pilot study of Rituximab in patients with recurrent, classic Hodgkin disease. *Cancer.* 2003;98:310–14.

44. Carbone A, *et al.* Expression status of BCL-6 and syndecan-1 identifies distinct histogenetic subtypes of Hodgkin's disease. *Blood*. 1998;92:2220–2228.
45. Greiner A *et al.* Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J. Pathol.* 2005; 205 :541–547.
46. Braeuninger A *et al.* Hodgkin and Reed–Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1997 ; 94 :9337–9342.
47. Brune V, *et al.* Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J. Exp. Med.* 2008;205:2251–2268.
48. Wlodarska I, Nooyen P, Maes B, Martin-Subero JI, Siebert R, Pauwels P, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A. Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003; 101(2):706-10.
49. Schwering I, *et al.* Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed–Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;101:1505–1512.
50. Carbone A, *et al.* Expression of functional CD40 antigen on Reed–Sternberg cells and Hodgkin's disease cell lines. *Blood*. 1995;85:780–789.
51. Van Gool SW, *et al.* Expression of B7–2 (CD86) molecules by Reed–Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Leukemia*. 1997 ; 11 :846–851.
52. Re D, *et al.* Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res.* 2001;61:2080–2084.
53. Stein H, *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*. 2001 ; 97 :496–501.
54. Torlakovic E, Tierens A, Dang HD, Delabie J. The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 2001;159:1807–1814.
55. Mathas S, *et al.* Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nature Immunol.* 2006;7:207–215.

56. Renne C, Martin-Subero JI, Eickernjager M, *et al.* Aberrant expression of ID2, a suppressor of B-cell specific gene expression in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol.* 2006;169:655–64.
57. Jundt F, *et al.* Activated Notch 1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood.* 2001;99:3398–3403.
58. Jundt F, *et al.* Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* 2008;22:1587–1594.
59. Doerr JR, *et al.* Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. *J. Mol. Biol.* 2005;350:631–640.
60. Ushmorov A, Leithauser F, Sakk O, *et al.* Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2006;107:2493–2500.
61. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420:860–867.
62. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene.* 1999;18:6853–6866.
63. Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF- κ B/Rel and I κ B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med.* 1996;74:749-769.
64. Rayet B, Gelinac C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene.* 1999;18:6938-6947.
65. Hinz M, Lemke P, Anagnostopoulos I, *et al.* Nuclear factor κ B-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity, *J Exp Med.* 2002;196:605–617.
66. Horie R, Watanabe T, Morishita Y, *et al.* Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF- κ B activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells, *Oncogene.* 2002;21:2493–2503.
67. Eliopoulos AG, Stack M, Dawson CW *et al.* Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF- κ B pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene.* 1997;14:2899–2916.

68. Fiumara P, Snell V, Li Y, *et al.* Functional expression of receptor activator of nuclear factor kappaB in Hodgkin disease cell lines. *Blood*. 2001;98: 2784-2790.
69. Wood KM, Roff M, Hay RT. Defective I κ B α in Hodgkin cell lines with constitutively active NF- κ B. *Oncogene*. 1998;16:2131–2139.
70. Dutton A, Reynolds GM, Dawson CW, *et al.* Constitutive activation of phosphatidyl-inositide 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol*. 2005;205:498–506.
71. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 489-501.
72. Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res*. 1999; 253: 210-229.
73. Romashkova JA, Makarov SS. NF- κ B is a target of Akt in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature*. 1999; 401:33-4.
74. van Weeren PC, de Bruyn KM, de Vries-Smits AM, van Lint J, Burgering BM. Essential role for protein kinase B (PKB) in insulin-induced glycogen synthetase kinase 3 inactivation: characterisation of dominant-negative mutant of PKB. *J Biol Chem*. 1998; 273:13150-6.
75. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001; 22:153-183.
76. Towatari M, Iida H, Tanimoto M, Iwata H, Hamaguchi M, Saito H. Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells. *Leukemia*. 1997;11: 479-484.
77. Adeyinka A, Nui Y, Cherlet T, Snell L, Watson PH, Murphy LC. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. *Clin Cancer Res*. 2002 ; 8: 1747-1753.
78. Persons DL, Yazlovitskaya EM, Cui W, Pelling JC. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res*. 1999;5: 1007-1014.

79. MacKeigan JP, Collins TS, Ting JP. MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. *J Biol Chem*. 2000;275: 38953-38956.
80. Yu C, Krystal G, Varticovski L, *et al*. Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer Res*. 2002; 62: 188-199.
81. Morgan MA, Dolp O, Reuter CW. Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood*. 2001; 97: 1823-1834.
82. Zheng B, Fiumara P, Li YV, *et al*. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin's disease: a signalling pathway shared by CD30, CD40 and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood*. 2003; 102:1019–27.
83. Kube D, Holtick U, Vockerodt M, *et al*. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood*. 2001; 98:762–70.
84. Skinnider BF, Elia AJ, Gascoyne RD, *et al*. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002; 99:618–26.
85. Weniger MA *et al*. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. *Oncogene*. 2006 ; 25 :2679–2684.
86. Mottok A, Renné C, Willenbrock K, Hansmann ML, Bräuninger A. Somatic hypermutation of *SOCS1* in lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma is accompanied by high JAK2 expression and activation of STAT6. *Blood*. 2007;110: 3387–3390.
87. Joos S, Granzow M, Holtgreve-Grez H, *et al*. Hodgkin's lymphoma cell lines are characterized by frequent aberrations on chromosomes 2p and 9p including REL and JAK2. *Int J Cancer*. 2003;103:489–95.
88. Mathas S. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- κ B. *EMBO Journal*. 2002;21:4104-13.
89. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001; 411: 355-365.

90. Torcia M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M, et al. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell*. 1996; 85: 345-356.
91. Skibinski G, Skibinska A, James K. The role of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in interactions between lymphocytes and stromal cells in secondary human lymphoid organs. *Immunology*. 2001; 102: 506-514.
92. Renné C, Willenbrock K, Küppers R, Hansmann ML, Bräuninger A. Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2005 ; 105: 4051-4059.
93. Renné C, Hinsch N, Willenbrock K, et al. The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer*. 2007; 120:2504–9.
94. Re D, Hofmann A, Wolf J, Diehl V, Staratschek-Jox A. Cultivated H-RS cells are resistant to CD95L-mediated apoptosis despite expression of wild-type CD95, *Exp Hematol*. 2000;28:31–35.
95. Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I et al. c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor–induced apoptosis. *J Exp Med* 2004;199:1041–1052.
96. Kashkar H, Haefs C, Shin H et al. XIAP-mediated caspase inhibition in Hodgkin's lymphoma-derived B cells. *J Exp Med*. 2003; 198:341–7.
97. Reed DM. On pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep*. 1902; 10: 133-196.
98. Hellinger SM, Herzig GP. Impaired cell-mediated immunity in Hodgkin's disease mediated by suppressor lymphocytes and monocytes. *J Clin Invest*. 1978;61: 1620-1627.
99. Levy R, Kaplan HS. Impaired lymphocyte function in untreated Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1974;290: 181-186.
100. Green I, Corse PF. A study of skin homografting in patients with lymphomas. *Blood*. 1959;14: 235-245.
101. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004; 103:1755–1762.

102. Poppema S, van den Berg A. Interaction between host T cells and Reed-Sternberg cells in Hodgkin lymphomas. *Semin Cancer Biol.* 2000 ; 10:345-50.
103. Rezvani K, Mielke S, Ahmadzadeh M, et al. High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood.* 2006;108:1291-1297.
104. Barao I, Hanash AM, Hallett W, et al. Suppression of natural killer cell-mediated bone marrow cell rejection by CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:5460-5465.
105. Zorn E, Kim HT, Lee SJ, et al. Reduced frequency of FOXP3+ CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic graft versus-host disease. *Blood.* 2005;106:2903-2911.
106. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 2001; 182:18-32.
107. Bacchetta R, Passerini L, Gambineri E, et al. Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J Clin Invest.* 2006;116:1713-1722.
108. Marshall NA, Vickers MA, Barker RN. Regulatory T cells secreting IL-10 dominate the immune response to EBV latent membrane protein 1. *J Immunol.* 2003;170:6183-6189.
109. Knutson KL, Disis ML, Salazar LG. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56:271-85.
110. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, et al. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res.* 1999;59:3128-3133.
111. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol.* 1999; 163:5211-18.
112. Curiel TJ et al. Specific recruitment of regulatory T-cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004. 10: 942-9.

113. Gao Q, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol.* 2007;25: 2586-93.
114. Kobayashi N, et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2007;13:902-11.
115. Petersen RP et al. Tumor infiltrating FOXP3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer.* 2006;107: 2866-72.
116. Mizukami Y, et al. Location pattern of FOXP3+ regulatory T-cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer.* 2008;98:148-53.
117. Bates GJ et al. Quantification of regulatory T-cells enables the identification of high risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006;24:5373-80.
118. Viguier M et al. FOXP3 expressing CD4+ CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.* 2004;173:1444-53.
119. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:1467–73.
120. Alvaro-Naranjo T, Lejeune M, Salvadó-Usach MT, et al. Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leuk Lymphoma.* 2005;46:1581–1591.
121. 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.* 2007;128:958–965.
122. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica.* 2008; 93:193–200.

123. Schreck S, Friebe D, Buettner M, Distel L, Grabenbauer G, Young LS, Niedobitek G. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol*. 2009; 27:31-9.
124. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*. 1998; 188: 2357-2368.
125. Yu P, Fu YX. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? *Lab Invest*. 2006; 86: 231-245.
126. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, 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*. 2007; 104:13134–13139.
127. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002; 99:4283–4297.
128. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp Hematol*. 2006; 34:399–406.
129. Samoszuk M, Nansen L. Detection of interleukin-5 messenger RNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with eosinophilia. *Blood*. 1990;75:13–16.
130. Jundt F, I Anagnostopoulos I, Bommert K et al. Hodgkin/Reed-Sternberg cells induce fibroblasts to secrete eotaxin, a potent chemoattractant for T cells and eosinophils. *Blood*. 1999;94:2065–71.
131. Foss HD, Herbst H, Oelmann E et al. Lymphotoxin, tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcripts are present in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of most Hodgkin's disease cases. *Br J Haematol*. 1993;84:627–635.
132. Van den Berg A, L. Visser L, Poppema S. High expression of the CC chemokine TARC in Reed-Sternberg cells. A possible explanation for the characteristic T-cell infiltrate in Hodgkin's lymphoma. *Am J Pathol*. 1999;154:1685–1691.
133. Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, Goeddel DV. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*. 1990;347:669–671.
134. Jucker M, Abts H, Li W et al. Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. *Blood*. 1991;77:2413–2418.

135. Foss HD, Hummel M, Gottstein S *et al.* Frequent expression of IL-7 gene transcripts in tumor cells of classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol.* 1995;146:33–39.
136. Gruss HJ, Brach MA, Drexler HG, Bonifer R, Mertelsmann RH, Herrmann F. Expression of cytokine genes, cytokine receptor genes, and transcription factors in cultured Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Cancer Res.* 1992;52:3353–3360.
137. Taga K, Mostowski H, Tosato G, Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood.* 1993;81:2964–2971.
138. Su CC, Chiu HH, Chang CC, Chen JC, Hsu SM, CD30 is involved in inhibition of T-cell proliferation by Hodgkin's Reed-Sternberg cells. *Cancer Res.* 2004;64:2148–2152.
139. Ohshima K, Akaiwa M, Umeshita R, Suzumiya J, Izuhara K, Kikuchi M, Interleukin-13 and interleukin-13 receptor in Hodgkin's disease: possible autocrine mechanism and involvement in fibrosis. *Histopathology.* 2001;38:368–375.
140. Foss HD, Herbst H, Gottstein S, Demel G, Araujo I, H. Stein H, Interleukin-8 in Hodgkin's disease. Preferential expression by reactive cells and association with neutrophil density. *Am J Pathol.* 1996;148:1229–1236.
141. Schwaller J, Tobler A, Niklaus G *et al.* Interleukin-12 expression in human lymphomas and nonneoplastic lymphoid disorders. *Blood.* 1995;85:2182–2188.
142. Kadin M, Butmarc J, Elovic A, Wong D. Eosinophils are the major source of transforming growth factor- β 1 in nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 1993;142:11–16.
143. Newcom SR, Gu L. Transforming growth factor β 1 messenger RNA in Reed-Sternberg cells in nodular sclerosing Hodgkin's disease. *J Clin Pathol.* 1995;48:160–163.
144. Hsu SM, Lin J, Xie SS, Hsu PL, Rich S. Abundant expression of transforming growth factor- β 1 and - β 2 by Hodgkin's Reed-Sternberg cells and by reactive T lymphocytes in Hodgkin's disease. *Hum Pathol* 1993;24:249–255.
145. Olive D. Lymphocyte coreceptor. *Med Sci (Paris).* 2006 ;22:1069-74.

