

UNIVERSITE PARIS-SUD 11

ÉCOLE DOCTORALE 425

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : *du fondamental à l'appliqué*

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11

Présentée et soutenue par

**LEILA HAMDI**

Le 19 Décembre 2013

---

**RECHERCHE DE**

**FACTEURS DE RISQUE IMMUNOLOGIQUES ASSOCIES AU  
LYMPHOME HODGKINIEN DE L'ENFANT**

---

**Composition du jury :**

**Pr. Vincent MARECHAL**, *rapporteur*

PMC, Immunopathologie et Immuno-Intervention Thérapeutique, Centre de recherche des cordeliers, PARIS.

**Dr. Ioannis THEODOROU**, *rapporteur*

UF. d'Immunogénétique, Centre de Génétique Moléculaire et Chromosomique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris.

**Pr. Aurore COULOMB L'HERMINE**, *Examineur*

Paris VI, Service d'anatomo-pathologie, AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Paris.

**Dr. Yassine TAOUFIK**, *Examineur*

Paris XI, Service d'immunologie, APHP, Site Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre.

**Pr. Ridha KHELIFA**, *Co-directeur de thèse, invité*

Carthage, Unité de diagnostic viral et moléculaire des tumeurs, hôpital Habib Thameur, Tunisie

**Pr. Martine RAPHAEL**, *Co-directeur de thèse*

Paris XI, Faculté de médecine, Le Kremlin Bicêtre.

**Dr. Caroline BESSON**, *Co-directeur de thèse*

Paris XI, Service d'hématologie, APHP, Site Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre,

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	4
<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	7
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	9
<b>INTRODUCTION</b> .....	10
<b>A- Le Lymphome de Hodgkin (LH)</b> .....	10
1. Définition .....	10
2. Épidémiologie.....	10
3. Diagnostic et anatomo-pathologie.....	12
4. Signes cliniques, traitement et facteurs pronostiques.....	13
5. Physiopathologie.....	14
5.1. Origine des cellules HRS.....	14
5.2. Voies de signalisation impliquées dans la survie des cellules tumorales.....	15
5.3. Rôle des cytokines dans le développement du LH.....	16
6. Facteurs de risques de LH, infection EBV .....	17
<b>B- Le virus Epstein Barr et son contrôle immunitaire</b> .....	19
1. Généralités.....	19
2. Classification et structure.....	20
3. Réplication productive et cycle lytique.....	22
4. La primo-infection : Mononucléose infectieuse (MNI).....	26
5. La réponse immunitaire contre l'EBV.....	27
6. Thérapie cellulaire par les lymphocytes T anti-EBV.....	32
7. Lymphomes associés à l'EBV.....	33
7.1. Lymphome de Burkitt.....	33
7.2. Lymphome de Hodgkin et EBV.....	33
7.3. Lymphomes T/NK.....	35
7.4. Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation.....	35
7.5. Lymphomes des patients infectés par le VIH.....	36
<b>C. Déficit immunitaire inné et LH</b> .....	36
1. Déficiences immunes communes variables (DICV).....	36
2. Syndrome Lymphoprolifératif Autoimmun (ALPS).....	38
3. Le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP).....	39
4. Les nouveaux déficits immunitaires associés au LH EBV+.....	40
<b>OBJECTIFS</b> .....	42
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	43
1. Principes de l'étude.....	43
2. Population étudiée.....	44
2.1. Critères d'inclusion.....	44

2.2. Recueil des données cliniques des patients LH.....	45
3. Méthodes de conditionnement du prélèvement sanguin.....	45
3.1. Isolement des PBMCs et congélation.....	46
3.2. Etablissement des LCLs.....	46
4. Etude des populations et des sous-populations lymphocytaires .....	47
4.1. Marquage des cellules.....	47
4.2. Phénotypage et quantification des lymphocytes.....	48
5. Dosage des immunoglobulines.....	50
6. Sérologie anti-Tétanos.....	51
7. Détermination quantitative des taux de l'IL-7 et de BaFF.....	51
8. Dosage sérique de TGF- $\beta$ .....	51
9. Extraction des ADN.....	51
10. Sérologie et charge virale EBV .....	52
11. Etude de la réponse T anti-EBV.....	53
11.1. Décongélation et mise en culture.....	53
11.2. Coloration des cellules au CFSE.....	53
11.3. Conditions de stimulation des PBMCs.....	54
11.4. Cytométrie en flux pour quantifier la réponse T anti-EBV.....	55
11.5. Technique Elispot.....	56
12. Tumorothèque et Recherche de l'EBV in situ.....	57
13. Méthodes statistiques.....	57
<b>RESULTATS.....</b>	<b>58</b>
A. Description de la population d'étude.....	58
1. Données cliniques.....	59
2. Sérologie et charge virale EBV.....	60
3. Relecture histologique et recherche de l'EBV <i>in situ</i> .....	60
B. Recherche de déficit immunitaire.....	63
I/Approche systématique sur les 83 premiers patients.....	64
1. Caractérisation des lymphopénies B.....	64
2. Analyse des populations lymphocytaires T .....	75
3. Conclusion intermédiaire.....	76
II/ Recherche systématique de déficit immunitaire chez 395 patients LH.....	76
C. Recherche de défaut spécifique de la réponse T anti-EBV.....	80
1. Etude de la réponse T anti-EBV par cytométrie de flux.....	80
1.1. Mise au point de la technique chez les témoins.....	80
1.2. Réponse T anti-EBV par cytométrie de flux chez les patients.....	83
2. Etude de la réponse lymphocytaire T spécifique anti-EBV par Elispot.....	86
2.1. Mise au point de la technique.....	86
2.2. Détection de la réponse T effectrice anti-EBV chez les patients LH-EPI.....	87
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>96</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>105</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

- ALPS:** Syndrome Lymphoprolifératifs Autoimmun
- ADN:** Acide Désoxyribonucléique
- ARN:** Acide Ribonucléique
- BAFF:** B cell Activating Factor belonging to the TNF family
- BCR:** B-cell signaling receptor.
- ZEBRA :** Z Epstein-Barr replication activators
- CFSE :** *Carboxyfluorescéine succinimidyl ester*
- CMH :** Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CTLs:** Lymphocytes T cytotoxiques
- DICV :** Déficits Immuns Communs Variables
- DIP :** Déficits Immunitaires Primaires
- DMSO:** Diméthylsulfoxyde
- EA:** Early antigen
- EBER :** EBV Encoded RNA
- EBNA:** EBV Nuclear Antigen
- EBV :** Epstein Barr Virus
- FSC:** Forward Scatter
- GVHD :** Graft versus Host Disease
- Hb :** Hémoglobine
- HLA :** Human Leukocyte Antigen
- IFN- $\gamma$ :** Interféron- $\gamma$
- Ig :** Immunoglobulines
- IL:** Interleukine
- IR :** Internal Repeats
- LB ZM :** Les Lymphocytes B de la zone marginale
- LCL :** Lignée Cellulaire Lymphoblastoïde

**LH** : Le lymphome de Hodgkin

**LMP1** : Latent Membrane Protein 1

**LNH** : Lymphome Non Hodgkinien

**LT $\alpha\beta$  DN** : Lymphocytes T « doubles négatifs »

**MC** : cellularité mixte

**MNI** : Mononucléose Infectieuse

**NF- $\kappa$ B**: Nuclear Factor Kappa B

**NK**: Natural Killer

**NKT** : Lymphocytes T natural killer

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**Orf**: open reading frame

**Pb** : paire de bases

**PBMCs** : Peripheral Blood Mononuclear cells

**PBS** : Phosphate Buffer Saline

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PHA** : Phytohémagglutinine

**PLB** : Patients Lymphopéniques B

**P non LB** : Patients non lymphopéniques

**PTLD** : Post Transplant Lymphoproliferative Disease

**RS** : cellules de Reed-Sternberg

**SAP**: Signaling associated Protein

**SEB**: Entérotoxine B staphylococcique

**SLAM**: signaling lymphocyte activation molecule

**SN** : scléronodulaire

**SSC**: Side Scatter

**SVF**: Sérum de Veau Fœtal

**TGF- $\beta$** : «Transforming growth factor» beta

**TNF**: Tumor Necrosis Factor

**TNFAIP3:** TNF $\alpha$ -induced protein 3.

**TNF-Rs:** Tumor Necrosis Factor Receptors

**TR:** Terminal Repeats

**TRAF3:** TNF receptor activating factor

**TSA:** Trichostatine A

**VCA :** Viral Capsid Antigen

**VIH :** Virus de l'Immunodéficience Humaine

**VS :** Vitesse de sédimentation

**XIAP:** X-linked inhibitor of apoptosis

**XLP :** Syndrome Lymphoproliféraf lié au chromosome X

## TABLE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	Coupe histologique de ganglion lymphatique d'un patient atteint de LH (A), présence des cellules de Reed Sternberg avec ses deux noyaux (B).....	10
<b>Figure 2 :</b>	Incidence du LH selon l'âge et le sexe en Ecosse .....	11
<b>Figure 3 :</b>	Incidence du type de LH en fonction du sexe (A) et incidence du LH (Hodgkin's) et des lymphomes non hodgkiniens (NHL) en fonction de l'âge des individus (B).....	11
<b>Figure 4 :</b>	Incidence du LH selon la détection ou non de l'EBV.....	13
<b>Figure 5 :</b>	Les cellules de Reed-Sternberg proviennent de cellules pré-apoptotiques du centre germinatif.....	15
<b>Figure 6 :</b>	Les cellules HR ont une activation constitutive de la voie de signalisation NF-κB.....	16
<b>Figure 7 :</b>	Risque relatif post- MNI de lymphome hodgkinien.....	18
<b>Figure 8 :</b>	Structure du génome viral EBV linéaire et circulaire.....	20
<b>Figure 9 :</b>	Cycle de vie du virus d'Epstein-Barr et ses interactions avec les cellules hôtes .....	24
<b>Figure 10 :</b>	Cycle de l'infection EBV in vivo.....	25
<b>Figure 11 :</b>	Aspect cytologique de lymphocytes « atypiques » hyperbasophiles évocateurs d'un syndrome mononucléosique comparés à un lymphocyte normal non stimulé.....	27
<b>Figure 12 :</b>	Evolution d'anticorps après primo-infection par l'EBV.....	28
<b>Figure 13 :</b>	Dynamique des réponses T CD8+ et CD4+ à l'EBV .....	29
<b>Figure 14 :</b>	Etapas de la techniques ELISPOT.....	30
<b>Figure 15 :</b>	Technique de détection des cellules cytotoxiques par cytométrie de flux.....	31
<b>Figure 16 :</b>	Double marquage histologique cellules HRS anti-EBER (brun-noir) et anti-LMP1 (rouge).....	35
<b>Figure 17 :</b>	La figure illustre la classification « EUROCLASS » .....	37
<b>Figure 18 :</b>	Signalisation de l'apoptose lymphocytaire par Fas.....	38
<b>Figure 19 :</b>	Spécificité de défaut des cellules NKT dans l'XLP.....	39
<b>Figure 20 :</b>	Rôle des récepteurs SLAM et de SAP dans les différentes populations de lymphocytes T	40
<b>Figure 21 :</b>	Schéma de l'essai thérapeutique.....	44
<b>Figure 22 :</b>	Schéma présentant le conditionnement des prélèvements de sang frais des patients Hodgkiniens .....	45
<b>Figure 23 :</b>	Analyse par cytométrie en flux des cellules sanguines réparties sur le graphe en fonction de leur taille et de leur granulosité .....	48
<b>Figure 24 :</b>	Illustration des différentes populations lymphocytaires dans le sang total d'un patient atteint de lymphome de Hodgkin.....	50
<b>Figure 25 :</b>	Exclusion des LCLs marquées au CFSE.....	54
<b>Figure 26 :</b>	Nombre de prélèvements des patients LH par mois.....	58
<b>Figure 27 :</b>	la répartition sexe-âge de 150 enfants atteints de LH.....	59

<b>Figure 27bis</b>	Répartition de la charge virale EBV en fonction de l'âge et du Sexe.....	60
<b>Figure 28 :</b>	Mise en évidence de l'EBV par immunohistochimie .....	61
<b>Figure 29:</b>	Stratégies adoptées pour la recherche de déficit immunitaire chez les patients LH.....	63
<b>Figure 30 :</b>	Corrélation entre lymphocytes B et lymphocytes T CD4 et CD8.....	65
<b>Figure 31:</b>	Distribtuion des sous-populations lymphocytaires B chez les patients ayant ou non une lymphopénie B.....	66
<b>Figure 32:</b>	Taux des immunoglobulines (Ig) chez les patients ayant ou non une lymphopénie B.....	66
<b>Figure 33 :</b>	Concentrations sériques de l'interleukine (IL)-7, de BAFF (B-cell-activating factor) et de TGF- $\beta$ chez des patients Hodgkiniens lymphopeniques .....	70
<b>Figure 34 :</b>	Caractéristiques histologiques et lymphopénie B.....	70
<b>Figure 35 :</b>	Survie sans progression selon le nombre de lymphocytes B au diagnostic de LH.....	73
<b>Figure 36:</b>	Evolution des lymphocytes B de 6 patients LH lymphopéniques B au diagnostic.....	74
<b>Figure 37 :</b>	Images de cytométrie en flux représentant les réponses cellulaires T CD8+ et T CD4+ aux différentes stimulations antigéniques.....	81
<b>Figure 38</b>	La réponse de lymphocytes T CD4 anti-EBV.....	84
<b>Figure 39</b>	La réponse de lymphocytes T CD8 anti-EBV.....	85
<b>Figure 40 :</b>	Exemple de résultat que l'on a obtenu avec le pool de peptide EBV et le virus EBV.....	86
<b>Photo 1 :</b>	Lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs).....	46

## TABLE DES TABLEAUX

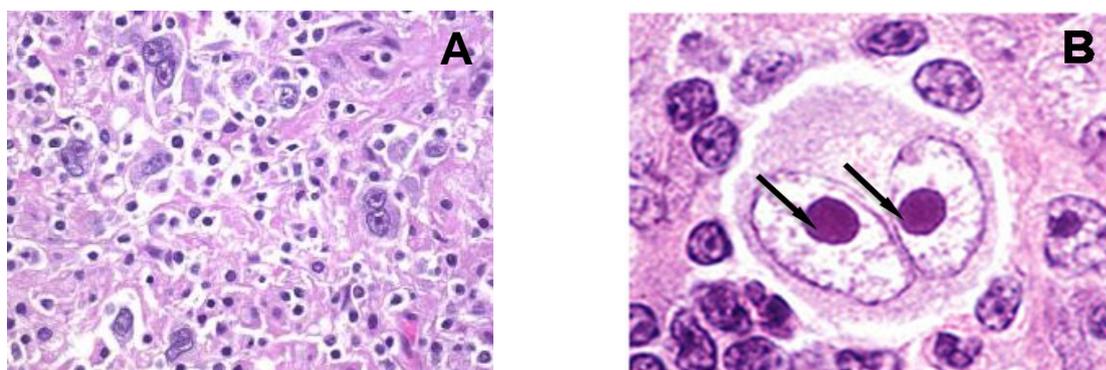
<b>Tableau 1 :</b>	Expression des protéines de latence selon le type de latence et pathologies associées.....	21
<b>Tableau 2 :</b>	Les protéines de latence et leurs principales fonctions.....	21
<b>Tableau 3 :</b>	Choix et interprétation du panel d'immunophénotypage.....	47
<b>Tableau 4 :</b>	Les sous-populations des cellules B périphériques (Wehr et al., 2008).....	49
<b>Tableau 5 :</b>	Mise en culture des PBMCs avec différentes conditions de stimulation.....	55
<b>Tableau 6 :</b>	Caractéristiques démographiques et cliniques des 155 patients LH.....	59
<b>Tableau 7 :</b>	Comparaison des LH-EBV+ et LH EBV-.....	62
<b>Tableau 8 :</b>	Distribution des populations lymphocytaires chez les 83 premiers patients LH et les témoins.....	64
<b>Tableau 9 :</b>	Description des patients lymphopéniques B (n=31).....	68
<b>Tableau 10 :</b>	Corrélation entre Lymphopénie B et facteurs pronostiques de LH.....	72
<b>Tableau 11 :</b>	Patients ayant une expansion modérée des lymphocytes T doubles négatifs parmi 83 patients.....	76
<b>Tableau 12 :</b>	Tableau récapitulatif des enfants inclus dans LH-EPI suspects de déficit immunitaire.....	78
<b>Tableau 13 :</b>	Résultats représentant les différentes réponses selon les types de stimulation.....	82
<b>Tableau 14 :</b>	Sexe, âge (en années) et charge virale (EBV) des patients analysés.....	83
<b>Tableau 15 :</b>	Réponse T CD4 anti-EBV dans les 3 groupes de patients.....	84
<b>Tableau 16 :</b>	Réponse T CD4 anti-EBV dans les 3 groupes de patients.....	85
<b>Tableau 17 :</b>	Comparaison des méthodes elispot.....	87
<b>Tableau 18 :</b>	Résultats elispot pour la réponse des LT effecteur spécifique anti-EBV.....	88

## INTRODUCTION

### A- Le Lymphome de Hodgkin (LH)

#### 1-Définition

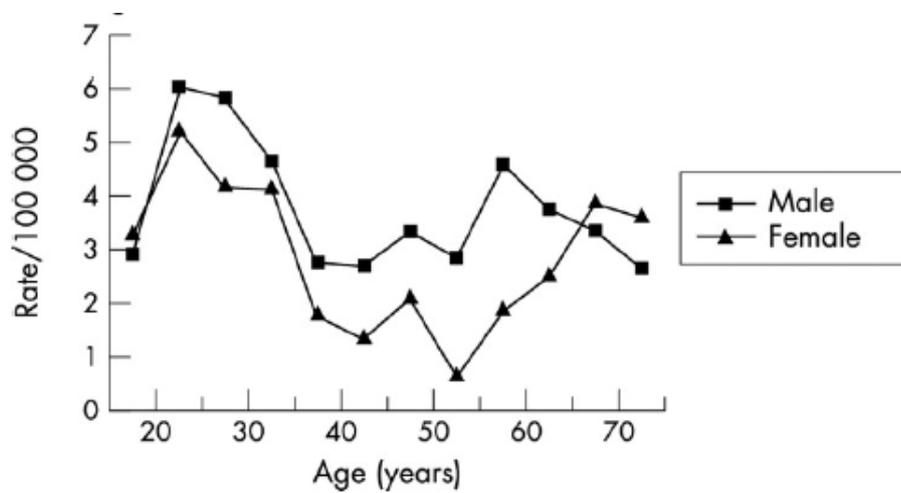
Le lymphome de Hodgkin (LH) est une hémopathie maligne décrite en 1832 par Thomas Hodgkin, caractérisée par une infiltration ganglionnaire par de volumineuses cellules tumorales appelées cellules de Reed-Sternberg (RS) présentes au sein d'un tissu réactionnel (Figure1). Ces cellules tumorales proviennent d'un précurseur lymphoïde B du centre germinatif. (Kuppers *et al*, 2002, Gandhi *et al*. 2004). Elles ont la particularité d'être fréquemment infectées par le virus Epstein Barr (EBV).



**Figure 1 : Coupe histologique de ganglion lymphatique d'un patient atteint de LH (A) (X500), présence des cellules de Reed Sternberg avec ses deux noyaux contenant chacun un nucléole éosinophile indiqué par les flèches (B) (X1000) (<http://www.lmp.ualberta.ca>, <http://webpathology.com>).**

#### 2-Épidémiologie

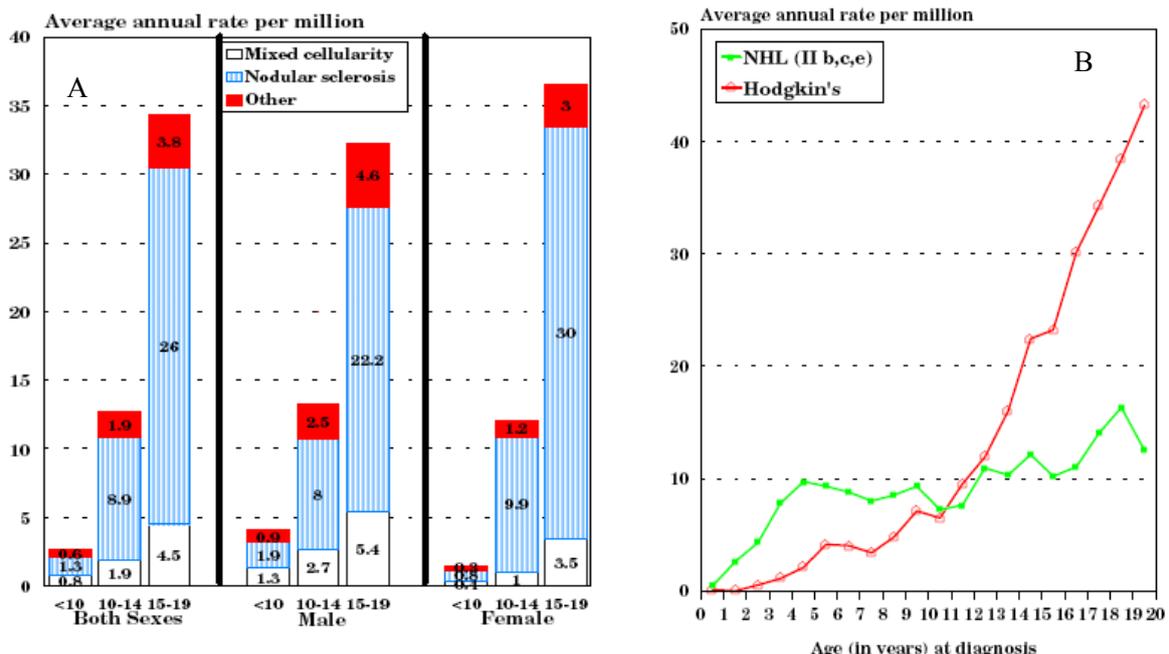
Le LH représente moins de 1 % de la totalité des cancers. Son incidence est d'environ 2,4 cas pour 100 000 habitants par an. Cette maladie touche plus fréquemment les hommes avec un sexe-ratio H / F de 1,5. Contrairement aux autres lymphomes, dont la fréquence augmente avec l'âge, le LH a une courbe d'incidence bimodale dans les pays industrialisés (Figure 2) : leur incidence est plus élevée au sein de deux groupes d'âge, le premier étant entre 15 et 30 ans et le second au-delà de 60 ans.



**Figure 2 : Incidence du LH selon l'âge et le sexe en Ecosse (Morris et al. 2002)**

**Légende :** L'incidence du Lymphome Hodgkinien est représentée en fonction de l'âge et du sexe. Un pic d'incidence est observé entre 15 et 35 puis au-delà de 55 ans.

La maladie est rare chez l'enfant et concerne essentiellement des enfants de plus de 10 ans et des adolescents. L'incidence de la maladie est en moyenne de 12 cas par million d'enfants de moins de 18 ans et par an (Figure 3B). Le nombre de cas estimé d'âge pédiatrique est d'une centaine par an en France. Il y a schématiquement deux entités de LH chez les enfants : une forme rare survenant avant l'âge de 10 ans, qui prédomine chez le garçon (sex-ratio de trois), associée à l'EBV dans 80% des cas, et l'autre plus fréquente, après 10 ans avec un sexe-ratio équilibré et une association à l'EBV plus rare, 20% des cas (Figure 3A) (Andriko JA. et al, 1997).



**Figure 3 : Incidence du type de LH en fonction du sexe (A) et incidence du LH (Hodgkin's) et des lymphomes non hodgkiniens (NHL) en fonction de l'âge des individus (B).**

### 3-Diagnostic et anatomo-pathologie

Le diagnostic de LH repose sur l'étude anatomopathologique, d'un ganglion, le plus souvent. Elle montre la présence de grandes cellules malignes (RS), binucléées, avec des nucléoles proéminents, et une destruction de l'architecture normale du ganglion. Il existe également une importante réaction cellulaire comportant lymphocytes T, histiocytes et éosinophiles (Stein et al. 2001). À cette étude morphologique, est couplée une étude de l'immunophénotype des cellules tumorales. Elles sont typiquement CD15+ et CD30+, souvent CD25+, sans expression du CD20 et, dans près de 20 à 30% des cas, elles expriment la protéine de latence membranaire de l'EBV, LMP-1.

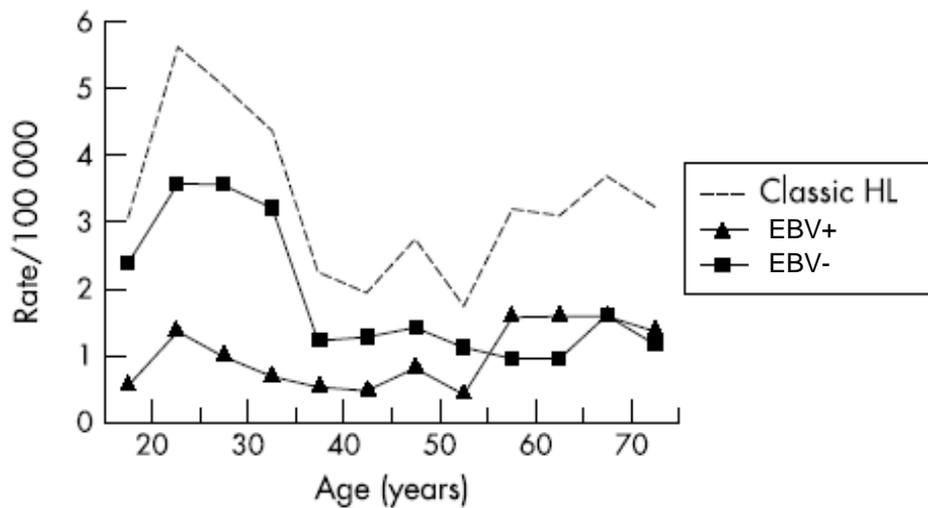
La classification de l'OMS des tumeurs hématopoïétiques reconnaît deux entités clinico-pathologiques de LH (Jaffe et al. 2001, Stein et al. 2001) : Le LH classique et le LH nodulaire à prédominance lymphocytaire anciennement paragranulome de Poppema et Lennert. Cette entité est désormais considérée comme une forme rare et indolente de lymphome non Hodgkinien. Les LH classiques sont classés en quatre sous-types morphologiques (Gaulard et Brousse, 2004) en fonction de la population cellulaire réactionnelle. Les deux sous-types les plus fréquents sont à sclérose nodulaire et à cellularité mixte :

*Forme à sclérose nodulaire* : C'est la variété la plus fréquente qui correspond à environ 60 à 70% des cas. Entouré d'une capsule épaissie, le parenchyme ganglionnaire est divisé en nodules par des bandes fibreuses de collagène.

*Forme à cellularité mixte* : La forme à cellularité mixte, regroupant environ 20 à 30 % des cas, est la plus fréquente chez les patients immunodéprimés, chez les sujets âgés et chez les jeunes enfants (moins de 10 ans). La prolifération cellulaire est diffuse, sans aspect nodulaire : sans nodules de fibrose.

Les formes « *riche en lymphocytes* » et « *à déplétion lymphocytaire* » sont plus rares et constituent chacune moins de 5% des cas de LH.

L'EBV peut être détecté dans les cellules tumorales par hybridation in situ (EBER) ou immunohistochimie (anticorps anti-LMP1). L'EBV est davantage détecté dans les formes de types cellularité mixte (MC) 40 à 90% que dans les formes de types scléronodulaire 10 à 30%. Il est aussi plus fréquent chez le jeune enfant et chez le sujet âgé (Figure 4).



**Figure 4 : Incidence du LH selon la détection ou non de l'EBV (Jarrett RF *et al.* 2003)**

**Légende :** Avant l'âge de 55 ans, les LH-EBV- sont plus fréquents que les LH-EBV+, au-delà de cet âge, la proportion de LH-EBV+ est supérieure à celle des LH-EBV-.

#### 4. Signes cliniques, traitement et facteurs pronostiques

L'augmentation de taille des ganglions lymphatiques (adénopathies) est le signe le plus fréquent ; les adénopathies sont localisées le plus souvent au niveau cervical ou axillaire. L'examen peut aussi retrouver des adénopathies inguinales, une splénomégalie ou une hépatomégalie. Environ un tiers des malades présentent aussi des signes généraux (dits signes "B") : amaigrissement, asthénie, fièvre prolongée, ou sueurs nocturnes et abondantes.

En fonction de l'extension de la maladie, on peut distinguer quatre stades cliniques (Selon la classification d'Ann-Arbor 1971):

- Stade I : un ganglion ou un groupe ganglionnaire atteint.
- Stade II : deux groupes ganglionnaires atteints d'un seul côté du diaphragme.
- Stade III : ganglions atteints de part et d'autre du diaphragme.
- Stade IV : Atteinte viscérale, foie, moelle osseuse.

Le traitement du LH associe une polychimiothérapie dont la durée dépend du stade à une radiothérapie pour les stades localisés seulement. Pour les formes localisées, la survie à long terme est excellente (>95% à 5 ans) et les protocoles actuels ont pour objet de permettre une décroissance du traitement. Chez l'enfant, les taux de survie à long terme sont supérieurs à 90% tous stades confondus dans la plupart des études pédiatriques. L'objectif actuel est la décroissance thérapeutique pour tous les stades afin de limiter les conséquences tardives des traitements (infertilité, cancers secondaires, toxicités endocrinienne et cardiaque) et ce, sans pénaliser les chances de guérison. Le protocole EURONET avait pour but de tester si l'on peut se passer de

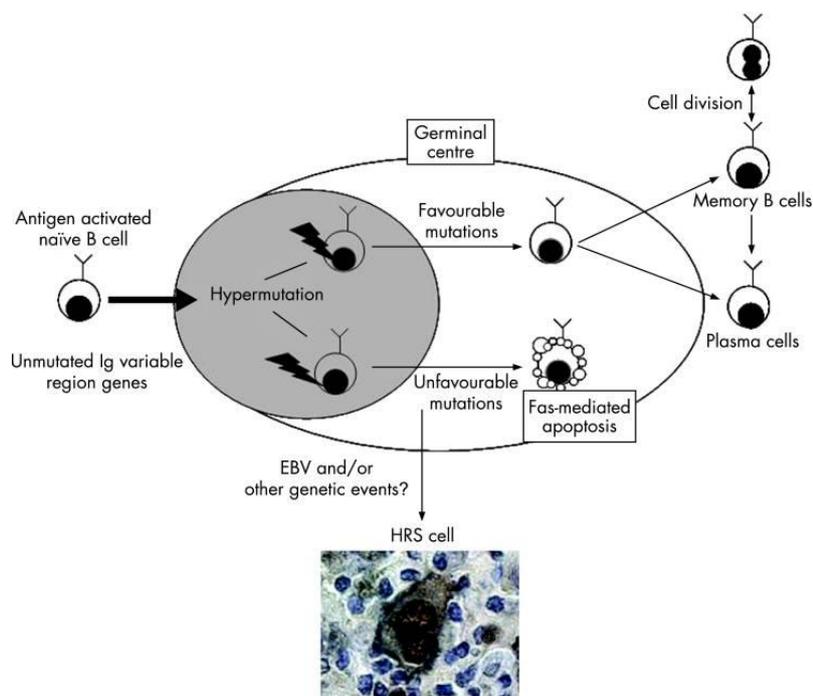
radiothérapie dans les formes de bon pronostic répondant rapidement au traitement et si on peut limiter la toxicité gonadique de la chimiothérapie en en modifiant le schéma thérapeutique (cf *infra*).

Les facteurs pronostiques péjoratifs sont le stade avancé, le sexe masculin, l'âge de plus de 45 ans, un gros volume tumoral, la présence de signes généraux ou de signes inflammatoires biologiques (Josting *et al.* 2000). Le caractère inflammatoire est pris en compte par la vitesse de sédimentation (VS). L'anémie et la lymphopénie sont aussi des facteurs pronostiques défavorables (Hasenclever D et Diehl V, 1998). Des facteurs pronostiques histologiques ont aussi été identifiés : La présence de l'EBV *in situ* est un facteur péjoratif uniquement chez le sujet de plus de 50 ans (Diepstra, 2009). Le nombre de macrophages dans l'environnement tumoral a aussi un impact pronostique (Steidl, 2010), et pourrait être très corrélé avec la présence de l'EBV *in situ* (Azumbuja, 2012, Barros, 2012).

## **5. Physiopathologie**

### **5.1 Origine des cellules HRS**

Les cellules tumorales ne représentent le plus souvent que 1% de la masse tumorale et elles n'expriment pas de marqueur typique d'une origine lymphoïde B ou T ce qui rendait difficile l'identification de leur origine. La mise en évidence, par des techniques de biologie moléculaire, que les cellules tumorales portent des réarrangements des gènes des immunoglobulines et des mutations somatiques traduit le fait que ces cellules proviennent des centres germinatifs du ganglion (Delabie *et al.*, 1994, Kuppers *et al.*, 1998a et b). Toutefois, ces gènes n'aboutissent pas à l'expression de chaînes d'immunoglobulines. Dans la majorité des cas, cette absence de synthèse résulte d'une répression des facteurs de transcription de la lignée B (Oct-2, Bob-1, Pu-1) (Schmitz, 2009). Cependant, dans 25% des cas environ, l'absence d'expression des gènes d'immunoglobulines est due à l'existence de mutations somatiques non fonctionnelles dans les chaînes lourdes (« crippling » mutations) (Kanzler, Kuppers *et al.* 1996). Ces mutations somatiques sont abortives, ce qui aurait dû conduire à l'élimination par apoptose de ces cellules (Kuppers R, 2009). L'infection par l'EBV peut intervenir dans la survie anormale de ces cellules (Figure 5).