146. Shinohara T, Taniwaki M, Ishida Y, Kawaichi M, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics*. 1994; 23(3):704-6.
147. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Ann Rev Immunol*. 2005 ; 23 :515-48.
148. Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H, Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *int immunol*. 1996;8:765-72.
149. Okasaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends immunol*. 2006;27:195-201.
150. Chen L. Co-inhibitory molecule of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4:336-47.
151. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, *et al*. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 ; 192 : 1027-34.
152. Brown JA, Dorfman DM, Ma FR, *et al*. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol*. 2003 ; 170 : 1257-66.
153. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, *et al*. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 ; 99 : 12293-7.
154. Rosenwald A, Wright G, Leroy K, *et al*. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favourable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003 ; 198 : 851-62.
155. Xerri L, Chetaille B, Seriari N, Attias C, Guillaume Y, Arnoulet C, Olive D. Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Hum Pathol*. 2008;39:1050-8.
156. Dorfman DM, Brown JA, Shahsafaei A, Freeman GJ. Programmed death-1 (PD-1) is a marker of germinal center-associated T cells and angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:802–810.

157. Muenst S, Hoeller S, Dirnhofer S, Tzankov A. Increased programmed death-1+ tumor-infiltrating lymphocytes in classical Hodgkin lymphoma substantiate reduced overall survival. *Hum Pathol.* 2009;40:1715-22.
158. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2008;111:3220–3224.
159. 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.* 2005;206:68–75.
160. Levine PH, Ablashi DV, Berard CW, et al. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer.* 1971;27:416–21.
161. Weiss LM, Strickler JG, Warnke RA, et al. Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am J Pathol.* 1987;129:86-91.
162. Anagnostopoulos I, Herbst H, Niedobitek G, et al. Demonstration of monoclonal EBV genomes in Hodgkin's disease and Ki-1positive anaplastic large cell lymphoma by combined Southern blot and in situ hybridization. *Blood.* 1989;74:810–6.
163. Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, et al. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1989;320:502–6.
164. Coates PJ, Slavin G, D'Ardenne AJ. Persistence of Epstein-Barr virus in Reed-Sternberg cells throughout the course of Hodgkin's disease. *J Pathol.* 1991;164:291–7.
165. Gutensohn N, Cole P. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Semin Oncol.* 1980;7:92–102.
166. Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med.* 2003;349:1324–32.
167. Hjalgrim H, Ekstrom Smedby K, Rostgaard K, et al. Infectious mononucleosis, childhood social environment and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2007;67:2382–8.
168. Staratschek-Jox A, Kotkowski S, Belge G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin-Reed-Sternberg cells: no evidence for the persistence of

- integrated viral fragments in latent membrane protein-1 (LMP-1)-negative classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol*. 2000;156:209–16.
169. Gallagher A, Perry J, Freeland J, *et al*. Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus (EBV): no evidence to support hit-and-run mechanism in cases classified as non-EBV-associated. *Int J Cancer*. 2003;104:624–30.
 170. Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007;60:1342–1349.
 171. Bechtel D, Kurth J, Unkel C, *et al*. Transformation of BCR-deficient germinal centre B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin's and posttransplant lymphoma. *Blood*. 2005;106:4345–50.
 172. Chaganti S, Bell AI, Beque-Pastor N, *et al*. Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal centre B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood*. 2005;106:4249–52.
 173. Mancao C, Altmann M, Jungnickel B, *et al*. Rescue of 'crippled' germinal centre B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood*. 2005;106:4339–44.
 174. Wu L, Nakano H, Wu Z. The CTAR2 domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activated NF-kappa B through TRAF6 and TAK1. *J Biol Chem*. 2005;281:2162–9.
 175. Eliopoulos AG, Gallagher, NJ, Blake SM, *et al*. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem*. 1999;274:16085–96.
 176. Eliopoulos AG, Young LS. Activation of the c-jun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene*. 1998;16:1731–42.
 177. Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, *et al*. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 1999;18:3064–73.
 178. Roberts ML, Cooper NR. Activation of a ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation. *Virology*. 1998;240:93–9.

179. Henderson S, Rowe M, Gregory C, *et al.* Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*. 1991;65:1107–15.
180. Laherty CD, Hu HM, Opipari AW, *et al.* The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*. 1992;267:24157–60.
181. Wang S, Rowe M, Lundgren E. Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res*. 1996;56:4610–3.
182. Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, *et al.* Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol*. 1994;68:5602–12.
183. Dutton A, Woodman CB, Chukwuma MB, *et al.* Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells. *Blood*. 2006;109:2597–603.
184. Miller CL, Burkhardt AL, Lee JH, *et al.* Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity*. 1995;2:155–66.
185. Portis T, Dyck P, Longnecker R. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;102:4166–78.
186. Baumforth KRN, Flavell JR, Reynolds GM, *et al.* Induction of autotoxin by the Epstein-Barr virus promotes the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood*. 2005;106:2138–46.
187. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, *et al.* Expression of the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol*. 2008;173:195–204.
188. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease: International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*. 1998;339:1506–1514.
189. 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*. 1989;7:1630-6.
190. Eghbali H, Raemaekers J, Carde P, The EORTC Lymphoma Group. The EORTC strategy in the treatment of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol*. 2005;66 Suppl: 135-40.
191. Franklin J, Paulus U, Lieberz D, Breuer K, Tesch H, Diehl V. Is the international prognostic score for advanced stage Hodgkin's disease applicable to early stage patients? German Hodgkin Lymphoma Study Group. *Barr Oncol*. 2000;11: 617-623.
192. Hutchings M, Loft A, Hansen M, Møller Pedersen L, Buhl T, Jurlander J, *et al*. FDG-PET after two cycles of chemotherapy predicts treatment failure and progression-free survival in Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;107:52-9.
193. Gallamini A, Hutchings M, Rigacci L, Specht L, Merli F, Hansen M, *et al*. Early interim 2-[18F] fluoro-2-deoxy-d-glucose positron tomography is prognostically superior to International Prognostic Score in advanced-stage Hodgkin's lymphoma: a report from a joint Italian-Danish study. *J Clin Oncol*. 2007;25:3746-52.
194. Sup SJ, Alemañy CA, Pohlman B, *et al*. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol*. 2005;23:3773-9.
195. Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Vassilakopoulos TP, *et al*. BCL-2 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease predicts a poorer prognosis in patients treated with ABVD or equivalent regimens. *Blood*. 2002;100:3935-41.
196. Smolewski P, Robak T, Krykowski E, *et al*. Prognostic factors in Hodgkin's disease: Multivariate analysis of 327 patients from a single institution. *Clin Cancer Res*. 2000;6:1150-60.
197. Brink AA, Oudejans JJ, van den Brule AJ, *et al*. Low p53 and high bcl-2 expression in Reed-Sternberg cells predicts poor clinical outcome for Hodgkin's disease: Involvement of apoptosis resistance? *Mod Pathol*. 1998;11:376-83.
198. Montalban C, Garcia JF, Abaira V, *et al*. Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: A study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2004;22:1664-73.

199. Morente MM, Piris MA, Abaira V, *et al.* Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of retinoblastoma protein expression, high Ki67 proliferation index, and absence of Epstein-Barr virus-latent membrane protein 1 expression. *Blood*. 1997;90:2429-36.
200. Montalban C, Garcia JF, Abaira V, *et al.* Influence of biologic markers on the outcome of Hodgkin's lymphoma: A study by the Spanish Hodgkin's Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol*. 2004;22:1664-73.
201. Doussis-Anagnostopoulou IA, Vassilakopoulos TP, Thymara I, *et al.* Topoisomerase IIalpha expression as an independent prognostic factor in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1759–1766.
202. Natkunam Y, Hsi ED, Aoun P, *et al.* Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein identifies a subset of classic Hodgkin lymphoma of germinal center derivation and improved survival. *Blood*. 2007;109:298–305.
203. Diepstra A, van Imhoff GW, Karim-Kos HE, *et al.* HLA class II expression by Hodgkin Reed-Sternberg cells is an independent prognostic factor in classical Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:3101–8.
204. Dukers DF, Meijer CJ, ten Berge RL, Vos W, Ossenkoppele GJ, Oudejans JJ. High numbers of active caspase 3-positive Reed-Sternberg cells in pretreatment biopsy specimens of patients with Hodgkin disease predict favorable clinical outcome. *Blood*. 2002;100:36-42.
205. Casasnovas RO, Mounier N, Brice P, *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*. 2007;25:1732–40.
206. Allemani C, Sant M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Coebergh JW. Hodgkin disease survival in Europe and the U.S: prognostic significance of morphologic groups. *Cancer*. 2006;107:352–60.
207. Martinez N, Camacho FI, Algara P, *et al.* The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favouring cell survival. *Cancer Res*. 2003;63: 8226-32.
208. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, *et al.* Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*. 2002;8: 68-74.

209. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403: 503-11.
210. Dave SS, Wright G, Tan B, *et al.* Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351: 2159-69.
211. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, Klasa R, Voss N, Connors JM, Gascoyne RD. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2005;106:2169-74.
212. Monti S, Savage KJ, Kutok JL, *et al.* Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*. 2005;105: 1851-61.
213. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, *et al.* The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109:4952–63.
214. Devilard E, Bertucci F, Trempat P, *et al.* Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene*. 2002;21:3095–102.
215. Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, de la Cueva P, *et al.* Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group: tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;108:662–8.
216. Steidl C, Lee, Tang S, Sohrab P, Farinha P, *et al.* Tumor-Associated Macrophages and Survival in Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;362: 875-85.
217. Connors JM. State-of-the-art therapeutics: Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005;23:6400-8.
218. Brusamolino E, Bacigalupo A, Barosi G, Biti G, Gobbi PG, Levis A, Marchetti M, Santoro A, Zinzani PL, Tura S. Classical Hodgkin's lymphoma in adults: guidelines of the Italian Society of Hematology, the Italian Society of Experimental Hematology, and the Italian Group for Bone Marrow

Transplantation on initial work-up, management, and follow-up.

Haematologica. 2009;94:550-65.

219. Press OW, LeBlanc M, Lichter AS, Grogan TM, Unger JM, Wasserman TH, *et al*. Phase III randomized inter-group trial of subtotal lymphoid irradiation versus doxorubicin, vinblastine, and subtotal lymphoid irradiation for stage IA to IIA Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 2001;19:4238-44.
220. Engert A, Franklin J, Eich HT, Brillant C, Sehlen S, Cartoni C, *et al*. Two cycles of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine plus extended-field radiotherapy is superior to radiotherapy alone in early favourable Hodgkin's lymphoma: Final results of the GHSG HD7 trial. *J Clin Oncol*. 2007;25:3495-502.
221. Noordijk EM, Carde P, Dupouy N, Hagenbeek A, Krol ADG, Kluin-Nelemans JC, *et al*. Combined-modality therapy for clinical stage I or II Hodgkin's lymphoma: Long-term results of the European Organization for Research and Treatment of Cancer H7 randomized controlled trials. *J Clin Oncol*. 2006;24:3128-35.
222. Fermé C, Eghbali H, Meerwaldt JH, Rieux C, Bosq J, Berger F, *et al*. Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 2007;357:1916-27.
223. Hancock SL, Tucker MA, Hoppe RT. Factors affecting late mortality from heart disease after treatment of Hodgkin's disease. *JAMA*. 1993;270:1949-55.
224. Adams MJ, Lipsitz SR, Colan SD, Tarbell NJ, Treves ST, Diller L, *et al*. Cardiovascular status in long-term survivors of Hodgkin's disease treated with chest radiotherapy. *J Clin Oncol*. 2004;23:3139-48.
225. Shapiro SJ, Shapiro SD, Mill WB, Campbell EJ. Prospective study of long-term pulmonary manifestations of mantle irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1990;19:707-14.
226. Hirsch A, Vander Els N, Straus DJ, Gomez EG, Leung D, Portlock CS, Yahalom J. Effect of ABVD chemotherapy with and without mantle or mediastinal irradiation on pulmonary function and symptoms in early-stage Hodgkin's disease. *J Clin Oncol*. 1996;14:1297-305.
227. Rueda A, Marquez A, Guma J, Llanos M, Herrero J, de las Nieves MA, *et al*. Treatment of stage I and II Hodgkin's lymphoma with ABVD

- chemotherapy: Results after 7 years of a prospective study. *Ann Oncol*. 2004;15:1798-804.
228. Meyer RM, Gospodarowicz MK, Connors JM, Pearcey RG, Bezjak A, Wells WA, *et al*. Randomized comparison of ABVD chemotherapy with a strategy that includes radiation therapy in patients with limited-stage Hodgkin's lymphoma: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group and the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2005;23:4634-42.
229. Straus DJ, Portlock CS, Qin J, Myers J, Zelenetz AD, Moskowitz C, *et al*. Results of a prospective randomized clinical trial of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine (ABVD) followed by radiation therapy (RT) versus ABVD alone for stage I, II, and IIIA non bulky Hodgkin disease. *Blood*. 2004;104:3483-9.
230. Canellos GP, Anderson JR, Propert K, 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*. 1992;327:1478-84.
231. Zijlstra JM, Lindauer-van der Werf G, Hoekstra OS, Hooft L, Riphagen II, Huijgens PC. 18F-fluoro-deoxyglucose positron emission tomography for post-treatment evaluation of malignant lymphoma: A systematic review. *Haematologica*. 2006;91:522-9.
232. Juweid ME, Stroobants S, Hökstra OS, Mottaghy FM, Dietlein M, Guermazi A, *et al*. Use of Positron Emission Tomography for response assessment of lymphoma: Consensus of the imaging subcommittee of International Harmonization Project in lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:571-8.
233. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, *et al*. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:579-86.
234. Bonfante V, Santoro A, Viviani S, Devizzi L, Balzarotti M, Soncini F, *et al*. Outcome of patients with Hodgkin's disease failing after primary MOPP-ABVD. *J Clin Oncol*. 1997;15:528-34.
235. Yuen AR, Rosenberg SA, Hoppe RT, Halpern JD, Horning JS. Comparison between conventional salvage therapy and high-dose therapy with autografting for recurrent or refractory Hodgkin's disease. *Blood*. 1997;89:814-22.

236. Longo L, Duffey PL, Young RC, Hubbard SM, Ihde DC, Glatstein E, *et al.* Conventional-dose salvage combination chemotherapy in patients relapsing with Hodgkin's disease after combination chemotherapy: The low probability for cure. *J Clin Oncol.* 1992;10:210-8.
237. Josting A, Franklin J, May M, Koch P, Beykirch MK, Heinz J, *et al.* New prognostic score based on treatment outcome of patients with relapsed Hodgkin's lymphoma registered in the database of the German Hodgkin's lymphoma study group. *J Clin Oncol.* 2002;20:221-30.
238. Sureda A, Robinson S, Canals C, Carella AM, Boogaerts MA, Caballero D, *et al.* Reduced-intensity conditioning compared with conventional allogeneic stem-cell transplantation in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma: An analysis from the Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J Clin Oncol.* 2008;26:455-62.

Molecular profiling of classical Hodgkin lymphoma tissues uncovers variations in the tumor microenvironment and correlations with EBV infection and outcome

*Bruno Chetaille,¹ *François Bertucci,¹ Pascal Finetti,¹ Benjamin Esterni,¹ Aspasia Stamatoullas,^{2,3} Jean Michel Picquenot,^{2,3} Marie Christine Copin,^{3,4} Frank Morschhauser,^{3,4} Olivier Casasnovas,^{3,5} Tony Petrella,^{3,5} Thierry Molina,^{3,6} Anne Vekhoff,^{3,6} Pierre Feugier,^{3,7} Reda Bouabdallah,^{1,3} †Daniel Birnbaum,¹ †Daniel Olive,¹ and Luc Xerri^{1,3}

¹Departments of Bio-Pathology, Molecular Oncology, Hematology, and Tumor Immunology, Institut Paoli-Calmettes and Université de la Méditerranée, Marseille;

²Groupe d'Etude des Lymphoproliférations, Centre Henri-Becquerel, Inserm U918, Rouen; ³Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA), Paris;

⁴Department of Pathology and Hematology, Centre Hospitalier and Université de Lille II, Lille; ⁵Department of Pathology and Hematology, Centre Hospitalier, Dijon; ⁶Department of Pathology and Hematology, Hôtel-Dieu, Paris; and ⁷Department of Hematology, Centre Hospitalier, Nancy, France

The outcome of classical Hodgkin lymphoma (cHL) patients may be related to the tumor microenvironment, which in turn may be influenced by Epstein-Barr virus (EBV) infection. To characterize the cHL microenvironment, a set of 63 cHL tissue samples was profiled using DNA microarrays. Their gene expression profile differed from that of histiocyte T cell-rich B-cell lymphoma (H/TCRBCL) samples that were used as controls, mainly due to high expression of *PDCD1*/

***PD-1* in H/TCRBCL. EBV⁺ cHL tissues could be distinguished from EBV⁻ samples by a gene signature characteristic of Th1 and antiviral responses. Samples from cHL patients with favorable outcome overexpressed genes specific for B cells and genes involved in apoptotic pathways. An independent set of 146 cHL samples was analyzed using immunohistochemistry. It showed a significant adverse value in case of high percentage of either TIA-1⁺-reactive**

cells or topoisomerase-2⁺ tumor cells, whereas high numbers of BCL11A⁺, FOXP3⁺, or CD20⁺ reactive cells had a favorable influence. Our results suggest an antitumoral role for B cells in the cHL microenvironment and a stronger stromal influence of the PD1 pathway in H/TCRBCL than cHL. The observation of Th1/ antiviral response in EBV⁺ cHL tissues provides a basis for novel treatment strategies. (Blood. 2009;113: 2765-2775)

Introduction

Current therapeutic approaches are often effective for the treatment of classical Hodgkin lymphoma (cHL). Nonetheless, approximately 40% of patients are refractory to initial treatment and/or relapse after achieving complete remission.^{1,2} Various prognostic systems are currently used to predict the outcome of cHL patients, including the International Prognostic Score (IPS), which is considered the "gold standard" for advanced-stage patients.³ However, the IPS has limited applicability for early-stage patients. Other prognostic systems have been developed for patients with localized disease,⁴ but there is no consensus about a model to be used in the routine management of all cHL patients. Identification of biologic markers that could help to select patients at high risk of treatment failure remains a crucial challenge.

As suggested by the correlation between the clinical course of cHL patients and the plasma levels of particular cytokines,⁵ the severity of the disease may result from cell signaling networks operating within neoplastic tissues. cHL lesions are characterized by the presence of a minority of malignant cells (usually < 5%), designated as Reed-Sternberg (RS) cells, which reside in a mixture of reactive cells composed of T and B cells, macrophages, plasma cells, and granulocytes.⁶ Reactive cells are thought to favor the proliferation of RS cells through cytokines and chemokines acting as paracrine factors.⁷

An aberrant immune response in the vicinity of RS cells is supposed to account for the maintenance of an immunosuppressive environment. It has been initially proposed that a local Th2 reaction predominates,⁷ but more recently, it was suggested that T regulatory (Treg) cells and PD1⁺ T cells also interact with RS cells,⁸⁻¹⁰ which produce the Treg attractant galectin-1⁸ and the PD-1 ligand, PDL-1.¹⁰ On the other hand, the observation of numerous CXCR3⁺ lymphocytes in some HL tumors has raised the possibility of an occasional Th1-predominant immune response.¹¹

The influence of Epstein-Barr virus (EBV) infection on the microenvironment remains unclear. EBV is present in RS cells of 40% to 60% of cHL patients and was shown to contribute to their survival.¹² EBV-infected RS cells were shown to stimulate the stromal production of particular chemokines such as CXCL10¹¹ and to produce CCL20, capable of attracting Treg cells.¹³ It has been suggested that immunologic reactions against EBV can occur in the peripheral blood of some cHL patients.¹⁴ However, no comprehensive characterization of intratumoral immunologic alterations induced by EBV⁺ RS cells has been described so far.

Several retrospective studies using immunohistochemistry (IHC) have attempted to define adverse prognostic markers associated with RS cells, such as high expression of BCL2¹⁵ or topoisomerase-II α (topo-II α),¹⁶ and/or loss of HGAL¹⁷ or HLA class II molecules.¹⁸ Other IHC reports have highlighted the characteristics of

Submitted July 11, 2008; accepted November 10, 2008. Prepublished online as Blood First Edition paper, December 18, 2008; DOI 10.1182/blood-2008-07-168096.

*B.C. and F.B. contributed equally to this work.

†D.B. and D.O. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2009 by The American Society of Hematology

nonmalignant immune cells that may predict unfavorable outcome, in particular a low infiltration of intratumoral FOXP3⁺ Treg cells in combination with a high percentage of either granzyme B⁺ or TIA-1⁺ lymphocytes.¹⁹⁻²²

In contrast to immunohistochemistry (IHC), gene expression profiling has been rarely used to analyze cHL tissues. A recent series of 23 cHL cases was focused on EBV-induced alterations.¹³ Only 2 prognostic studies have been published so far. In 2002, we reported the first study that suggested the existence of correlations between gene expression profiles and prognosis,²³ although the number of cases (n = 21) was too small to draw a final conclusion. More recently, a gene profiling analysis of 29 cHL cases focused on patients with advanced disease.²⁴ In the present study, we have analyzed a large series of cHL tissues from patients with various clinical characteristics, and we have identified new prognostic factors related to the microenvironment.

Methods

Patients

A set of 63 pretreatment cHL tissue samples was profiled using Affymetrix DNA microarrays (Santa Clara, CA). They were collected at the time of diagnosis from 63 different cHL patients (including 10 children younger than 15 years) who underwent lymph node surgical biopsy in several French hematologic centers (Marseilles, Lille, Dijon, Nancy, Paris) belonging to the network of the Groupe d'Etude des Lymphomas de l'Adulte (GELA). Each patient (or parents, for children) gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki with the approval of ethics committees from all participating institutions. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen within 30 minutes of removal. All cases were de novo reviewed by 2 hematopathologists (B.C. and L.X.) before analysis. They were classified according to the WHO classification⁶ as nodular sclerosis (NS; n = 42), mixed cellularity (MC; n = 17), and lymphocyte depleted (n = 1). Three samples that displayed predominant features of interfollicular involvement were considered as unclassified to avoid any bias in the comparison between NS and MC subtypes. EBV status of cHL samples was assigned according to the IHC detection of latent membrane protein-1 (LMP1) and/or in situ hybridization of *EBER* as negative (n = 35), positive (n = 18), or undetermined due to technical reasons (n = 10). Clinical characteristics of these patients are detailed in Table S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article. Briefly, cHL patients presented with either Ann Arbor stage I-II (n = 30) or Ann Arbor stage III-IV (n = 29) and were treated with relatively uniform and standard first-line anthracyclin-based chemotherapy regimens (mostly ABVD [doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine] for adults). Forty-one patients (31 adults and 10 children) had a favorable outcome defined by sustained complete remission for a minimal follow-up of 50 months, and 21 adult patients had an unfavorable outcome, characterized by either failure to achieve complete remission, progressive disease, or relapse during follow-up. These latter criteria were used to define events in univariate Cox analysis. The outcome of one patient was considered as not valuable due to the occurrence of sarcoidosis during follow-up. Control samples profiled with DNA microarrays included tissues from histiocyte/T cell-rich B-cell lymphoma (H/TCRBCL, n = 5) and from benign lymphadenitis (n = 5). All cHL and H/TCRBCL tissue specimens contained more than 80% of neoplastic areas, as assessed using frozen sections adjacent to the profiled samples. Three HL-derived cell lines (L-428, KM-H2, HDLM-2), the fibroblastic cell line HFFB, and the endothelial cell line HUVEC were also profiled as controls.

Gene profiling data were validated and/or completed by analyzing an independent set of 146 cHL patients (different from those analyzed by DNA microarrays) using tissue microarrays (TMAs) and IHC on paraffin tissue samples. Clinical characteristics of these patients are detailed in Table 1. An additional group of 13 H/TCRBCL samples was used for IHC validation experiments on whole paraffin sections.

Table 1. Clinical characteristics of TMA cHL patients and correlations with bcl11A immunohistochemical expression on reactive cells

Characteristic	n (%)	BCL11A IHC score		P
		≤ 2	> 2	
Age				
< 45 y	121 (84)	49	59	NS
≥ 45 y	23 (16)	11	10	
Sex				
Male	82 (56.2)	40	36	NS
Female	64 (43.8)	21	34	
Histologic subtype				
Nodular sclerosis	106 (78.5)	40	55	
Mixed cellularity	26 (19.3)	14	11	
Lymphocyte depletion	2 (1.5)	2	0	
Unclassified	1 (0.7)	0	0	
EBV tumor status				
Negative	115 (79.3)	51	56	NS
Positive	30 (20.7)	10	14	
Ann Arbor stage				
1	9 (6.2)	0	8	.024
2	77 (52.7)	31	38	
3	29 (19.9)	13	13	
4	31 (21.2)	17	11	
B symptoms				
Absent	69 (58.5)	21	43	NS
Present	49 (41.5)	23	20	
Bulky tumor				
Absent	70 (59.8)	20	42	.002
Present	47 (40.2)	28	15	
Extranodal extension				
Absent	98 (83.8)	34	55	NS
Present	19 (16.2)	11	7	
No. of nodal sites involved				
< 3	67 (52.3)	23	37	NS
≥ 3	61 (47.7)	27	27	
Inguinal involvement				
Absent	88 (90.7)	30	49	NS
Present	9 (9.3)	7	2	
ESR				
< 50	64 (52)	25	37	NS
≥ 50	59 (48)	24	25	
Hemoglobin				
< 10.5 g/dL	29 (21.5)	14	12	NS
≥ 10.5 g/dL	106 (78.5)	40	56	
White cell count				
≤ 15 × 10 ⁹ /L or less	110 (80.3)	43	57	NS
> 15 × 10 ⁹ /L	27 (19.7)	12	11	
Lymphocyte count				
< 0.6 × 10 ⁹ /L or < 8%	22 (17.5)	12	5	.033
≥ 0.6 × 10 ⁹ /L or ≥ 8%	104 (82.5)	39	60	
Albumin				
< 40 g/L	56 (53.8)	28	20	.037
≥ 40 g/L	48 (46.2)	16	30	
International Prognostic Score				
IPS ≤ 2	60 (47.6)	16	39	.003
IPS > 2	66 (52.4)	35	25	
Outcome				
Favorable	74 (51)	8	53	< .001
Unfavorable	71 (49)	53	17	

Gene expression analysis

Details of gene expression analysis are given in Document S1. Briefly, total RNA was extracted from frozen samples as described.²³ Affymetrix U133 A2.0 human oligonucleotide microarrays were used for gene expression

profiling. Preparation of cRNA, hybridizations, washes, and detection were completed as recommended by the supplier.