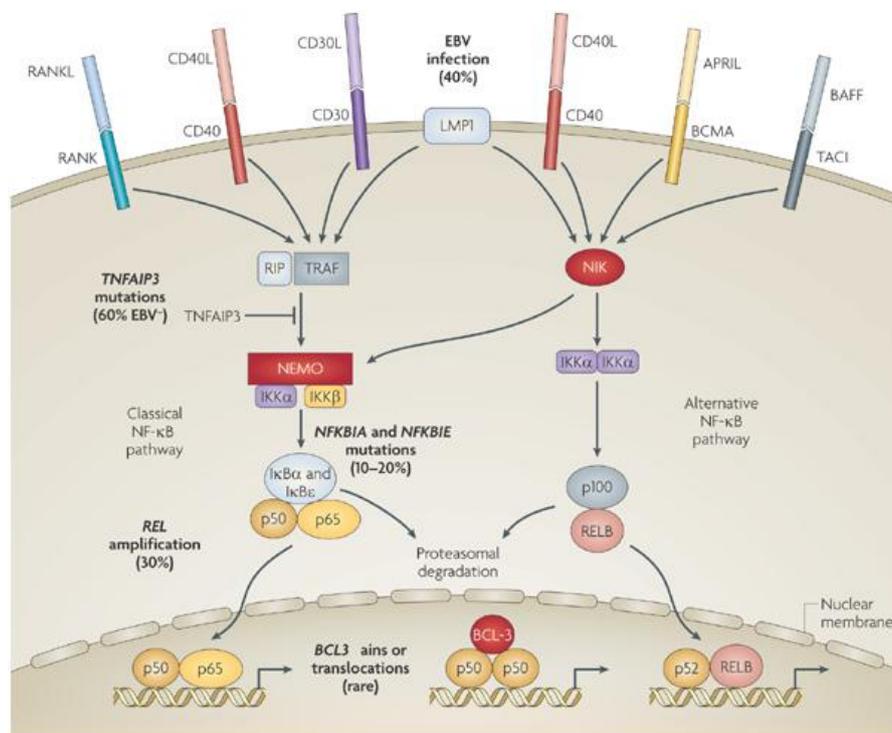


**Figure 5 :** Les cellules de Reed-Sternberg proviennent de cellules pré-apoptotiques du centre germinatif. Elles portent des mutations somatiques des gènes des immunoglobulines. Quand celles-ci sont défavorables, elles sont éliminées par apoptose Fas-médiée. L'EBV peut contribuer à leur survie. Kapatai G, J Clin Pathol. 2007.

## 5.2. Voies de signalisation impliquées dans la survie des cellules tumorales (Figure 6)

Plusieurs voies de signalisation cellulaires sont dérégulées dans les cellules RS (Schmitz, 2009). Un des mécanismes majeurs dans la pathogénicité de ces cellules est l'activation de la voie NF- $\kappa$ B à la fois par la voie classique, dite canonique, et par la voie alternative, dite non-canonique. NF- $\kappa$ B, est un facteur de transcription impliqué notamment dans la synthèse de cytokines prolifératives (IL-6, IL-13) et de facteurs anti-apoptotiques (bcl-xL). La voie NF- $\kappa$ B est activée habituellement par des cytokines ou la présence d'organismes pathogènes. Ces facteurs pro-inflammatoires en stimulant la voie NF- $\kappa$ B, entraînent la prolifération et la survie des cellules HRS en augmentant l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire cycline D2, et les protéines anti-apoptotiques comme A1, TRAF1 (*TNF receptor activating factor*), bcl-xL (Hinz *et al.*, 2001). Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B interviennent dans de nombreux processus physiologiques tels que la réponse immune adaptative ou innée, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et l'inflammation. D'autres voies et facteurs de transcription sont dérégulés dans les cellules HRS : PI3K-Akt, ERK, AP1, et d'autres récepteurs tyrosines kinases. Toutes ces voies de signalisation interagissent et coopèrent dans la pathogenèse du LH (Kuppers, 2009) et sont susceptibles d'être perturbées par l'EBV (cf plus loin). Enfin, des mutations ou des amplifications des gènes contrôlant l'apoptose et régulant la croissance et la prolifération cellulaire sont fréquemment

retrouvées. Elles impliquent principalement les deux voies de signalisation JAK-STAT et NF- $\kappa$ B. Ainsi, ont été mises en évidence des mutations faux sens du gène  $I\kappa$ B $\alpha$ , inhibiteur de NF- $\kappa$ B, ou des amplifications de REL. Plus récemment de fréquentes mutations ou délétions de TNFAIP3 codant pour A20, inhibiteur de NF- $\kappa$ B, ont été identifiées parmi les cas non associés à l'EBV (Kuppers 2009).



**Figure 6 : Les cellules HR ont une activation constitutive de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B via : 1) l'activation de récepteurs stimulant les TRAFs (tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factors), 2) la modification d'expression de gènes régulant NF- $\kappa$ B : mutations ou délétions d'inhibiteurs A20 (ou TNF $\alpha$ -induced protein 3 (TNFAIP3)). et IKBA) ou amplification de REL, 3) | signalisation par LMP-1 ((EBV)-encoded latent membrane protein 1 (LMP1)) active aussi cette voie. (Kuppers 2009).**

### 5.3. Rôle des cytokines dans le développement du LH

Les cytokines sont un groupe de protéines sécrétées, produites et régulées par les cellules immunitaires. Leur activité biologique est pléiotrope et redondante, c'est-à-dire que chaque cytokine a plusieurs cibles et que plusieurs cytokines peuvent induire la même réponse cellulaire. Leur expression et effet varient en fonction du type cellulaire, de l'environnement cellulaire et de la concentration des autres cytokines. Les cytokines et chémokines sont les effecteurs de la réaction inflammatoire. Elles attirent les leucocytes sur le site des blessures cellulaires, activent les cellules, leur permettent de proliférer et de finaliser les réparations tissulaires. Les cellules HRS sécrètent de nombreuses cytokines afin d'influencer leur environnement et de participer au processus du développement tumoral (survie, prolifération, angiogenèse, métastase, évaison

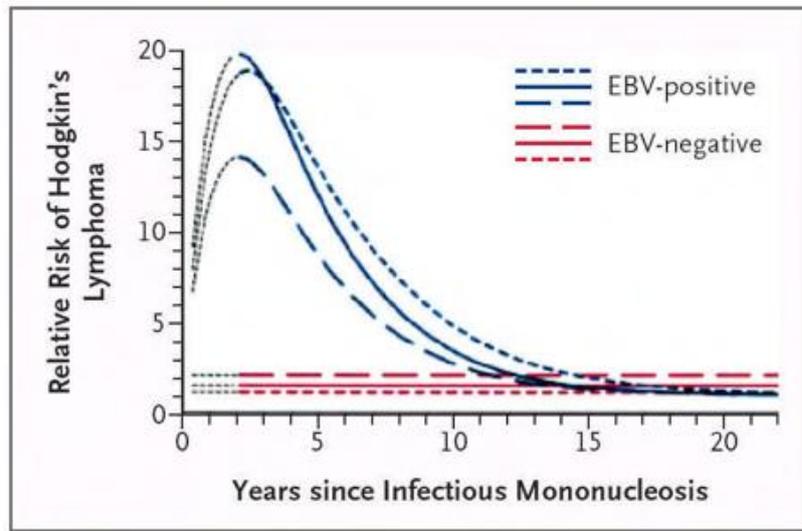
immune). Le mécanisme de régulation principal de la sécrétion des cytokines est la voie NF- $\kappa$ B, (Pikarsky *et al.*, 2004).

Toutes les cellules du microenvironnement tumoral sont activement attirées par les cellules HRS. Ces dernières sécrètent des chémokines RANTES/CCL5, CCL17 (ou TARC) et CCL22 afin d'attirer les lymphocytes T helpers et T régulateurs. La sécrétion d'IL-5, CCL-5 et CCL28 attire les éosinophiles dans le microenvironnement tumoral tandis que les mastocytes sont attirés uniquement par RANTES/CCL5 et les neutrophiles par l'IL-8. RANTES/CCL5 a également un effet direct sur la survie et la prolifération des cellules HRS (Aldinucci *et al.*, 2008). L'IL-6 et IL-7 permettent la prolifération des lymphocytes B et T respectivement. Avec la présence de récepteurs de l'IL-6 sur les cellules HRS, IL-6 peut également servir de facteur de croissance autocrine. Les cellules HRS expriment également l'IL-13 et son récepteur. IL-13 agit probablement comme un facteur de croissance autocrine, cela est confirmé par le fait que des anticorps neutralisants l'IL-13 inhibent la prolifération cellulaire des cellules HRS (Kapp *et al.*, 1999). L'IL-10 est exprimée dans 16% des cas de LH, et en bien plus forte proportion dans le cas des LH associés à l'EBV (66%) (Herbst *et al.*, 1996). IL-10 inhibe certaines cytokines de la différenciation en TH1, notamment IL-2. L'IFN- $\gamma$  est détecté par immunohistochimie dans environ 50% des cas de LH, aussi bien dans les cellules HRS que dans les cellules environnantes. Il stimule les monocytes et macrophages pour qu'ils phagocytent les micro-organismes étrangers. L'IFN- $\gamma$  promeut également la production de certains facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  est produit par les lymphocytes T, les cellules HRS et les éosinophiles. C'est une cytokine anti-inflammatoire bloquant la régulation de l'IL-2R et inhibant la prolifération des lymphocytes T. Il inhibe également l'activité des NK, et lymphocytes B pour augmenter l'immunosuppression. TGF- $\beta$  induit la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène, expliquant la présence de fibrose observée régulièrement dans le sous-type scléro-nodulaire des LH.

## **6-Facteurs de risques de LH, infection EBV**

De nombreux arguments épidémiologiques sont en faveur d'une hétérogénéité étiologique des LH en fonction de l'âge et du terrain. L'incidence du LH du sujet jeune est corrélée avec des facteurs socio-économiques suggérant une exposition tardive aux agents infectieux de l'enfance (Hjalgrim, 2008). Dans les pays en développement, l'apparition récente d'un pic d'incidence chez l'adulte jeune semble aussi correspondre à une amélioration des conditions socio-économiques et à une exposition plus tardive aux agents infectieux dont l'EBV. De nombreuses études ont montré une augmentation du risque de LH dans les années suivant une mononucléose infectieuse (MNI), forme clinique symptomatique de primo-infection EBV. Il faut noter cependant que ce risque

paraît limité aux LH-EBV+, qui sont pourtant les formes les moins fréquentes de l'adulte jeune (Hjalgrim, Askling *et al.* 2003, Figure 7).



**Figure 7 : Risque relatif post- MNI de lymphome hodgkinien (Hjalgrim *et al.*, 2003).**

**Légende :** Les traits pleins représentent les risques relatifs de LH EBV+ (bleu) et EBV- (rouge), sous l'hypothèse que les données manquantes sur le statut EBV étaient non informatives. Les pointillés courts représentent les risques relatifs de LH EBV+ et EBV- sous l'hypothèse que les tumeurs dont le statut EBV est inconnu, sont EBV+. Les pointillés longs représentent les risques relatifs de LH EBV+ et EBV- sous l'hypothèse que les tumeurs dont le statut EBV est inconnu sont EBV-. Les analyses sont restreintes à la période de 2 ans et plus après la MNI.

Par ailleurs, les patients atteints de LH ont au diagnostic comme dans les années précédant, des titres d'anticorps anti-EBV (IgG anti-Viral Capsid Antigen (VCA)) plus élevés que des témoins (Mueller, Evans *et al.* 1989). Enfin, dans les années précédant la maladie, la charge virale EBV serait plus importante dans les formes EBV+ que dans les formes EBV- ou chez les sujets sains (Gandhi, Tellam *et al.* 2004). C Besson a montré une corrélation entre charge virale EBV et IgG anti-VCA (Besson, 2006) ce qui suggère que ces marqueurs pourraient refléter un moins bon contrôle immunitaire de l'EBV. D'autre part, elle a montré des corrélations intrafamiliales significatives de ces titres d'anticorps ce qui est en faveur d'un contrôle génétique de ces titres (Besson, 2009).

Des études génétiques ont ainsi montré ces dernières années que les risques de LH-EBV+ étaient respectivement augmentés et diminués chez les sujets porteurs des allèles HLA-A\*01 et HLA-A\*02 (Niens, 2007). Ces résultats ont été confirmés par une étude récente sur génome entier menée sur 1200 patients dont 28% ayant un LH-EBV+ (Urayama, 2012). Cette étude a mis en évidence que des locus HLA dont HLA-A étaient fortement associés à la survenue de LH. Une

autre étude a montré une association entre d'autres sous-types HLA et le LH, HLA-B5 étant significativement augmenté et HLA-DR7 significativement diminué dans la population de patients cHL comparé à la population de contrôle sains (Huang *et al.*, 2012). Dans le cas des patients développant un LH EBV, une augmentation spécifique des HLA-DR2 et HLA-DR5, HLA-A1, HLA-B37 et HLA-DR10 est mise en évidence. Chez les patients développant un LH EBV- a été observée une augmentation significative des HLA-A2, HLA-B7 et HLA-DR2 par rapport à la population contrôle. Cette étude a permis de détecter de nouveaux gènes HLA classe I et II protecteurs ou prédisposants pour le développement d'un lymphome de Hodgkin, en prenant en compte l'association éventuelle à EBV (Huang *et al.*, 2012). De façon intéressante, les allèles HLA-A\*01 et \*02 ont été retrouvés associés au risque de survenue de MNI (Hjalgrim, 2010). Ceci suggère que le contrôle immunitaire de l'EBV par les lymphocytes T cytotoxiques est un déterminant du risque de LH-EBV+.

Enfin, des travaux récents ont mis en évidence un lien entre l'évolution du LH et celle de la charge virale EBV : une étude a montré qu'une bonne réponse au traitement du LH était associée à une baisse significative de la charge virale EBV. Dans cette même étude, un patient a eu une ré-augmentation de sa charge virale EBV juste avant une rechute. Ainsi, les auteurs suggèrent que la mesure de la charge virale EBV pourrait avoir un intérêt dans le suivi et le pronostic des patients LH+EBV+ (Spacek *et al.*, 2011). Par ailleurs, la présence d'ADN viral dans le plasma au moment du diagnostic de LH ou six mois plus tard, est corrélée à une moindre survie sans rechute (Kanakry *et al.*, 2013).

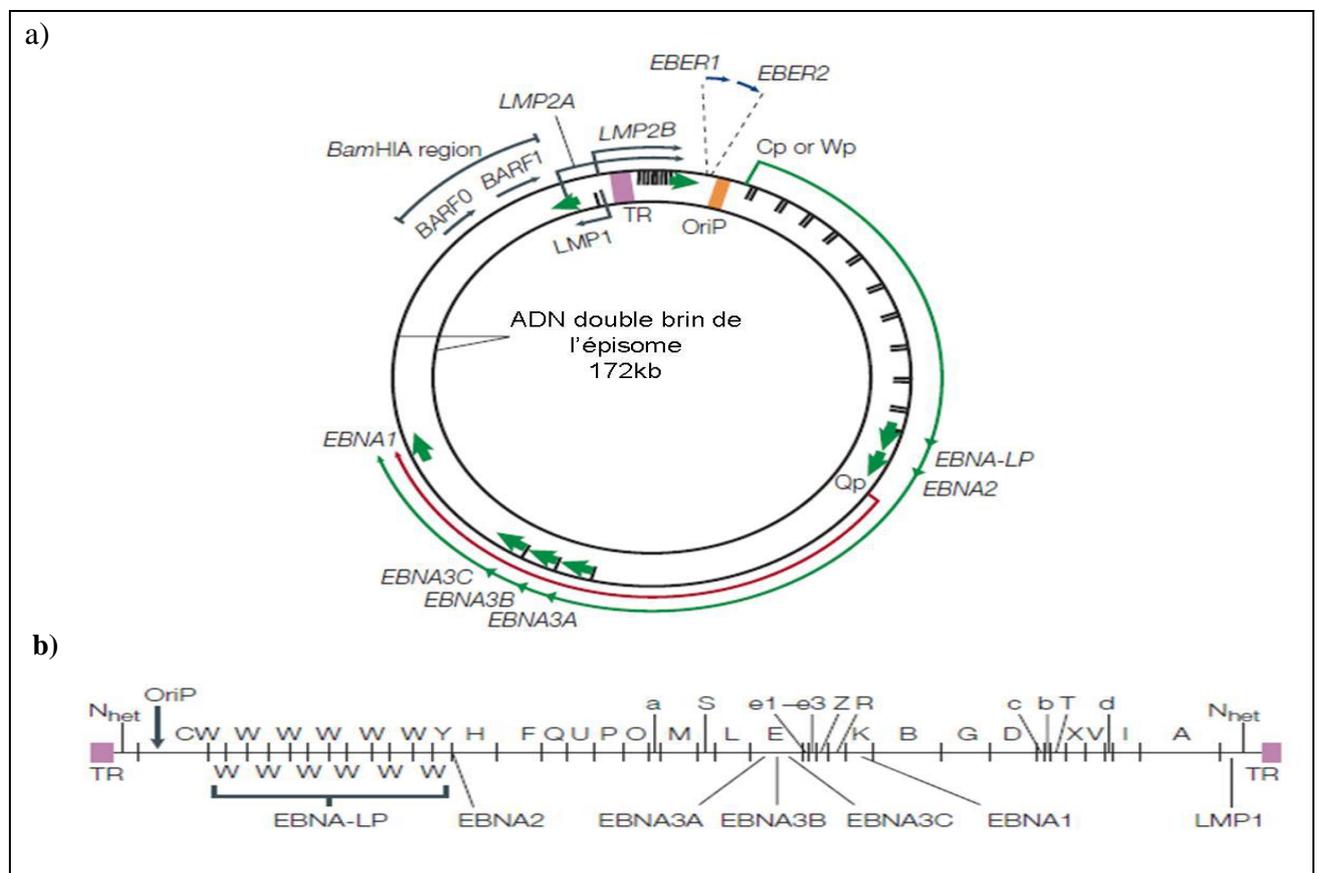
## **B- Le virus Epstein Barr et son contrôle immunitaire**

### **1-Généralités**

Plus de 90% de la population mondiale a rencontré l'EBV. La primo-infection a lieu, le plus souvent, au cours de l'enfance ou de l'adolescence et est généralement asymptomatique. Cependant dans certains cas, elle peut être associée à une mononucléose infectieuse (MNI) caractérisée par un ensemble de signes cliniques (Cohen, 2000). Une fois que le virus est acquis, il persiste tout au long de la vie d'un individu, à l'état latent dans des lymphocytes B (Young, Rickinson 2004). Il peut, au cours de l'infection latente, se réactiver sous forme de particules virales excrétées au niveau de l'oropharynx et dans la salive. Par ailleurs, le virus est impliqué dans la pathogénie de plusieurs cancers comme le lymphome de Burkitt dans lequel il a été découvert, le carcinome du nasopharynx ou le LH.

## 2-Classification et structure

Le virus Epstein-Barr (EBV) a été découvert en 1964, par microscopie électronique dans des lymphomes de Burkitt par Epstein, Achong et Barr (Epstein *et al*, 1964). Il s'agit d'un Herpès virus Humain appartenant à la famille des *Herpesviridae*, sous famille des *Gammapherpesvirinae*. C'est un virus enveloppé qui possède un ADN double brin linéaire de 172 kpb protégé par une nucléocapside icosaédrique (20 faces). Son ADN est linéaire dans la particule virale mais est sous forme épisomique (circulaire) dans la cellule infectée. Il est divisé en plusieurs domaines uniques, séparés par des répétitions internes (IR pour Internal Repeats) (IR1-IR4), la séquence IR1 de 3000 pb divise le génome en un domaine unique long (UL pour Unique Long) et un domaine unique court (US pour Unique Short). Chaque extrémité comporte des répétitions terminales (TR pour Terminal Repeats) de 538 pb, qui permettent la circularisation du génome (figure 8). Il contient 70 cadres ouverts de lecture Orf (*open reading frame*) permettant la transcription de gènes d'un grand nombre (100 à 150) de protéines. La combinaison de l'expression de ces protéines permet au virus d'établir différentes formes d'infections (Callan, 2004).



**Figure 8 : Structure du génome viral d'EBV linéaire et circulaire.** (a) Diagramme représentant la localisation et la transcription des gènes de latence d'EBV sur l'épisome viral à ADN double brin. OriP : origine de réplication plasmidique utilisée lors de la latence ; TR : terminal repeat, séquences d'ADN répétitives permettant la circularisation de l'ADN viral ; Cp Wp Qp : promoteurs situés respectivement dans les fragments BamHI C, W et Q. (b) Localisation des cadres de lecture (ORF open reading frame) des protéines de latence d'EBV. Les fragments BamHI sont nommés en fonction de leur taille, A étant le plus grand. (D'après Young and Rickinson, 2004).

Il existe 4 types de latence (Rickinson *et al.* 2001) définis en fonction de l'expression de protéines de latence. Ils correspondent à des contextes cliniques et des pathologies différentes (Tableau 1).

**Tableau 1 : Expression des protéines de latence selon le type de latence et pathologies associées**

Protéines de latence	EBNA-1	EBNA-2	EBNA-3	LMP-1	LMP-2	EBER	Maladies
Latence 0	-	-	-	-	+	+	Porteur sain
Latence I	+	-	-	-	-	+	Lymphome de Burkitt
Latence II	+	-	-	+	+/-	+	Lymphome de Hodgkin, Carcinome nasopharyngé
Latence III	+	+	+	+	+	+	Lymphome de l'immunodéprimé

Les protéines de latence possèdent des fonctions précises permettant la transformation et l'immortalisation de la cellule infectée, elles sont définies dans le tableau suivant (Tableau 2).

**Tableau 2: Les protéines de latence et leurs principales fonctions**

Protéines	Latence	Localisation	Fonctions principales
EBNA-1	I, II, III	Nucléaire	Immortalisation des lymphocytes B Maintien du génome viral sous forme épisomale
EBNA-2	III		Immortalisation des lymphocytes B Activateur de transcription cellulaire et virale en se fixant à RBP-J $\kappa$
EBNA-3A (EBNA-3)	III		Répresseur de l'action d'EBNA-2, se lie à RBP-J $\kappa$ , participe à l'immortalisation des lymphocytes B
EBNA-3B (EBNA-4)	III		Inconnue, se lie à RBPJ $\kappa$
EBNA-3C (EBNA-6)	III		Répresseur de l'action d'EBNA2, agit sur le cycle cellulaire, se lie à RBP-J $\kappa$ , participe à l'immortalisation des lymphocytes B
EBNA-LP (EBNA-5)	III		Cofacteur d'EBNA-2 Interagit avec p53 et pRb
LMP-1	II, III	Membranaire	Oncogène majeur Active les voies NF- $\kappa$ B
LMP-2A	II, III		Module le signal du BCR Prévient la réactivation virale
LMP-2B	II, III		Inconnue

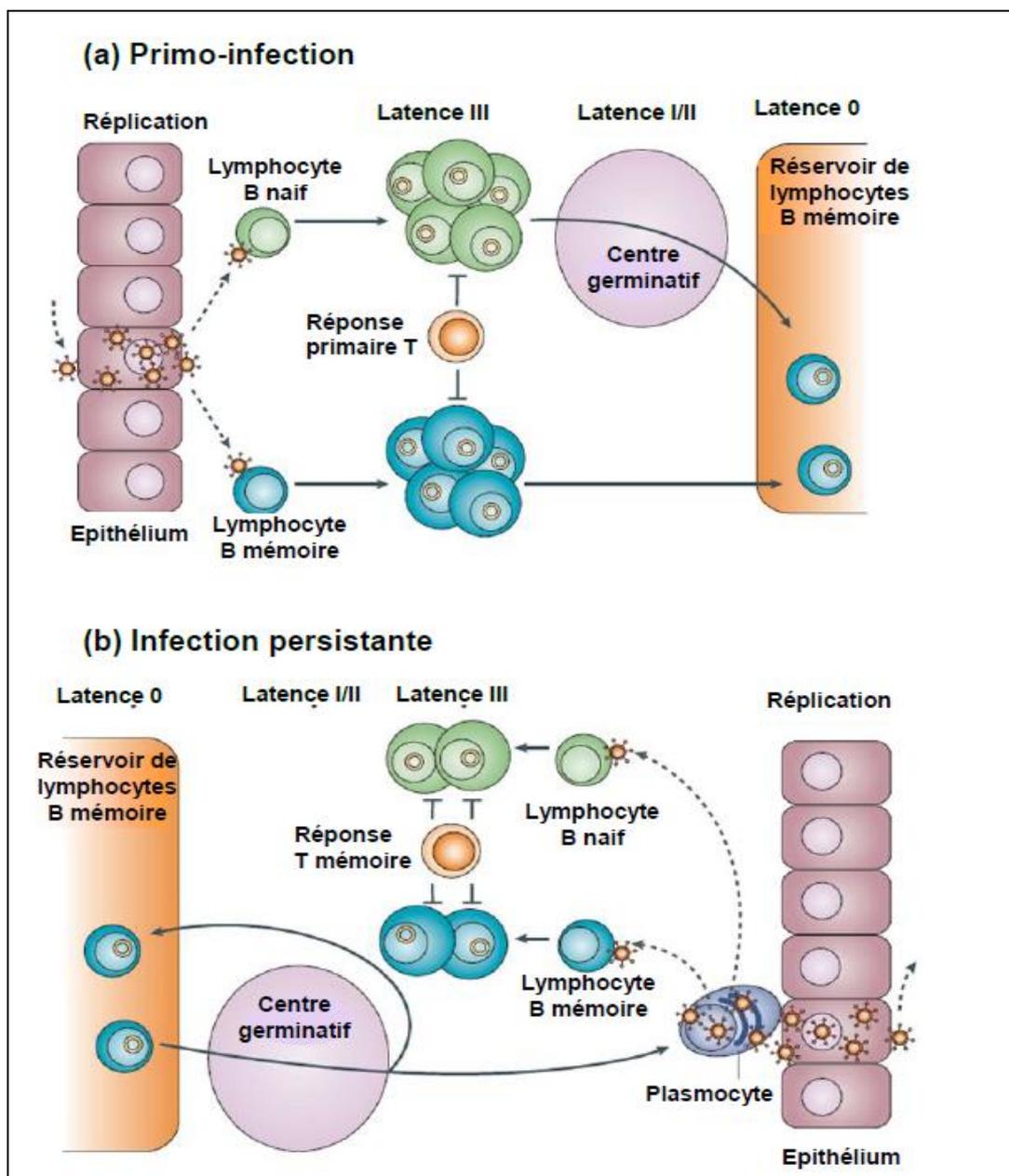
### 3-Réplication productive et cycle lytique

Le cycle de multiplication de l'EBV dans la cellule suit le schéma classique qui comporte les étapes d'attachement et de pénétration, puis la synthèse des macromolécules (acides nucléiques et protéines), enfin l'assemblage des nucléocapsides, l'enveloppement et la libération des virions infectieux. Toutes ces étapes ont pu être étudiées *in vitro* dans des cultures dérivées de lymphocytes B. La particule virale s'attache spécifiquement à la surface de la cellule grâce à l'interaction entre la gp350/220 de l'enveloppe virale et la molécule CD21 présente sur la membrane plasmique cellulaire. Ce récepteur CD21 (ou CR2), un récepteur physiologique du complément, fait partie de la superfamille des immunoglobulines et est exprimé sur les lymphocytes B matures. La fixation du virus sur CD21 induit les signaux initiaux d'activation des cellules. Une fois attachée, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire et la pénétration requiert l'interaction du complexe gp85-gp42. L'EBV peut utiliser comme corécepteurs les molécules HLA-DR, -DP ou -DQ (Haan *et al.* 2000). La nucléocapside, libérée dans le cytoplasme, migre en direction des pores nucléaires et se désintègre progressivement pour laisser la molécule d'ADN viral seule entrer dans le noyau.

Les synthèses aboutissant ensuite à la fabrication de nouveaux virions ne se produisent que dans un petit nombre de lymphocytes B. Les gènes « très précoces » du génome viral sont transcrits, notamment les facteurs de transcription nucléaires (BZLF1 ou ZEBRA - et BRLF1), ce qui conduit à l'activation de l'expression des gènes précoces. Les produits de ces derniers, comme l'ADN-polymérase virale et d'autres enzymes responsables de la synthèse de l'ADN, répliquent l'ADN à partir de l'origine de réplication « lytique » (ou Ori-Lyt). C'est à partir de ces nouvelles molécules linéaires de génome EBV que les gènes tardifs sont transcrits : les protéines synthétisées sont celles de la capsid et des glycoprotéines de l'enveloppe. La molécule de génome est incorporée à l'intérieur d'une capsid presque terminée pour constituer la nucléocapsid. Cet assemblage a lieu dans le noyau cellulaire et nécessite une protéase codée par le virus. Les nucléocapsides rencontrent, au cours de leur migration en direction de la surface de la cellule, les membranes nucléaires et/ou intracytoplasmiques dans lesquelles elles bourgeonnent. L'acquisition définitive de l'enveloppe précède la libération du virion dans le milieu extracellulaire et la lyse de la cellule.

L'EBV est principalement transmis par la salive (Gerber *et al.* 1972) et va infecter les cellules épithéliales de l'oropharynx et des glandes salivaires. De rares cas de transmission de l'EBV par transfusion sanguine ont été rapportés (Henle *et al.* 1985, Tattevin *et al.* 2002). La transmission de l'EBV lors des greffes d'organes ou de moelle osseuse n'est pas rare chez les enfants EBV-séronégatifs. Le virus réalise d'abord un cycle répliatif avec une libération de virions infectieux.

Ce cycle se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, les gènes « très précoces » du génome sont transcrits, notamment les facteurs de transcriptions nucléaires nommés BZLF1 (ou ZEBRA pour *Z Epstein-Barr replication activators*) et BRLF1. Ceux-ci vont alors activer l'expression des gènes précoces, dont les produits participent, entre autres, au métabolisme de l'ADN viral (thymidine kinase, ADN polymérase). Ils vont également permettre la réplication du génome viral et vont induire l'expression des gènes tardifs codants pour les protéines de structure des virions telles que les antigènes de capsid virale (VCA) et les antigènes membranaires. L'EBV infecte les lymphocytes B après avoir infecté les cellules épithéliales de l'oropharynx. Les lymphocytes B infectés subissent une expansion clonale réprimée par une réponse T cytotoxique. Le virus va alors préférentiellement établir une infection latente caractérisée par l'expression des protéines de latence par les lymphocytes B infectés. (Figure 9).



**Figure 9 :** Cycle de vie du virus d'Epstein-Barr et ses interactions avec les cellules hôtes : *Infection des cellules épithéliales et des lymphocytes B par l'EBV* (d'après Young and Rickinson, 2004) (1) Primo-infection : le virus transmis par la salive infecte un lymphocyte B naïf ou mémoire du tissu lymphoépithélial oropharyngé soit directement, soit après passage à travers une cellule épithéliale (transcytose). Le virus établit une infection latente dans le lymphocyte B qui se transforme en lymphoblaste proliférant (latence III). La prolifération de ces cellules est contrôlée par la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8+, seuls quelques lymphoblastes échappent à la réponse immunitaire et vont constituer un réservoir de cellules B mémoires dans lesquelles l'expression d'antigènes viraux est réduite au minimum (latence 0), sauf lors d'une division cellulaire physiologique (latence I). Cela constitue le site de persistance du virus EBV. (2) Persistance de l'infection : lors d'une stimulation antigénique, une cellule B mémoire se différencie en plasmocyte, provoquant la réactivation du virus et l'initiation du cycle lytique. Les virions produits peuvent infecter des lymphocytes B naïfs ou mémoires ou les cellules épithéliales de l'oropharynx, où l'infection lytique est entretenue et amplifiée avec excrétion de virus dans la salive. La réponse immune de l'hôte (en particulier les lymphocytes T CD8+), permet de contrôler l'infection à presque tous les stades hormis lors de la phase de latence 0.

L'EBV possède un haut pouvoir transformant sur les lymphocytes B et il est capable d'induire leur prolifération continue. (Figure 10). Ainsi, *in vitro*, l'infection *in vitro* des lymphocytes B par le virus transforme ces cellules en lignée cellulaire lymphoblastoïde (LCL). Seuls quelques gènes sont exprimés, aboutissant à la production de six protéines nucléaires « EBV nuclear antigen » (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C et EBNA-LP « leader protein »), de trois protéines membranaires « latent membrane protein » (LMP-1, LMP-2A et LMP-2B) et de deux ARN non traduits « EBV encoded small RNA » (EBER1 et EBER2). Ce type de latence, correspond à la latence de type III (Young et Rickinson, 2004). Par contre *in vivo*, la réponse T anti-EBV permet le contrôle de l'infection.