Gene expression data were analyzed by the Robust Multichip Average method in R using Bioconductor and associated packages.²⁵ Unsupervised hierarchic clustering was done using the Cluster program.²⁶ Results were displayed using the TreeView program.²⁶ To identify the gene clusters responsible for the resulting subdivision of samples, we used the method of quality-threshold (QT) clustering²⁷ and selected the gene clusters with minimal number of 50 genes and minimal correlation of 0.75. Two types of supervised analysis were used. For the comparison of samples based on a continuous variable (clinical outcome), we used univariate Cox analysis. For the comparison of samples based on a categorical variable, we used a discriminating score with confidence levels being estimated by 100 random permutations of samples.^{28,29} Distinction between subgroups was assessed by linear discriminant analysis (LDA).³⁰

Gene set enrichment analysis (GSEA)³¹ was performed to assess by supervised analysis the differential expression of potentially relevant previously defined gene sets. Three genes lists were tested: the biologic processes from the Gene Ontology database (<http://www.geneontology.org>), the functional/pathway gene sets C2 from the Molecular Signatures Database (<http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/index.jsp>), and the T cell-related gene sets previously described elsewhere.³⁴ To assess significance of GSEA results, 100 permutations were done. The minimum size of tested gene sets was 10 genes. We report those gene sets found to be significant at 5% risk with a false discovery rate of less than 25%. All microarray data have been deposited with Gene Expression Omnibus (GEO) under accession number GSE13996.³⁵

RQ-PCR analysis

As a validation of DNA microarray data, we performed reverse quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) analysis of 2 selected genes (*IFNG* and *IFIH1* [*MDA5*]) that we found differentially expressed between EBV⁺ and EBV⁻ cHL subgroups. Expression levels were measured in 7 cHL samples (4 EBV⁺ and 3 EBV⁻) previously profiled by DNA microarrays. GAPDH was used as the endogenous RNA and cDNA quantity control. Briefly, 2 µg total RNA was subjected to reverse transcription using oligo(dT)15 primers and Moloney murine leukemia virus (m-MLV) reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). One-fiftieth of this cDNA was used as the template for amplification of *IFNG*, *IFIH1*, and *GAPDH* transcripts, using a TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an ABI PRISM 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Primers were designed according to the Sequence Detection System Software 2.1 (Applied Biosystems) and were referenced by the supplier (Applied Biosystems): Hs00174143_m1 for *IFNG*, Hs00223420_m1 for *IFIH1*, and Hs99999905_m1 for *GAPDH*. Analysis of the quantitative real-time PCR curves was performed by the RQ analysis software (Applied Biosystems). Normal peripheral blood lymphocytes were used as a reference sample. Amplification of the *GAPDH* gene was used as a normalization control for each sample.

Immunohistochemistry

We assessed the protein expression of 17 markers in an independent set of 146 cHL samples using IHC as described.³⁶ The selection was based on antibody availability and on other criteria: IHC was used as a direct validation process for both BCL11A and BFAR markers, whose genes belonged to the molecular prognostic gene signature provided by DNA microarrays. Other IHC markers were specific for cell populations suspected to influence the molecular signature, such as CD20 for B cells and BDCA2 for plasmacytoid dendritic cells (pDCs). Other markers were reported to have prognostic value in cHL, such as BCL2,¹⁵ FOXP-3,¹⁹⁻²² TIA-1,^{19,20} granzyme B,¹⁹⁻²¹ STAT1,²⁰ and topo-IIα.¹⁶ The remaining antibodies were markers of reactive cells that may interact with RS cells, such as tryptase (mast cells), PS100 (dendritic cells), CD8, CD57, and PD-1 (T-cell subsets). SMAD4 was analyzed because SMAD4-deficient stromal T cells are known to produce abundant Th2 cytokines that can stimulate the growth of tumor cells.³⁷ Briefly, areas containing malignant RS cells surrounded by a significant amount of reactive background were marked in

the paraffin blocks from each cHL case; 1-mm-diameter cylinders from 3 different areas were then included in the TMA. Primary antibodies were as follows: BCL11A (kindly gifted from the Leukemia Research Fund Monoclonal Antibody Facility, University of Oxford, Oxford, United Kingdom), BCL2 (Dako, Glostrup, Denmark), LMP-1 (Dako), CD57 (Novocastra, Newcastle upon Tyne, United Kingdom), FOXP-3 (eBioscience, San Diego, CA), tryptase (Dako), TIA-1 (Immunotech, Marseilles, France), granzyme B (Novocastra), PS100 (Immunotech), BFAR (kind gift from Maryla Krajewska, Burnham Institute for Medical Research, La Jolla CA), CD20 (Dako), CD8 (Dako), STAT1 (Cell Signaling, Beverly, MA), BDCA2 (dendritics, Lyon, France), topo-IIα (Dako), SMAD4 (Novocastra), and PD-1.³⁸ Dilutions were as recommended by the respective suppliers, except for BCL11A (1/50), BFAR (1/100), and PD-1 (1/50). The PD-1 antibody was also used to validate the supervised H/TCRBCL signature on a group of 13 H/TCRBCL paraffin tissue samples analyzed on whole paraffin sections. After staining, slides were independently evaluated by 2 hematopathologists (L.X. and B.C.). Because the intensity of each marker varied between cases due to the use of different tissue fixatives, only the count of positively stained cells was estimated. The mean of the counts obtained at high power (×400) magnification from 3 different representative TMA cores per case was calculated by each reader in each case. The mean of the counts from each reader was then calculated to assess the IHC score used for statistical analysis. The scores were defined as 0 (no staining), 1 (< 10% of positive cells), 2 (10%-50% of positive cells), or 3 (50%-100% of positive cells). When relatively balanced numbers of patients were obtained in each class group, all possible cutoffs were tested (0 vs 1-3, 0-1 vs 2-3, and 0-2 vs 3); and the cutoff with the strongest effect on the hazard ratio was eventually retained. When necessary, RS cells and reactive cells were separately counted. Pictures were obtained using a DMD 108 microvideo system (Leica, Wetzlar, Germany).

Statistical analysis

The association between 2 categorical variables was examined using Fisher exact or χ^2 tests. The primary end point was event-free survival (EFS), which was defined by the time interval between the diagnosis of the disease and the date of relapse or death (any cause). Overall survival was defined by the time between the diagnosis and the date of death (any cause). Event-free patients were right censored at the date of the last follow up. Survival curves were derived from Kaplan-Meier estimates and compared by the log-rank test. Significant changes of relative risks of event were explored using Cox proportional hazard models in univariate and multivariate analysis. Multivariate models were built using a backward stepwise selection of variables to minimize the Akaike information criterion. The stepwise procedure started from the variables selected with a univariate *P* value less than .1 and a percentage of missing values less than 15%. All results are presented with their 95% confidence intervals. Statistical tests were 2 sided at the 5% level of significance. All the statistical analyses were done using the "survival" package from R.2.7.0 statistical software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Unsupervised clustering reveals molecular heterogeneity of cHL

Unsupervised hierarchic clustering of the complete data including 63 cHL, 5 H/TCRBCL, and 5 benign lymphadenitis tissue samples identified 3 major clusters of samples (hereafter designated I, II, and III; Figure 1A). All H/TCRBCL and adenitis samples were grouped in cluster III. As shown by the length of dendrogram branches, these control samples were more homogeneous at the transcriptional level than cHL samples, although that could be due to their comparatively small number.

Hierarchic clustering of the 63 cHL and the 6229 probe sets with significant variation in expression level across the samples