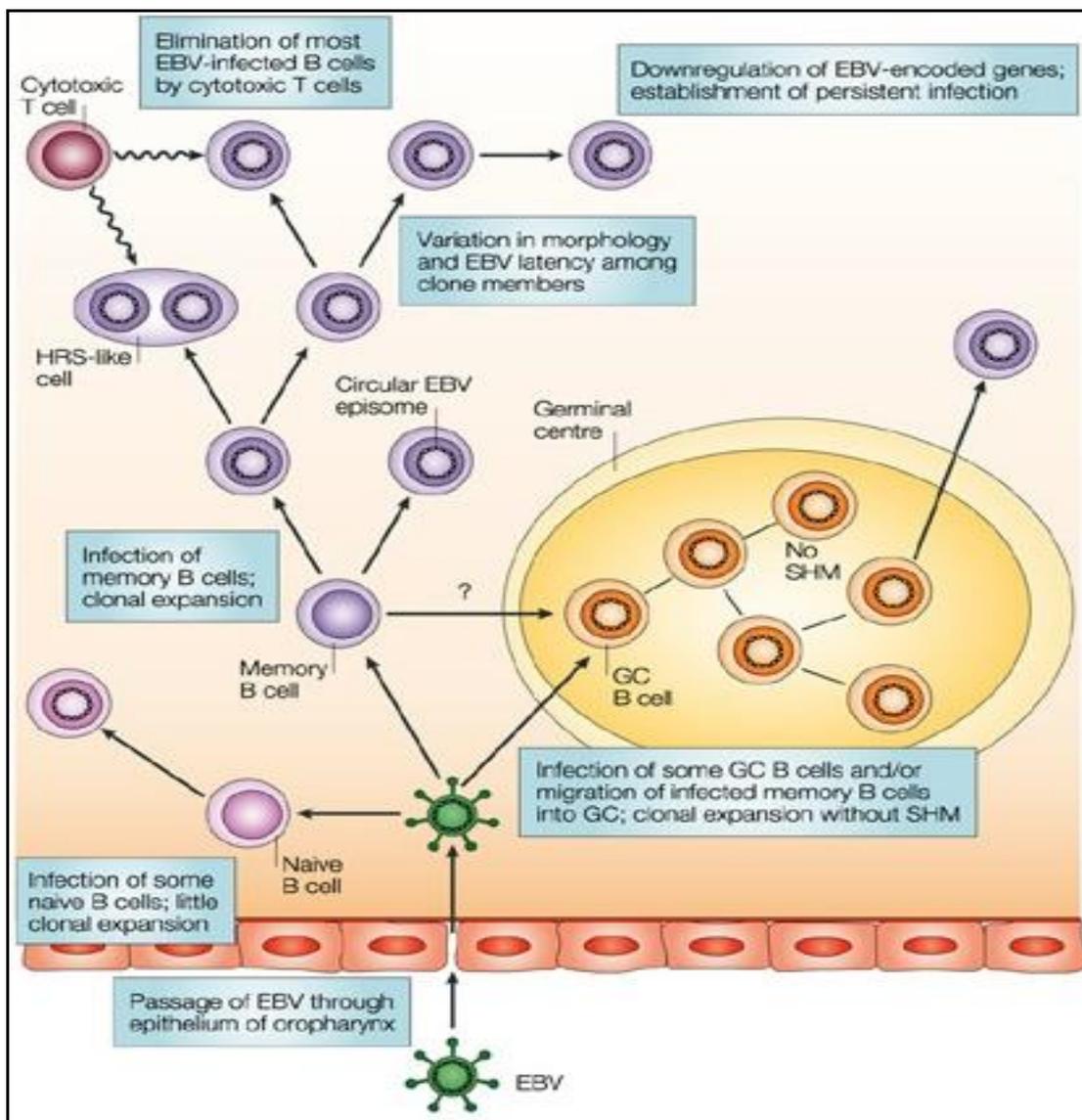


Figure 10 : Cycle de l'infection EBV *in vivo* (Küppers R.2003)

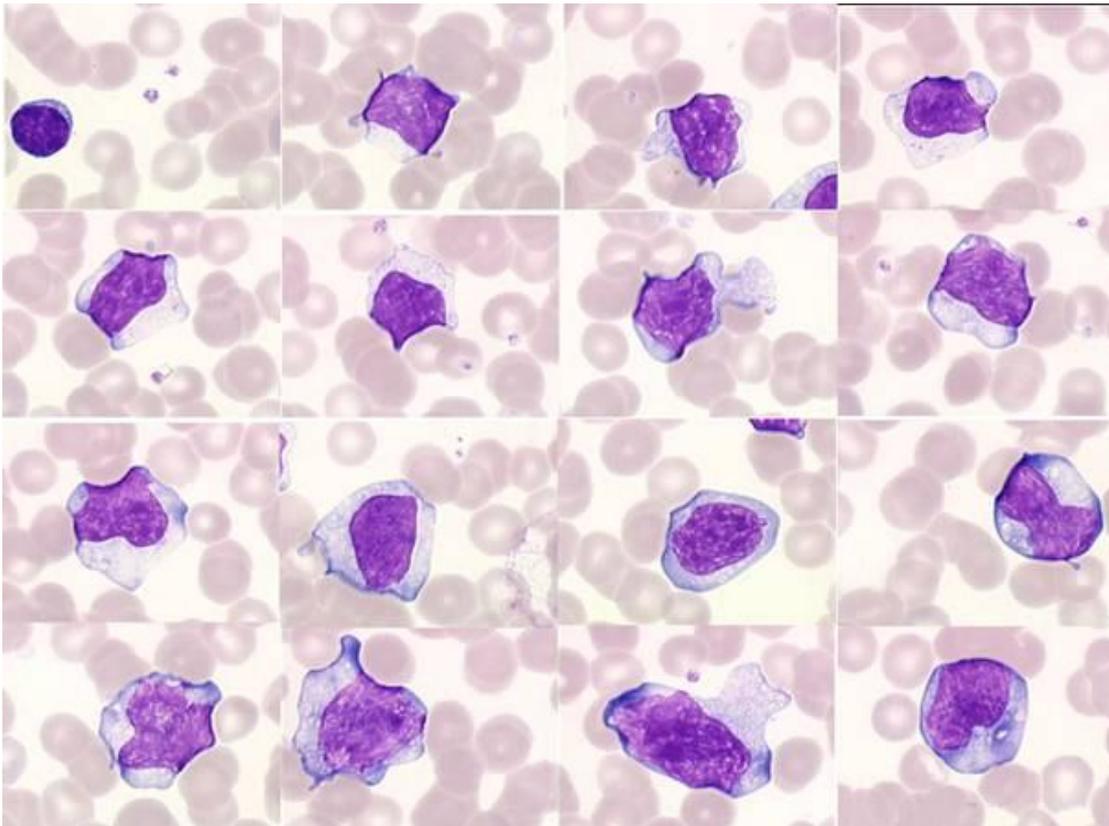
#### **4-La primo-infection EBV : Mononucléose infectieuse (MNI)**

La primo-infection à EBV survient très souvent dans la petite enfance. Les enfants de moins de 5 ans montrent une sérologie positive à l'EBV dans 50% des cas dans les pays occidentaux, et dans 100% des cas dans les pays en voie de développement. A cet âge, l'infection par l'EBV est généralement asymptomatique ou peut se révéler sous la forme d'une pharyngite discrète. Lorsque la primo-infection survient plus tard, lors de l'adolescence ou chez les jeunes adultes, elle est symptomatique dans environ 50% des cas et se manifeste par une MNI.

Après une période d'incubation de 4 à 8 semaines, la MNI se présente sous forme de : fièvre, angine ou rhinopharyngite, polyadénopathies, et asthénie prolongée (Rea *et al.* 2001). Le lien entre MNI et EBV a été établi dans les années 60. Les chercheurs Werner et Gertrude Henle travaillant sur l'EBV, montrèrent, grâce aux techniques sérologiques d'immunofluorescence et de fixation du complément, que les anticorps dirigés contre l'EBV étaient non seulement détectables chez les africains atteints de lymphome de Burkitt mais aussi dans 85 % de la population adulte des Etats-Unis. En 1968, un technicien de leur laboratoire, séronégatif pour l'EBV, développa une MNI ; son sérum prélevé après la maladie était devenu positif. L'EBV fut définitivement reconnu comme l'agent étiologique de la MNI, à la suite d'études séro-épidémiologiques rétrospectives menées chez les étudiants d'universités américaines. Il est bien établi que la transmission de l'EBV se fait principalement par voie salivaire. Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence les facteurs impliqués dans la survenue ou non d'une MNI, au cours d'une primo-infection EBV. L'étude épidémiologique de Borer *et al.* (Borer *et al.* 1999) a montré une corrélation positive entre le niveau socio-économique élevé et la survenue de la MNI ; les auteurs expliquent cette tendance par l'amélioration des conditions d'hygiène, qui entraîne une exposition plus tardive au virus.

Biologiquement, la MNI se caractérise par la présence dans le sang d'une hyperleucocytose constituée majoritairement de lymphocytes « atypiques » ou à cytoplasme hyperbasophile (Figure 11). Cette hyperlymphocytose témoigne de la présence d'une réponse immune cellulaire importante, qui joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection à l'EBV. Au moment de l'apparition des symptômes de la MNI, l'immunophénotypage de la population lymphocytaire sanguine montre majoritairement des cellules T cytotoxiques CD8+ atypiques de grande taille ; les cellules T CD4+ et les cellules NK activées sont moins nombreuses. Dans 10% des cas, les patients développeront une splénomégalie ou une hépatomégalie, et de manière exceptionnelle des complications pourront apparaître, telles qu'une anémie hémolytique, une myocardite ou des complications neurologiques. Toutes ces manifestations cliniques ne sont pas dues à l'infection par le virus elle-même, mais résultent d'une réaction immunitaire exagérée causant une lymphoprolifération des cellules T CD8+ contre les antigènes viraux (Hislop *et al.*, 2007). Les

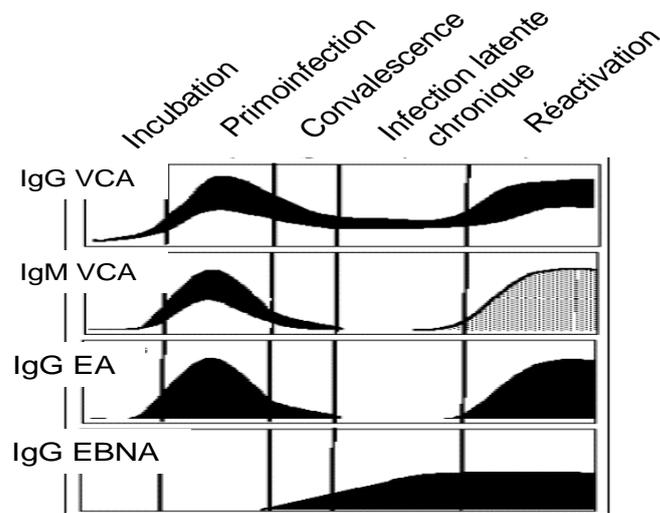
symptômes régressent habituellement en quelques semaines, sauf l'asthénie qui peut persister plusieurs mois à une année.



**Figure 11** : Aspect cytologique de lymphocytes « atypiques » hyperbasophiles évocateurs d'un syndrome mononucléosique comparés à un lymphocyte normal non stimulé (premier en haut à gauche). On note un cytoplasme étendu et irrégulier, basophile avec un renforcement de la basophilie périphérique. Le noyau est irrégulier à chromatine fine et parfois nucléolée. Il faut souligner l'importance du polymorphisme cellulaire sur le frottis sanguin contrairement au monomorphisme observé dans les hémopathies malignes.

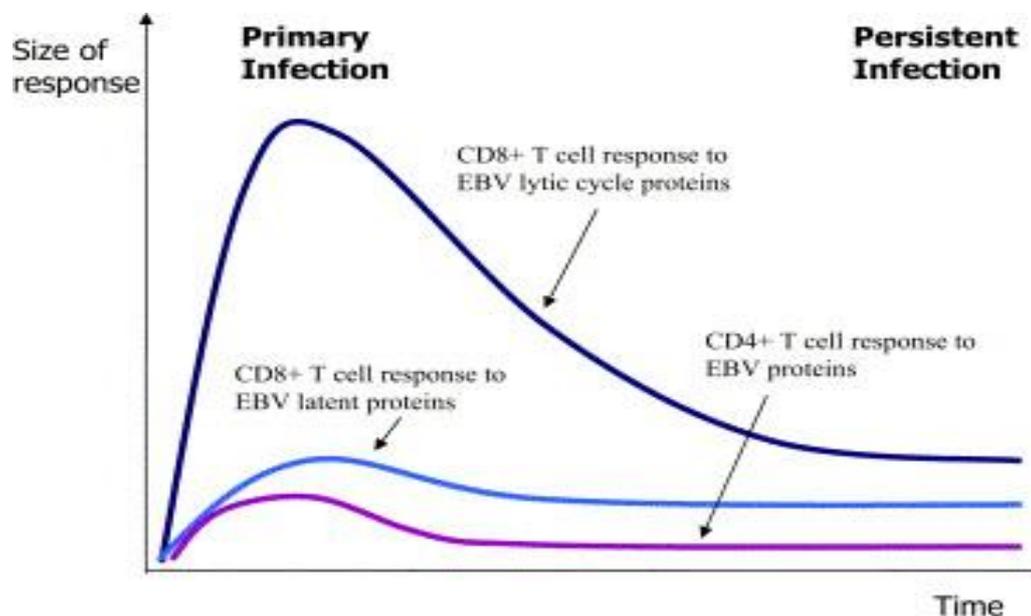
### 5-La réponse immunitaire contre l'EBV

Lors de l'infection par l'EBV, l'organisme hôte va développer une réponse humorale ainsi qu'une réponse cellulaire. La réponse humorale correspond à des anticorps dirigés contre plusieurs protéines virales latentes ou du cycle répliatif. Il y a tout d'abord l'apparition d'anticorps anti-VCA (« *Viral Capsid Antigen* ») IgM et IgG, puis les anticorps contre les antigènes précoces du cycle lytique, c'est à dire anti-EA (« *Early antigen* ») et anti-ZEBRA (« *BamH1 EBV replication activator* »), ceux-ci sont transitoires, et enfin des IgG antinucléaires dirigés contre les protéines de latence EBNA apparaissent plus tardivement (Callan, 2004). Seuls les anticorps anti-VCA et anti-EBNA vont persister tout au long de la vie (Figure 12).



**Figure 12: Evolution d'anticorps après primo-infection par l'EBV. Les zones grisées signifient que cette réponse est inconstante.**

Le contrôle de la prolifération des lymphocytes B ne pourra être effectif qu'au moment de l'apparition de la réponse cytotoxique T spécifique. L'immunité à médiation cellulaire contre l'EBV a un rôle primordial dans la suppression de la prolifération des cellules EBV positives (Uehara T et al, 1992). La réponse cellulaire va entrer en jeu dès la primo-infection. Les lymphocytes NK (Natural Killer) sont les premières. Les cellules NK vont produire différents médiateurs à activités antivirale de façon non spécifique, des perforines et des granzymes qui vont induire la lyse des cellules infectées par l'EBV. Elles vont aussi sécréter de l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), cytokine qui inhibe entre autre la réplication virale. Ensuite, la réponse adaptative va se mettre en place avec une réponse T cytotoxique très intense spécifique de l'EBV. La réponse intense des lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) est due à leur expansion massive, qui permet de contrôler le virus rapidement, les CTLs vont libérer des perforines et des granzymes. Ces CTLs sont majoritairement spécifiques des épitopes issus des protéines du cycle lytique, et très peu sont spécifiques d'épitopes d'antigènes latents (Margaret F.C. Callan, 2004) (Figure 13). La réponse T CD4+ est faible et se traduit par une sécrétion d'IFN- $\gamma$ .

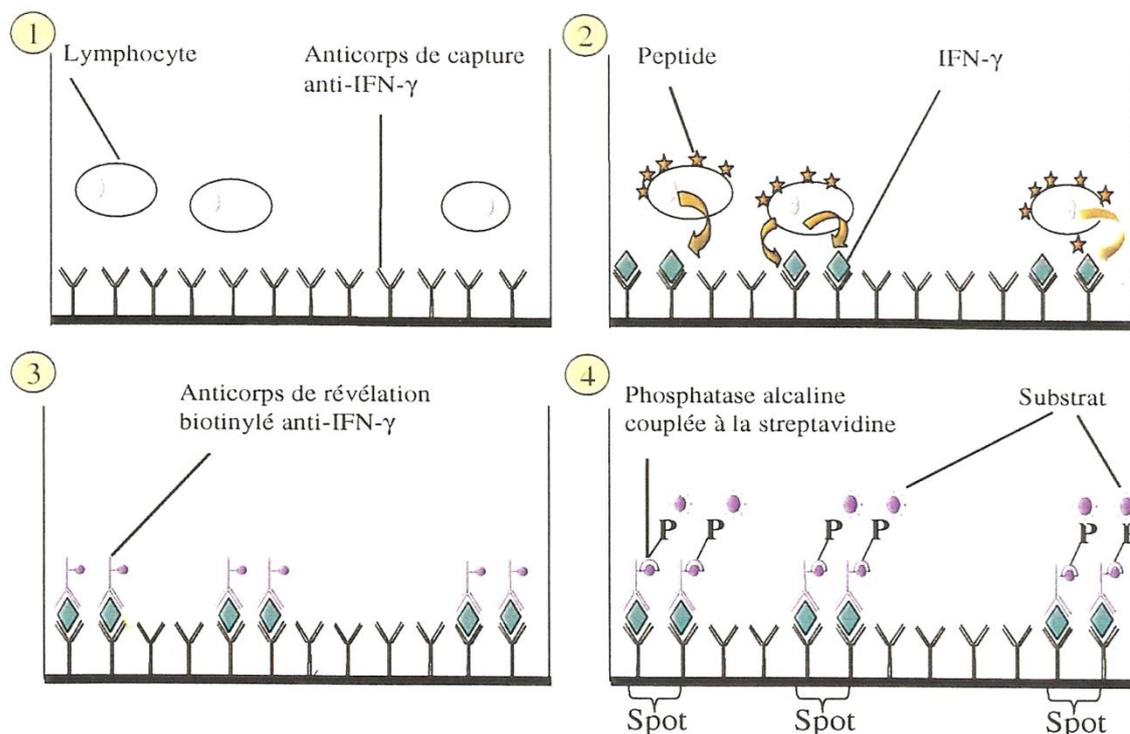


**Figure 13: Dynamique des réponses T CD8+ et CD4+ à l'EBV (Margaret F.C. Callan, 2004)**

Après avoir contrôlé la primo-infection, une grande partie des CTLs va mourir par apoptose et une petite partie va survivre pour constituer un réservoir relativement stable de lymphocytes T CD8+ mémoires. Il en sera de même pour les lymphocytes T CD4+ qui peuvent être subdivisés en sous population mémoire centrale et en sous population mémoire effecteur. La sous population mémoire effecteur va réagir rapidement après une réactivation du virus (passage de la phase de latence à la phase lytique) et la sous population mémoire centrale qui constitue des précurseurs des mémoires effecteurs va entretenir le réservoir de mémoire effecteur (Heller et al, 2008). Les cellules mémoires (CD8+ et CD4+) ont donc pour rôle de contrôler l'infection EBV persistante et de réprimer la réactivation du virus. Ces réponses cellulaires sont essentielles dans le contrôle de l'infection EBV en particulier pour les lymphoproliférations qui lui sont associées. Ainsi, il a été montré que les patients présentant des lymphomes EBV en particulier les LH associés à l'EBV pouvaient présenter un déficit des lymphocytes T CD4 dirigés contre l'antigène viral EBNA1 permettant ainsi au virus d'exercer sa capacité de transformation lymphomateuse (Heller KN *et al.*, 2008).

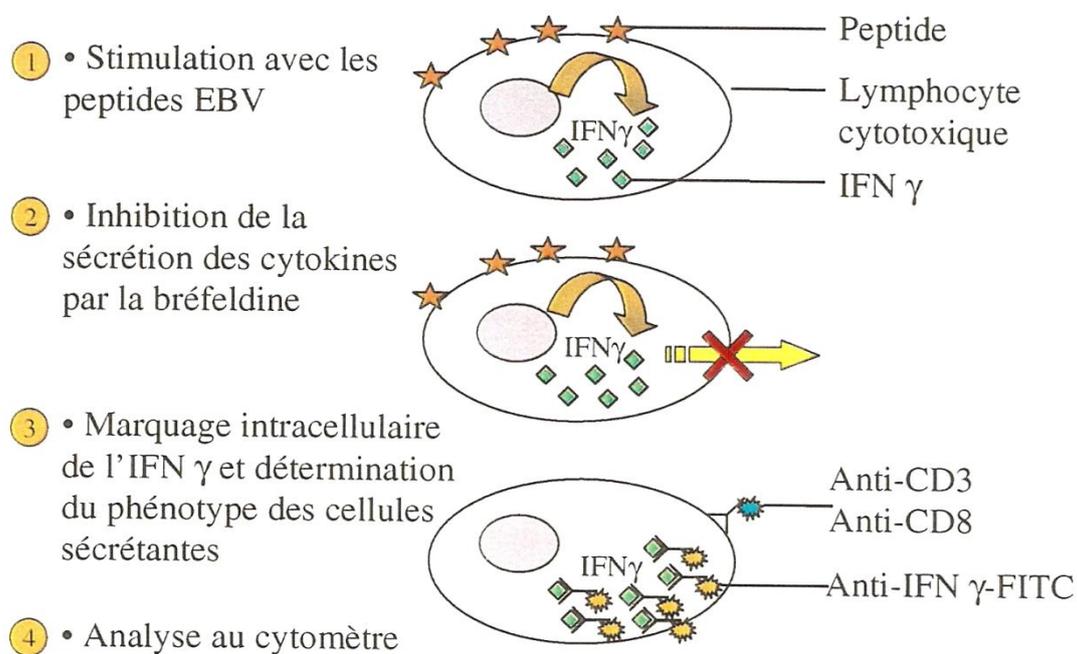
Plusieurs méthodes d'exploration de la réponse T anti-virale sont aujourd'hui disponibles. Elles n'explorent pas toutes la même activité mais permettent de détecter des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'un agent infectieux. Les techniques actuelles sont basées sur la quantification de la production de cytokines après stimulation par un antigène (Tan LC et al, 1999) par ELISPOT ou cytométrie de flux. L'ELISPOT (Enzyme Linked Immunospot) est actuellement la technique la plus couramment employée. Des cellules sont déposées dans des puits sensibilisés par des anticorps anti-cytokine (Figure14) (1). L'antigène est ajouté stimulant les réponses cellulaires et les cytokines sécrétées sont capturées par les anticorps (2). La révélation s'effectue à

l'aide d'un 2<sup>ème</sup> anticorps biotinylé qui prend en sandwich les cytokines (3). La phosphatase alcaline couplée à la streptavidine se fixe sur ce dernier. Enfin l'addition du substrat permet de détecter les cellules sécrétantes par l'apparition de tâches colorées (spot) (4). Les différentes étapes de la réaction sont schématisées sur la figure (14).



**Figure 14 : Etapes de la techniques ELISPOT**

**La cytométrie de flux** (Crucian, BE et al, 2001 ; Kusushima, K., et al 1999). La détection des cellules produisant des cytokines se fait dans ce cas après marquage intracellulaire. Comme précédemment les cellules sont stimulées in vitro par des antigènes viraux et sont traitées par la bréfeldine qui inhibe l'excrétion des cytokines dans le milieu extracellulaire, elles vont donc s'accumuler en intracellulaire et pourront être directement marquées dans les cellules après perméabilisation membranaire. Le phénotype des cellules pourra d'autre part être déterminé avec des anticorps dirigés contre les marqueurs de membrane. Les cellules marquées sont analysées au cytomètre de flux. La technique est schématisée sur la figure 15.



**Figure.15 : Technique de détection des cellules cytotoxiques par cytométrie de flux**

### La stimulation antigénique.

Plusieurs sources d'antigène peuvent être utilisées : peptides, virus recombinant, lignées cellulaires transformées par l'EBV et cellules dendritiques présentatrices d'antigènes.

#### -Les peptides

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> reconnaissant des peptides de 8 à 10 acides aminés, la réponse T CD8 sera étudiée en stimulant directement le TCR des CD8 par un peptide synthétique correspondant à un épitope immunodominant. Cette méthode nécessite en général de déterminer le type HLA de classe I du sujet car la nature de l'épitope est étroitement liée à la molécule de HLA qui le présente. Un mélange de peptides 9-mer du cycle latent de l'EBV a été utilisé. Ces peptides ont été choisis de façon à être reconnus par de nombreuses molécules du CMH de classe I (Corinne Miceli-Richard et al, 2009).

#### - Lignées lymphoblastoïdes

La présentation de l'antigène est directement effectuée par les cellules d'une lignée lymphoblastoïde transformée par l'EBV. Cette lignée pourra être établie à partir des lymphocytes du sujet à analyser, soit avec son propre virus, soit à partir d'une souche de laboratoire (B95). Cette méthode permet d'obtenir la réponse d'un plus grand nombre de lymphocytes cytotoxiques en raison de la présentation de la totalité des épitopes de latence. Cette méthode permet en général l'étude des réponses dirigées contre les protéines de latence (Sharifi R et al, 2004).

- Peptides présentés par les cellules dendritiques

Des cellules dendritiques sont enrichies *in vitro* par culture de monocytes sanguins dans un milieu enrichi en IL4 et GMCSF puis par des stimuli de maturation. Les cellules sont ensuite exposées aux peptides spécifiques des CTL étudiés. Les cellules dendritiques pulsées (chargées) par les peptides présentent les épitopes de façon très efficace et à haute concentration à la surface des cellules et peuvent ainsi réactiver des CTL même s'ils sont présents à faible titre. Cette technique peut en sus permettre de sélectionner et d'enrichir une population de CTL spécifique d'un épitope et de l'utiliser en thérapeutique (Redchenko IV et Rickinson AB, 1999).

L'analyse de la réponse immune cellulaire anti-EBV CD4+ peut être effectuée avec les mêmes techniques. Dans ce cas particulier, il est possible d'exposer les cellules directement avec des antigènes sous forme de protéines virales recombinantes. Les protéines exogènes seront en effet apprêtées par les molécules de CMH de classe II et présentées.

### **6-Thérapie cellulaire par les lymphocytes T anti-EBV**

L'expression des antigènes viraux par les cellules tumorales fait de ces cellules transformées une cible intéressante dans les approches d'immunothérapie cellulaires basées principalement sur l'expansion *ex vivo* de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'EBV. La thérapie cellulaire est donc utilisée dans deux objectifs précis : un objectif anti-tumoral ou un objectif anti-infectieux (Merlo A *et al.*, 2010 ; Smith C *et al.*, 2012). Une approche de thérapie cellulaire avec des lymphocytes cytotoxiques dirigés contre l'EBV a démontré son efficacité sur le LH réfractaire (Bollard *et al.* 2004 ; Cruz CR *et al.*, 2011) et peut ainsi être une alternative au traitement actuel du LH en cas d'échec du traitement conventionnel. De même, une approche de thérapie cellulaire avec des lymphocytes T cytotoxiques et auxiliaires dirigés contre l'EBV est actuellement utilisée dans les infections à EBV résistantes au Rituximab dans les allogreffes de moelle osseuse. Les lymphocytes T anti-EBV du donneur sont sélectionnés *in vitro* et injectés au receveur. Une expansion *in vivo* des lymphocytes auxiliaires et/ou des lymphocytes cytotoxiques anti-EBV détectable concorde souvent avec une régression de la charge virale. En cas d'inefficacité, une deuxième dose est réinjectée en respectant une limite du nombre de lymphocytes T afin d'éviter l'apparition de GVHD (*Graft versus Host Disease*) (Comoli P *et al.*, 2008). Ces approches démontrent le rôle essentiel de la réponse lymphocytaire T anti-EBV dans le traitement et la prévention des lymphoproliférations associées à l'EBV.

## **7-Lymphomes associés à l'EBV**

Les lymphomes associés à l'EBV peuvent être regroupés en deux catégories, ceux qui surviennent chez les sujet immunocompétent (lymphome de Burkitt, LH et lymphomes T,NK) et ceux qui sont favorisés par un déficit immunitaire inné ou acquis (infection VIH, ou transplantation d'organe).

### **7.1. Lymphome de Burkitt**

En Afrique sub-saharienne, le lymphome de Burkitt est endémique avec une incidence annuelle de 5 à 10 cas pour 100 000 enfants. Dans plus de 90% des cas, on le trouve associé à l'EBV. Dans le reste du monde, les cas sont sporadiques et sont associés à l'EBV dans seulement 15% des cas. Le facteur principal de la pathogenèse du lymphome de Burkitt est une translocation chromosomique impliquant le bras long du chromosome 8 (8q24), dans la région du proto-oncogène *c-myc*. Cette translocation conduit à la dérégulation de l'expression de l'oncogène *c-myc* favorisant l'apparition de cellules cancéreuses. Le rôle d'EBV n'est pas clairement élucidé, mais l'expression des gènes de latence de type I, EBNA1 et les EBERs, pourrait avoir un rôle dans la sélection et la prolifération des cellules malignes (Young and Murray, 2003). On constate une corrélation entre la répartition des lymphomes de Burkitt endémiques et celle du paludisme qui est reconnu comme étant avec EBV un cofacteur des lymphomes de Burkitt. Certaines protéines de l'agent du paludisme, *P. falciparum*, tel qu'un domaine riche en cystéine de l'antigène membranaire (CIDR1 $\alpha$ ), sont impliquées dans l'activation de lymphocytes B et peuvent également jouer un rôle dans la réactivation d'EBV (Chene *et al.*, 2007).

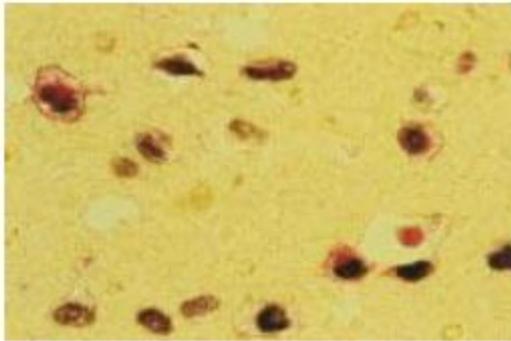
### **7.2. Lymphome de Hodgkin et EBV**

Comme nous l'avons vu, dans les pays occidentaux, l'EBV est détecté dans les cellules HRS dans environ 20% des cas et jusqu'à 90% des cas dans les pays en voie de développement (Dolcetti and Boiocchi, 1998; Flavell and Murray, 2000 ; Kuppers, 2009). La présence d'EBV dans la tumeur est confirmée par une technique d'hybridation ou de southern blot, qui permettent la détection de l'ADN viral, complétée par le marquage immunohistochimique des protéines virales EBER et LMP1 (Figure 16). Lorsque l'EBV est présent dans les cellules tumorales, son génome est sous forme épisomale. L'analyse de la portion terminale répétée du génome de l'EBV a montré qu'il s'agissait d'épisomes monoclonaux montrant que la population tumorale dérive d'une seule cellule infectée démontrant que l'infection par l'EBV des cellules B précède leur transformation tumorale et leur expansion clonale (Dolcetti and Boiocchi, 1998). Ces RS-EBV<sup>+</sup> expriment les protéines de latence de type II que sont EBNA-1, LMP-1 et LMP-2 et les transcrits ARN non codants EBERs. EBNA-1 est important dans la répllication épisomale et pourrait contribuer à la physiopathologie

du LH en attirant les lymphocytes T régulateurs dans l'environnement tumoral. *LMP1* est un oncogène, les souris transgéniques développant des lymphomes B. A la membrane cellulaire, elle mime le récepteur activateur CD40 et induit l'activation de NF- $\kappa$ B (Ersing *et al.*, 2013). *LMP1* induit dans les lymphocytes B de nombreux changements phénotypiques, diminuant l'expression des gènes spécifiques des lymphocytes B et augmentant le nombre de molécules d'adhésion comme ICAM et LFA-3, des marqueurs d'activation des lymphocytes B CD23, CD30, CD40 et CD71 et des gènes antiapoptotiques comme *bcl-2*. Par ailleurs, *LMP1* interagit avec des protéines du cytosquelette, comme la vimentine, et pourrait ainsi contribuer au changement de morphologie des cellules HRS (Dolcetti and Boiocchi, 1998). *LMP1* intervient également activement dans la communication des cellules HRS avec leur environnement en induisant l'expression de cytokines immunomodulatrices. Par exemple, *LMP1* induit la production d'IL-10, qui empêche la prolifération des lymphocytes T servant à contrôler l'infection par l'EBV chez les individus sains et favorise la prolifération des lymphocytes B (Nakagomi *et al.*, 1994). De plus, *LMP1* augmente la sécrétion d'IL-12 par les cellules environnantes des cellules HRS, cytokine impliquée dans la différenciation des lymphocytes T en Th1 (Schwaller *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 1998). *LMP1* induit aussi la production d'IL-6 et IL-8 en activant la voie NF- $\kappa$ B et les MAP-kinases (Eliopoulos *et al.*, 1999). L'IL-6 stimule la prolifération des LCL et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, promouvant la sécrétion d'anticorps. Dans les cellules HRS, elle peut également avoir un rôle de facteur de croissance autocrine. *LMP2A* mime l'activation du récepteur activateur du lymphocyte B, BCR (B-cell signaling receptor). L'EBV active donc des voies majeures de survie et prolifération du lymphocyte B du centre germinatif et joue ainsi un rôle essentiel au cours de la lymphomagénèse.

Les microARN (miARN) sont des régulateurs de l'expression des gènes qui jouent un rôle important dans l'hématopoïèse et la tumorigenèse. Il a été rapporté que les virus ont leur propre ensemble miARNs (Kim DN *et al.*, 2007). L'interaction entre le virus et les cellules malignes dans le LH pourrait être médiée en partie par les miARNs. Navarro A et ses collaborateurs, ont analysé l'expression des miARN dans le LH et l'influence de l'EBV sur leur profil d'expression par RT-PCR. Ils ont identifié un groupe de 25 miARNs qui peuvent différencier les LH des ganglions réactionnels. En outre, un ensemble de 36 miARNs permettent de différencier les sous-types CM et SN. Enfin, 10 miARN ont leur expression modifiée en cas d'infection EBV. Ces résultats suggèrent que les miARNs jouent un rôle dans la biologie du LH et peuvent être utiles dans le développement de thérapies ciblant les miARNs (Navarro A *et al.*, 2008). Cependant, nous n'avons pas trouvé de données mettant en évidence le rôle spécifique de miRNA d'origine virale dans la physiopathologie du LH.

Enfin, illustrant le rôle essentiel de l'EBV dans la lymphomagenèse il a été montré que le nombre de mutations somatiques invalidantes dans le gène TNFAIP3 codant pour la protéine induite par le TNF- $\alpha$ , protéine A20, est significativement plus faible dans les cellules HRS EBV+ + (12,5%) qu'EBV- (70%), suggérant des fonctions complémentaires de l'inactivation de TNFAIP3 et de l'infection par EBV dans la pathogenèse du lymphome de Hodgkin (Schmitz *et al.*, 2009). Tout cela met bien en évidence qu'EBV joue un rôle actif dans le développement du lymphome de Hodgkin.