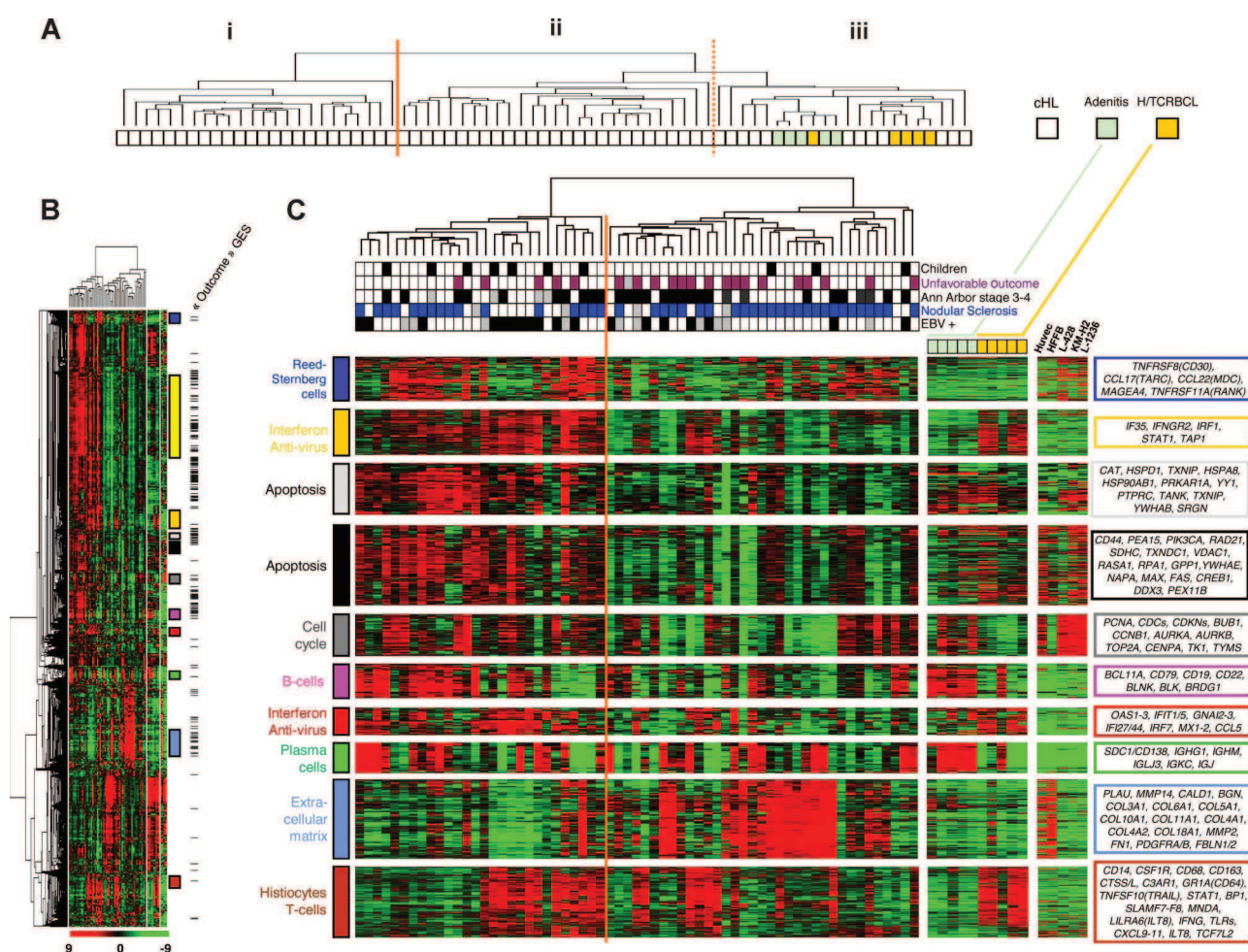


Figure 1. Global gene expression profiling of cHL samples and control samples. (A) The hierarchic clustering of all tissue samples analyzed using cDNA microarrays. The resulting dendrogram includes 63 lymph node tissue samples from cHL patients (white boxes), 5 from histiocyte/T cell-rich B-cell lymphoma (H/TCRBCL) patients (orange boxes), and 5 from benign lymphadenitis patients (green boxes). This clustering is based on the mRNA expression levels of 10 394 probe sets retained after a filtering process that removed probe sets with low and poorly measured expression as defined by an expression value inferior to 100 units in all 73 samples. Three major clusters of samples are observed and designated as I, II, and III. The heterogeneity of cHL samples is obvious. H/TCRBCL and benign lymphadenitis samples are grouped in cluster III and seem more homogeneous at the transcriptional level than cHL samples, although that could be due to their comparatively small number. (B) Hierarchic clustering restricted to cHL samples ($n = 63$) and based on 6229 probe sets with significant variation in mRNA expression levels across these samples. Each row represents a gene and each column represents a sample. The 2 separated color matrixes on the right correspond to the expression profile of control tissue samples (5 benign lymphadenitis, 5 H/TCRBCL samples, and 5 cell lines from left to right). Because these control samples are not considered in the clustering of cHL samples, genes are in the same order than in the major left matrix. The expression level of each gene in a single sample is relative to its median abundance across the 63 cHL tissue samples and is depicted according to a color scale ($\log_2$ scale) shown at the bottom. Red and green indicate expression levels, respectively, above and below the median. The magnitude of deviation from the median is represented by the color saturation. The dendrogram of cHL tissue samples (above matrix) represent overall similarities in gene expression profiles, whereas colored bars on the right indicate the locations of 11 gene clusters of interest. Black dashes on the right represent the 501 probe sets associated with clinical outcome according to the univariate Cox analysis ("Outcome" GES). A zoomed view of panel B is shown in panel C, highlighting the dendrogram and gene clusters. In the dendrogram (C, top) of cHL tissue samples, 2 large groups are evidenced by clustering and delimited by an orange vertical line. Below the dendrogram, relevant characteristics of cHL tissue samples are represented according to a color ladder (gray when unclassifiable or unavailable): age (adult, white; children, black), clinical outcome (favorable, white; unfavorable, purple), Ann Arbor stage (I-II, white; III-IV, black), histologic type (nodular sclerosis, blue; mixed cellularity, white), and EBV tumoral status (negative, white; positive, black). The control samples are colored as in panel A. The 5 cell lines are HUVEC (endothelial cells), HFFB (fibroblastic cells), L-428, KM-H2, and L-1236 (Reed-Sternberg cells) (from left to right). Expanded views of selected gene clusters corresponding to relevant cell types/function are named from top to bottom: "Reed-Sternberg cells" (dark blue bar), "interferon pathway and antiviral response (1)" (orange bar), "apoptosis" (2 clusters; light gray and black bars), "cell cycle" (dark gray bar), "B cells" (pink bar), "interferon pathway and antiviral response (2)" (red bar), "plasma cells" (green bar), "extracellular matrix" (light blue bar), and "histiocytes/T cells/innate immune response" (brown bar). The "cell metabolism" cluster (yellow bar in B) is not zoomed in panel C. The most relevant genes included in these clusters are indicated on the right by their EntrezGene symbol.³⁹

(SD > 0.5) is shown in Figure 1B and C. Samples were distributed in 2 main groups (Figure 1C) and this distribution was correlated with clinical outcome, because among the 28 patients of the left group, 23 (82%) had favorable outcome, whereas among the 35 patients of the right group, only 18 (51%) had favorable outcome ($P = .03$, Fisher exact test). No significant correlation was found between this distribution and the age of patients (adults vs children), Ann Arbor stage (I-II vs III-IV), EBV status (positive vs negative), or histologic type (MC vs NS).

Gene clustering revealed groups of coordinately expressed genes. Quality threshold (QT) clustering identified 17 gene clusters

(correlation 0.75), some of which represented expression signatures corresponding to defined biologic processes or cell types (see colored bars on the right of Figure 1B and zooms in Figure 1C). They included a "cell-cycle" cluster (84 probe sets) that was globally overexpressed in cell lines compared with tissues and included genes encoding *PCNA*, cyclins, CDCs and CDKNs, *STK6*, *AURKB*, *TOP2A*, *CENPA*, *TK1*, and *TYMS*; an "interferon pathway and antiviral response" cluster (236 probe sets) that was enriched in genes involved in response to viral infections such as *IFI35*, *IFNGR2*, *IRF1*, *STAT1*, and *TAP1*. This cluster was overexpressed in most EBV⁺ cHL samples, as well as in H/TCRBCL

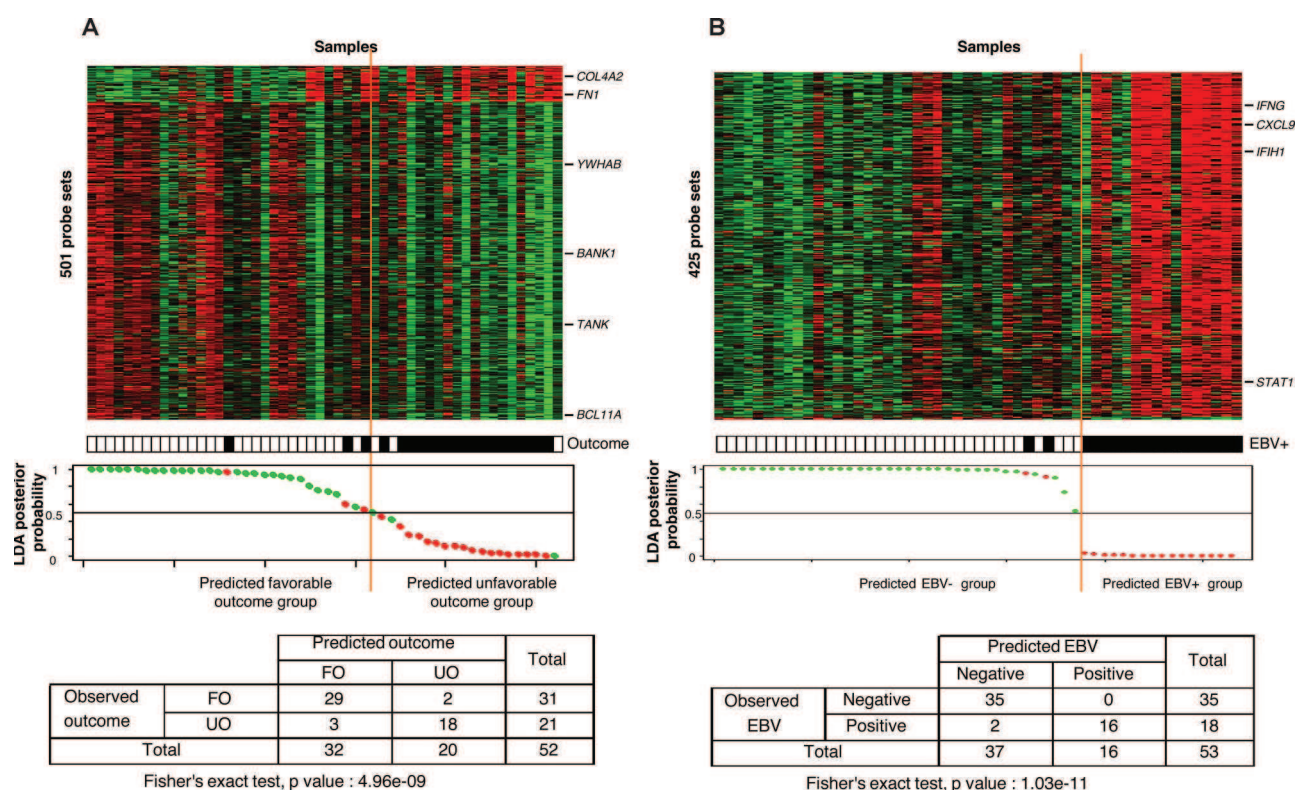


Figure 2. Supervised classification of cHL samples based on the “clinical outcome” signature and on the “EBV status” signature. (A) The classification of 52 informative cHL adult samples using the molecular signature of 501 probe sets correlated with clinical outcome. Thirty-one samples were from patients with favorable outcome (FO) and 21 samples from patients with unfavorable outcome (UO). Expression data and clinical features (top panel) are depicted as in Figure 1. Probe sets are ordered from top to bottom by their decreasing discriminating score. Tumor samples are ordered from left to right according to their LDA function score. The solid orange line indicates the threshold 0 that separates the 2 predicted classes of samples referred to as “predicted FO group” (at the left of the line) and “predicted UO group” (right to the line). The bottom panel represents the LDA posterior probability for each sample to belong to the FO group (y-axis), with the samples (x-axis) ranked according to their LDA function score. The observed clinical outcome is indicated by colored dots: green indicates FO; red, UO. There was a statistically significant correlation between the observed clinical outcome and the predicted clinical outcome based on the corresponding gene signature, as shown by the resulting cross table. With a representation similar to panel A, panel B shows the molecular classification of 53 informative cHL samples using the 425 probe sets identified as differentially expressed between the 18 EBV⁺ samples and the 35 EBV⁻ samples (top panel). The LDA posterior probability (y-axis) is the probability for each sample to belong to the EBV⁻ group (bottom panel). The observed EBV status is indicated by colored dots: green indicates negative; red, positive. The statistical correlation between the observed EBV status and the predicted EBV status was highly significant, as shown by the resulting cross table.

samples. The largest cluster designated “cell metabolism” (1141 probe sets) included many genes involved in oxidative phosphorylation, protein synthesis, protein folding, and protein ubiquitination. Two “apoptosis” clusters (52 and 161 probe sets) were also evidenced, including *FAS*, *DDX3*, *MAX*, *TXNIP*, *HSPD1*, *HSPA8*, *HSP90AB1*, and *TANK*. Other gene clusters reflected specific cell types present in cHL tissues. The “plasma cell” cluster (81 probe sets) was overexpressed in adenitis compared with H/TCRBCL and included genes coding for immunoglobulins and syndecan-1 (*SDC1/CD138*). The “B-cell” cluster (62 probe sets) was overexpressed in adenitis samples; it included genes involved in B-cell function such as *BCL11A*, *CD19*, *CD22*, *CD79A/B*, *BANK1*, *VPREB3*, *STAP1* (*BRDG1*), *BLNK*, and *BLK*. The “extracellular matrix” cluster (323 probe sets) contained genes related to extracellular matrix remodeling such as collagen genes, *MMPs*, *CALD1*, *PLAU*, *PDGFRs*, *FNI*, *SPARC*, and *DCN*. As expected, this cluster was strongly expressed in both HFFB and HUVEC cell lines (derived from fibroblasts and endothelial cells, respectively), but was not expressed in RS cell lines. The “histiocytes/T cells/innate immune response” cluster (222 probe sets) was overexpressed in H/TCRBCL samples and in most EBV⁺ cHL samples. It was enriched in markers associated with either histiocytes or T cells, or involved in innate immune response such as *CD14*, *CD68*, *CSF1R*, *CD163*, *CTSS/L*, *C3AR1*, *FCGR1* (*CD64*), *FCGR3A* (*CD16a*), *STAT1*, *TNFSF10* (*TRAIL*), *MNDA*, *LILRA/Bs*,

GBP1, *CXCL9-11*, *SLAMF7-8*, *TLR1/2/4/5/8*, *TCF7L2*, and *LILRA6* (*ILT8*). Finally, 2 other gene clusters of interest were just below the correlation threshold of QT clustering. They included a “Reed-Sternberg cell” cluster (97 probe sets; correlation, 0.58), characterized by overexpression of genes encoding known RS cell markers such as *TNFRSF8* (*CD30*), *CCL17* (*TARC*), *CCL22* (*MDC*), *MAGEA4*, and *TNFRSF11A* (*RANK*). As expected, this latter cluster was strongly expressed in HL cell lines but was not expressed in non-Hodgkin cell lines and tissues. The last gene cluster was an additional “interferon pathway and antiviral response” cluster (60 probe sets; correlation, 0.61), which was enriched in genes involved in response to viral infections such as *OAS1-2-3*, *CCL5/RANTES*, *IFIT1*, *IFIT5*, *GNAI2-3*, *IFI44*, *IFI27*, *IRF7*, and *MX1-2*. This latter cluster was overexpressed in most EBV⁺ cHL samples.

Visual inspection revealed that a few of these independent gene clusters were responsible for much of the subdivision of cHL samples (Figure 1C).

The clinical outcome of cHL patients is correlated with a specific gene expression signature

In search for a gene expression signature associated with the clinical outcome of cHL patients, we applied supervised Cox analysis to adult patients. With a 5% FDR, 501 probe sets were associated with outcome, corresponding to 450 unique genes

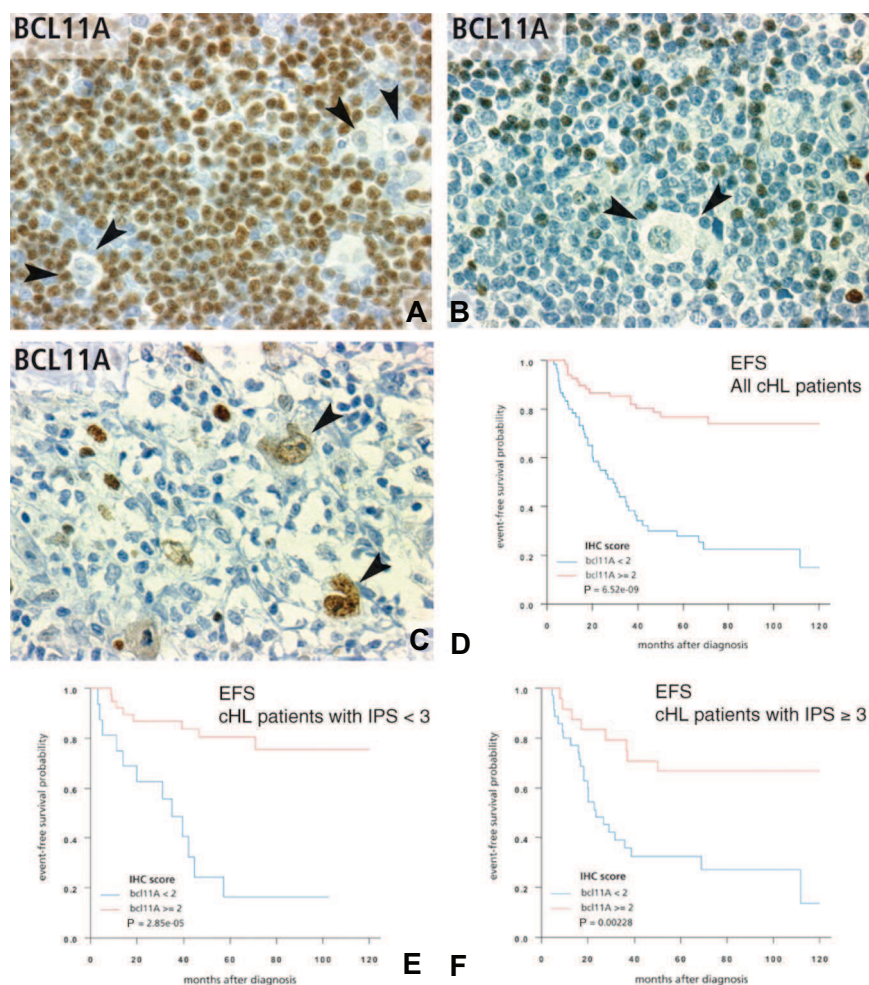


Figure 3. Immunohistochemical patterns of Bcl11A expression in classical Hodgkin lymphoma and correlations with survival. (A,B) The usual pattern of BCL11A positivity in cHL tissues. The immunostaining is located mainly in the nucleus of reactive small lymphocytes surrounding Reed-Sternberg cells (arrows). Variable numbers of positive plasmacytoid dendritic cells were also observed. The number of positive reactive cells scored as high/score 3 or low/score 1 (A and B, respectively) was strongly correlated with EFS in the whole population of 143 informative patients (different from those analyzed by DNA microarrays), as shown by Kaplan-Meier estimates (D). Among these patients, Bcl11A positivity has also a significant prognostic value in the subgroup of patients with an international prognostic score of 2 or less (E) and in patients with an IPS more than 2 (F) as shown by Kaplan-Meier estimates of EFS. Panel C illustrates an infrequent pattern of Bcl11A expression in cHL tissues, with a positive signal located in neoplastic Reed-Sternberg cells (►). This latter pattern was not statistically correlated with survival. Panels A-C correspond to a 40×/0.75 objective lens (×400 magnification).

comprising 47 genes (52 probe sets) associated with unfavorable outcome and 403 genes (449 probe sets) associated with favorable outcome (Table S2). The resulting LDA-based classification of adult samples is shown in Figure 2A with a correct classification of 90% ($P < .001$, Fisher exact test).

As shown in Figure 1B, many of these 501 probe sets were included in several gene clusters of interest described in the previous section. On the one hand, 23% of probe sets of the “B-cell” cluster, such as *BCL11A*, *BANK1*, *STAP1* (*BRDG1*), *BLNK*, *FCER2*, *CD24*, and *CCL21*, were associated with favorable outcome, as were 19% of those of an “apoptosis” cluster with genes such as *YWHA*, *CASP8*, *PTPRC*, and *TANK*, and 11% of those of the “cell metabolism” cluster. On the other hand, 9% of probe sets of the “extracellular matrix” cluster with genes such as collagen genes (*COL1A1/4A1/4A2/5A1/18A1*), *THBS1/2*, *FNI*, *EDNRA*, *ITGB5*, and *LAMA4* were associated with unfavorable outcome. These results were further corroborated by GSEA analysis. Indeed, among the gene lists significantly overrepresented in favorable outcome samples ($P < .001$) were lists associated with B cells (“Sig_BCR_Signalling_Pathway,” “St_B_Cell_Antigen_Receptor”), with apoptosis (“Apoptosis_Kegg,” “St_FAS_Signaling_Pathway,” “Apoptosis_Genmapp,” “Death_Pathway,” “Apoptosis”), and with cell metabolism (“mRNA.Processing,” “RNA.Splicing,” “RNA.Processing,” “Protein.Amino.Acid.Dephosphorylation,” “Oxidative_Phosphorylation”). Conversely, among the gene lists significantly overrepresented in unfavorable outcome samples ($P < .001$) were lists associated with stroma remodeling (“Skeletal_Development,” “Nervous_System_Development”).

To validate this signature at the protein level and to extend the analysis to other potential prognostic markers, we performed IHC on an independent series of 146 cHL samples. Examples of IHC staining for BCL11A, CD20, FOXP3, and TIA-1 are shown in Figures 3,4.

As expected from initial reports,^{40,41} BCL11A staining in cHL samples was evidenced in a fraction of reactive cells corresponding to small B lymphocytes and pDCs, and more rarely in tumor cells (Figure 3). We searched for a correlation between IHC results and clinical outcome of cHL patients (results detailed in Tables 2,3). Univariate Cox proportional hazards regression model showed an adverse value on overall survival (OS) in case of high percentage of either TIA-1⁺-reactive cells or topo-IIa tumor cells, whereas high numbers of CD20⁺ or BCL11A⁺-reactive cells had a favorable influence on OS (Table 2). With respect to EFS, univariate analysis retained high counts of FOXP3⁺, CD20⁺, or BCL11A⁺-reactive cells as significant features of favorable prognosis, whereas high counts of topo-IIa⁺ neoplastic cells were correlated with poor outcome (Table 3). The significant value of both TIA-1 and FOXP3 was dependent on the choice of the cutoff, whereas the 2 different cutoffs tested for BCL11A were both effective (data not shown). No prognostic value on either OS or EFS was found for IHC detection of BCL2, LMP-1, PD-1, CD57, tryptase, granzyme B, BFAR, PS100, CD8, STAT1, SMAD4, and BDCA2.

Next, we applied univariate analysis to the prognostic impact of cHL classical prognostic parameters (Tables 2,3). The prognostic influence of IHC markers, adjusted for classical prognostic factors, was assessed in multivariate analysis by the Cox proportional

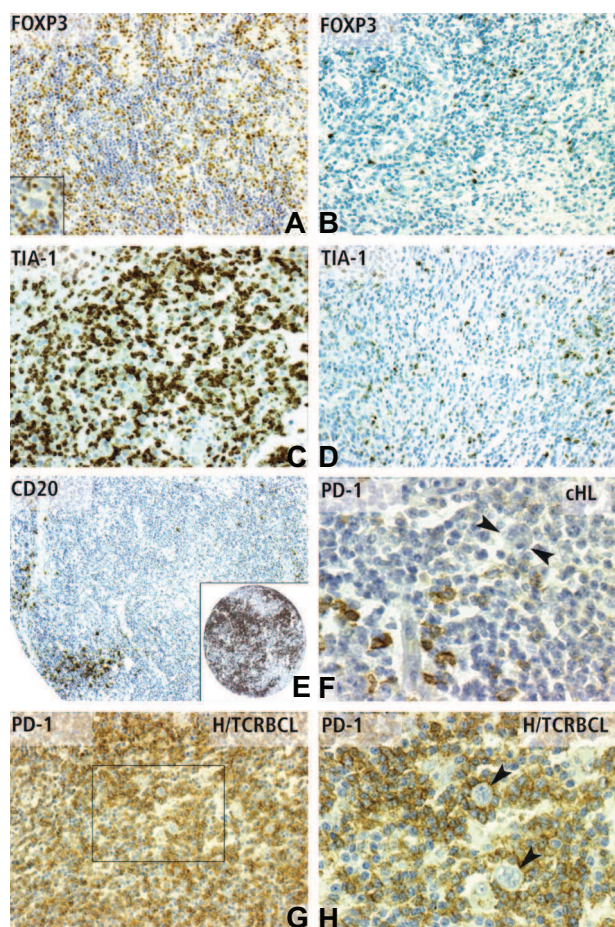


Figure 4. Immunohistochemical patterns of CD20, FOXP3, TIA-1, and PD-1 expression. (A) FOXP3 nuclear positivity in numerous reactive lymphocytes (IHC score 3), but not in Reed-Sternberg cells (inset) in a cHL case with favorable outcome. In contrast, only rare scattered FOXP3-positive lymphocytes (IHC score 1) are observed in a cHL case with unfavorable outcome (B). TIA-1 positivity in cHL cases with poor outcome was frequently observed as high (IHC score 3) (C), whereas cHL cases with favorable outcome often display a low level (IHC score 1) of TIA-1 expression (D). (E) CD20 reactivity on a TMA core from a case of cHL with unfavorable outcome, which contained only scarce positive reactive lymphocytes (IHC score 1), compared with the strong CD20 positivity (IHC score 3) of a case of cHL with favorable outcome (inset). PD-1 immunostaining was detected in a minority of reactive lymphocytes in most cHL cases (F), whereas Reed-Sternberg cells are negative (F, ►). As expected from cDNA microarray data, the PD-1 antibody strongly stained the vast majority of reactive T lymphocytes in H/TCRBCL cases (G), whereas neoplastic B cells were negative, as evidenced by high-power view (H, ►). Panels A-D and G were obtained using a 20×/0.6 objective lens (×200 magnification). Panel E was obtained using a 10×/0.32 objective lens (×100 magnification). Panels F and H correspond to a 40×/0.75 lens (×400 magnification).

hazards model. TIA-1, CD20, BCL11A, topo-IIa, age older than 45 years, female sex, and high leukocyte count remained as informative parameters after multivariate analysis of OS (Table 2). Multivariate analysis of EFS led to a final model including only BCL11A and leukocyte count as informative predictors of EFS (Table 3). BCL11A was the most powerful predictive marker for EFS (Figure 3D), was correlated with the IPS score (Table 1), and also had a predictive value within the groups of patients with IPS less than 3 and IPS more than 3 (Figure 3E,F).

The signature of EBV⁺ cHL tissues is enriched in genes characteristic of Th1 and antiviral responses

We next searched for a signature of EBV⁺ samples that could indicate a specific immune reaction within cHL tissues.

Supervised analysis was applied to identify genes differentially expressed between EBV⁺ (n = 18) and EBV⁻ (n = 35) cHL samples. With a 0.01% risk, 425 probe sets corresponding to 357 unique genes/ESTs were identified (Table S3), including 422 probe sets (354 unique genes) overexpressed in EBV⁺ samples and 3 probe sets (3 unique genes) overexpressed in EBV⁻ samples. The resulting LDA-based classification of samples is shown in Figure 2B with a correct classification rate of 96% ($P < .001$, Fisher exact test).

The genes overrepresented in the EBV⁺ signature belonged to several significant functional categories including “innate immune response” (GSEA, $P = .018$), “immune response” (GSEA, $P = .005$), and “defense response” (GSEA, $P = .007$). EBV⁺ cHL had higher levels of expression of *IFNG* and several IFNG-inducible genes (*GBP1*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *STAT1*, *IFIT5*), and of various antiviral molecules, either IFN-induced (*PLSCR1*, *IFIH1*) or involved in the innate antiviral response such as *IFIH1* (*MDA5*), *TLR1*, *TLR8*, *OAS1*, and *IVNSIABP*.

EBV⁺ cHL samples were also associated with higher expression of genes related either to activated T cells such as *SLAMF7*, *SLAMF8*, *TNFSF10* (TRAIL), and *CD38*, or to macrophages such as *CXCL9*, *CXCL10*, *STAT1*, *CD14*, *CD68*, cathepsins (*CTSD/B/S*), *CASP1*, *C3AR1*, *CCL5* (*RANTES*), *FCGR1A* (*CD64*), *CD163*, *TNFSF13* (*APRIL*), *CCR1*, and complement factors.

Using GSEA based on previously published T cell-related gene sets, we found that the gene signature of EBV⁺ cHL tissues was significantly enriched in genes up-regulated in Th1 T cells (*GS9* and *GS11*, $P < .001$; *GS10*, $P = .063$). In contrast, we found no significant association between our EBV signature and the different gene sets overexpressed in Th2 (*GS12* to *GS14*) T-cell subsets.