**Figure 16 : Double marquage histologique cellules HRS anti-EBER (brun-noir) et anti-LMP1 (rouge) (Flavell *et al.*, 2000)**

### **7.3. Lymphomes T/NK**

Bien que la cible préférentielle d'infection par l'EBV soit les lymphocytes B, l'EBV a été relié également à différents lymphomes touchant les lymphocytes T et NK (natural killer). Un exemple commun en Asie est un lymphome extranodal qui se présente sous forme d'une lésion érosive dans la cavité nasale. Ce type de lymphome dériverait de cellules cytotoxiques infectées par l'EBV ayant pour origine soit un lymphocyte T, soit une cellule NK (Young and Rickinson, 2004).

### **7.4 Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation**

Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD, pour Post Transplant Lymphoproliferative Disease) comprend toutes les lymphoproliférations qui surviennent après une greffe d'organe ou de moelle osseuse. La majorité des PTLD est EBV positive (80% des cas) et montre une latence de type III, bien que des profils de latence de type I et II puissent également être trouvés (Wistinghausen *et al.*, 2013; Young and Murray, 2003; Young and Rickinson, 2004). La plupart des PTLD surviennent l'année suivant la greffe, lorsque l'immunosuppression thérapeutique est la plus importante. L'incidence des PTLDs dépend essentiellement du type de tissu greffé (Holmes et Sokol, 2002), du statut immunitaire du couple receveur-donneur, de l'âge du receveur, du type d'immunodépresseurs anti-rejets utilisés, et d'autres facteurs moins importants. La primo-infection chez un receveur EBV-séronégatif greffé avec un greffon d'un donneur séropositif est un facteur de risque important : lors des greffes d'organe, les greffés EBV-

séronégatifs présentent un risque de PTLD 10 à 80 fois plus élevé que les greffés EBV-séropositifs. Leur gravité peut aller de la simple prolifération polyclonale de lymphocytes B, qui régresse habituellement à la levée de l'immunosuppression, jusqu'au lymphome non-hodgkinien monoclonal et agressif. Des lymphoproliférations semblables sont observées chez des patients traités par immunosuppresseurs pour une maladie auto-immune et sont associés à l'EBV dans 50% des cas (Tran *et al.*, 2008).

### **7.5. Lymphomes des patients infectés par le VIH**

Depuis une vingtaine d'années, la disponibilité des multithérapies antirétrovirales a permis de restaurer l'immunité des personnes infectées par le VIH et de diminuer la mortalité due au SIDA. Alors que l'incidence des lymphomes non Hodgkiniens a beaucoup diminué depuis l'utilisation des antirétroviraux (Besson, 2000), celle des LH est restée stable et reste multipliée d'un facteur 10 à 20 par rapport aux sujets non infectés (Goedert, 2012). Globalement, le génome EBV est détectable dans les cellules tumorales dans 60 à 70 % de l'ensemble des cas de LNH des patients VIH. Le pourcentage d'association de l'EBV est de 80- 100% dans les cas de LH (Ambinder, 2009). Chez quelques patients, il a été montré que l'apparition des lymphomes B a été précédée par une diminution des CTL anti-EBV et par une augmentation de la charge virale EBV (Kersten *et al.*, 1997). Un défaut de lymphocytes T CD4 EBV spécifiques a aussi été montré comme pouvant précéder la survenue de lymphome cérébral EBV+ (Gasser O 2007).

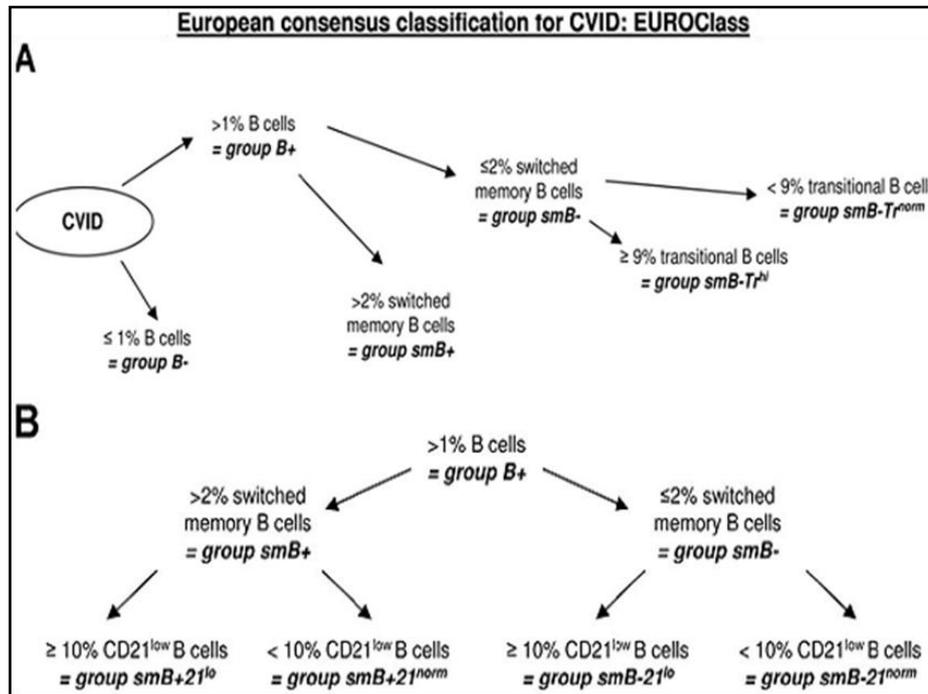
## **C. Déficit immunitaire inné et LH**

Comme nous l'avons vu, les déficits immunitaires acquis – contextes de transplantation d'organe ou de cellules souches ou de l'infection VIH- sont associés à une augmentation de risque de LH. Au cours de certains déficits immunitaires innés, des incidences élevées de LH ont aussi été retrouvées. Une étude de registre américain des cancers associés aux déficits immunitaires a ainsi fait état de 42 cas de LH associés à des déficits immunitaires primitifs (Filipovich AH, 1992). Il s'agissait de patients atteints de défauts de l'immunité cellulaire (ataxie-télangiectasie, Wiskott Aldrich ou humorale (DICV, hyper IgM).

### **1. Déficit immuns communs variables (DICV)**

Le déficit immunitaire commun variable (DICV) est le plus fréquent des déficits immunitaires (Malphettes M *et al.*, 2008). La prévalence du déficit immunitaire commun variable en France se situe probablement autour de 1/25000. Les deux sexes sont touchés avec la même fréquence, mais il existe des différences liées à l'origine ethnique. Ce déficit est rare chez les Asiatiques et exceptionnel chez les Noirs. Il est familial dans 20 à 25 % des cas. Il est du le plus souvent des

anomalies de la commutation isotypique ou de la différenciation lymphocytaire B. Il est caractérisé par un défaut de production d'immunoglobulines avec pour conséquence une hypogammaglobulinémie (hypo-Ig), conséquence d'une hypo-IgG associée à une hypo-IgA et/ou une hypo-IgM. La classification européenne des DICV est fondée sur l'immunophénotypage des lymphocytes B par cytométrie du flux (Wehr C *et al*, 2008) (Figure 17).

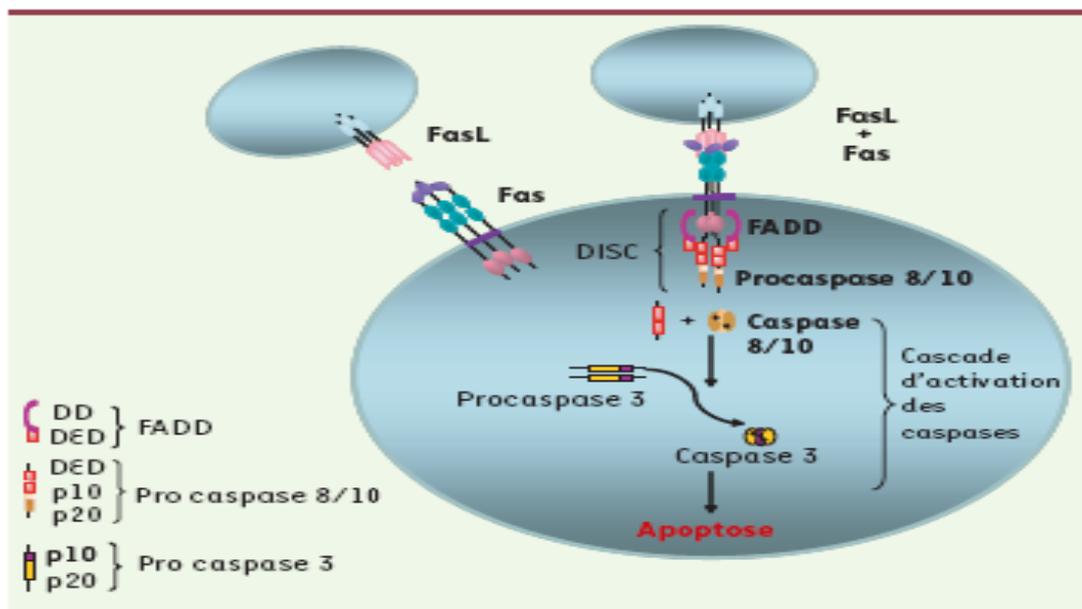


**Figure 17.** La figure illustre la classification « EUROCLASS » qui prend en compte les proportions de lymphocytes B transitionnels (A) et de lymphocytes B CD21<sup>low</sup> (B). B indique les lymphocytes B totaux ; smb : cellules B mémoire tardives (switchées); Tr : transitionnelles, et 21 : cellules B CD21<sup>low</sup>.

Il s'agit d'une maladie très hétérogène dans sa présentation biologique et clinique, probablement du fait que plusieurs anomalies génétiques peuvent aboutir au phénotype commun d'hypogammaglobulinémie, avec des expressions cliniques variables. Les symptômes cliniques débutent parfois dès l'enfance mais le plus souvent à l'âge adulte. Le délai diagnostique est le plus souvent de plusieurs années (É Oksenhendler, 2007). Il n'y a pas de traitement curatif. Le traitement repose sur l'immunoglobulinothérapie substitutive par immunoglobulines humaines polyvalentes, par voie intraveineuse ou sous-cutanée. Une antibiothérapie ciblée est nécessaire pour traiter les infections. Les principales manifestations sont infectieuses, auto-immunes (Michel M *et al*, 2004) et tumorales. Les lymphomes ont une incidence multipliée par 12 par rapport à la population générale (Mellemkjaer L 2002). Huit cas d'association DICV-LH ont été répertoriés dans le registre américain des cancers associés aux déficits immunitaires (Filipovich AH, 1992). On retrouve une dizaine d'autres observations dans la littérature (Zenone T *et al*, 1996 ; Christopoulos C *et al*, 1995, Fesus SM *et al*, 1989, Espanol *et al*, 1993, Cristopoulos *et al*, 1995, Zenone T *et al*, 1996 ; Aghamohammadi, 2007, Mellemkjaer L 2002).

## 2. Syndrome Lymphoprolifératif Autoimmun (ALPS)

Le syndrome lymphoprolifératif avec auto-immunité (ALPS, auto-immune lymphoproliferative syndrome) a été décrit en 1967 (Canale et Smith, 1967) comme une rare anomalie du fonctionnement de la production des lymphocytes. Elle se caractérise par une hypergammaglobulinémie, essentiellement G et A, et surtout une accumulation dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires d'une population polyclonale de lymphocytes  $T\alpha\beta$  matures n'exprimant ni CD4 ni CD8, appelés lymphocytes T « doubles négatifs » ( $LT\alpha\beta$  DN). Cette population représente normalement moins de 1% des cellules T CD3+ tandis que les patients ALPS en ont généralement plus de 3% (de 3 à 60%) (Lim et al., 1998). Ce syndrome est dû dans la majorité des cas à des mutations dominantes du gène Fas, qui code un récepteur membranaire inducteur d'apoptose appartenant à la superfamille des Tumor Necrosis Factor Receptors (TNF-Rs) (Frédéric Rieux-Laucat, 2006) (Figure 18). Dans un contexte de déficience en Fas, le lymphocyte T activé qui « attend » un signal d'apoptose module son corécepteur CD4 ou CD8 et devient double- négatif. De surcroît, les lymphocytes T activés stimulent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, entraînant la sécrétion d'une grande quantité d'anticorps dans le sérum (hypergammaglobulinémie). La voie Fas-FasL est importante pour la régulation de l'homéostasie lymphocytaire, notamment pour éliminer les lymphocytes effecteurs après stimulation antigénique.



**Figure 18 : Signalisation de l'apoptose lymphocytaire par Fas (Frédéric Rieux-Laucat, 2006)**

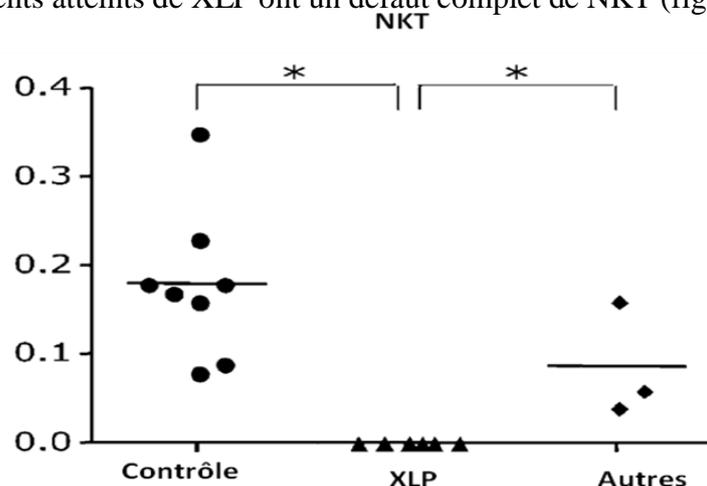
Ce syndrome associe des adénopathies, une splénomégalie et, éventuellement, une hépatomégalie. Des manifestations auto-immunes sont retrouvées chez plus de deux tiers des patients ALPS, le plus souvent sous la forme de cytopénies auto-immunes (anémie hémolytique, thrombopénie et

neutropénie). La lymphoprolifération dans l'ALPS est habituellement bénigne mais il existe un risque accru de développer des lymphomes. Il s'agit de 5 cas LH et de 5 cas de LNH. Le risque de LH a été estimé augmenté d'un facteur 50 (Straus, 2001). Il n'était pas précisé dans la littérature si ces cas étaient ou non associés à l'EBV.

### 3. Le syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP)

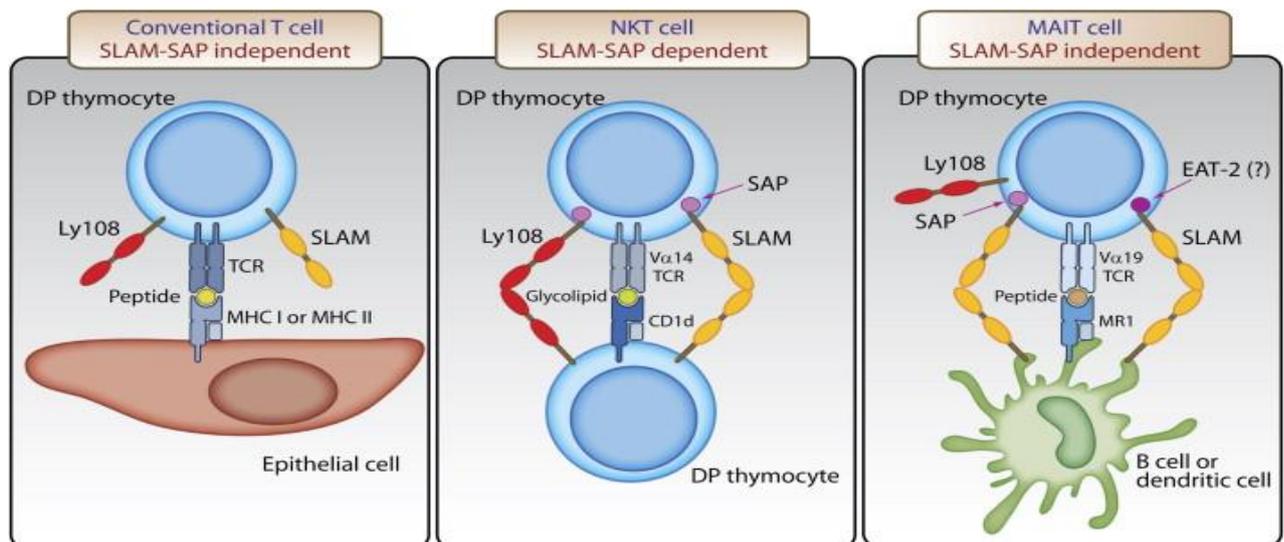
Le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (syndrome XLP) est caractérisé par une altération de l'immunosurveillance de l'EBV (Purtilo D, 1975). Ce syndrome touche les jeunes garçons. La cause génétique de ce déficit a été identifiée en 1998 (Sayos *et al.* 1998). Il s'agit de mutations dans un gène localisé au niveau de la région Xq25 du chromosome X, gène codant pour une protéine intervenant dans l'activation lymphocytaire T. Dans la plupart des cas, la mutation se trouve dans le gène *SH2D1A* (*SH2 domain protein 1A*). Ce gène code pour une protéine appelée SAP (Signaling associated Protein). Cette protéine interagit avec la « SLAM » (*signaling lymphocyte activation molecule*) ; il en résulte une perturbation de l'immunité à médiation cellulaire anti-EBV. D'autres patients ont des mutations du gène *XIAP*, qui code pour une molécule (*X-linked inhibitor of apoptosis*) impliquée dans la régulation de l'apoptose. L'expression défectueuse du gène *XIAP* se traduit par des perturbations dans la survie et la différenciation des lymphocytes T *natural killer* (NKT) (Rigaud S. *et al.*, 2006).

Les patients atteints de XLP ont un déficit en lymphocytes NKT. Il s'agit d'une sous-population particulière de lymphocytes T présentant des propriétés immunomodulatrices par leur capacité à sécréter rapidement de grandes quantités de cytokines comme l'IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 et de TGF- $\beta$  (Bendelac *et al.*, 1997 ; Kronenberg *et al.*, 2002). Les cellules NKT expriment dans leur majorité un invariant TCR V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 qui interagit avec la classe I du système HLA. Les cellules NKT ont un rôle important pour l'initiation et la régulation des réponses immunitaires innées et adaptatives. Les patients atteints de XLP ont un défaut complet de NKT (figures 19 et 20).



**Figure 19 : Spécificité de défaut des cellules NKT dans l'XLP**

**Légende :** Les pourcentages de cellules NKT (CD3 + V $\alpha$ 24 TCR + V $\beta$ 11 TCR +) dans les cellules mononucléées de six patients atteints de XLP (XLP), huit donneurs sains (Contrôle) et trois patients ayant d'autres déficits.



**Figure 20. Rôle des récepteurs SLAM et de SAP dans les différentes populations de lymphocytes T.** La différenciation des thymocytes en lymphocytes T conventionnels dépend d'interactions entre le TCR et ses corécepteurs CD4 et CD8 avec des peptides présentés par des molécules HLA exprimées par des cellules épithéliales thymiques, cette différenciation est indépendante de SLAM. Par contre, le développement des thymocytes en NKT est médié par des interactions entre un invariant TCR V $\alpha$ 14+ et des glycolipides présentés par des molécules HLA de classe I exprimées par d'autres thymocytes. Les thymocytes expriment beaucoup de SLAM et de Ly108, qui permettent les interactions. Elles sont médiées par des signaux SAP-dépendants qui permettent la différenciation NKT.

Malgré une fonction immunitaire cellulaire et humorale apparemment normale en l'absence d'infection par l'EBV, la réponse à l'infection par l'EBV est altérée. Ce syndrome se manifeste typiquement par une MNI avec fièvre, adénopathies et hépatosplénomégalie, qui peut évoluer très rapidement vers une hépatite fulminante accompagnée d'une aplasie médullaire parfois fatale. On observe de façon constante une absence de production d'anticorps anti-EBNA (Purtilo D.T., *et al.* 1982 ; Grierson H. et Purtilo D.T. 1987). L'évolution est parfois compliquée de lymphomes qui sont dans 25 % des cas la première manifestation de la maladie. Dans la grande majorité des cas, il s'agit de lymphomes non hodgkiniens de type B (Harrington, 1987). D'autres patients présentent un LH). Quatre cas de LH ont été signalés dans le registre des XLP (Gaspar, 2002).

#### 4. Les nouveaux déficits immunitaires associés au LH EBV+

En 2009, un nouveau déficit immunitaire associé au LH-EBV<sup>+</sup> a été mis en évidence à partir de l'étude de 2 cas survenus chez des fillettes consanguines d'origine turque. (Huck K, 2009). D'autres cas similaires ont été rapportés en 2011 (Stepensky, Weintraub et al. 2011). Il s'agit d'un défaut d'ITK (IL-2-inducible T-cell kinase) caractérisé par un déficit de la réponse immunitaire vis à vis de l'EBV et par une association avec le LH-EBV<sup>+</sup>. Les mutations sont des mutations non-sens. Ces mutations entraînent, comme pour le XLP, une absence de NKT. Enfin en 2013, une délétion du gène *megakaryoblastic leukemia 1 gene (MKL1)* a été mise en évidence chez 2 triplets atteints de LH EBV<sup>+</sup> (Bjorkholm, 2013). *MKL1* est impliqué dans la survie cellulaire et

l'apoptose. Son rôle dans la lymphomagenèse n'est pas connu et des études de confirmation doivent être réalisées pour confirmer son rôle éventuel dans la physiopathologie du LH.

## OBJECTIFS

Les déficits immunitaires innés prédisposant au LH sont actuellement considérés comme exceptionnels. Cependant, leur fréquence pourrait être sous-estimée car, à notre connaissance, aucune étude n'a systématiquement recherché ces anomalies du système immunitaire chez les enfants atteints de LH. Le protocole EURONET à partir duquel les enfants sont recrutés a pour objectif la décroissance thérapeutique afin de limiter les conséquences tardives des traitements et ce, sans pénaliser les chances de guérison. Sont inclus dans cette étude, les patients de moins de 18 ans ayant un LH classique au diagnostic, ayant signé un consentement éclairé. Adossée à ce protocole, l'étude LH-EPI a pour but de rechercher des facteurs immunologiques ou génétiques de susceptibilité au LH de l'enfant. Notre projet était d'évaluer la prévalence de ces déficits chez des patients atteints de LH. De façon complémentaire, nous avons cherché à mesurer la réponse T anti-EBV chez les enfants atteints de LH afin de rechercher des défauts spécifiques de la réponse T anti-EBV. Notre étude est la première qui s'est intéressée à l'étude de la réponse T CD4+ et T CD8+ anti-EBV chez des enfants atteints de LH.

## MATERIEL ET METHODES

### 1. Principes de l'étude

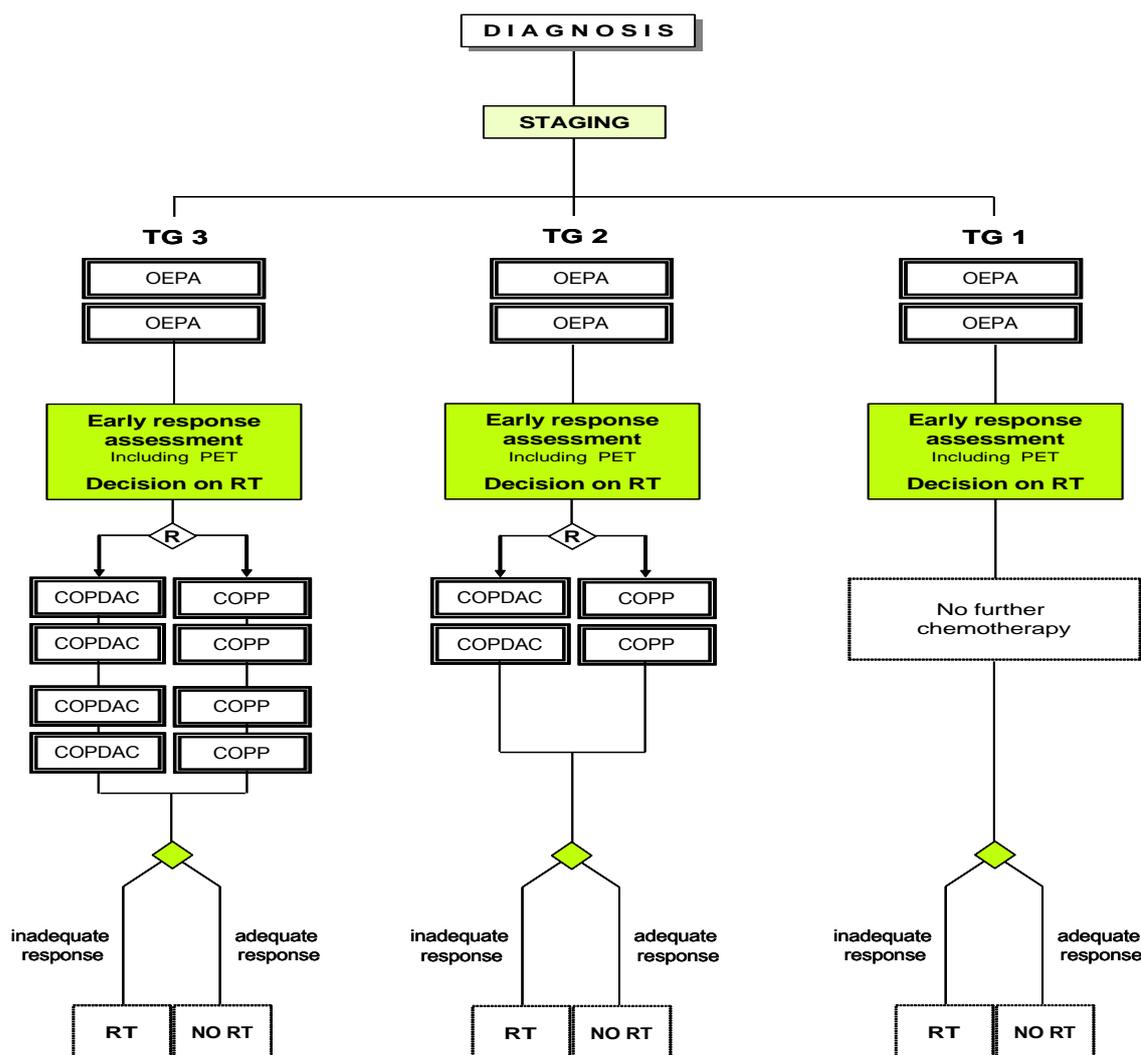
Notre étude s'inscrit dans le cadre d'un protocole, le protocole Euronet, protocole thérapeutique européen du LH chez les enfants et les adolescents. Adossé à ce protocole, nous menons une étude (LH-EPI) afin de rechercher des facteurs immunologiques ou génétiques de susceptibilité au LH de l'enfant. Nous souhaitons approfondir les connaissances sur l'étiologie de la maladie, rechercher des déficits immunitaires en particulier des défauts de contrôle de la réponse immunitaire vis à vis de l'EBV et comprendre la forte prédominance masculine observée chez les enfants de moins de 10 ans.

**L'étude Européenne inter-groupes dans les lymphomes de Hodgkin de l'enfant et de l'adolescent EuroNet PHL C1** est coordonnée par le Pr D Korholz (investigateur principal) chairman du groupe pédiatrique européen d'onco-hématologie et à l'échelle française par le Pr J Landman-Parker (CHU Trousseau, Paris) dans le cadre de la Société Française des Cancers de l'Enfant. L'objectif de cet essai est la décroissance thérapeutique afin de limiter les conséquences tardives des traitements (infertilité, cancers secondaires, toxicités endocrinienne et cardiaque) et ce, sans pour autant pénaliser les chances de guérison. Il propose une stratégie permettant de 1. supprimer la radiothérapie chez les patients de bon pronostic, bons répondeurs après les deux premières cures de polychimiothérapie et 2. limiter la toxicité gonadique pour les patients de pronostic intermédiaire ou défavorable. Cet essai est multicentrique européen ouvert randomisé de phase III. Peuvent être inclus les enfants de moins de 18 ans atteints de lymphome de hodgkin classique en première ligne de traitement, sont exclus les sujets infectés par le VIH. Un effectif de 2200 enfants dont 500 en France est attendu.

### Schéma de l'essai

#### Stratification des groupes thérapeutiques (TG) Proportion attendue

TG-1: patients stades I A/B et II A	35%
TG-2: patients stades II B et III A	30%
TG-3: patients stades III B or IV A/B	35%



**Figure 21 : Schéma de l'essai thérapeutique**

Légende : En fonction des facteurs pronostiques initiaux (stade et présence de signes généraux), les patients sont répartis en trois groupes pronostiques (TG-1: stades I A/B et II A, TG-2: stades IEA/B, IIEA, II B ou III A, TG-3: stades IIIEB, IIIEA/B, III B or IV A/B). Après deux cures de chimiothérapie OEPA, associant Vincristine, etoposide, prednisone, et doxorubicin, la réponse est évaluée par TEP scanner. Pour les enfants de risque intermédiaire ou élevé, une chimiothérapie complémentaire est administrée après randomisation entre COPDAC (cyclophosphamide, vincristine, prednisone, et dacarbazine) et COPP (cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, et prednisone). Les enfants qui gardent une réponse insuffisante en fin de traitement reçoivent une réthérapie complémentaire (RT).

## 2. Population étudiée

### 2.1. Critères d'inclusion

Sont inclus dans cette étude, les patients de moins de 18 ans ayant un LH au diagnostic, ayant signé un consentement éclairé et, pour les Français, étant traité dans un des centres de la SFCE (Société Française contre le Cancer des Enfants) et leurs parents ainsi que vingt enfants sains qui ont servi de témoins. Ces enfants sont prélevés dans le cadre du soin courant à Bicêtre et sont

sélectionnés sur la base de la normalité de leur numération. Les sujets connus comme infectés par le VIH sont exclus.

## 2.2. Recueil des données cliniques des patients LH

Les informations recueillies systématiquement sont le stade de la maladie, la charge virale EBV, le sexe, l'âge et les signes généraux du patient ainsi que le taux d'hémoglobine (Hb) et la vitesse de sédimentation (VS). Le suivi après traitement est régulièrement mis à jour. Ces Données seront corrélées aux résultats biologiques.

## 3. Méthodes de conditionnement du prélèvement sanguin

A partir d'un prélèvement sanguin (volume prélevé adapté au poids de l'enfant : poids < 15 kg : 5 ml ; 15-20 kg : 10 ml ; 20-25 kg : 20 ml ; > 25 kg : 25 ml), sont conservés du culot sec pour l'extraction de l'ADN, des cellules mononucléées du sang et du sérum. Une NFS est réalisée pour chaque patient. Des lignées lymphoblastiques transformées par l'EBV sont établies. Une exploration immunitaire est réalisée (immunophénotypage lymphocytaire, dosage des immunoglobulines et des sous-classes d'IgG, des sérologies post-vaccinale et EBV) pour les 150 premiers enfants atteints. Pour les enfants ayant un LH associé à l'EBV, un défaut spécifique du contrôle de l'EBV est recherché (immunophénotypage des lymphocytes NKT, exploration des réponses T anti-EBV, sérologie et charge virale EBV).

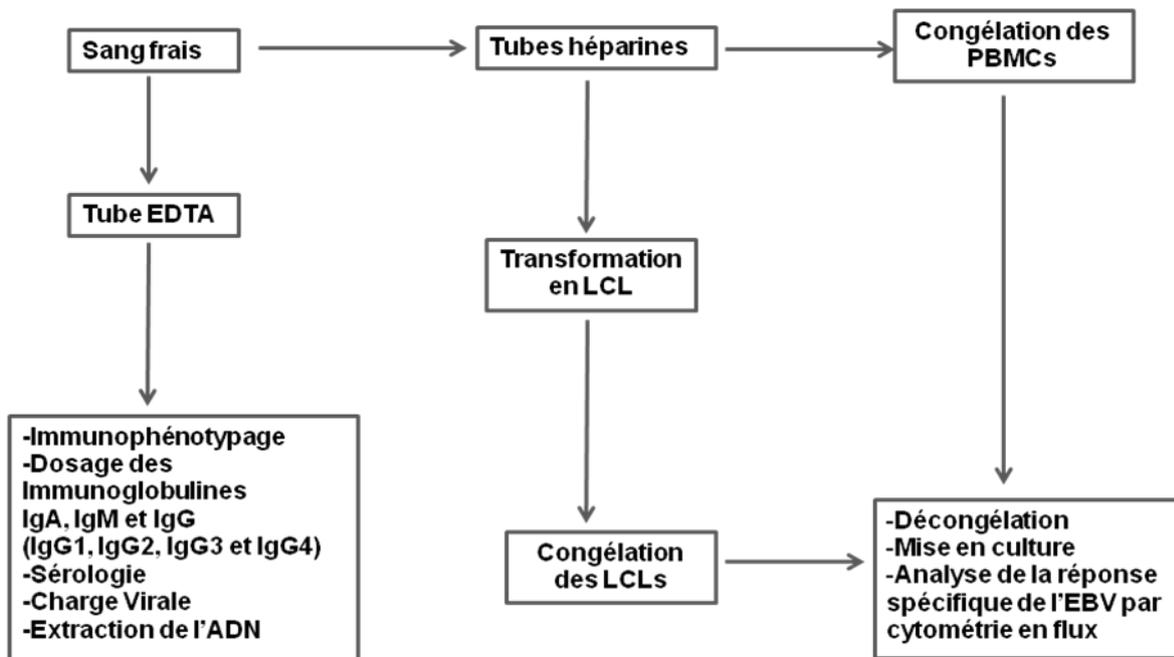


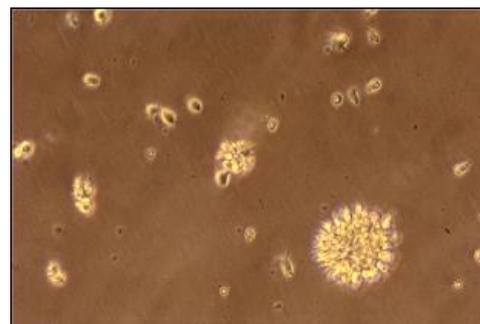
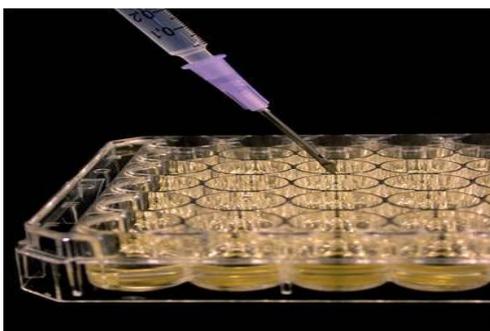
Figure 22 : Schéma présentant le conditionnement des prélèvements de sang frais des patients atteints de lymphome Hodgkinien

### 3.1. Isolement des PBMCs et congélation:

Les PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear cells : cellules mononucléées issues du sang périphérique) des témoins et des patients sont isolées à partir de sang prélevé sur tube hépariné (20ml), grâce à une centrifugation par gradient de densité par Ficoll-Hypaque. Une partie des cellules est infectée par l'EBV afin d'être transformée en Lignée Cellulaire Lymphoblastoïde (LCL) (cf plus bas) et l'autre partie est congelée. Les cellules à congeler sont d'abord centrifugées, puis après élimination du surnageant, sont resuspendues dans du sérum de veau fœtal (SVF) contenant 10% de DMSO (Diméthylsulfoxyde) à raison de 5 millions de cellules par mL. Les cellules sont ensuite transférées dans de l'azote liquide. Cette méthode de congélation est également utilisée pour la congélation des LCL.

### 3.2. Etablissement des LCLs:

Une partie des PBMCs obtenues après Ficoll est utilisée pour établir des LCL. Il s'agit de la transformation des lymphocytes B, après l'infection par l'EBV (LCG Standards ATCC VR-1492, Strain B95-8, human herpesvirus 4 purifiée, issu d'une lignée cellulaire humaine (883L)), en lignée lymphoblastique stable et continue. Le culot cellulaire obtenu après lavage au PBS et centrifugation, est resuspendu dans du milieu RPMI complet (RPMI 1640 glutamax Gibco, 10% SVF, pénicilline à 100U/mL, streptomycine à 100µg/mL, tampon HEPES à 10mM, pyruvate de sodium à 1mM, acides aminés non essentiels, Invitrogen) et infecté avec de l'EBV. On utilise 1mL d'EBV pour 10 millions de PBMCs suspendues dans 2mL de RPMI (deux fois le volume d'EBV). Les cellules sont incubées à l'étuve à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, pendant 2h. A la suite de cette incubation, du RPMI est rajouté de manière à avoir 1million de cellules/ml. De plus, la ciclosporine qui empêche les lymphocytes T de détruire les lymphocytes B transformés par l'EBV, est rajoutée à raison de 35µL de ciclosporine pour un volume de culture de 14mL. Enfin, les lignées sont mises en culture dans des plaques de culture de 24 puits à raison de 1mL/puits et sont incubées à l'étuve à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Après plusieurs jours de culture, de division régulière et de surveillance, les cellules sont congelées.



**Photo1 : Lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs)**

(<http://www1.imperial.ac.uk/departementofmedicine/divisions/infectiousdiseases/viro/epsteinbarr/>)

#### 4. Etude des populations et des sous-populations lymphocytaires par immunophénotypage (cytométrie de flux)

##### 4.1. Marquage des cellules

Le nombre et le pourcentage de lymphocytes B, T et NK sont déterminés par cryométrie en flux (Beckman-Coulter, Villepinte, France) sur sang total ou PBMC isolées après ficoll. En pratique, cent microlitres (100 µl) de sang total ou des PBMC décongelées de patients hodgkiniens ou de témoins sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante (20-23°C) et à l'obscurité, avec un mélange d'anticorps à des concentrations optimales : anti-CD19- Electron Coupled Dye (ECD), anti-CD5-Fluoresceinisothiocyanate (FITC), anti-CD27-phycoyanine (PC) PC5, anti-CD38-PC7, anti-CD21-phycoérythrine (PE), anti-IgM à PC5, anti-IgD-PE, anti-Kappa-FITC/Lambda-PE/CD19-ECD, anti-CD3 (ECD), anti-CD4-PC5, anti-CD8-PC7, anti-CD56, anti-CD16, CD57, des anti-TCR $\gamma/\delta$ -FITC, anti-TCR $\alpha/\beta$ -PE, anti-TCR V $\alpha$ 24 -PC7, anti-TCR V $\beta$ 11-PE, anti-CD45RA-PE, anti-CD45-FITC et anti-CD45 DR -FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5 (Tab.3) (Beckman-Coulter, Villepinte, France). Les hématies sont ensuite lysées dans une solution de lyse, la Versalyse (Beckman-Coulter), à température ambiante et à l'obscurité pendant 20 minutes. La Versalyse joue le rôle de tampon de fixation pour les anticorps et de solution de lyse pour les globules rouges. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans l'Isoflow (Beckman-Coulter) et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes.

Une quantification lymphocytaire est réalisée après le marquage et juste avant l'acquisition en rajoutant une solution de Flow-Count (Beckman Coulter) constituée d'un nombre de billes précis marqués en suspension. Les sous-populations lymphocytaires sont analysées par cryométrie en utilisant différents anticorps monoclonaux permettant leur identification de manière spécifique.

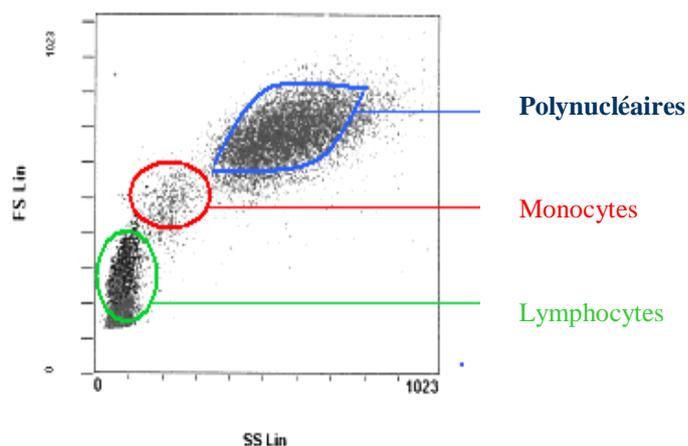
**Tableau 3- Choix et interprétation du panel d'immunophénotypage**

NFS sur le Sysmex-XE pour la quantification des lymphocytes sanguins totaux	
Numération des différentes populations lymphocytaires (Ly T, Ly B et Ly NK)	CD45, CD3, CD19 et CD56-CD16
Population et sous population T	CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ (DN), CD45RA
Étude des Ly NKT	CD3, CD16, CD57 et CD56-CD16
Population et sous-populations B	CD19, CD5, kappa, lambda, CD27, IgM, IgD, CD21 et CD38

#### 4.2. Phénotypage et quantification des lymphocytes

*La cytométrie en flux* est une méthode de dénombrement et d'isolation de cellules spécifiquement marquées par un fluorochrome. Le cytomètre permet l'analyse de la taille (FSC pour *Forward Scatter*), de la granulosité (SSC pour *Side Scatter*) et l'expression simultanée par les cellules de plusieurs spécificités antigéniques reconnues par des plusieurs anticorps marqués par des fluorochromes différents. Cette technique est utilisée afin de quantifier les populations lymphocytaires T, B et NK ainsi que les sous populations lymphocytaires dans le but de rechercher des déficits immunitaires possibles chez les enfants étudiés.

*L'immunophénotypage* des lymphocytes est réalisé sur un cytomètre à six couleurs, le FC 500 (Beckman-Coulter, Villepinte, France) sur les 70 premiers patients, leurs parents et les témoins, puis, sur le Navios (Beckman-Coulter, Villepinte, France), cytomètre à 8 couleurs. L'analyse est faite avec le logiciel CXP analysis V2.2 (Beckman-Coulter, Villepinte, France).



**Figure 23 : Analyse par Cytométrie en flux des cellules sanguines réparties sur le graphe en fonction de leur taille et de leur granulosité**

La cytométrie en flux a permis de rechercher un déficit immunitaire de type DICV, XLP et déficit en Fas/FasL :

- **Les DICV** sont recherchés par quantification des lymphocytes B et des sous populations B en utilisant les anticorps monoclonaux suivants : anti-CD27, anti-CD38, anti-CD21, anti-IgD, anti-IgM, anti-Kappa / lambda, anti-CD19 (Wehr et al, 2008).

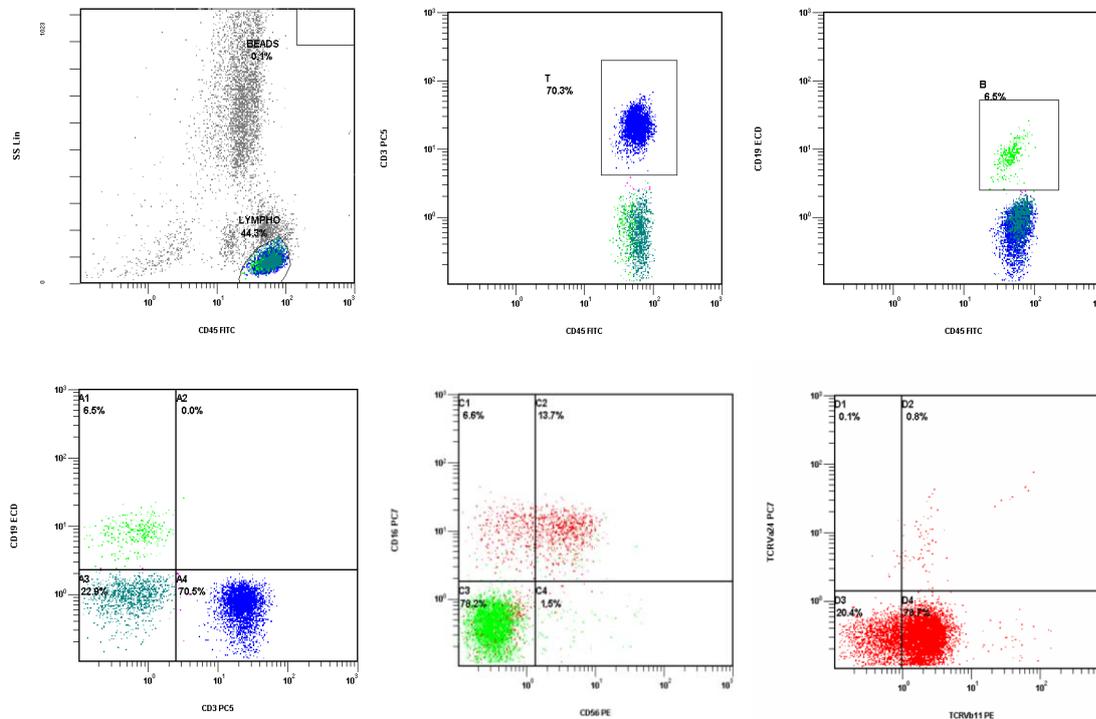
**Tableau 4- Les sous-populations des cellules B périphériques (Wehr et al., 2008)**

Les sous-populations des cellules B périphériques détectées par cytométrie en flux
Cellules B mémoires switchées (avec commutation de classe d'Ig) <b>(CD27+ IgD- IgM-)</b>
Cellules B mémoires sans commutation de classe d'Ig <b>(CD27+ IgD+ IgM+)</b>
Cellules B transitionnelles <b>(CD38+++ IgM++)</b>
Plasmocytes/Plasmablastes <b>(CD38+++ IgM-)</b>
Cellules B matures <b>(CD19+ CD20+)</b>
Cellules B matures peu activées <b>(CD19+ CD21 faible)</b>

- Le **XLP** est recherché par quantification des cellules NKT (lymphocytes T *Natural Killer*) en marquant les cellules par des anticorps anti-CD56, anti-CD16, anti-CD57, anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD3 (Wehr et al, 2008) ou d'anti-TCRV $\alpha$ 24, anti-TCR V $\beta$ 11 et anti-CD3 (Benoit Pasquier et al, 2005).

- Le **déficit en Fas/FasL** est exploré par quantification des lymphocytes T (CD3+) double négatifs CD4-/CD8- dans la population lymphocytaire T alpha/beta+ en utilisant les anticorps anti-TCR $\alpha/\beta$ , anti-CD4, anti-CD8 et anti-CD3 (Stephen E. Straus et al, 1999 ; Aspalter R M., et al, 2000).

La figure 14 est un exemple de diagramme obtenu par cytométrie en flux et illustre les différentes populations lymphocytaires identifiées et dénombrées dans le sang d'un patient atteint de LH. Les lymphocytes B (CD19+), T (CD3+) et NKT (CD3+, CD56+ et CD16+ ou CD3+ et TCRV $\alpha$ 24+/TCR V $\beta$ 11+) sont recherchés dans la population lymphocytaire exprimant fortement le CD45 (Figure 24).



**Figure 24 : Illustration des différentes populations lymphocytaires dans le sang total d'un patient atteint de lymphome de Hodgkin.**

**Légende :** Le sang total est coloré avec anti-CD45/CD56/CD19/CD3, anti-CD19, anti-CD3, anti-CD56, anti-CD16, anti-V $\alpha$ 24TCR et anti-V $\beta$ 11TCR. Le pourcentage des cellules T (b, d), B (c, d), NK (e) et NKT (f) correspondant au double positives est indiqué dans chaque graphe.

## 5. Dosage des immunoglobulines

La quantification des immunoglobulines sériques (IgG, IgA et IgM) et des sous classes d'IgG (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) est réalisée par immunonéphélogométrie sur le système BN ProSpec. Les échantillons de plasma sont dilués avec du diluant pour échantillon (OUMT65, SIEMENS) au 1/400 pour le dosage des IgG et au 1/20 pour le dosage des IgA et IgM. Le dosage est fait grâce à des antisérums (sérum liquide, d'origine animale, obtenu par immunisation de lapins avec des immunoglobulines humaines hautement purifiées) anti-IgG (OSAS15, SIEMENS), anti-IgA (OSAR15, SIEMENS) et anti-IgM (OSAT15, SIEMENS) et à un tampon de réaction R (OUMS65, SIEMENS). La présence des IgG, IgA et IgM, se caractérise par la formation d'immunocomplexes qui dispersent la lumière projetée. L'intensité de la lumière dispersée est fonction de la concentration d'immunoglobuline. Les résultats sont exprimés en unité de concentration (g/L). L'exploitation se fait par rapport à un standard de concentration connue. Les valeurs pour les IgG, IgA et IgM sont interprétées chez l'enfant en fonction de l'âge.

## 6. Sérologie anti-Tétanos

Ce test est utilisé pour mesurer *in vitro* la présence et le taux des IgG spécifiques dirigés contre la toxine tétanique (Tox.T.) présent dans le sérum du patient. Les anticorps anti-toxine tétanique sont produits en réponse à la vaccination avec la protéine de la toxine tétanique. La présence d'une réponse du patient à l'immunisation peut être ainsi évaluée par la mesure sérologique du taux des anticorps anti-toxine tétanique par la technique ELISA en utilisant le kit ELISA VaccZyme Anti-toxine tétanique de type IgG (Réf : MK010).

## 7. Détermination quantitative des taux de l'IL-7 et de BaFF

Dans le cadre de l'exploration des lymphopénies (cf infra), ce test est utilisé pour déterminer les concentrations de l'IL7 (Facteur de différenciation des cellules B favorisant la maturation des cellules pré-B en cellules B dans la moelle osseuse) et de BaFF (Facteur de survie des cellules B) dans le sérum de patients LH ayant une lymphopénie B et de patients non lymphopéniques par la technique ELISA en utilisant les kits ELISA Human IL-7 Immunoassay (Réf : HS750) et Human BAFF/BLyS (Réf : DBLYS0) selon les recommandations du fabricant.

## 8. Dosage sérique de TGF- $\beta$

Dans le cadre de l'exploration des lymphopénies (cf infra), le plasma de patients lymphopéniques et non lymphopéniques est étudié. Cent  $\mu$ l de plasma sont ajoutés à 400  $\mu$ l de milieu RPMI contenant 10% de sérum de veau foetal, et 500  $\mu$ l de la suspension cellulaire ( $10^6$  cellules) sont ajoutés en présence ou en absence de 200 nmol / L de trichostatine A (TSA). Les échantillons sont incubés pendant 18 heures et l'activité luciférase est déterminée sur un luminomètre (Berthold) en utilisant le programme du dosage de la luciférase selon les instructions du fabricant (Promega). Les concentrations de TGF-b sont calculées à partir de l'activité luciférase en utilisant une courbe standard obtenue pour chaque expérience, avec des quantités connues de TGF-b dissous dans le plasma provenant de donneurs normaux **au sein du laboratoire de virologie à Paul Brousse** (Edith Rogier et al, 2006).

## 9. Extraction des ADN

L'extraction de l'ADN est réalisée au sein du laboratoire **de génétique moléculaire, pharmacogénétique et hormonologie** du CHU de Bicêtre et a pour but de conserver de l'ADN pour chaque patient en vue d'approfondir et d'étiquetter les déficits immunitaires obtenus par cytométrie en flux. L'ADN des patients atteints de LH est extrait du culot globulaire en utilisant le réactif « QIAamp DNA Blood minikit » selon le protocole fourni par le fabricant (QiagenR) et

ceci, après avoir éliminé le plasma. Les composants cellulaires du sang sont lysés. Les protéines associées à l'ADN sont digérées par une enzyme dite Protéine Kinase K. Ensuite, l'ADN est séparé grâce à une colonne contenant une membrane de gel de silice qui fixe seulement l'ADN. Les débris cellulaires sont éliminés par des lavages de la colonne avec des tampons puis par centrifugation. L'ADN est élué de la colonne en utilisant un tampon puis par centrifugation. L'absorbance (à 260 nm) de tous les extraits d'ADN est mesurée par un spectrophotomètre dans le but de caractériser la qualité et la quantité de l'ADN.

## **10. Sérologie et charge virale EBV**

L'étude est réalisée sur le plasma séparé obtenu sur le tube EDTA des patients, par Anne-Aurelie Mazet et son équipe au sein du laboratoire **de Virologie au CHU de Bicêtre**.

### ***a. Sérologie***

La sérologie est réalisée sur le plasma par méthode ELISA avec les kits commerciaux DiaSorin® et ImmunoWELL® bmd s.a, sur l'automate Liaison selon les recommandations du fabricant. Elle permet un diagnostic de certitude d'infection au virus Epstein-Barr grâce au dosage (titrage) de différents types d'anticorps (IgG-VCA, IgM-VCA, IgG-EBNA, IgG-EA). Le kit de dosage des IgG anti-EBNA mesure la réponse humorale vis à vis du peptide synthétique EBNA-1, qui est la protéine majoritaire parmi les EBNA (Henle et al. 1987). Par contre, des extraits de lysats de capsid virale sont utilisés pour le dosage des IgG anti-VCA. La séropositivité EBV est définie par la positivité des IgG anti-VCA. Quand celles-ci sont négatives après dilution, la sérologie est réalisée sur plasma pur afin de déterminer les sujets EBV négatifs définis comme ayant des IgG anti-VCA négatives sur plasma pur. Les sujets ayant une sérologie positive sont codés comme EBV+ dans la suite de ce travail. Les primo-infections EBV sont recherchées par le dosage des IgM anti-VCA chez les sujets qui ont à la fois des IgG anti-VCA positives et des IgG anti-EBNA négatives.

### ***b. Charge virale EBV***

La charge virale EBV est déterminée par la technique qPCR en temps réel (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) (Dehee et al. 2001) en utilisant le kit PCR (ABBOTT) et en travaillant sur l'instrument de détection Abbott m2000rt. Les extractions d'acides nucléiques sont réalisées sur l'automate EasyMag de BioMérieux selon les recommandations du fabricant. La qPCR est une technique d'amplification génique dans laquelle on rajoute, en plus des réactifs de PCR habituels et aux deux amorces délimitant la région à amplifier, une sonde correspondant à une séquence interne, marquée par un fluorochrome. La fluorescence est mesurée individuellement grâce à un réseau de fibres optiques qui achemine toutes les 5 secondes le signal émis vers une caméra. Un

logiciel établit une courbe d'apparition de la fluorescence normalisée en fonction du temps exprimé en nombre de cycles. Ceci permet une quantification de la cible initiale. Les amorces de PCR amplifient le gène thymidine kinase (5'-GACAACTCGGCCGTGATGGA-3' et 5'-TGAAGTTGGAGGCGGACGA-3'). La RT PCR de l'EBV et de l'ADN de l'albumine sont réalisées simultanément afin de déterminer la quantité d'ADN cellulaire dans chaque échantillon (Dehee et al. 2001). Les résultats sont exprimés en nombre de copies par ml. Le seuil au-delà duquel la technique est considérée positive est de 125 copies/ml.

## **11. Etude de la réponse T anti-EBV**

Afin d'étudier la réponse immunitaire contre l'EBV chez les enfants atteints de LH, nous l'avons comparée à celle des parents des patients, qui sont considérés comme témoins. Deux techniques sont utilisées la cytométrie de flux et l'ELISPOT. La première technique que nous avons utilisée est la cytométrie de flux en mesurant la réponse T anti-EBV vis-à-vis de LCL autologues et de peptides EBV. Les LCLs établies pour chacun des patients ne présentent pas forcément suffisamment à leur surface l'ensemble des peptides viraux immunogènes en association avec les molécules du HLA, d'où l'idée de tester les deux conditions : LCLs seules et LCLs avec un mélange de peptides viraux optimaux. De plus, les peptides sont testés seuls sans LCLs afin de s'assurer que la réponse lymphocytaire est restreinte aux molécules du HLA.

### **11.1. Décongélation et mise en culture :**

Les LCLs préalablement congelées sont rapidement décongelées au bain-marie (37°C) 4 jours avant la manipulation et resuspendues dans 8 ml de RPMI puis déposées sur 4 ml de Ficoll dans un tube falcon de 15 ml et centrifugées pendant 20 minutes à 2300 tpm afin d'éliminer toutes les cellules mortes. L'anneau cellulaire est récupéré dans un grand volume de RPMI et lavé à 1200 tpm pendant 10 minutes afin d'éliminer toute trace de ficoll. Les LCLs sont ensuite mises en culture.

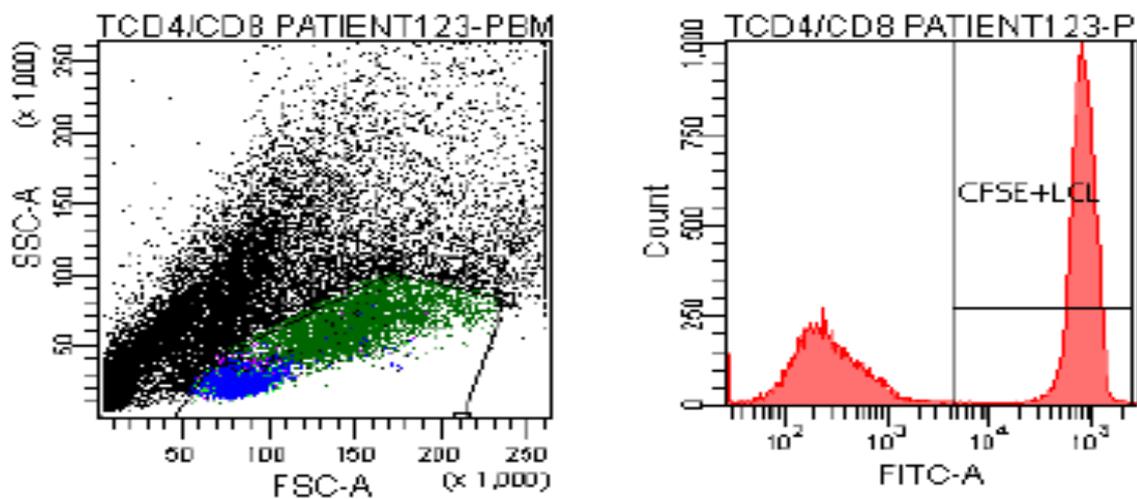
Quatre jours après, les PBMCs préalablement congelées sont décongelées et transférées dans un tube Falcon de 15 mL avec 10 ml de RPMI préchauffé à 37°C. Cette étape de décongélation est réalisée rapidement afin d'éviter l'action toxique du DMSO sur les cellules. Après lavage, les cellules sont comptées de manière précise sur cellule de Malassez (Figure 33). Une fois comptées, les cellules sont suspendues dans du RPMI à raison de 1 million de cellules/mL et mises en culture pendant 5 heures.

### **11.2. Coloration des cellules au CFSE**

Le Carboxyfluorescéine succinimidyl ester (CFSE) est un moyen de marquage fluorescent efficace des lymphocytes. L'intensité de fluorescence diminue de moitié à chaque cycle de division

lymphocytaire. La capacité du CFSE à marquer intensément les lymphocytes associée à sa faible toxicité cellulaire en font un marqueur idéal pour l'évaluation de la division cellulaire. Marqueur fluorescent constitué de fluoréscéine base, il est également compatible avec un large choix de fluorochromes utilisés en cytométrie en flux multi-couleurs. La population lymphocytaire (LCLs) marquée par le CFSE sera exclue et séparée des autres populations cellulaires (PBMC).

Les LCLs sont ficollées et lavées avec du PBS 1X, puis récupérées dans du RPMI/SVF à condition de  $10^6$  cellules/mL. Les cellules sont ensuite marquées par le CFSE utilisé à une concentration finale de  $7,5 \mu\text{M}$  (soit  $1,5 \mu\text{L}$  pour  $1 \text{ mL}$  de suspension cellulaire (LCL) et incubées au bain marie pendant 15 minutes à  $37^\circ\text{C}$ . Après incubation, les LCLs sont lavées 3 fois avec du RPMI et utilisées pour la stimulation des PBMCs. La concentration optimale de CFSE permettant une séparation correcte du marquage fluorescent en cytométrie en flux est déterminée en testant plusieurs concentrations de CFSE (figure 25).



**Figure 25 :** Exclusion des LCLs marquées au CFSE. Les PBMC sont sélectionnées sur le graphe de gauche en essayant d'éliminer le maximum de débris et de LCL (cellules de plus grande taille). Le graphe de droite permet d'éliminer toutes les LCLs CFSE+ afin de pouvoir étudier spécifiquement la réponse des PBMC contre l'EBV.

### 11.3. Conditions de stimulation des PBMCs :

Après mise en culture, les PBMCs sont recomptées et réparties dans des plaques de culture de 24 puits à raison de 1 million de cellules/mL/puits. Les cellules sont réparties dans des puits éloignés sur la plaque afin d'éviter toute contamination entre les puits. Ensuite dans les puits sont rajoutés des LCL et/ou des peptides, du SEB ou rien (Tab.5). Le puits ne contenant que de PBMCs représente le contrôle négatif et celui contenant le SEB représente le contrôle positif de la manipulation. Un pool de sept peptides optimaux est utilisé dans nos manipulations. Ce pool nous a gracieusement été offert par Mme le docteur Guislaine Carcelain du laboratoire d'Immunologie Cellulaire de l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Ce même pool a également été utilisé pour l'étude

de la réponse T, par la technique Elispot chez des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde dans notre laboratoire (Miceli et al., 2009). Il s'agit d'un mélange de peptides (9-mer) du cycle latent et de cycle lytique de l'EBV: EBNA-1, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, LMP-2, BZLF et BMLF. Pour chaque peptide, une solution mère est réalisée en remettant en suspension les peptides lyophilisés dans de l'eau contenant 10% de DMSO, servant de solvant, à une concentration de 40µg/ml. Les solutions mères de chacun des peptides sont stockées à -20°C. Chaque peptide est utilisé à une concentration finale de 1µg/ml dans le but de favoriser une réponse par les PBMCs. Notre témoin positif est le SEB (entérotoxine B staphylococcique), superantigène capable de stimuler fortement les PBMCs. Le SEB est utilisé à une concentration finale de 2µg/mL (soit 1 µl pour 500 µl de suspension cellulaire). Le ratio LCL:PBMC utilisé est de 1:1.

**Tableau 5 : Mise en culture des PBMCs avec différentes conditions de stimulation**

Puits	PBMC	LCL	Peptides	SEB
1	+			
2	+	+		
3	+		+	
4	+	+	+	
5	+			+

#### 11.4. Cytométrie en flux pour quantifier la réponse T anti-EBV :

La réponse T anti-EBV est mesurée par quantification de la production de CD107a, IL-2 et IFN- $\gamma$ . Le CD107a ou LAMP-1 (*lysosome-associated membrane protein-1*) est un marqueur d'activité cytotoxique qui se retrouve à la surface des cellules cytotoxiques (NK et CTL) lorsqu'elles sont activées. L'IL-2 est une cytokine de type Th1 produite par les lymphocytes activés et stimule la prolifération des cellules effectrices. Sa production est le reflet d'une activation de la réponse immunitaire adaptative. L'IFN- $\gamma$  est une cytokine de type Th1 produite par les lymphocytes T et les cellules NK et possède des propriétés antivirales et antitumorales. L'IL-2 et l'IFN- $\gamma$  sont quantifiées en intracellulaire par cytométrie en flux.

Dix µL d'anticorps (Ac) anti-CD107a couplé au fluorochrome FITC est rajouté dans les cinq puits. A la surface membranaire, le CD107a est alors accessible à l'Ac correspondant avant d'être réinternalisé (Aktas et al., 2009 ; Betts et Koup, 2004). Au même moment que le rajout de l'Ac anti-CD107a, la Monensine ou « Golgi-Stop » (0,7µL/million de cellules) et la Brefeldin A

(10<sup>6</sup>ig/mL) sont rajoutées dans tous les puits. La Brefeldin empêche l'exocytose des cytokines produites lors de l'activation des cellules effectrices et la Monensine empêche le processus de transport intracellulaire des CD107a (Alter et al, 2004). Après 12h d'incubation (*overnight*), les cellules de chaque puits sont transférées dans des tubes de cytométrie en flux et les cellules sont lavées avec 2 mL de tampon PBS-BSA1% et centrifugées. Après élimination du surnageant, un marquage intracellulaire est réalisé en utilisant une solution de lyse et une solution de perméabilisation afin de permettre aux Ac d'entrer dans les cellules et d'accéder aux cytokines dont la sécrétion est bloquée. Après incubation de 9 minutes dans le tampon de perméabilisation, un lavage des cellules est effectué dans du PBS-BSA1%. Le surnageant est éliminé et les Ac suivants sont rajoutés : anti-IL2-PE (10 $\mu$ L/tube), anti-IFN $\gamma$ -APC (5 $\mu$ L/tube), anti-CD3-APC-H7 (5 $\mu$ L/tube), anti-CD8-PCP.Cy5.5 (10 $\mu$ L/tube) et anti-CD4-PE-CY7 (5 $\mu$ L/tube). Le choix d'un marquage intracytoplasmique au lieu d'un marquage membranaire des CD3 et CD8 est justifié par la régulation négative et donc la réinternalisation de ces molécules après activation cellulaire (Betts et Koup, 2004). Enfin, après une incubation de 30 min à 4°C à l'obscurité, les cellules sont lavées et 100  $\mu$ L de PFA 1% sont rajoutés afin de fixer les cellules avant de les passer au cytomètre pour quantifier leur production.

### **11.5. Technique Elispot:**

Afin de rechercher un déficit spécifique de la réponse lymphocytaire T anti-EBV chez les enfants atteints du LH-EBV +, un test elispot a aussi été effectué. Il permet de quantifier les lymphocytes T activés par des antigènes spécifiques anti-EBV par la quantification de production de l'interféron gamma grâce à l'apparition de spots au fond du puits.

Les PBMCs sont décongelés à 37°C dans 5 ml de RPMI/50%SVF, puis immédiatement centrifugés 10 min à 1500 rpm à température ambiante. Après élimination du surnageant, les PBMCs sont resuspendus dans du milieu AIM-V puis laissés 3h dans une étuve à 37°C, 5%CO<sub>2</sub>. Un comptage est ensuite fait, comme décrit précédemment. Elles sont ensuite centrifugées et reprises en milieu AIM-V pour obtenir 2,5 millions/ml. Des barrettes de quatre puits coatées avec un anticorps anti-interféron gamma sont utilisées pour la technique. Les barrettes ainsi que les réactifs utilisés (hormis les peptides) font partis du Kit T-Spot.TB (Oxford immunotech, TB-300). Pour chaque patient, il y a deux contrôles, un négatif contenant 100  $\mu$ l d'AIM-V et 100  $\mu$ l de cellules soient 250000 cellules et un positif contenant 250000 cellules et 100  $\mu$ l de phytohémagglutinine (PHA). Il y a également deux puits test contenant 250000 cellules et 100 $\mu$ l du pool de peptides EBV optimaux décrit plus haut.

Le lendemain, six lavages de 400 µl de PBS 1X sont effectués puis après séchage, 50 µl d'anticorps monoclonal murin anticytokine IFN-g conjugué à la phosphatase alcaline 1X est ajouté. Le tout est incubé 1h à 4°C. Il y a à nouveau six lavages de 400 µl de PBS 1X et séchage puis ajout de 50 µl de solution BCIP/NBTPlus. La révélation dure 7 min puis deux fois cinq lavages à l'eau distillée, séparés par un séchage, sont effectués. Une fois la barrette bien sèche, la lecture se fait sur le BioReader 5000 PRO-XF (BioSys).

La réponse lymphocytaire T effectrice vis-à-vis du virus EBV est considérée positive si le nombre corrigé de spots (Cellules activées par le pool de peptide EBV – Cellules non activées) est supérieur ou égal à 10 spots / 250000 PBMC et si l'index est supérieur ou égal à 2. L'index étant le rapport du nombre de spots dans les cellules activées par le pool de peptide EBV / nombre de spots dans les cellules non activées.