The differential expression of 2 selected genes of the signature, *IFIH1* (*MDA5*) and *IFNG*, was validated using RQ-PCR. The levels of mRNA measured by RQ-PCR confirmed those observed with the DNA microarrays, that is, a higher level of expression in the 4 EBV⁺ samples compared with the 3 EBV⁻ samples for *IFIH1* (*MDA5*) (fold change = 5.1; $P = .12$, Student *t* test) and *IFNG* (fold-change = 2.6; $P = .008$, Student *t* test).

Nodular sclerosis and mixed cellularity cHL samples have distinct molecular features

We next compared the gene expression profiles of cHL samples with respect to their histologic type. A total of 76 probe sets corresponding to 67 unique genes/ESTs was differentially expressed between the 42 NS cHL samples and the 17 MC cHL samples. Sixty-four probe sets, representing 55 unique genes, were overexpressed in NS samples, and 12 probe sets, representing 12 unique genes, were overexpressed in MC samples (Table S4). The resulting LDA-based classification of samples is shown in Figure S1.

Among the 55 genes overexpressed in NS cHL, ontology analysis revealed an overrepresentation of genes related to extracellular matrix (*CALD1*, *COL6A3*, *ITGB1*, *ITGAV*), and to nonspecific cellular functions (*PDGFRA*, *THY1*, *RHOC*). Conversely, the functional categories of the genes overexpressed in MC cHL were reflective of lymphocyte activation (*TLR8*, *CD38*, *SLAMF7*).

The stroma of H/TCRBCL is highly enriched in PD-1⁺-reactive T cells that do not express usual Tfh or Treg markers

We chose to include H/TCRBCL samples as controls because they represent the only lymphoma type that harbors an equivalent amount of reactive T cells and macrophages as found in cHL. Thus the differences evidenced by gene expression

Table 2. Overall survival analysis

Variable	Class/cutoff	n (%)	Univariate analysis*		Multivariate analysis†	
			Hazard ratio of event risk	P	Hazard ratio of event risk	P
Bcl2‡	IHC score > 0	53 (39.8)	1.64 (0.843-3.188)	.15		
EBV‡	IHC score > 0	29 (20.4)	0.627 (0.243-1.618)	.33		
PD1	IHC score > 1	8 (18.2)	0.447 (0.055-3.625)	.45		
CD57	IHC score > 1	42 (35.3)	1.09 (0.497-2.373)	.84		
FOXP3	IHC score > 1	97 (73.5)	0.908 (0.415-1.987)	.81		
Tryptase	IHC score > 1	116 (83.5)	1.86 (0.566-6.088)	.31		
TIA-1	IHC score > 2	34 (24.5)	2.4 (1.202-4.786)	.013	1.91 (0.841-4.331)	.12
Granzyme B	IHC score > 1	40 (36.4)	1.31 (0.618-2.779)	.48		
PS100	IHC score > 1	77 (53.8)	1.28 (0.651-2.522)	.47		
Topolla‡	IHC score > 1	66 (49.3)	2.85 (1.358-5.961)	.006	4.11 (1.663-10.136)	.002
BFAR‡	IHC score > 1	84 (70.6)	0.798 (0.356-1.792)	.59		
Smad4	IHC score > 0	20 (29.4)	0.799 (0.287-2.224)	.67		
Bcl11A	IHC score > 1	68 (53.1)	0.104 (0.04-0.268)	2.90×10^{-6}	0.103 (0.032-0.329)	.001
CD20	IHC score > 1	76 (53.9)	0.322 (0.157-0.658)	.002	0.325 (0.135-0.781)	.012
CD8	IHC score > 1	54 (45.4)	1.28 (0.601-2.728)	.52		
Stat1	IHC score > 1	33 (42.9)	1.13 (0.48-2.672)	.78		
BDCA2	IHC score > 1	24 (35.3)	1.28 (0.405-4.051)	.67		
Age	≥ 45 y	21 (14.9)	2.56 (1.197-5.477)	.015	6.47 (2.321-18.019)	.001
Sex	Female	64 (44.8)	0.44 (0.211-0.918)	.029	0.364 (0.147-0.904)	.03
Ann Arbor	III-IV	59 (41.3)	1.39 (0.716-2.708)	.33		
B symptoms	Present	47 (40.5)	2.87 (1.301-6.331)	.009		
Bulky tumor	Present	47 (40.5)	5.25 (2.292-12.012)	8.80×10^{-5}		
Extranodal disease	Present	19 (16.4)	1.51 (0.569-4.014)	.41		
No. of nodal sites	≥ 3	61 (48)	1.11 (0.528-2.325)	.79		
Inguinal involvement	Present	9 (9.4)	2.74 (0.926-8.094)	.069		
ESR	≥ 50	59 (48.4)	1.2 (0.57-2.518)	.63		
Hemoglobin	≥ 10.5 g/dL	105 (78.4)	0.795 (0.357-1.771)	.57		
White cell count	> $15 \times 10^9/L$	27 (19.9)	2.54 (1.222-5.269)	.013	2.79 (1.212-6.418)	.016
Lymphocyte count	≥ $0.6 \times 10^9/L$ or ≥ 8%	103 (82.4)	0.533 (0.236-1.204)	.13		
Albumin level	≥ 40 g/L	47 (45.6)	0.326 (0.131-0.812)	.016		

*Univariate Cox proportional hazards regression model.

†Cox proportional hazards regression model after backward stepwise variables selection procedure.

‡Bcl2, EBV, topoisomerase-2, and BFAR immunostainings were analyzed on Reed-Sternberg cells, whereas the results mentioned for all other antibodies were analyzed on reactive cells.

profiling are expected to be due mainly to stromal components, rather than to the nature of neoplastic cells. We searched for stromal markers that could reliably differentiate cHL and H/TCRBCL samples.

Global clustering (Figure 1A) suggested strong differences between the 2 entities. We applied supervised analysis to search for a gene expression signature that would discriminate between the 5 H/TCRBCL and the 63 cHL samples. With a 0.01% risk, we identified 666 probe sets corresponding to 614 unique genes/ESTs as differentially expressed (Table S5). The resulting LDA-based classification of samples is shown in Figure S2.

Differentially expressed probe sets included 310 probe sets, corresponding to 276 unique genes overexpressed in H/TCRBCL. These overexpressed genes belonged to miscellaneous functional categories including genes related to macrophages (*STAT1*, *LAMP1*), Th1 response (*IFNG*, *CCR5*), and *MUC1*, coding for a protein closely related to the epithelial membrane antigen. One of the most significantly overrepresented genes in H/TCRBCL was *PDCD1/PD-1*, which codes for a lymphocyte inhibitory receptor. The fact that PD-1 was recently reported by others as well as ourselves to be expressed at high levels by T-follicular helper (Tfh) cells^{38,42} led us to verify the RNA levels of other known Tfh markers, namely CXCL13 and ICOS⁴³: both were significantly lower in H/TCRBCL samples. In addition, we performed a GSEA analysis based on previously published

Tfh-related gene set lists.³⁰ We found no significant association between any of the different gene sets overexpressed in Tfh (GS1 to GS8) and the H/TCRBCL gene signature.

Conversely, compared with cHL, H/TCRBCL samples showed underexpression of *PTEN*, *SOCS2*, *SOCS5*, and genes related to the TGFβ pathway (*TGFBR3*, the TGFβ inducible genes *KLF10* [*TIEG*] and *TGFB11*). Of note, *TNFSFR8* (*CD30*) was also, as expected, underexpressed in H/TCRBCL.

To validate the H/TCRBCL gene signature, PD-1 and MUC1 protein expression were analyzed using IHC on the validation set of cHL samples and on a distinct set of 13 H/TCRBCL paraffin samples. As expected from DNA microarray data, a variable number of malignant B cells in 8 of 13 H/TCRBCL cases stained for MUC1, whereas all cHL cases were negative. The PD-1 antibody strongly stained (IHC score 2 or 3) the vast majority of reactive T lymphocytes in 13 of 13 H/TCRBCL cases (Figure 4G,H), whereas only 8 of 44 informative cHL cases displayed a 2 or 3 IHC score of PD-1 staining in reactive lymphocytes (Figure 4F). These data therefore confirm our mRNA data ($P < .001$).

We then determined at the protein level whether PD-1⁺ stromal T cells in H/TCRBCL could be derived from either Tfh or Treg cells, using their classical markers CXCL13 and FOXP3, respectively. Only a weak or absent CXCL13 IHC staining was evidenced in the 13 H/TCRBCLs analyzed. In these 13 cases, CXCL13⁺ reactive cells were much sparser than PD-1⁺ cells. FOXP3

Table 3. Event-free survival analysis

Variable	Class/cutoff	n (%)	Univariate analysis*		Multivariate analysis†	
			Hazard ratio of event risk	P	Hazard ratio of event risk	P
Bcl2‡	IHC score > 0	53 (39.8)	1.22 (0.726-2.034)	.46		
EBV‡	IHC score > 0	29 (20.4)	0.668 (0.338-1.319)	.24		
PD1	IHC score > 1	8 (18.2)	0.627 (0.179-2.193)	.46		
CD57	IHC score > 1	42 (35.3)	1.42 (0.81-2.493)	.22		
FOXP3	IHC score > 1	97 (73.5)	0.555 (0.32-0.966)	.037		
Tryptase	IHC score > 1	75 (54)	0.892 (0.537-1.482)	.66		
TIA-1	IHC score > 2	34 (24.5)	1.16 (0.654-2.063)	.61		
Granzyme B	IHC score > 1	40 (36.4)	1.25 (0.707-2.201)	.45		
PS100	IHC score > 1	77 (53.8)	0.808 (0.49-1.33)	.4		
Topolla‡	IHC score > 1	66 (49.3)	1.75 (1.048-2.918)	.032		
BFAR‡	IHC score > 1	84 (70.6)	0.756 (0.416-1.372)	.36		
Smad4	IHC score > 0	20 (29.4)	0.742 (0.345-1.597)	.45		
Bcl11A	IHC score > 1	68 (53.1)	0.216 (0.122-0.38)	1.10×10^{-7}	0.206 (0.107-0.394)	1.80×10^{-6}
CD20	IHC score > 1	76 (53.9)	0.532 (0.318-0.89)	.016		
CD8	IHC score > 1	54 (45.4)	0.792 (0.451-1.39)	.42		
Stat1	IHC score > 1	33 (42.9)	0.746 (0.378-1.472)	.4		
BDCA2	IHC score > 1	24 (35.3)	1.31 (0.625-2.745)	.47		
Age	≥ 45 y	21 (14.9)	1.46 (0.758-2.808)	.26		
Sex	Female	64 (44.8)	0.71 (0.426-1.185)	.19		
Ann Arbor	III-IV	59 (41.3)	1.19 (0.719-1.976)	.5		
B symptom	Present	47 (40.5)	1.57 (0.901-2.738)	.11		
Bulky tumor	Present	47 (40.5)	2.35 (1.348-4.104)	.003		
Extranodal disease	Present	19 (16.4)	1.2 (0.56-2.589)	.63		
No. of nodal sites	≥ 3	61 (48)	1.18 (0.677-2.054)	.56		
Inguinal involvement	Present	9 (9.4)	1.78 (0.69-4.594)	.23		
ESR	≥ 50	59 (48.4)	0.747 (0.428-1.302)	.3		
Hemoglobin	≥ 10.5 g/dL	105 (78.4)	0.783 (0.428-1.432)	.43		
White cell count	> $15 \times 10^9/L$	27 (19.9)	1.98 (1.107-3.527)	.021	1.8 (0.912-3.559)	.09
Lymphocyte count	≥ $0.6 \times 10^9/L$ or ≥ 8%	103 (82.4)	0.886 (0.455-1.725)	.72		
Albumin level	≥ 40 g/L	47 (45.6)	0.337 (0.169-0.668)	.002		

*Univariate Cox proportional hazards regression model.

†Cox proportional hazards regression model after backward stepwise variables selection procedure.

‡Bcl2, EBV, Topoisomerase-2, and BFAR immunostainings were analyzed on Reed-Sternberg cells, whereas the results mentioned for all other antibodies were analyzed on reactive cells.

immunodetection was virtually negative in 13 of 13 H/TCRBCL paraffin samples (< 5% of positive reactive lymphocytes). These results thus gave no clue as to a Tfh or Treg derivation of PD-1⁺ cells in H/TCRBCL.

Discussion

There have been few gene expression analyses of nonmicrodissected cHL tissues.^{23,24} In a preliminary study in which BCL11A was not analyzed, we observed that the B-cell marker CD22 and several genes regulating apoptosis were overexpressed in patients with favorable outcome, whereas genes involved in extracellular matrix remodeling had an adverse influence.²³ Accordingly, the major finding of the present study is the favorable role of reactive B cells within cHL tissues. Also in agreement with our previous data is the influence of apoptotic and matrix remodeling genes that we describe herein. The present findings are also partly in line with a recent study suggesting that favorable outcome of cHL patients may be correlated with overexpression of genes specific for particular B-cell subpopulations, whereas high topo-IIα expression may be linked to poor survival.²⁴ However, there is only limited overlap between the latter report and the present one, which might be explained by major methodologic differences. In fact,

the present study analyzed patients with either localized or advanced disease and used Affymetrix oligonucleotide microarrays containing approximately 16 000 genes. In contrast, the Spanish study²⁴ analyzed only advanced-stage patients and used spotted microarrays containing fewer than 10 000 genes in which BCL11A was not included.