## **12. Tumorothèque et Recherche de l'EBV *in situ***

Une tumorothèque est réalisée pour les patients inclus dans EURONET, elle est coordonnée par le Professeur Aurore Coulomb (CHU Trousseau) et le Dr Sabah Boudjemaa et leur équipe de recherche au service d'anatomie et cytologie pathologiques. Elles ont pu déterminer la présence de l'EBV par deux techniques : l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*. L'immunohistochimie a permis de montrer l'expression de la protéine LMP1. L'hybridation *in situ* avec les sondes EBERs met en évidence le génome de l'EBV au sein des cellules infectées. Sont aussi analysés dans le ganglion et/ou dans la moelle, *in situ* les sous-populations lymphocytaires en utilisant les anticorps suivants : anti-CD15 et anti-CD30 pour marquer les cellules tumorales, anti-CD20 pour les cellules B et anti-CD3 pour les lymphocytes T et anti-CD68 pour les macrophages.

## **13-Méthodes statistiques**

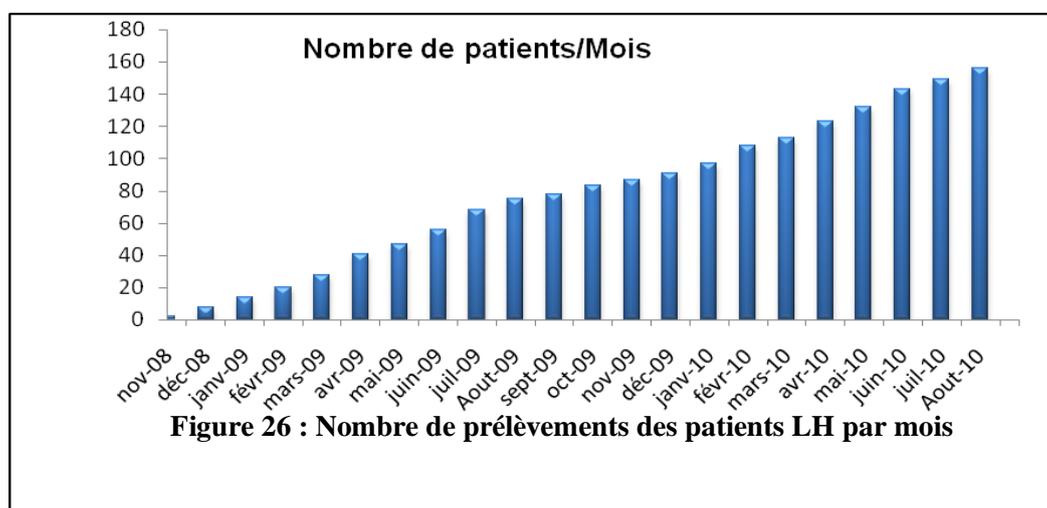
La description et la comparaison des variables d'intérêt sont réalisées avec les techniques statistiques usuelles suivantes : test de Khi-deux et test exact de Fisher pour les comparaisons de proportions, test de Student et tests non paramétriques de Kruskal Wallis pour les comparaisons d'une variable quantitative en fonction d'une variable qualitative en 2 classes,. L'étude des corrélations entre les variables quantitatives d'intérêt est réalisée par le test non paramétrique de Spearman. Le logiciel utilisé est Epiinfo.

## RESULTATS

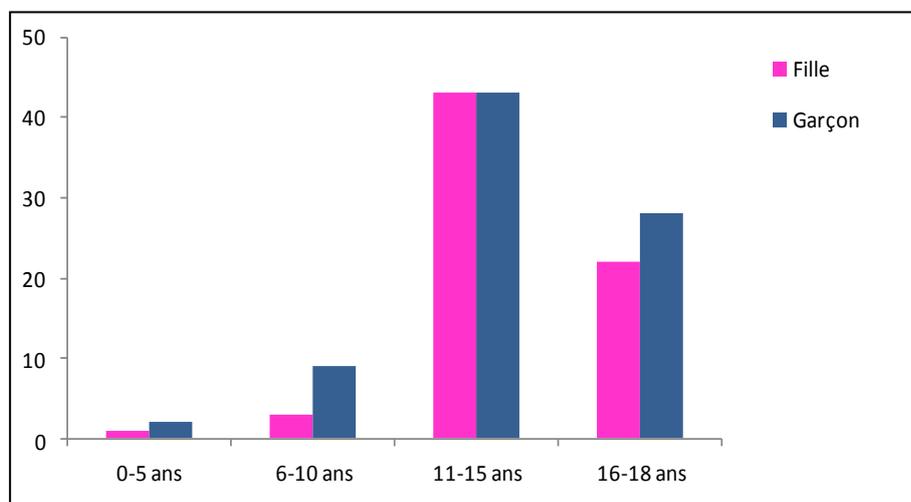
Certains déficits immunitaires augmentent le risque de LH tels que le déficit immunitaire commun variable (DICV) ou le syndrome XLP. Cependant, leur prévalence n'a jamais été étudiée parmi des cas incidents de LH. Nous recherchons des défauts de l'immunité, favorisant la survenue de LH et/ou la réplication de l'EBV, comme facteurs de susceptibilité au LH de l'enfant. Notre étude est adossée au protocole Européen de traitement des LH de l'enfant, coordonné par J. Landman-Parker (CHU Trousseau). Il est proposé aux enfants atteints et à leurs parents de participer à l'étude lors de l'inclusion dans le protocole.

### A-Description de la population d'étude

Les prélèvements de 346 enfants, de novembre 2008 à Juin 2012, atteints de LH et de 528 de leurs (280 mères et 248 pères) parents sont acheminés à Bicêtre et analysés et/ou conservés. Notre population présentée ici est constituée des 155 premiers patients inclus, patients pour lesquels nous disposons de l'ensemble des données, cliniques, biologiques, leurs parents et de 19 témoins. La figure 1 illustre le nombre cumulé de patients reçu par mois jusqu'à ce seuil (figure 26).



L'âge médian de la population étudiée est de 13 ans, allant de 5 à 18 ans. La figure 27 montre la répartition sexe-âge des 155 enfants étudiés. Le nombre de garçons est plus élevé que celui des filles (M: 82 [53%], F: 73 [47%]) avec un sexe-ratio M / F de 1, 1 (Figure 27). Nous confirmons la prédominance masculine avant l'âge de 10 ans (M:11, F: 4). Les caractéristiques des témoins étaient: 12 garçons, 8 filles, l'âge médian est de 7 ans (2-16 ans).



**Figure 27: La répartition sexe-âge des 155 enfants atteints de LH**

### 1. Données cliniques

Les données des patients sont récupérées à partir de la base de données de l'essai EURONET à l'URC de l'hôpital Saint-Antoine. Cette répartition correspond à ce qui est attendu pour une population de LH de l'enfant (Tab.6) (Hasenclever D et Diehl V, 1998).

**Tableau 6 : Caractéristiques démographiques et cliniques des 155 patients LH**

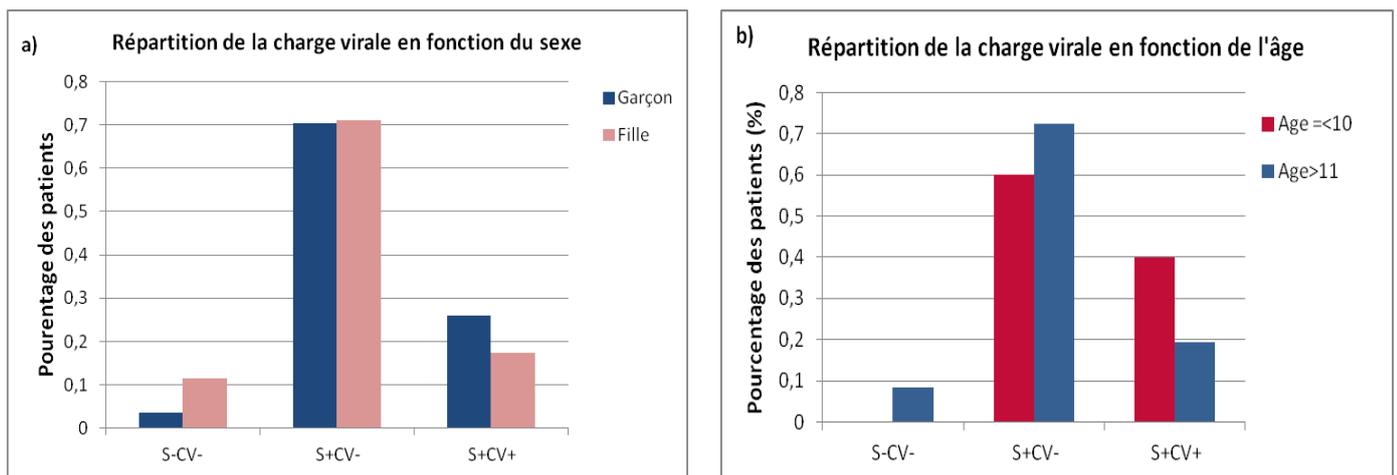
Catégorie	Nombre de patients (%)
Age (ans)	
<10	25 (16%)
>=10	130 (84%)
Sexe	
F	73 (47%)
M	82 (53%)
Stade (Ann-Arbor)	
I-II	88 (58%)
III-IV	65 (42%)
DM	2
Signes cliniques B	
Non	96 (62%)
Oui	59 (38%)
Hémoglobine (g/dl)	
<10,5	42 (27%)
>=10,5	113 (73%)
Globules Blancs/mm <sup>3</sup>	
<15000	118 (76%)
>=15000	37 (24%)
Vitesse de Sédimentation (mm/h)	
VS<30	39 (29%)
VS>=30	95 (71%)
DM	21
Albumine (g/l)	

<40	61 (40%)
>=40	91 (60%)
DM	3
<hr/>	
Groupes pronostiques	
TG1	55 (36%)
TG2	30 (19%)
TG3	70 (45%)

DM : donnée manquante

## 2. Sérologie et charge virale EBV

Les résultats de la sérologie et de la charge virale EBV sont disponibles pour 150 patients. Parmi l'ensemble des patients, 7% (11/150 patients) ont une sérologie EBV négative. Il s'agit de 8 filles (12-16 ans, âge médian 14 ans) et 3 garçons (12, 15 et 17 ans). Comme attendu, 93% de la population étudiée a une sérologie EBV positive (139/150 patients). Parmi eux, deux tiers (69 %, 96/139) ont une charge virale négative (<125 copies/mL). La charge virale est positive (>125 copies/mL de plasma) chez 31% des patients ayant une sérologie positive. Parmi ces 43 patients, 29 ont une charge virale élevée au dessus de 1000 copies /ml. Les distributions de charge virale ne diffèrent pas significativement entre les garçons et les filles ( $p=0,30$ ) (Figure a). Les enfants de moins de 10 ans ont plus souvent une charge virale élevée ( $\geq 500$ /mL) que ceux qui ont plus de 10 ans ( $p=0,03$ ) (figure b). ( $p$ -value calculée par Student's T-Test).

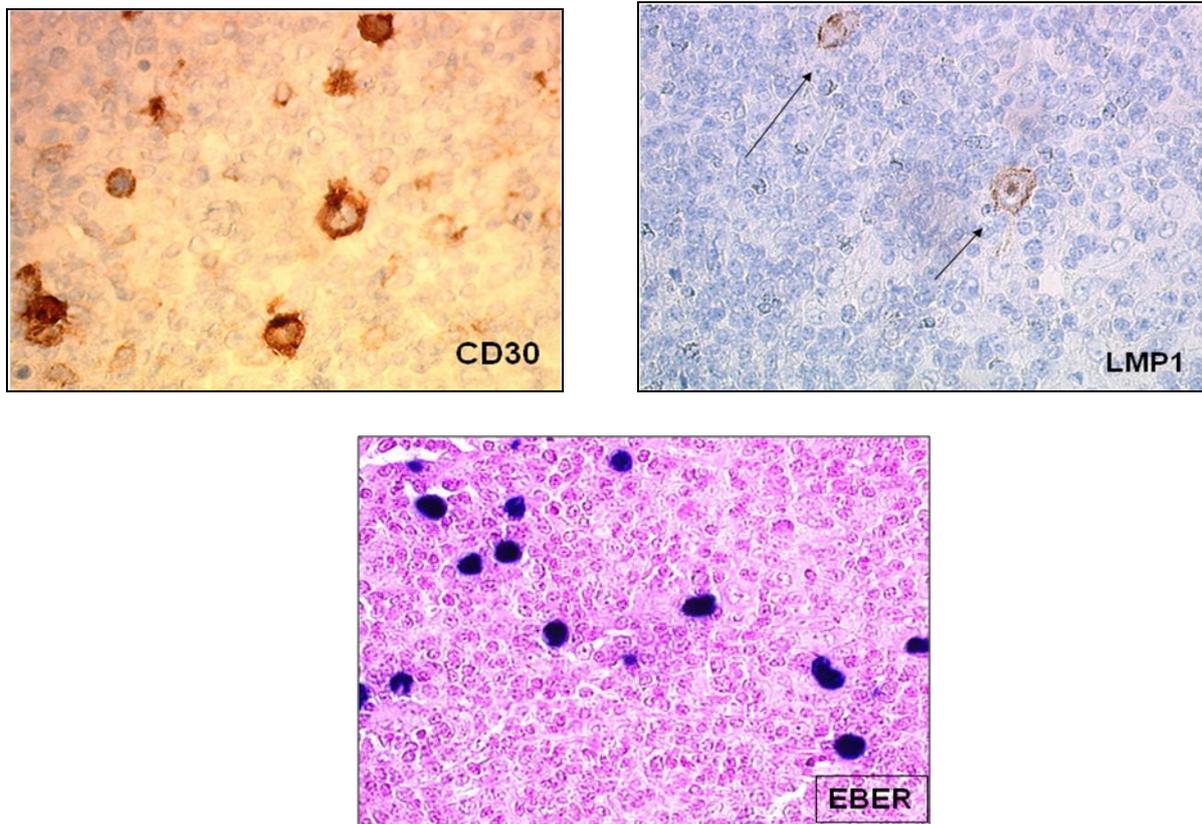


**Figure 27bis: Répartition de la charge virale EBV en fonction de l'âge (b) et du Sexe (a) de 150 patients LH**

## 3. Relecture histologique et recherche de l'EBV *in situ*

Les prélèvements histologiques qui sont réalisés et conservés dans les Hôpitaux concernés participant à l'étude sont relus (Dr Sabah Boudjemaa, Pr Aurore Coulomb, Trousseau). Nous avons participé à la relecture histologique dans le laboratoire d'anatomo-pathologie. La relecture a consisté à confirmer le diagnostic et à rechercher l'expression de l'EBV par hybridation *in situ* des

transcrits EBER et/ou par immunohistochimie (Ac anti-LMP1). Notons que pour conclure à l'association avec l'EBV, il est nécessaire que le virus soit détecté dans la majorité des cellules tumorales. Ces dernières sont définies par un marquage avec l'anticorps anti-CD30 (Figure 28).



**Figure 28 : Mise en évidence de l'EBV par immunohistochimie**

**Légende :** Les volumineuses cellules tumorales de LH (cellules de Reed Sternberg) expriment l'antigène CD30 et fixent l'anticorps anti-LMP1. L'hybridation *in situ* avec les sondes EBERs met en évidence l'ARN de l'EBV au sein des cellules infectées.

La relecture histologique est disponible pour 84 patients atteints de LH : 87% sont de type scléro-nodulaires (SN), 7% à cellularité mixte (CM) et 6% non spécifié (en raison principalement de petites biopsies à l'aiguille sur des adénopathies profondes). La proportion de garçon était très majoritaire parmi les CM (80% ; 4 Garçons/1 fille) et ces formes sont associées à un plus jeune âge (médiane 11,5, de 11 à 15). L'EBV est détecté *in situ* dans 23% des cas de LH. Les enfants atteints de LH-EBV+ se distinguent des LH-EBV- par un âge plus jeune (10 ans d'âge moyen versus 14 ans,  $p=3.10^{-4}$  (tableau 7). Ils sont aussi fréquemment des garçons (63%) et fréquemment de sous-type CM (40%).

**Tableau 7 : Comparaison des LH-EBV+ et EBV –**

	<b>Total</b>	<b>LH-EBV+</b>	<b>LH-EBV-</b>	<b>P</b>
N	84	19	65	
Sex-ratio (m/f)	43/41	12/7	31/34	0,24
Age moyen au diagnostic	13,5	10	14	3.10 <sup>-4</sup>
Type histologique (n=84)				0,90
Scléronodulaire	74	16	58	
Cellularité mixte	5	2	3	
Non spécifié	5			
Charge virale EBV	36			
CV <300 (copies /ml)	30	2	28	3.10 <sup>-3</sup>
CV >300 (copies/ml)	6	4	2	

*p-value est calculée par test de Chi-deux*

La corrélation entre la charge virale EBV et la détection *in situ* est étudiée chez 36/84 patients. Il y a une corrélation très forte entre détection de l'EBV *in situ* et la charge virale EBV élevée (3.10<sup>-3</sup>)

## B. Recherche de déficit immunitaire

Deux stratégies successives sont adoptées au cours de notre étude (Figure 29).

Pour les 83 premiers patients inclus, une étude virologique et immunologique très approfondie est menée systématiquement comportant : la sérologie et la charge virale EBV, la sérologie anti-tétanos, un immunophénotypage lymphocytaire complet et un dosage des immunoglobulines et des sous-classes d'IgG.

Dans une deuxième approche nous avons étendu l'analyse à l'ensemble des 395 patients avec un dépistage de déficit immunitaire basé sur le dosage des immunoglobulines. Une exploration immunologique approfondie est réalisée uniquement chez les patients présentant une hypogammaglobulinémie et/ou une charge virale EBV élevée.

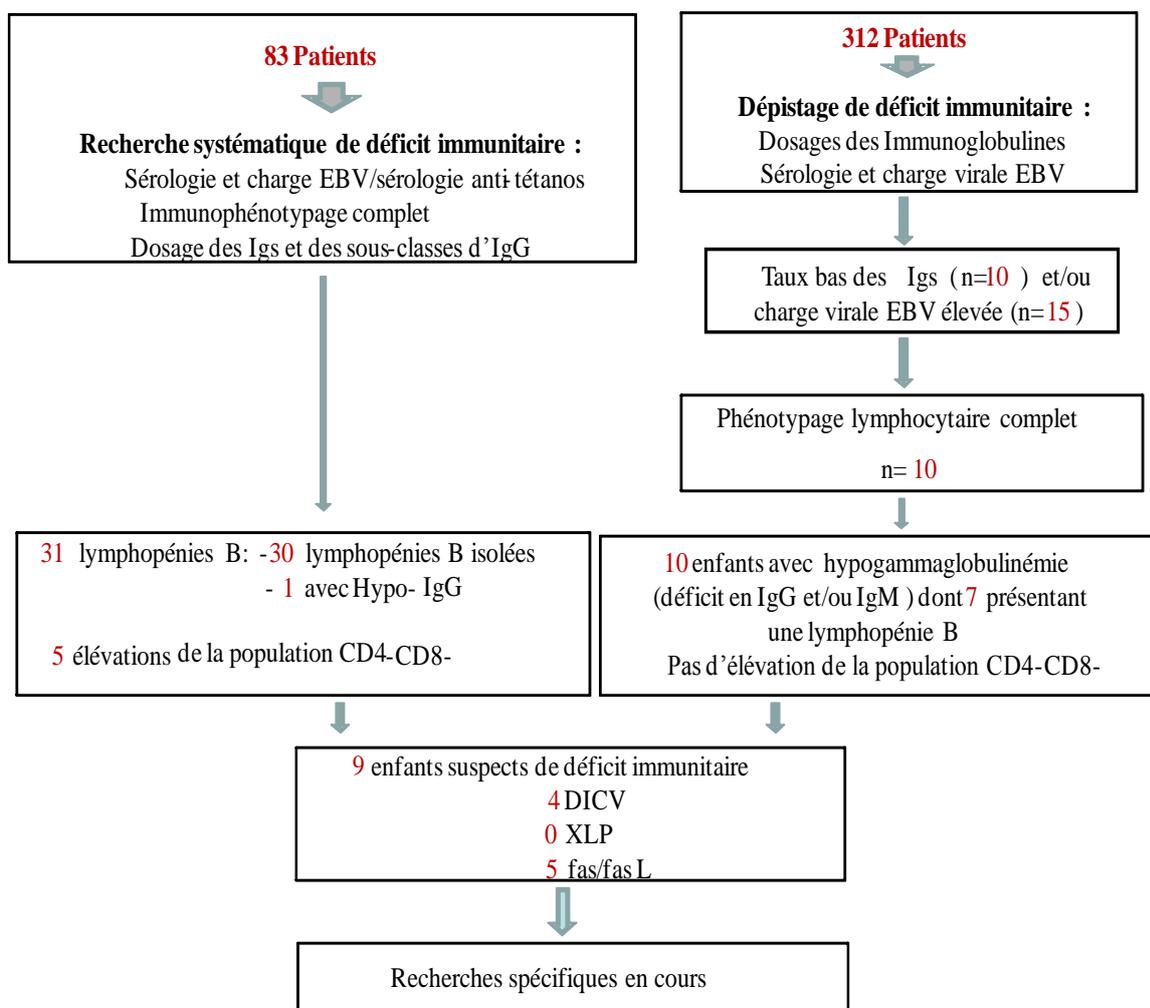


Figure 29 : Stratégies adoptées pour la recherche de déficit immunitaire chez les patients LH

## I/ Approche systématique sur les 83 premiers patients

Chez les patients, nous avons observé une diminution significative par rapport aux sujets témoins du nombre de lymphocytes totaux, (Patients ; 32 parmi les 83 patients (39%) (Médiane 1384 cellules/ $\mu$ l, extrêmes 270-3190 cellules/ $\mu$ l ; controles ; 2880 cellules / $\mu$ l, médiane 1560 cellules / $\mu$ l, extrêmes 1630-4730,  $p < 0,0001$ ), de lymphocytes B totaux (31 parmi les 83 patients (37%) (Médiane 124 cellules/ $\mu$ l, extrêmes 14-391,  $p < 0,0001$ ), des lymphocytes T totaux (20 parmi les 83 (24%) patients, médiane 1015 cellules/ $\mu$ l, extrêmes 67-2340,  $p < 0,0001$ ) et des lymphocytes NK (32/83 patients (38%), médiane 95 cellules / $\mu$ l, extrêmes 9-516) (Tableau 8).

**Tableau 8 : Distribution des populations lymphocytaires chez les 83 premiers patients LH et les témoins (test de student)**

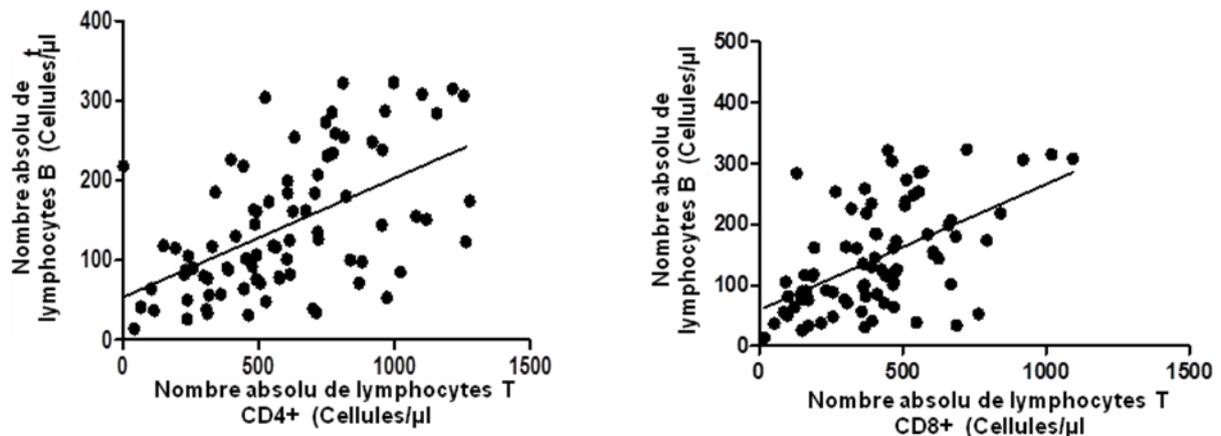
	Norme (cellules/ $\mu$ l)	Cas n=83		Témoins n=19		P-value
		médiane (cellules/ $\mu$ l)	N %<norme	Médiane (cellules/ $\mu$ l)	N %<norme	
<b>Lymphocytes totaux</b>	1200 – 4000	<b>1384</b> <b>(270– 3190)</b>	32 (39%)	2880 (1630 – 4730)	0 (0%)	$2.10^{-7}$
<b>Lymphocytes B</b>	100 – 500	<b>124</b> <b>(14– 391)</b>	31 (37%)	477 (132 – 1392)	0 (0%)	$10^{-5}$
<b>Lymphocytes T</b>	600 – 2400	<b>1015</b> <b>(67 – 2340)</b>	20 (24%)	2047 (1162 – 2952)	0 (0%)	$10^{-7}$
<b>Lymphocytes T-CD4</b>	300 – 1400	<b>577</b> <b>(41 -1278)</b>	13 (16%)	925 (632 – 2672)	0 (0%)	$3.10^{-4}$
<b>Lymphocytes T-CD8</b>	200 – 900	<b>394</b> <b>(19 – 1094)</b>	21 (25%)	611 (210 – 1728)	0 (0%)	$4.10^{-3}$
<b>Lymphocytes T- DN CD4-/CD8-(%)*</b>	$\leq 2,5$	1,4 (0,4 – 4,2)	<b>&gt;norme</b> 5 (7%)	1,46 0, 7 - 2, 7	<b>&gt;norme</b> 0 (0%)	
<b>Lymphocytes NKT (%) TCRV<math>\beta</math>11+/TCR-V<math>\alpha</math>24+*</b>	$> 0$ (0,18 $\pm$ 0,08)	0,8 (0,4 – 1,4)	0 (0%)	0,8 0, 5 – 1, 1	0 (0%)	NS
<b>Lymphocytes NK</b>	90 – 600	<b>95</b> <b>(9 – 516)</b>	32 (38%)	177 (50 – 449)	3 (15%)	0,03

\* : réalisé pour 70 sujets

### 1. Caractérisation des lymphopénies B

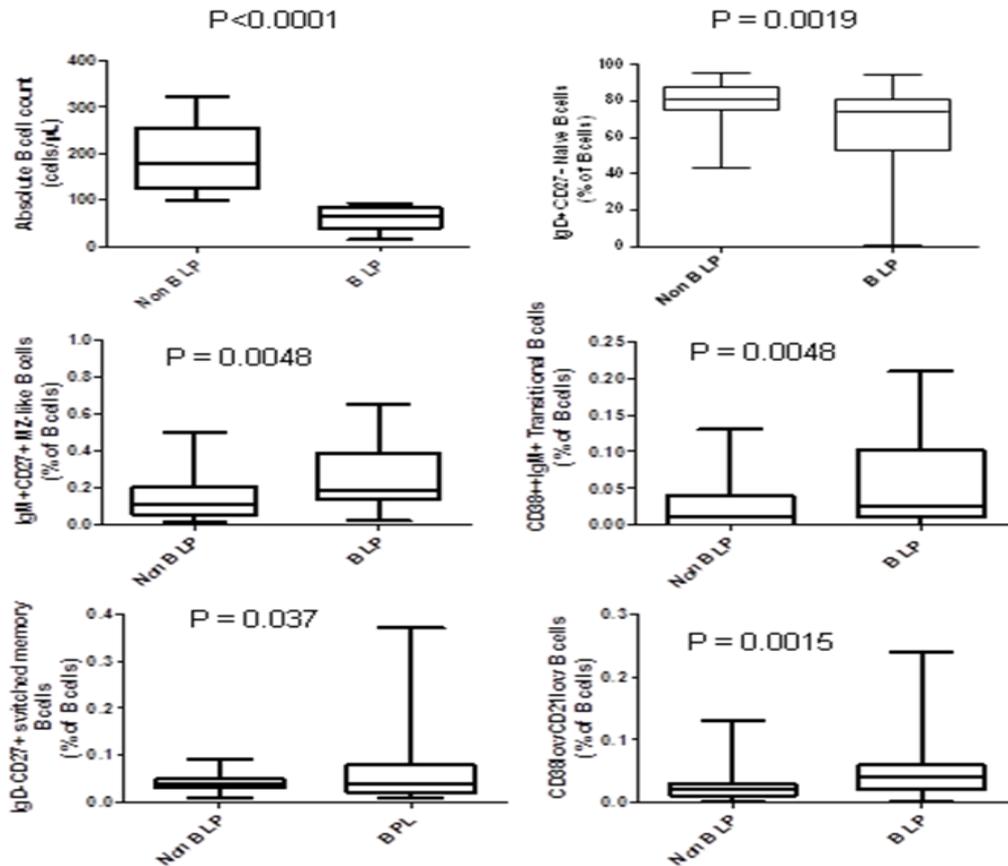
Afin de caractériser les patients lymphopéniques B et de rechercher si cette lymphopénie était liée au LH lui-même ou si elle correspondait à un déficit immunitaire inné, nous avons exploré plus avant les 31 patients lymphopéniques B. Selon les valeurs normales adoptées avec l'âge (Comains

Bitter et al, 1997), une lymphopénie B était détectée chez 31/83 patients (37%) ((Médiane 64 cellules/ $\mu$ l, extrêmes 14-92) (tab2). Ces anomalies quantitatives de lymphocytes B n'étaient pas corrélées avec l'âge ( $p = 0,19$ ) ou le sexe ( $p = 0,19$ ). La lymphopénie B était accompagnée d'une lymphopénie T dans 15 de ces cas : Le nombre absolu de lymphocytes B dans le sang périphérique était fortement corrélés avec le nombre absolu de lymphocytes T CD8 + ( $r^2 = 0,34$ ,  $p < 0,0001$ ) et avec les lymphocytes T CD4 + ( $r^2 = 0,29$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figure 30).



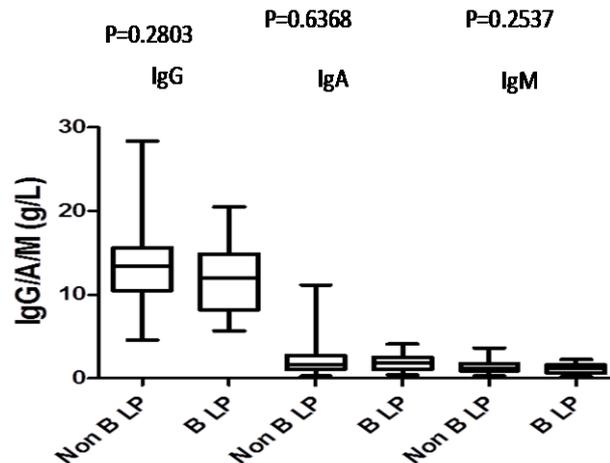
**Figure 30: Corrélation entre lymphocytes B et lymphocytes T CD4 et CD8**

Pour mieux caractériser ces patients nous avons d'abord comparé les sous-populations B des patients PLB et des patients non lymphopéniques (P non LB). Le pool des lymphocytes B périphériques (CD19+) est constitué de plusieurs sous-populations fonctionnelles distinctes, comportant les lymphocytes B naïfs ( $IgD^{high}IgM+CD27-$ ), les lymphocytes B transitionnels ( $CD19+IgM+IgD+CD27+$ ), les lymphocytes B marginaux ( $CD19+CD38^{high}IgM^{high}CD27-$ ), les lymphocytes B mémoires tardifs (*switchés*) ( $CD19+IgD-IgM-CD27+$ ), plasmoblastes ( $CD19+CD38^{high}IgM-$ ) et les lymphocytes B  $CD19+CD38^{low}CD21^{low}$  (Claudia Wehr et al 2008). L'analyse de la répartition des sous-populations lymphocytaires B a révélé que les patients PLB avaient en proportion comme en nombre absolu moins de lymphocytes B naïfs que les patients non LB (figure31) ( $p=0,008$ ). Malgré une certaine hétérogénéité entre les patients, la proportion des quatre sous-populations de lymphocytes B non naïfs analysées étaient augmentées chez les patients PLB par rapport aux P non LB : lymphocytes transitionnels ( $p=0,03$ ), lymphocytes B marginaux ( $p=0,01$ ), lymphocytes B *switchés* ( $p=0,11$ ) et lymphocytes B  $CD38^{low}CD21^{low}$  ( $p=0,01$ ). Les plasmablastes  $CD38^{high}IgM-$  étaient à peine détectables dans les deux groupes de patients (données non présentées).



**Figure31 : Distribution des sous-populations lymphocytaires B chez les patients ayant ou non une lymphopénie B**

Globalement, les taux IgG, IgA et IgM ne diffèrent pas entre les patients LB et non LB suggérant que la commutation isotypique, la différenciation des cellules plasmatiques et la production d'Ig ne sont pas globalement affectées chez les patients lymphopéniques (figure 32). A noter, les taux d'IgG anti-tétanos étaient normaux dans tous les cas (> à 0,15 µl/mL).



**Figure32 : Taux des immunoglobulines (Ig) chez les patients ayant ou non une lymphopénie B**

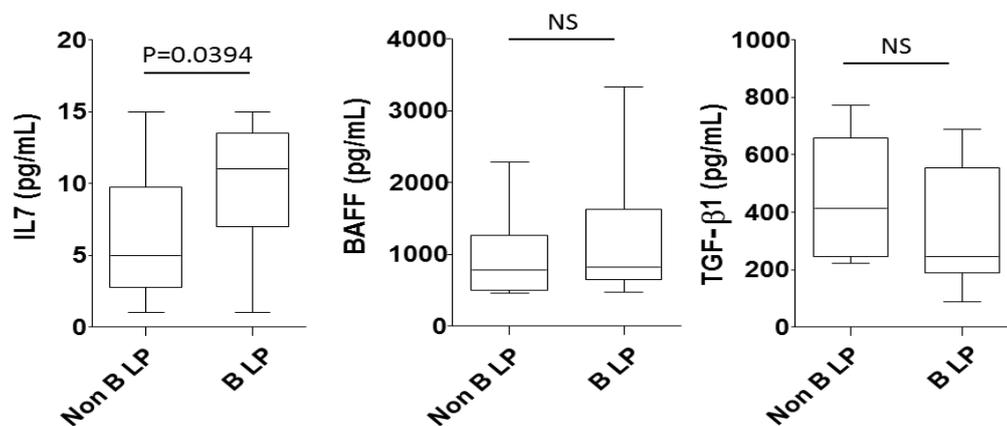
Par contre, à l'échelle individuelle, la lymphopénie B était accompagnée d'une hypogammaglobulinémie dans un seul cas sur les 31 patients lymphopéniques. Ce patient (P32) avait un nombre de lymphocytes B à 77 / $\mu$ L, un taux d'IgG égal à 6,0 g/l, VN : 7-16, Tab.9), un pourcentage des cellules B mémoires switchées diminué à 1% (VN : 6,5%- 29,2%), un pourcentage normal de lymphocytes B marginaux à 18% (VN: 7,2-30,8%), des lymphocytes CD21low indétectables (VN : 1,1%- 6,9%). Ceci le rend fortement suspect de déficit immunitaire de type commun variable (DICV). Globalement la prévalence de DICV dans notre étude est de 1% ce qui est très supérieur à la prévalence rapportée en population générale 1/25000 (0,004%) décrits dans la littérature. Ceci tend à appuyer notre hypothèse de départ d'une augmentation de la prévalence de DICV chez les LH. Ceci nous a incités à approfondir notre étude tout en modifiant notre stratégie de recherche de déficit immunitaire avec un *screening* des patients suspects basés sur les dosages d'immunoglobulines et non sur le phénotypage lymphocytaire (*cf infra*). Cependant, nous avons cherché d'abord à approfondir nos résultats concernant les lymphopénies B par des études complémentaires afin d'entendre de mieux comprendre leur physiopathologie.

**Tableau 9 : Description des patients lymphopéniques B (n=31)** un seul cas sur les 31 patients lymphopéniques avait une hypogammaglobulinémie. Ce patient (P32) avait un nombre de lymphocytes B à 77 / $\mu$ L, un taux d'IgG égal à 6,0 g/l, VN : 7-16, Tab.9), un pourcentage des cellules B mémoires switchées diminué à 1% (VN : 6,5%- 29,2%), un pourcentage normal de lymphocytes B marginaux à 18% (VN: 7,2-30,8%), des lymphocytes CD21low indétectables (VN : 1,1%- 6,9%) \* : Les valeurs normales sont adaptées à l'âge pour chaque sujet

Patients	Sexe	Age (an)	N Lym totaux (cellules/ $\mu$ l) (VN : 1200-4100)	N LB / $\mu$ l (VN: 100-500)*	N LT/ $\mu$ l (VN: 600-2400)*	LB naïfs %	mémoires tardives %	%CD21 (low) (CD21-/CD38-)	%Lym B transitionnels	%Lym B marginales	IgM (g/L) (VN: 0.4-2.3)*	IgG (g/L) (VN: 7-16)*	IgA(g/L) (VN: 0.7-4.0)*
P1	F	16	1890	53	1740	0.65	0,10	0,04	0,02	0,20	2,36	13,3	2,01
P5	F	12	870	90	546	0.726	0,07	0,05	ND	0,18	2,24	14,2	1,97
P6	M	15	1120	64	916	0.34	0,02	0,04	0,01	0,65	1,78	9,89	1,03
P14	F	15	550	56	406	0.743	0,05	0,03	0,15	0,18	0,63	13,9	1,89
P15	M	16	820	88	646	0.837	0,06	0,02	0,03	0,09	0,44	10,2	1,17
P17	F	14	1160	82	986	0.605	0,18	0,11	0,00	0,15	2,35	11,5	3,03
P23	M	18	1110	80	489	0.591	0,10	0,14	0,21	0,29	0,72	16,4	2,41
P26	M	17	940	79	744	0.554	0,01	0,05	0,14	0,43	0,51	8,21	0,56
P28	F	10	1280	48	783	0.50	0,15	0,24	0,01	0,30	1,88	20,5	2,8
P31	F	17	1090	57	718	0.50	0,06	0,05	0,02	0,38	0,81	11,9	2,17
P32	M	15	680	77	522	0.763	0,01	0,00	ND	0,18	0,6	6,0	1,04
P34	M	17	740	90	454	0.907	0,01	0,01	0,15	0,06	1,51	13,8	2,56
P42	F	17	690	33	484	0.776	0,07	0,02	0,00	0,19	1,47	8,6	1,53
P50	F	14	850	92	671	0.836	0,02	0,02	0,01	0,14	1,36	9,42	1,76
P53	F	14	1070	71	857	0.41	0,02	0,03	0,09	0,57	1,47	18,1	4,12
P54	M	12	2060	85	1651	0.326	0,04	0,01	0,14	0,48	1	10,7	2
P56	F	7	1750	71	1475	ND	ND	ND	ND	ND	1,69	18,9	2,53
P58	F	15	490	82	349	0.829	0,08	ND	0,01	0,05	1,22	14,9	2,88
P59	M	18	640	38	527	0.806	0,03	0,06	0,06	0,14	1,56	13,4	2,75
P64	M	9	1540	77	995	0.004	0,37	0,00	0,00	0,62	1,63	16,3	2,24
P71	M	13	1770	39	1410	ND	ND	ND	ND	ND	0,58	15,6	4,57
P79	F	13	560	87	390	0.78	0,04	0,05	0,02	0,14	1,15	13,1	1,86
P93	M	15	370	64	227	0.766	0,09	0,11	0,04	0,10	0,54	14,7	3,37
P94	F	16	600	41	468	0.945	0,02	0,06	ND	0,02	1,37	19,7	3,44
P104	F	16	270	37	190	0.817	0,01	0,02	0,06	0,02	0,66	11,2	2,04
P105	F	18	450	50	349	0.8	0,03	0,04	ND	0,14	2,47	16,4	1,49
P106	M	11	1640	34	1409	0.533	0,02	0,03	0,05	0,41	1,3	14,6	0,95
P113	F	9	520	26	385	0.753	0,07	0,03	0,00	0,06	1,43	15,9	0,73
P122	F	16	970	31	836	ND	ND	ND	ND	ND	2,33	13,6	2,72
P124	M	18	270	14	67	ND	ND	ND	ND	ND	0,47	17,4	3,6
P139	F	17	940	76	714	0.747	0,04	0,07	ND	0,20	1,64	11,3	1,85

Pour explorer davantage les mécanismes physio-pathologiques éventuel (s) de la lymphopénie B chez les patients LH, nous avons mesuré les concentrations plasmatiques d'**IL-7** (Interleukine-7), de **BAFF** (B cell Activating Factor belonging to the TNF family) et de **TGF- $\beta$**  dans un sous-groupe de 10 patients HL lymphopéniques et de 10 patients LH non lymphopéniques. L'**Interleukine-7 (IL-7)**, est un facteur de croissance des lymphocytes B. L'IL7 sécrétée par les cellules stromales induit une diminution de l'expression des molécules d'adhésion. Les cellules pré-B prolifèrent et se détachent des cellules stromales. A ce stade, les cellules pré-B n'ont plus besoin du contact direct avec les cellules stromales mais continuent à avoir besoin de l'IL-7 pour leur croissance et leur maturation (Gérard et Marie-Paule Lefranc 2001). **BAFF** joue, avec son récepteur BR3, un rôle très important dans la différenciation et la maturation et la survie des LB (transitionnels, LB ZM). Son absence provoque un arrêt du développement des LB au stade LB T1 et un défaut des LB T2 et matures (Schiemann et al, 2001). Un blocage de sa liaison à son récepteur aboutit à la diminution des LB ZM (Gross et al, 2001). **TGF- $\beta$**  «*Transforming growth factor*» *beta* est un inhibiteur de prolifération cellulaire peut à la fois bloquer la prolifération et induire l'apoptose de certaines cellules B.

Les concentrations plasmatiques de l'IL-7 sont plus élevés chez les patients lymphopéniques que chez les non lymphopéniques ( $p=0,04$ ) (figure 33) ce qui traduit un mécanisme de compensation et exclut le fait que la lymphopénie B résulte d'un défaut d'IL-7. BAFF ne diffère pas significativement entre les deux groupes de patients ( $p=0,46$ ) (figure 33). De plus, nos données suggèrent que les taux sériques de l'IL7 et BAFF sont fortement corrélés avec le pool de lymphocytes B naïfs dans le sang périphérique. Ceci suggère que le pool des lymphocytes B naïfs est maintenu en partie par des mécanismes d'homéostasie. Enfin, les taux de TGF- $\beta$  tendent à être plus élevés chez les 10 patients non lymphopéniques que chez les lymphopéniques sans que la différence soit significative ( $p=0,23$ ). (P-value calculée par Student's T-Test).

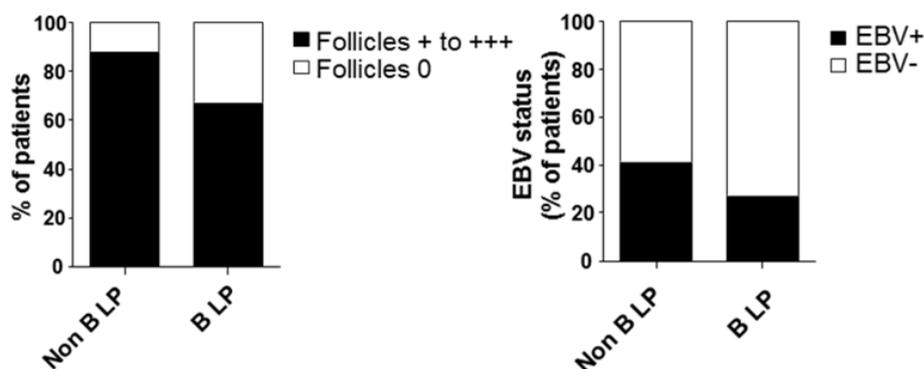


**Figure 33: Concentrations sériques de l'interleukine (IL)-7, de BAFF (B-cell-activating factor) et de TGF-β chez des patients Hodgkiniens lymphopéniques (BLP) et non lymphopéniques (Non BLP).**

### Données d'anatomo-pathologie et lymphopénies B

Une corrélation entre les données provenant de la relecture d'anatomo-pathologie est effectuée dans le but d'explorer *in situ* les populations lymphocytaires B des ganglions et de la moelle osseuse des patients lymphopéniques B et de la comparer aux patients non lymphopéniques. Au total, 24 patients sont analysés à la fois en anatomo-pathologie et en cytométrie de flux dans le sang périphérique.

Globalement la lymphopénie B n'est pas corrélée avec la morphologie que ce soit le sous-type histologique, la quantité de cellules tumorales et la présence de nécrose. Il n'y a pas non plus de différence significative entre l'estimation semi-quantitative du nombre de lymphocytes B *in situ* et le nombre de lymphocytes B dans le sang périphérique. Par contre, le nombre de lymphocytes B circulants est corrélé avec la présence de l'EBV *in situ* (<0,05) (figure34). Les patients lymphopéniques ont moins souvent un LH associé à l'EBV que les patients non lymphopéniques.



**Figure34 : Caractéristiques histologiques et lymphopénie B**

### **Lymphopénie B et facteurs pronostiques de LH**

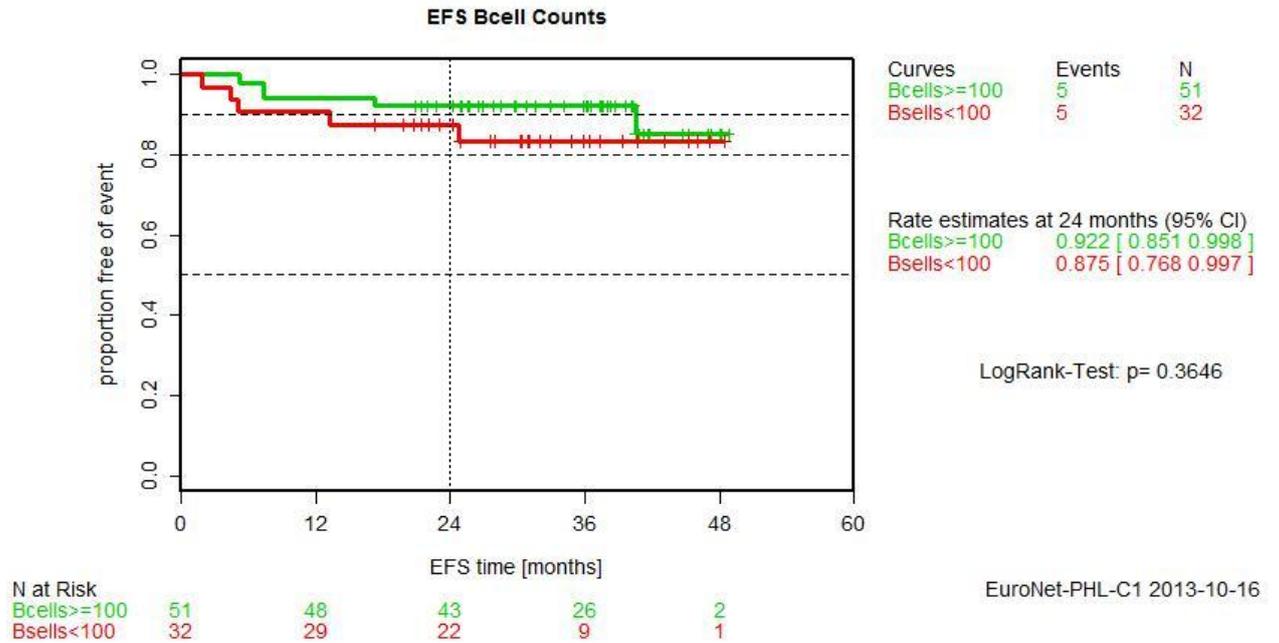
Ces anomalies quantitatives des lymphocytes B ne sont pas corrélées avec l'âge ou le sexe mais avec les facteurs pronostiques péjoratifs de LH que sont le stade avancé, la présence de signes cliniques inflammatoires (signes B) et une hémoglobine abaissée (<10.5g/dL) (Tableau10). Ces résultats sont présentés en analyse univariée. Dans le cadre de la collaboration avec le Pr Hasenclaver une analyse multivariée sera menée. Il y a aussi une tendance vers plus de rechutes parmi les patients lymphopéniques B ( $p=0.12$ ). Les courbes de survie sans évènement sont produites par l'équipe de statistique du protocole EURONET (Pr Hasenclaver, Leipzig) et vont être prochainement actualisées. Avec un nombre plus élevé d'évènements, la puissance de l'analyse pour détecter une différence sera améliorée. Pour l'instant ces courbes ne mettent pas évidence de différence significative entre les deux groupes (figure35).

**Tableau 10 : Corrélation entre Lymphopénie B et facteurs pronostiques de LH**

		Nombre des patients	Lymphocytes B	P=
Age (années)	<=10	14	173.14 (101.49)	0,22
	>10	69	136.78 (81.06)	
Sexe	F	42	135.45 (84.96)	0,42
	M	41	150.56 (85.94)	
Stade (Ann-Arbor)	I-II	37	169.72 (82.24)	<b>0,004</b>
	III-IV	35	115.42 (70.36)	
Signes cliniques B	Non	47	158.63 (86.34)	<b>0,033</b>
	Oui	23	116.69 (69.72)	
Hémoglobine (g/dl)	<=10,5	22	112.90 (62.85)	<b>0,024</b>
	>10,5	61	153.73 (90.02)	
Globules Blancs/mm <sup>3</sup>	<15000	64	140.9 (87.74)	0.67
	>=15000	19	149.68 (78.16)	
Vitesse de Sédimentation (mm/h)	VS<=30	15	170.4 (92.45)	0.18
	VS>30	57	134.70 (83.26)	
Albumine (g/l)	<=40	39	136.17 (82.97)	0.38
	>40	38	153.28 (87.98)	
Charge virale EBV	<125	45	136.28 (79.2)	0.27
	>125	28	160 (93.89)	
Groupes pronostiques (TG)	TG1	30	177.36 (88.85)	<b>&lt;0.05</b>
	TG2	17	157.35 (83.38)	
	TG3	36	107.38 (69.96)	
Rechute	Non	74	150.1 (90.1)	0.12
	Oui	9	102.8 (31.8)	

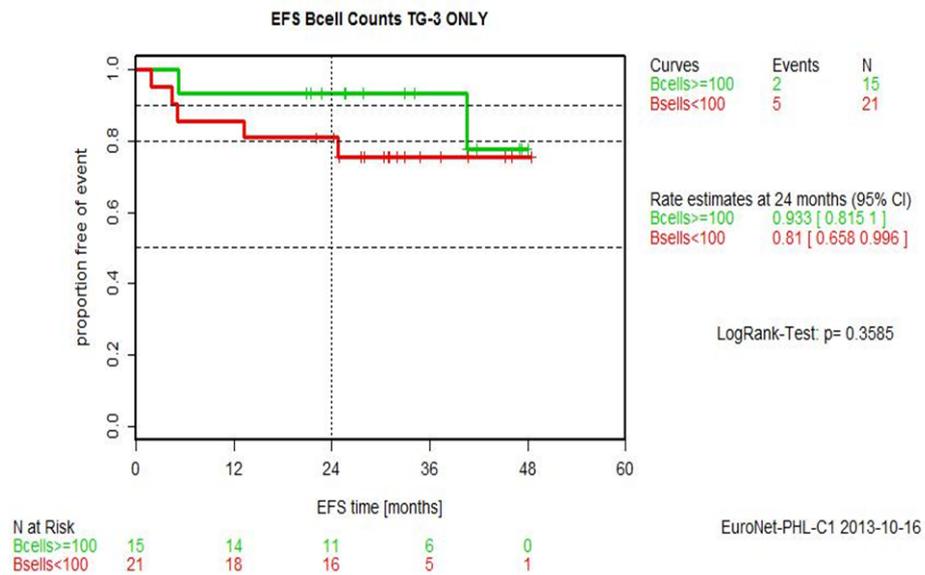
Figure35 : Survie sans progression selon le nombre de lymphocytes B au diagnostic de LH

A) Chez tous les patients



B) Chez les patients de mauvais pronostic seulement, traités de façon homogène

## EFS TG-3 ONLY



## Evolution des lymphopénies B au cours du suivi

Des prélèvements de contrôle sont demandés pour tous les patients lymphopéniques à distance du diagnostic de LH pour préciser l'évolution des anomalies quantitatives et ou qualitatives des lymphocytes. Chez 6 patients en rémission complète depuis 2 ans après le traitement, nous avons observé une normalisation de la numération des lymphocytes B périphériques et de la distribution des sous-populations (figure 36). Cela montre que les anomalies au sein de pool de cellules B dépendent de facteurs liés au HL et non à un déficit immunitaire inné.

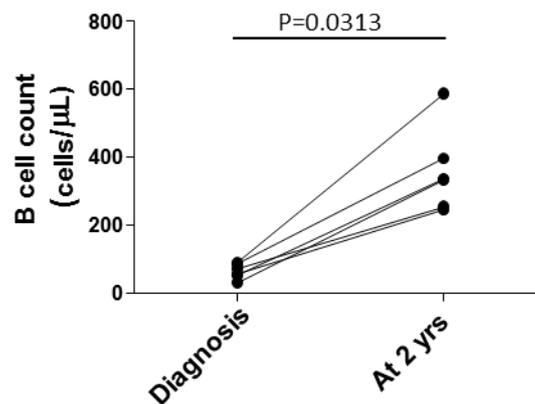


Figure 36: Evolution des lymphocytes B de 6 patients LH lymphopéniques B au diagnostic

## Conclusion

Au total, les lymphopénies sont un facteur pronostique connu de LH. Il s'agit de façon plus marquée de lymphopénies B. Elles sont fortement associées aux autres facteurs pronostiques connus de LH. Quand elles sont isolées, elles se corrigent à distance du diagnostic. La recherche de profil cytokinique associé à ces lymphopénies (TGF, BAFF, IL-7) n'a pas permis de mettre en évidence de mécanisme physiopathologique simple pour expliquer ces lymphopénies. Ces résultats sont illustrés dans un article en cours de publication dans Hématologie (Voir annexes). Ils ont été présentés au symposium international sur les lymphomes de Hodgkin en octobre à Cologne (Allemagne), la copie du poster figure ci-après. Un article reprenant l'ensemble des résultats présentés sur la caractérisation des lymphopénies B est en cours de finalisation, pour soumission dans une revue internationale. Il sera transmis au jury d'ici la date de soutenance, la page de titre et de résumé est présentée ci-après (Voir annexes).

## 2. Analyse des populations lymphocytaires T

Sont analysées les populations de lymphocytes T (CD3+) totaux, lymphocytes T CD4+, lymphocytes T CD8+, lymphocytes TCR $\gamma/\delta$ + et TCR $\alpha/\beta$ +, ainsi que les cellules NKT. Les résultats sont exprimés en nombre et/ou pourcentage en fonction de l'âge. **Afin de rechercher un déficit de type XLP, un déficit des lymphocytes de type NKT** est recherché : il est défini par l'absence totale des cellules NKT (TCRV $\beta$ 11+/TCRV $\alpha$ 24+) (Benoit Pasquier et al, 2005). Nous avons analysé les lymphocytes NKT chez les patients de sexe masculin uniquement. Aucun déficit évocateur de XLP n'est détecté chez les patients LH (médiane 0,9%, extrêmes 0,4 - 1,4%, n = 37). Des études moléculaires complémentaires à la recherche de mutation de SAP ont été menées pour 4 patients LH pour lesquels un déficit immunitaire semblait probable (déficit en lymphocytes B mémoires *switchés* avec un taux bas des IgG). Le séquençage du gène SAP sur l'ADN génomique de ces 4 patients LH B+, smB-, CD21 normal et IgM+/CD38+ augmentés, n'a pas permis de mettre en évidence de mutation.

**Afin de rechercher un éventuel déficit immunitaire de type ALPS, une expansion des lymphocytes T double négatifs (DN) CD4-/CD8-** est recherchée par cytométrie en flux. Parmi les 83 patients atteints de LH, 78 n'avaient pas d'expansion des lymphocytes T doubles négatifs CD4-/CD8- (DN) dans le sang périphérique (<1,5% des lymphocytes totaux ou < à 2,5% des lymphocytes CD3+). Ces patients ont un pourcentage normal de lymphocytes T DN TCR $\alpha\beta$ +/CD4-/CD8- (médian 1,25%, extrêmes 0,4% - 2,4% de lymphocytes CD3+). Par contre, cinq patients ont un taux élevé de lymphocytes T DN (médian 3,38%, gamme 2,5% - 4,2% de lymphocytes CD3+). Chez ces patients, les pourcentages des lymphocytes T DN sont supérieurs à 2,5% dans les lymphocytes CD3+. Pour approfondir ce résultat, un déficit fonctionnel de la voie Fas/FasL est recherché par quantification de l'IL-10 et de FasL (plasma). Les résultats de ces analyses complémentaires ont permis d'exclure un déficit fonctionnel de la voie Fas/FasL (tableau 11).

**Tableau 11 : Patients ayant une expansion modérée des lymphocytes T doubles négatifs parmi 83 patients,**

Patients	Sexe	Age (an)	% de DN (CD4-/CD8-)	Cellules T (106/L)	T CD4 (106/L)	T CD8 (106/L)	Cellules B (106/L)	Cellules NK (106/L)	IgM (g/L)	IgG (g/L)	IgA (g/L)
P1	M	11	3,4	1687	1080	506	155	384	1,2	10,9	1,4
P2	F	14	4,2	960	430	468	106	231	1,49	16,3	3,09
P3	F	14	2,8	1080	604	363	135	198	1,0	16,1	2,4
P4	F	11	4	1294	375	588	184	219	1,88	15,7	2,01
P5	M	16	2,5	380	193	160	115	218	0,88	13,9	1,3

### 3 .Conclusion intermédiaire

Compte-tenu de l'impact du LH au diagnostic sur les populations lymphocytaires, nous n'avons pas pu affirmer de défaut qualitatif des sous-populations lymphocytaires évoquant les déficits immunitaires. Globalement parmi ces 83 premiers enfants analysés, aucun cas évocateur de XLP n'a été mis en évidence sur la base de la quantification des lymphocytes NKT, pour les 5 cas qui auraient pu évoquer un ALPS, les études complémentaires ont exclu ce diagnostic. Ces résultats avaient été présentés en 2009 à l'ASH et en 2010 à la SFH (Voir annexes). Un cas était suspect de DICV du fait d'une lymphopénie B et d'un dosage d'immunoglobuline abaissé. Nous avons alors choisi d'étendre notre étude à l'ensemble des patients inclus dans le protocole EURONET (cf infra) avec une stratégie différente visant à faire un premier screening à partir du dosage des immunoglobulines puis un immunophénotypage lymphocytaire complet pour les patients dont les valeurs d'immunoglobulines étaient abaissées.

## II/ Recherche systématique de déficit immunitaire chez 395 patients LH

Dans cette deuxième approche, une exploration immunologique approfondie est réalisée uniquement chez les patients présentant une hypogammaglobulinémie. Les différentes populations lymphocytaires sont analysées en se basant sur la classification de Wehr « Euroclass » (Wehr C et al, 2008) (cf introduction). Les dosages des immunoglobulines et de sous-classes d'immunoglobulines sont réalisés pour les 395 patients inclus dans l'étude. Sur toute la cohorte, nous avons donc identifié 6 patients potentiellement atteints de DICV soit, 1,5% (Tableau 12). Pour être sur que ce soit bien un DICV et non une conséquence de la

maladie, un contrôle à distance de celle-ci est demandé afin de redoser les IgG. Sur les 6 patients ayant une diminution des IgG, 2 ont, au contrôle, des IgG normales, 2 ont des IgG bas et sont donc fortement suspects de DICV et 2 n'ont pas pu être contrôlés car l'un est décédé et l'autre est en aplasie profonde après une rechute de sa maladie. De plus, un immunophénotypage est fait afin de quantifier les LT, LNK et LB ainsi que les sous populations de LB aussi bien lors du premier prélèvement que du prélèvement de contrôle.

Sur les 6 patients ayant une diminution des IgG au prélèvement initial, deux ont un DICV confirmé (P32 et P61), c'est-à-dire une baisse des IgG confirmée à distance de la maladie. Le patient 32 avait une diminution des lymphocytes totaux (lymphopénie), lors du premier prélèvement, qui s'est corrigée au prélèvement de contrôle et a une baisse des LB mémoires *switchés* sur les deux prélèvements. Il peut être classé selon Euroclass (cf page 37) comme b+, smB-, cd21<sup>norm</sup>, tr<sup>norm</sup>. Le patient 61 a une forte diminution des IgG contrôlée à distance de la maladie et une baisse des LB mémoires *switchés* qui s'est corrigée au prélèvement de contrôle. Il peut être classé selon Euroclass comme b+, smB+, cd21<sup>norm</sup>, tr<sup>norm</sup>. Deux patients (P147 et P190) sont suspectés d'avoir un DICV, mais ils n'ont pas été confirmés à distance de la maladie. Néanmoins leur phénotype est anormal. Le patient 147 a une lymphopénie B, une baisse des LB marginaux ainsi qu'une diminution des IgM. Il peut être classé selon Euroclass comme b+, smB+, cd21<sup>norm</sup>, tr<sup>norm</sup>. Le patient 190 a également une lymphopénie B, une baisse des LB *switchés*, des LB marginaux ainsi qu'une diminution des IgA et des IgM. Il peut être classé selon Euroclass comme b+, smB-, cd21<sup>norm</sup>, tr<sup>norm</sup>. Nous ne pouvons pas les reprélever, car l'un est décédé et l'autre est allogreffé. Enfin, les deux patients restants (P110 et P252) n'ont pas de DICV avéré car nous n'observons pas de baisse persistante des IgG. Néanmoins, le patient 110 a une baisse des LB marginaux au premier prélèvement et au contrôle. Le patient 252 avait une lymphopénie B au diagnostic qui s'est corrigée, mais conserve une baisse des LB marginaux et une augmentation des IgA. Ce phénotype anormal pourrait refléter un autre type de déficit immunitaire non DICV.

**Tableau 12 : Tableau récapitulatif des enfants inclus dans LH-EPI suspects de déficit immunitaire.**

Voici les 6 patients avec une diminution des IgG au premier prélèvement. Sont présentés les résultats des dosages AGM, le nombre de lymphocytes totaux, le pourcentage de LB et dans cette population, le pourcentage de LB mémoires switchés, de LB marginaux et de LB naïfs, au premier prélèvement et au contrôle, ainsi que les valeurs de références (Normes) et leur statut vis-à-vis du DICV.

	Age (ans)	Sexe	Lymphocytes totaux (CD45 <sup>+</sup> ) (10 <sup>6</sup> /L)	LB (CD19 <sup>+</sup> ) (%)	LB mémoires switchés (CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> ) (%)	LB marginaux (CD27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> ) (%)	LB naïfs (CD27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> ) (%)	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	Déficit immunitaire
<b>Normes</b>			1200 – 4100	7 – 24	6,5 - 29,2	7,2 - 30,8	49 – 100	6,5 – 12,2	0,5 – 1,6	0,5 – 1,6	
<b>Patients</b>											
<b>32</b>	15	M	680	11,3	0,9	18,3	80,2	6,1	1	0,6	DICV
<b>Contrôle 32</b>	18		1304	17	5,3	5,6	86,4	5,4	0,9	0,5	
<b>61</b>	15	M	1960	7,4	1	15,6	82,8	6,0	1,8	1,2	DICV
<b>Contrôle 61</b>	18		1710	22	8,7	11,2	77,7	2,5	0,8	0,5	
<b>110</b>	12	F	1930	9	9,2	6,2	82,5	6,1	1,1	0,7	NON
<b>Contrôle 110</b>	15		2337	18	13,3	4,6	77,1	9,2	1,3	0,9	
<b>147*</b>	15	M	1730	3,3	16,6	3,4	58	5,8	0,8	0,2	DICV
<b>190*</b>	17	M	3270	2,8	0,9	5	92,8	6	0,4	0,3	DICV
<b>252</b>	11	F	1720	5,4	10,8	1,3	65,6	5,7	1,7	0,6	Possible, exploration à approfondir
<b>Contrôle 252</b>	15		2008	21	5,1	2,4	88,8	9	2,8	0,8	

\* : Pas de contrôle réalisé car patient décédé, \*\* : Pas de contrôle réalisé car patient en aplasie profonde

Au total, il y a 2 patients ayant un DICV avéré, 2 patients ayant un DICV probable qui n'a pas pu être confirmé sur un prélèvement contrôlé du fait de leur évolution clinique sur les 395 patients étudiés. Des études moléculaires vont être réalisées pour caractériser plus avant ces 4 enfants. Dans ce but, une collaboration avec le CEDI est entreprise pour rechercher des mutations des gènes impliqués potentiellement. Un manuscrit sera rédigé pour décrire cette observation.

Parallèlement à cette étude de déficit immunitaire, nous avons recherché un déficit de la réponse T anti-EBV comme expliqué ci-après.

## **C. Recherche de défaut spécifique de la réponse T anti-EBV**

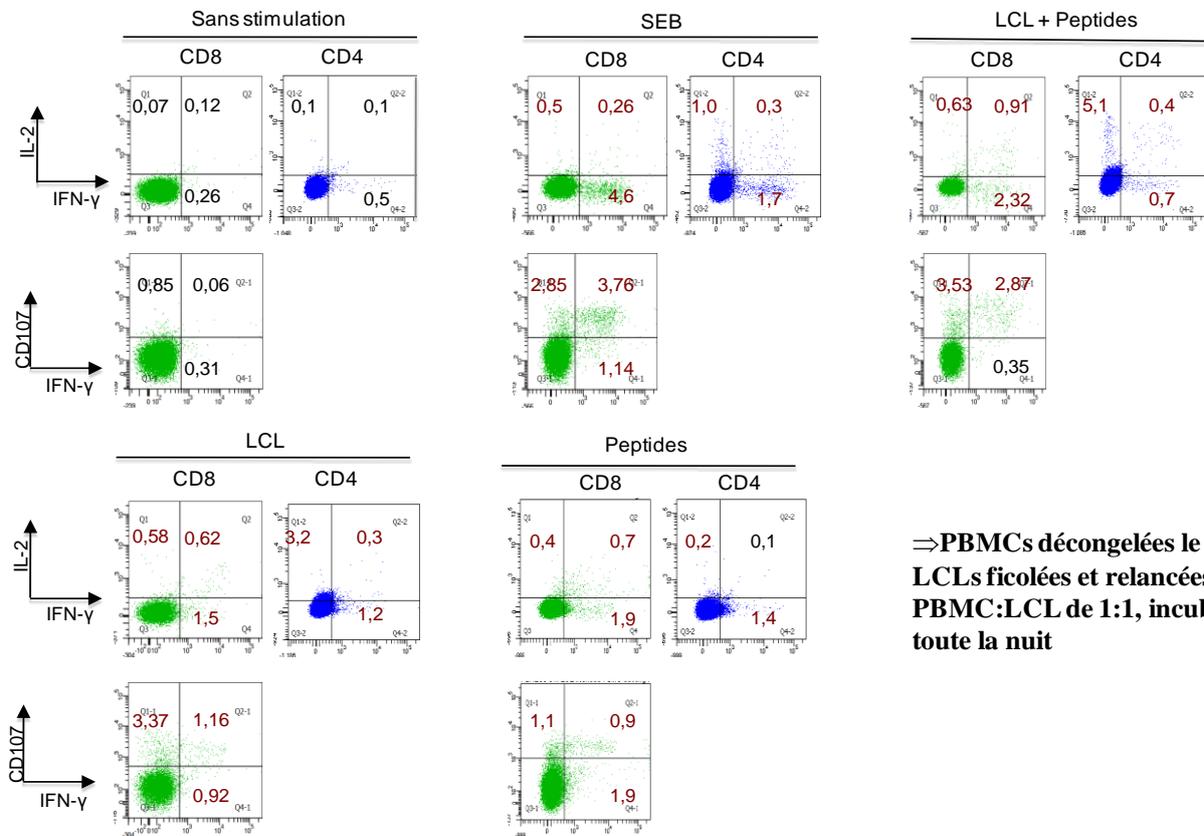
Comme nous l'avons vu, l'étude des facteurs immunologiques, par immunophénotypage, a permis de trouver des DICV chez 4 enfants LH. D'une façon complémentaire, nous recherchons des défauts de contrôle de la réponse immunitaire vis à vis de l'EBV. Toutes les données précédemment présentées montrent un rôle important de l'infection par l'EBV dans le développement de LH, et argumentent le fait que la réponse T vis-à-vis de l'EBV est essentielle dans le contrôle du LH. Nous avons ainsi décidé d'étudier la réponse immunitaire T, vis-à-vis de l'EBV, chez des enfants atteints de LH dans l'hypothèse qu'un défaut de l'immunité cellulaire contre l'EBV favoriserait la réplication de l'EBV et serait donc un facteur de susceptibilité au LH-EBV+ de l'enfant.