We confirm herein that both low number of FOXP3⁺ cells and high number of TIA-1⁺ cytotoxic lymphocytes correlate with a poor outcome, as previously reported.¹⁹⁻²² We also confirm that cHL patients with high topo-IIα expression have inferior survival, and that the mere count of granzyme-B⁺ cells is devoid of predictive significance as reported elsewhere.^{16,21,24} These confirmations are of particular value, because we used an independent and previously unreported set of patients, different antibodies, and counting methods.

BCL11A is a transcription factor expressed in normal pDCs and B cells^{40,41} and in primary mediastinal B-cell lymphoma cells.⁴⁴ We report herein that BCL11A expression has a high favorable prognostic value when localized in reactive pDCs and B cells, but not in RS cells. This led us to analyze separately the pDC and B-cell populations using antibodies against BDCA2 and CD20, respectively. The amount of CD20⁺ reactive cells was correlated with better outcome but was much less significant than BCL11A, whereas the number of BDCA2⁺ cells showed no significance. An interpretation of these findings

could be that cooperation between pDCs and B cells within the tumor is required for an efficient antitumoral response. BCL11A⁺ pDCs may be implicated in the antitumor response, because it has been reported that EBV-stimulated pDCs can produce IFN α , promote activation of natural killer (NK) cells, and stimulate IFN γ -producing CD3⁺ cells.⁴⁵ This may not be contradictory with the lack of prognostic value of BDCA2 staining compared with BCL11A, because different pDC subsets may be recognized by either antibody.

Our major finding regarding the association of high intratumoral B-cell counts with better outcome is in accordance with the excellent prognosis of the particular variant of cHL referred to as “nodular, lymphocyte-rich cHL” (NLRHL), which contains important B-cell amounts.⁴⁶ The histologic type of our B cell-rich cHL cases was either MC or NS, but we noticed that RS cells were often located in the outer rim of B-cell nodules, a feature reminiscent of the localization of RS cells in NLRHL.⁴⁶ This raises the hypothesis that our B cell-rich cases could correspond to intermediate points on a putative spectrum spanning from NLRHL to NS or MC, depending on the B-cell content of the lesions.

H/TCRBCL and cHL lesions share morphologic similarities,⁶ and the differential diagnosis of H/TCRBCL versus cHL can be a pitfall for pathologists.⁴⁷ We report herein that the majority of reactive T cells in H/TCRBCL express the PD-1 inhibitory receptor, whereas such PD-1⁺ T cells are sparser in cHL. This implies that PD1 immunodetection on paraffin sections can be helpful for the diagnosis of H/TCRBCL. Sustained PD1 expression in H/TCRBCL may be induced by IFN γ , whose transcripts were also more abundant in H/TCRBCL than cHL tissues. Because it is known that macrophages produce high amounts of PDL-1,⁴⁸ the natural PD-1 ligand, T cells in H/TCRBCL might be submitted to a continuous PD-1 inhibitory signal, and thus unable to react against tumor cells, which may explain the specific aggressive behavior of H/TCRBCL.⁴⁷

To date, only a few differences have been found in the microenvironment of EBV⁺ versus EBV⁻ RS cells, such as an increased expression of IP10/CXCL10,¹¹ and CCL20.¹³ The present study demonstrates that EBV⁺ and EBV⁻ cHL tissues can be clearly separated from each other by a robust gene signature involving innate immunity and antiviral responses in EBV⁺ tumors. In fact, the EBV⁺ cHL subset overexpressed antiviral genes such as *IVNS1ABP* (*NS1BP*), *PLSCR1*, and *OAS*, together with the pattern recognition receptor TLR8 and the MDA5 helicase, which are both involved in the recognition of viruses of various structures.⁴⁹ Signaling through TLRs and helicases is known to converge toward induction of interferons, which are the principal cytokines mediating innate immunity against viral infection.⁴⁹

Our gene profiling data also provide evidence of intratumoral Th1 activity in EBV⁺ cHL. The molecular profile of EBV⁺ tumors (simultaneous overexpression of *IFNG*, *CXCL9*, *CXCL10*, and *CXCL11/ITAC*) suggests that this Th1 reaction could be

orchestrated by IFN γ , which is capable of inducing expression of not only CXCL10, but also CXCL9/MIG and CXCL11/ITAC, both also known as CXCR3 ligands and potential chemoattractants of Th1 lymphocytes. Of note, CXCL9 and CXCL10 were also predominantly expressed in EBV⁺ cHL samples in a recent gene profiling analysis, but without any evidence of Th1 or antiviral reaction.¹³ This discrepancy may be because the latter study was focused on cHL samples of the NS type only.¹³ It is noteworthy that our patients with EBV⁺ cHL did not have a better outcome, thereby suggesting that the described intratumoral immune reaction is inadequate to eliminate tumor cells. Nonetheless, our data raise the possibility that it could be further stimulated to design future therapies.

In conclusion, the present report suggests that B cells have an important influence on cHL outcome and that EBV favors a Th1 reaction in the cHL microenvironment. The latter point could be considered as a basis for targeted immunotherapies.

Acknowledgments

Special thanks to Coralie Attias for technical assistance and Karen Leroy and the Ligue Nationale Contre le Cancer (Programme Carte d'Identité des Tumeurs) for their help in the analysis of H/TCRBCL samples. We are grateful to Karen Pulford for the gift of the anti-BCL11A antibody.

We thank all the members of the GELA network who provided tumor samples or clinical data that could not be included in the study due to technical concerns, especially Gilles Salles, Françoise Berger, Philippe Gaulard, Josette Brière, Anne Janin, Pauline Brice, Pierre Brousset, Jean-François Michiels, Catherine Chassagne, Catherine Seban, Gérard Sebahoun, Frédérique Retornaz, Celia Salanoubat, Gérard Michel, and Hervé Chambost.

This work was supported by GELA and by grant 3684XA0431F from the Association de la Recherche contre le Cancer (Villejuif, France) and by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC 2004).

Authorship

Contribution: B.C., B.E., and L.X. analyzed TMA results; F.B. and P.F. performed and analyzed cDNA array experiments; A.S., J.M.P., M.C.C., F.M., O.C., T.P., T.M., A.V., P.F., and R.B. collected tissue samples and clinical data; D.B. supervised statistical analyses; D.O. supervised PCR experiments and helped to discuss the results; L.X. and F.B. wrote the paper; and L.X. designed the research.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Luc Xerri, Department of Bio-Pathology, Institut Paoli-Calmettes, 232 Boulevard de Sainte Marguerite, BP 156, 13273 Marseille Cedex 9, France; e-mail: xerri@marcelle.fncclcc.fr.

References

1. Fermé C, Mounier N, Casasnovas O, et al. Long-term results and competing risk analysis of the H89 trial in patients with advanced-stage Hodgkin lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA). *Blood*. 2006; 107:4636-4642.
2. Brice P. Managing relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 2008;141:3-13.
3. Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease: International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. *N Engl J Med*. 1998;339:1506-1514.
4. Hoppe RT, Advani RH, Bierman PJ, et al. Hodgkin disease/lymphoma: clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2006;4:210-230.
5. Casasnovas RO, Mounier N, Brice P, 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*. 2007;25:1732-1740.
6. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. Hodgkin lymphoma. In: *Pathology and Genetics*

- of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001:189-235.
7. Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2002;99:4283-4297.
 8. Juszczynski P, Ouyang J, Monti S, et al. The AP-1-dependent secretion of galectin-1 by Reed-Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13134-13139.
 9. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, et al. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2004;103:1755-1762.
 10. Yamamoto R, Nishikori M, Kitawaki T, et al. PD-1/PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008;111:3220-3224.
 11. 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*. 2005;206:68-75.
 12. Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein-Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007;60:1342-1349.
 13. Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM, 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*. 2008;173:195-204.
 14. Khan G. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp Hematol*. 2006;34:399-406.
 15. Sup SJ, Alemany CA, Pohlman B, et al. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. *J Clin Oncol*. 2005;23:3773-3779.
 16. Doussis-Anagnostopoulou IA, Vassilakopoulos TP, Thymara I, et al. Topoisomerase IIalpha expression as an independent prognostic factor in Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1759-1766.
 17. Natkunam Y, Hsi ED, Aoun P, et al. Expression of the human germinal center-associated lymphoma (HGAL) protein identifies a subset of classic Hodgkin lymphoma of germinal center derivation and improved survival. *Blood*. 2007;109:298-305.
 18. Diepstra A, van Imhoff GW, Karim-Kos HE, et al. HLA class II expression by Hodgkin Reed-Sternberg cells is an independent prognostic factor in classical Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007;25:3101-3108.
 19. Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1467-1473.
 20. Alvaro-Naranjo T, Lejeune M, Salvadó-Usach MT, et al. Tumor-infiltrating cells as a prognostic factor in Hodgkin's lymphoma: a quantitative tissue microarray study in a large retrospective cohort of 267 patients. *Leuk Lymphoma*. 2005;46:1581-1591.
 21. 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*. 2007;128:958-965.
 22. Tzankov A, Meier C, Hirschmann P, Went P, Pileri SA, Dirnhofer S. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2008;93:193-200.
 23. Devillard E, Bertucci F, Tremat P, et al. Gene expression profiling defines molecular subtypes of classical Hodgkin's disease. *Oncogene*. 2002;21:3095-3102.
 24. Sánchez-Aguilera A, Montalbán C, de la Cueva P, et al. Spanish Hodgkin Lymphoma Study Group: tumor microenvironment and mitotic checkpoint are key factors in the outcome of classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2006;108:662-8.
 25. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4:249-264.
 26. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14863-14868.
 27. Wang Y, Jatkoa T, Zhang Y, et al. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22:1564-1571.
 28. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-537.
 29. Magrangeas F, Nasser V, Avet-Loiseau H, et al. Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood*. 2003;101:4988-5006.
 30. Venables WN, Ripley BD. *Modern Applied Statistics with S-Plus*, 2nd Ed. Berlin, Germany: Springer; 1987.
 31. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:15545-15550.
 32. Open Biomedical Ontologies. The Gene Ontology Database. <http://www.geneontology.org/>. Accessed November 10, 2008.
 33. Massachusetts Institute of Technology. Molecular Signatures Database (MSigDB). <http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/index.jsp>. Accessed November 10, 2008.
 34. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood*. 2007;109:4952-4963.
 35. National Center for Biotechnology Information. Gene Expression Omnibus (GEO). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>. Accessed November 10, 2008.
 36. Ballester B, Ramuz O, Gisselbrecht C, et al. Gene expression profiling identifies molecular subgroups among nodal peripheral T-cell lymphomas. *Oncogene*. 2006;25:1560-1570.
 37. Kim BG, Li C, Qiao W, et al. Smad4 signalling in T cells is required for suppression of gastrointestinal cancer. *Nature*. 2006;441:1015-1019.
 38. Xerri L, Chetaille B, Seriani N, et al. Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Hum Pathol*. 2008;39:1050-1058.
 39. National Center for Biotechnology Information. Entrez Gene. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>. Accessed November 10, 2008.
 40. Pulford K, Banham AH, Lyne L, et al. The BCL11AXL transcription factor: its distribution in normal and malignant tissues and use as a marker for plasmacytoid dendritic cells. *Leukemia*. 2006;20:1439-1441.
 41. Marafioti T, Paterson JC, Ballabio E, et al. Novel markers of normal and neoplastic human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*. 2008;111:3778-3792.
 42. Roncador G, García Verdes-Montenegro JF, Tedoldi S, et al. Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica*. 2007;92:1059-1066.
 43. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, et al. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*. 2004;173:68-78.
 44. Weniger MA, Pulford K, Gesk S, et al. Gains of the proto-oncogene BCL11A and nuclear accumulation of BCL11A(XL) protein are frequent in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2006;20:1880-1882.
 45. Lim WH, Kireta S, Russ GR, Coates PT. Human plasmacytoid dendritic cells regulate immune responses to Epstein-Barr virus (EBV) infection and delay EBV-related mortality in humanized NOD-SCID mice. *Blood*. 2007;109:1043-1050.
 46. Anagnostopoulos I, Hansmann ML, Franssila K, 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*. 2000;96:1889-1899.
 47. Rüdiger T, Gascoyne RD, Jaffe ES, et al. Workshop on the relationship between nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma and T cell/histiocyte-rich B cell lymphoma. *Ann Oncol*. 2002;13(suppl 1):44-51.
 48. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007;8:239-245.
 49. Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol*. 2008;20:17-22.