### **1. Etude de la réponse T anti-EBV par cytométrie de flux**

#### **1.1. Mise au point de la technique chez les témoins**

Avant d'étudier la réponse cellulaire vis à vis de l'EBV chez les patients atteints de LH, celle-ci est étudiée chez des sujets témoins n'ayant pas développé de LH mais ayant rencontré l'EBV. Quatre témoins sont analysés, il s'agit de parents de patients, dont les cellules sanguines sont recueillies le même jour que celles du patient et manipulées au laboratoire exactement dans les mêmes conditions avec établissement d'une lignée anti-EBV autologue et congélation des PBMCs. Les témoins sont âgés de 40 à 54 ans avec un âge médian de 43 ans. Plusieurs mises au point sont nécessaires dans le but de retrouver les conditions optimales à la réalisation de la manipulation. Les facteurs qui ont influencé la mise au point sont la qualité et la quantité de LCLs et de PBMCs mis en contact ainsi que les temps d'incubation nécessaires à l'obtention d'une réponse à la stimulation antigénique satisfaisante.

Le contrôle positif de la technique est la stimulation par le superantigène SEB, qui entraîne une réponse cytokinique caractérisée par une sécrétion d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 ainsi qu'une augmentation significative de l'expression de CD107a à la surface des lymphocytes T CD8 témoignant d'une importante dégranulation en réponse à la stimulation par le superantigène. L'absence de stimulation antigénique constitue le témoin négatif, la sécrétion cytokinique est très faible. La stimulation des PBMCs par les LCL autologues avec ou sans ajout de peptides viraux entraîne une augmentation significative de la sécrétion cytokinique par les lymphocytes T CD4 et T CD8 par rapport au témoin négatif. Ces résultats sont résumés dans le tableau 13 et illustrés par un exemple au niveau de la figure 37.



⇒PBMCs décongelées le matin,  
LCLs ficolées et relancées, ratio  
PBMC:LCL de 1:1, incubation  
toute la nuit

**Figure 37 : Images de cytométrie en flux représentant les réponses cellulaires T CD8+ et T CD4+ dans les différentes stimulations antigéniques.**

Témoins N=4	CD4		CD8	
	IL-2	INF- $\gamma$	IL-2	INF- $\gamma$
<b>T1</b>				
Non Stimulé	0	0,11	0	0,26
PBMCs + LCL	0,16	0,53	0,36	0,87
PBMCs + Peptides	0,12	0,63	0,09	0,37
<b>PBMCs + LCL+ Peptides</b>	<b>0,34</b>	<b>0,26</b>	<b>0,56</b>	<b>0,41</b>
SEB	0,12	0,5	0,52	0,88
<b>T2</b>				
Non Stimulé	0,1	0,5	0,2	1
PBMCs + LCL	6,9	3,1	7,5	2,5
PBMCs + Peptides	1,5	2,5	1,4	1,6
<b>PBMCs + LCL+ Peptides</b>	<b>7,5</b>	<b>1,8</b>	<b>7,3</b>	<b>3,9</b>
SEB	6,5	3,3	2,5	3,3
<b>T3</b>				
Non Stimulé	0	0,11	0,02	0,12
PBMCs + LCL	0,22	0,28	0,24	0,67
PBMCs + Peptides	0,1	0,2	0,1	0,5
<b>PBMCs + LCL+Peptides</b>	<b>0,48</b>	<b>0,25</b>	<b>0,61</b>	<b>0,54</b>
SEB	1,31	0,69	1,42	1,04
<b>T4</b>				
Non Stimulé	0,004	0,057	0	0,16
PBMCs + LCL	0,26	0,26	0,25	0,68
PBMCs + Peptides	0,2	0,2	0,2	0,5
<b>PBMCs + LCL+Peptides</b>	<b>0,89</b>	<b>0,9</b>	<b>0,43</b>	<b>0,87</b>
SEB	2,48	2,35	0,75	1,39

**Tableau 13: Résultats chiffrés représentant les différentes réponses chez les témoins selon les types de stimulation.**

L'analyse des réponses T anti-EBV par cytométrie en flux de ces 4 témoins montre globalement que les réponses les plus élevées sont observées après stimulation par LCL + peptides. C'est donc cette condition qui a été retenue pour l'étude de la réponse T anti-EBV chez les enfants.

## 1.2. Réponse T anti-EBV par cytométrie de flux chez les patients

Trois groupes de patients sont analysés en fonction de leur sérologie EBV et de leur charge virale EBV. (1) Un groupe de 4 patients âgés de 3,8,13 et 16 ans (sexe ratio F/M : 0.3) à sérologie EBV positive et à charge virale fortement élevée (> à 1000 copies/ml ) ; (2) un groupe de 6 patients âgés de 9 à 15 ans (âge médian : 13.5 ans et sexe ratio F/M : 0.2) à sérologie EBV positive et à charge virale négative (<125 copies/ml) et (3) un groupe de 5 patients âgés de 14 à 16 ans (âge médian : 15 ans et sexe ratio F/M : 4) n'ayant jamais rencontré l'EBV et donc à sérologie et à charge virale EBV négatives (tableau 14). Les réponses de chaque groupe de patients sont étudiées et comparées dans les tableaux 15 et 16.

**Tableau 14 : Sexe, âge (en années) et charge virale EBV des patients analysés.**

	Patients	Sexe	Age (an)	Sérologie EBV	Charge virale EBV
<b>Sérologie positive (EBV+)</b> <b>Charge virale forte</b>	<b>P109</b>	<b>M</b>	<b>8</b>	<b>+</b>	<b>21423</b>
	<b>P129</b>	<b>F</b>	<b>13</b>	<b>+</b>	<b>1795</b>
	<b>P137</b>	<b>M</b>	<b>16</b>	<b>+</b>	<b>2130</b>
	<b>P83</b>	<b>M</b>	<b>3</b>	<b>+</b>	<b>1300</b>
<b>Sérologie positive (EBV+)</b> <b>Charge virale faible</b>	<b>P63</b>	<b>F</b>	<b>13</b>	<b>+</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P113</b>	<b>M</b>	<b>9</b>	<b>+</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P131</b>	<b>M</b>	<b>15</b>	<b>+</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P138</b>	<b>M</b>	<b>14</b>	<b>+</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P89</b>	<b>M</b>	<b>12</b>	<b>-</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P90</b>	<b>M</b>	<b>15</b>	<b>+</b>	<b>&lt;125</b>
<b>Sérologie négative (EBV-)</b>	<b>P49</b>	<b>F</b>	<b>15</b>	<b>-</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P117</b>	<b>F</b>	<b>15</b>	<b>-</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P123</b>	<b>F</b>	<b>16</b>	<b>-</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P125</b>	<b>M</b>	<b>14</b>	<b>-</b>	<b>&lt;125</b>
	<b>P130</b>	<b>F</b>	<b>15</b>	<b>-</b>	<b>&lt;125</b>

- Réponse T CD4

Tableau 15 : Réponse T CD4 anti-EBV dans les 3 groupes de patients et les 4 témoins. Résultats exprimés en calculant  $\Delta = \% \text{ cellules exprimant le marqueur après stimulation par la condition LCL+peptides} - \% \text{ cellules non stimulées exprimant le marqueur}$ .

**Sérologie positive/ Charge virale +++**

	CD4	
	IL-2	INF- $\gamma$
P1	0,35	0,41
P2	0,45	0,47
P3	0	0,13
P4	0,23	0
Moyenne	0,26	0,33

**Témoins**

	CD4	
	IL-2	INF- $\gamma$
T1	0,34	0,15
T2	7,40	1,30
T3	0,48	0,14
T4	0,88	0,84
Moyenne	2,27	0,60

**Sérologie positive/ Charge virale ++**

	CD4	
	IL-2	INF- $\gamma$
P1	1,13	0,18
P2	0,29	0,35
P3	0,32	0,03
P4	0,63	0,01
P5	5,91	0,59
P6	0,54	0
Moyenne	1,66	0,23

**Sérologie négative**

	CD4	
	IL-2	INF- $\gamma$
P1	0,51	0
P2	0,4	0
P3	1,43	0,05
P4	0,12	0,01
P5	0,13	0
Moyenne	0,61	0,01

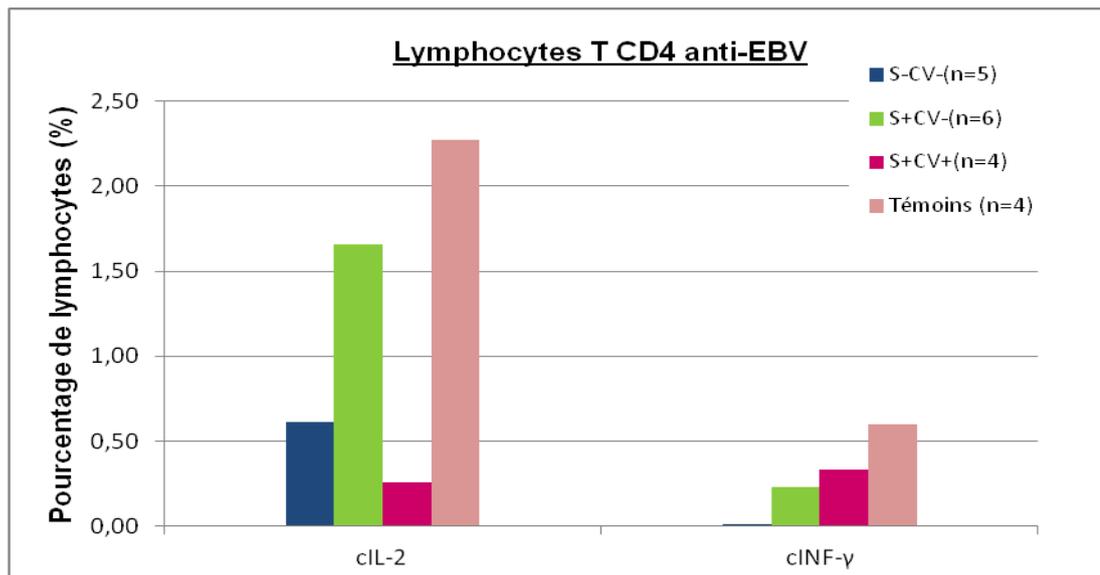


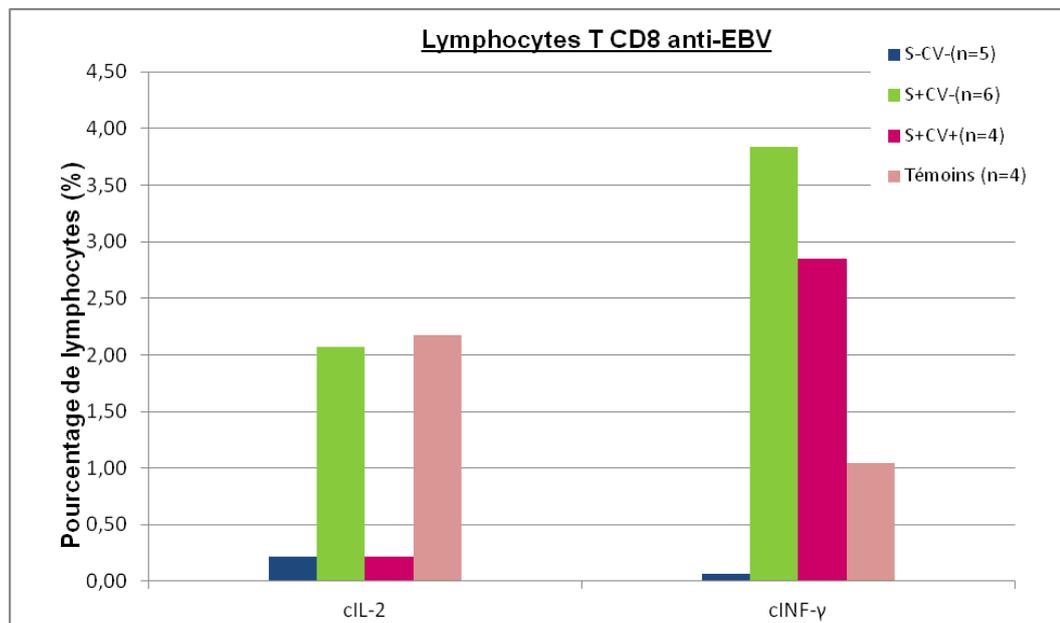
Figure38 : La réponse de lymphocytes T CD4 anti-EBV

- **Réponse T CD8**

**Tableau 16 : Réponse T CD8 anti-EBV dans les 3 groupes de patients et les 4 témoins. Résultats exprimés en calculant  $\Delta$  = % cellules exprimant le marqueur après stimulation par la condition LCL+peptides - % cellules non stimulées exprimant le marqueur.**

Sérologie positive/ Charge virale > 1000 copies/ml				Témoins		
CD8				CD8		
	CD107	IL-2	INF- $\gamma$		IL-2	INF- $\gamma$
P1	11,5	0,47	1,18	T1	0,56	0,15
P2	14	0,21	7,37	T2	7,10	2,90
P3	41	0	0	T3	0,59	0,42
P4	4,02	1,34	0	T4	0,43	0,71
Moyenne	22,16	0,22	2,85	Moyenne	2,17	1,04

Sérologie positive/ Charge virale <125 copies/ml				Sérologie négative			
CD8				CD8			
	CD107	IL-2	INF- $\gamma$		CD107	IL-2	INF- $\gamma$
P1	7,20	0,49	0,00	P1	35,9	0	0
P2	15,40	0,20	0,18	P2	12,5	0,39	0
P3	13,20	0,47	0,40	P3	44,5	0,37	0,13
P4	6,40	0,24	0,00	P4	12,2	0,12	0,15
P5	16,70	8,93	18,64	P5	3,67	0,35	0
P6	4,14	0,49	0,76	Moyenne	26,27	0,22	0,07
Moyenne	11,78	2,07	3,84				



**Figure39 : La réponse de lymphocytes T CD8 anti-EBV**

L'étude de la réponse T anti-EBV suggère une baisse de la production d'IL-2 par les CD4 (Figure 38) et les CD8 (Figure 39) de patients atteints de LH avec une charge virale EBV fortement élevée en réponse à une stimulation par des peptides EBV en présence de lignées autologues par rapport à celles de sujets témoins ou de sujets atteints de LH ayant une sérologie EBV négative. Cependant, cette tendance reste à confirmer ou à infirmer sur un nombre plus important de sujets par groupe.

Malheureusement nous n'avons pas pu étendre la technique à plus de patients car nous avons été limités par le nombre de patients pour lesquels les lignées EBV autologues avaient poussé et pour lesquels il restait un nombre suffisant de PBMCs conservés pour pouvoir réaliser la technique. Nous avons alors décidé d'appliquer une autre technique l'ELISPOT.

## 2. Etude de la réponse lymphocytaire T spécifique anti-EBV par ELISPOT

Afin de contrôler la réponse spécifique anti-EBV par la technique ELISPOT, on a d'abord sélectionné les patients. Ceux qui sont retenus comme suspects d'avoir un défaut du contrôle de l'EBV sont ceux qui ont une sérologie positive à l'EBV ainsi qu'une charge virale positive, c'est-à-dire supérieure à 1000copies/ml.

### 2.1. Mise au point de la technique :

On a dans un premier temps comparé deux types de stimulation. Les échantillons qui sont utilisés pour la mise au point de la technique proviennent d'enfants transplantés de foie pour lesquels un suivi de la réponse T anti-EBV et de la charge virale EBV est réalisée. Pour 5 patients 100 µl de *pool* de peptide EBV sont mis dans un puits test, comme expliqué dans le matériel et méthode, et dans l'autre puits test, 100 µl de virus EBV (LCG Standards ATCC VR-1492, souche B95-8, human herpesvirus 4 purifiée, issu d'une lignée cellulaire humaine (883L)) sont mis, à la place des 100 µl de *pool* de peptide EBV. On a testé 3 échantillons provenant d'enfants ayant une charge virale positive, un enfant avec une charge virale négative et un enfant contrôle qui a une sérologie EBV négative. Un exemple de résultat est présenté figure 40 et les résultats des tests sont donnés dans le tableau 17.

#### Patient avec une charge virale positive



**Figure 40 : Exemple de résultats obtenu avec le pool de peptides EBV et le virus EBV.**

**Légende :** Pour chaque patient, il y a deux contrôles, un négatif (PBMC seules) et un positif (PBMC+ phytohémagglutinine (PHA)). Il y a également deux puits test contenant (PBMC+ Peptides EBV) ou (PBMC+ Virus EBV).

**Tableau 17 : Comparaison des méthodes ELISPOT, après stimulation par le virus EBV et avec un *pool* de peptides EBV.**

	<b>Infection par l'EBV</b>	<b>Réponse anti-EBV virus entier</b>	<b>Réponse anti-EBV <i>pool</i> de peptides viraux</b>
<b>Enfant 1</b>	Sérologie positive charge virale positive	Négative	Positive
<b>Enfant 2</b>	Sérologie positive charge virale positive	Négative	Positive
<b>Enfant 3</b>	Sérologie positive charge virale positive	Négative	Positive
<b>Enfant 4</b>	Sérologie positive charge virale négative	Négative	Limite
<b>Enfant 5</b>	Sérologie négative	Négative	Négative

Grâce à cette comparaison, on a choisi d'utiliser l'elispot après stimulation par le *pool* de peptides EBV. En effet, celui-ci est plus sensible car on détecte une réponse interféron gamma chez plus d'enfants. Chez les enfants 1, 2 et 3, ayant une charge virale EBV positive, le système immunitaire est stimulé afin de contrôler l'infection. Les LT anti-EBV prolifèrent dans le sang périphérique ce qui se traduit par une réponse positive à l'elispot. Cette réponse positive correspond aux cellules T effectrices anti-EBV qui excrètent de l'interféron gamma en présence du pool de peptides EBV. L'enfant 4, qui a une charge virale négative, a une réponse limite car ayant contrôlé l'infection, il a des LT effecteurs anti-EBV mais en plus faible quantité. L'enfant 5 n'ayant jamais été exposé à l'EBV et donc une sérologie négative, est négatif à l'elispot car il n'a pas de LT effecteur anti-EBV.

## **2.2. Détection de la réponse T effectrice anti-EBV chez les patients LH-EPI :**

Comme expliqué précédemment, l'elispot est réalisé sur des patients ayant une charge virale élevée et pour lesquelles il reste plus de 750 000 PBMC. Sachant qu'à la décongélation on perd environ 50% des cellules, il faut compter au moins 1,5 millions de PBMC congelés. Quatre patients ayant une charge virale élevée sont comparés à 4 autres patients ayant une sérologie positive et une charge virale négative et à un patient ayant une sérologie négative afin d'être sûr, une nouvelle fois, que

notre *pool* de peptide EBV n'active pas de façon non spécifique les PMBC. C'est notre contrôle négatif.

Les résultats sont inscrits dans le tableau 18 ci-dessous :

**Tableau 18 : Résultats elispot pour la réponse des LT effecteur spécifique anti-EBV grâce à la détection de l'interféron gamma.**

Patient	Age (ans)	Sexe	Statut de l'EBV	Réponse anti-EBV
286	16	F	Charge virale = 8792 copies/mL	Positive
393	15	F	Charge virale = 1680 copies/MI	Positive
399	13	F	Charge virale = 3783 copies/mL	Positive
391	10	F	Charge virale = 14400 copies/MI	Négative
295	16	F	Sérologie EBV positive / Charge virale négative	Positive
395	10	M	Sérologie EBV positive / Charge virale négative	Positive
380	11	F	Sérologie EBV positive / Charge virale négative	Négative
398	11	F	Sérologie EBV positive / Charge virale négative	Négative
366	17	F	Sérologie négative	Négative

Comme le montre le tableau, nous n'avons observé globalement de différence de résultat entre le groupe témoin et le groupe test. Cependant, à l'échelon individuel, un des enfants dont la charge virale est élevée n'a pas de réponse détectable en ELISPOT ce qui constitue un défaut de contrôle de l'infection. Les trois autres enfants n'ont pas de déficit de l'immunité spécifique anti-EBV. Des explorations complémentaires vont être réalisées pour explorer l'enfant qui n'a pas de réponse T anti-EBV détectable malgré le fait qu'il a un lymphome Hodgkinien.

#### **Conclusion intermédiaire :**

L'étude de la réponse T anti-EBV par la cytométrie de flux, sur 15 enfants LH, a montré une tendance vers une baisse de la production d'IL-2 par les CD4 et CD8 de patients atteints de LH avec une charge virale EBV élevée en réponse à une stimulation par des peptides EBV en présence de lignées autologues par rapport à celles de sujets témoins ou de sujets atteints de LH sans avoir rencontré l'EBV. L'étude de la réponse T anti EBV par la technique d'ELISPOT sur 9 patients n'a pas montré globalement de déficit du contrôle de l'EBV sauf pour une jeune patiente de 10 ans ayant une charge virale EBV très élevée sans réponse T anti-EBV efficace. Les résultats que nous avons obtenus restent à confirmer par l'analyse d'un nombre plus important de patients

## DISCUSSION

Le risque de LH est connu pour être augmenté en cas de déficit immunitaire acquis ou inné (Claudia Wehr et al, 2008 ; Erik Glocker et al, 2007). Parmi les déficits immunitaires innés associés à un risque accru de LH, sont décrits les DICV, XLP et ALPS. La présente étude a cherché à évaluer, pour la première fois à notre connaissance, la prévalence de ces déficits immunitaires chez des enfants atteints de LH.

### **Caractéristiques cliniques et histologiques de notre population d'étude**

La distribution des caractéristiques cliniques de 155 patients LH, collectées à partir de la base de données de l'essai EURONET à l'URC de l'hôpital Saint-Antoine, correspond à ce qui est attendu pour une population de LH de l'enfant (Hasenclever D et Diehl V, 1998). Il existe une légère prédominance masculine chez les patients atteints de LH (Jarrett et al. 2003). Le sex-ratio M/F est de 1,1. Il augmente à 3 au dessous de l'âge de 10 ans. Parmi les biopsies (n=84) qui sont relues, la prédominance des formes histologiques scléro-nodulaires (87%) correspond à ce qui est rapporté dans les pays développés (Jarrett et al. 2003). La proportion de LH au sein desquels l'EBV a été détecté (23%) ainsi que la plus faible proportion de LH-EBV+ parmi les formes scléro-nodulaires par rapport aux formes à cellularité mixte de LH sont en accord avec ce qui était attendu (Jarrett et al. 2003, Enblad et al. 1999, Glaser et al. 1997, Chang et al. 2004). Les patients atteints de LH-EBV+ sont plus fréquemment des garçons que des filles ce qui a été montré dans les études précédentes (Jarrett et al. 2003, Chang et al. 2004) y compris chez les enfants atteints de LH-EBV+ dans les pays en voie de développement (Chang et al. 2005). Les patients atteints de LH-EBV+ sont significativement plus jeunes que ceux atteints de LH-EBV- ( $p= 3.10^{-4}$ ) et ont une charge virale EBV significativement plus élevée ( $p= 3.10^{-3}$ ). Plusieurs études ont rapporté des charges virales EBV élevées dans le sang, les PBMCs ou le sérum de patients atteints de LH au diagnostic (Drouet et al. 1999, Gallagher et al. 1999, Kanakry JA 2013).

### **Recherche de déficits immunitaires**

*Lymphopénie B* - Parmi les 83 premiers patients analysés, nous avons recherché un déficit immunitaire par une approche approfondie pour chaque cas : dosages des immunoglobulines, charge virale et sérologie EBV, immunophénotypage lymphocytaire complet. L'immunophénotypage a montré, dans un premier temps, une diminution de la population lymphocytaire globale chez les patients atteints de LH par rapport aux témoins et une lymphopénie B fréquente au moment du diagnostic (37%). Trente-et-un patients avaient un pourcentage diminué de lymphocytes B. Cette anomalie était accompagnée d'une lymphopénie T dans 15 cas et d'une hypogammaglobulinémie

dans 2 cas sur les 31. Un présentait un taux d'IgG bas et un autre présentait un taux diminué d'IgM en fonction de l'âge. La lymphopénie B était corrélée aux facteurs pronostiques connus du LH et on a observé une tendance vers une évolution moins bonne de la maladie chez les patients lymphopéniques. Ces données sont conformes à ce qui est rapporté dans la littérature à ce sujet. Kazimiera J, et ses collaborateurs ont étudié les lymphocytes B et T dans 13 cas de LH de l'adulte. Cinq parmi eux avaient un pourcentage diminué de lymphocytes totaux dans le sang périphérique et 1/13 patients un faible nombre absolu de lymphocytes B (Kasimiera et al., 1973). Une lymphopénie globale et une lymphopénie B corrélées avec le stade du LH ont été observées sur 238 patients au diagnostic (Ayoub et al., 1999). Nous avons complété cette analyse descriptive par une quantification de cytokines IL-7, BAFF et TGF bêta et par une corrélation avec les données histologiques. Nous n'avons pas élucidé les mécanismes physiopathologiques impliqués mais il apparaît très vraisemblable que la lymphopénie B soit liée à un excès de mort cellulaire des lymphocytes B. La discussion plus complète des mécanismes physio-pathologiques impliqués dans la survenue de la lymphopénie B au cours du LH est présente dans l'article en cours de publication dans *Hématologie* (cf pages 73 à 78).

*Syndrome XLP*- Le syndrome XLP est aussi associé à une augmentation de risque de lymphomes associés à l'EBV. En 2002, Gaspar et ses collaborateurs ont montré la survenue de lymphomes chez environ un tiers des garçons XLP étudiés. Presque tous les lymphomes sont majoritairement d'origine cellulaire B. Quatre cas de LH ont été rapportés au registre XLP. Les patients XLP développent également des hypogammaglobulinémies. Afin de rechercher un déficit de type XLP, un déficit des NKT a été recherché : il a été défini par l'absence totale des cellules NKT (TCRV $\beta$ 11+/TCRV $\alpha$ 24+) (Pasquier B et al, 2005). Environ 50% à 70% des cas XLP sont dues à des mutations du gène SH2D1A (Coffey et al, 1998; Sayos et al, 1998; Nichols et al, 1998). Ces mutations varient des mutations ponctuelles non-sens et faux sens, conduisant à des protéines SAP instables ou non fonctionnelles, à de grandes délétions dans le gène SH2D1A (Latour et Veillette, 2003; Ma et al, 2007; Morra et al, 2001). Globalement parmi ces 83 premiers enfants analysés, aucun cas évocateur de XLP n'a été mis en évidence sur la base de la quantification des lymphocytes NKT. Des études moléculaires complémentaires à la recherche de mutation de SAP ont été menées aussi pour 4 patients LH pour lesquels un déficit immunitaire semblait probable (déficit en lymphocytes B mémoires *switchés* avec un taux bas des IgG). Le séquençage du gène SAP sur l'ADN génomique de ces 4 patients LH B+, smB-, CD21 normal et IgM+/CD38+ augmentés, n'a pas permis de mettre en évidence de mutation.

*L'auto-immune syndrome lymphoprolifératif (ALPS)* est un trouble de l'apoptose caractérisé par une lymphadénopathie, une splénomégalie et l'accumulation périphérique de lymphocytes T TCR  $\alpha\beta$  +

double négatifs CD4-/CD8- (cellules DN). Cette élévation en DN (CD4-/CD8-) a été défini par Joao B et al en 2010, comme un pourcentage de Lymphocytes T DN  $\geq 1,5\%$  dans les lymphocytes totaux ou  $\geq 2,5\%$  dans les lymphocytes CD3+ (Oliveira JB et al. 2010). D'autres études ont confirmé que les patients ALPS sont prédisposés à développer des lymphomes à l'âge adulte (Rieux-Laucat F et al. 2003). Stephen E. Straus et ses collaborateurs ont examiné la possibilité que les mutations Fas et le défaut concomitant de l'apoptose des lymphocytes soient des facteurs héréditaires prédisposant aux lymphomes (Straus SE et al. 2001). En 2001, 130 membres de 39 familles possédant des mutations héréditaires de Fas ont été étudiés; les lymphomes étaient co-ségrégés avec des mutations de Fas dans 10 individus de 8 familles. Ces 8 familles comprenaient 75 membres dont 43, y compris les 10 individus atteints de lymphome, présentaient certaines ou toutes les manifestations des ALPS comme les adénopathies/spélnomégalie, l'expansion des cellules T DN et auto-immunité (Stephen E. Straus et al. 2001). Le risque de lymphome hodgkinien et non-Hodgkinien chez les individus présentant des mutations Fas héritées dans cette étude est de 51 et 14 fois plus élevé que chez les témoins, respectivement. Ont été rapportés plus récemment 11 patients atteints de LH et 9 patients atteints de LNH dans la cohorte ALPS (Rao VK, Oliveira JB, Blood 2011). ALPS-FAS avec des mutations germinales du FAS est la forme la plus commune de l'ALPS, elle a été associée à un risque accru de lymphome (Straus, Blood 2001). Dans notre étude, l'analyse de lymphocytes T DN TCR $\alpha\beta$ +/CD4-/CD8- a été réalisée dans 83 prélèvements. Cinq sur les 83 patients LH (6%) avaient une expansion de lymphocytes T (DN) dans le sang périphérique (supérieurs à 2,5% dans les lymphocytes CD3+). Nos résultats ont été complétés par la recherche d'un déficit fonctionnel de la voie Fas/FasL par la quantification de l'IL-10 et de FasL dans le plasma des patients. Cette analyse a permis d'exclure tout déficit fonctionnel de la voie Fas/FasL chez ces patients.

Globalement parmi ces 83 premiers enfants analysés, aucun cas évocateur de XLP n'a été mis en évidence sur la base de la quantification des lymphocytes NKT, pour les 5 cas qui auraient pu évoquer un ALPS, les études complémentaires ont exclu ce diagnostic, un cas était suspect de DICV avec une lymphopénie B et un dosage d'immunoglobuline abaissé. Nous avons alors choisi d'étendre notre étude avec une stratégie différente visant à faire un premier screening à partir du dosage des immunoglobulines puis un immunophénotypage lymphocytaire complet pour les patients dont les valeurs d'immunoglobulines étaient abaissées.

*Recherche de DICV* - En travaillant sur un nombre plus élevé de patients (395 patients), 2 enfants ont un DICV avéré et 2 ont un DICV probable (absence de prélèvement de contrôle à distance de la maladie). On sait que le risque global de cancer est augmenté chez les patients atteints de DICV. Il s'agit principalement de lymphomes Hodgkiniens et non Hodgkiniens et de cancers de l'estomac (L Mellemkjaer et al. 2002, Filipovich AH et al. 1994). Le Centre Français National de Référence pour

les déficits immunitaires primaires (DIP) a enregistré 4632 patients atteints à partir de Juillet 2012. Les déficits immunitaires des lymphocytes T et les déficits immunitaires des lymphocytes B représentent 36% et 46% respectivement. Deux cent soixante-sept patients ont développé 276 cancers (incidence 5,8%). Cent cinquante-sept patients ont développé des tumeurs malignes lymphoïdes et 78 patients ont développé des tumeurs solides (Filipovich AH). Les lymphomes décrits sont des LH et des LNH souvent associés à l'EBV. Globalement la prévalence de DICV dans notre étude est de 1% ce qui est très supérieur au 1/25000 (0,004%) décrits dans la littérature. On sait que les patients atteints de DICV ont une incidence pour le lymphome multipliée par 12 par rapport à une population témoin. Dans notre étude, on a observé que les personnes atteintes du LH avaient une prévalence de DICV, multipliée par 250, cependant l'intervalle de confiance est bien sûr très grand vu le faible nombre de cas observés. Ceci semble valider notre hypothèse que le DICV est un facteur de susceptibilité du LH. Des explorations génétiques doivent être réalisées pour préciser les défauts en cause. En effet, au cours des 10 dernières années, il a été démontré que certains gènes, comme ICOS, CD19, CD20, CD81, CD21 et LRBA1, sont connus comme impliqués dans ce phénotype (Abolhassani H. and al, 2013). De plus, les HLA-DR et -DQ peuvent contribuer à la pathogenèse de DICV ou pourraient être considérés comme des marqueurs appropriés pour la possibilité de l'apparition de ce défaut génétique (Amanzadeh A. and al, .2012).

### **Réponse T anti-EBV**

L'une des hypothèses qui expliquerait le développement du LH EBV+ chez l'enfant serait l'altération de l'équilibre entre EBV et l'hôte notamment une altération de la réponse T anti-EBV. Il a été démontré qu'une charge virale EBV fortement élevée est associée à la présence de l'EBV in situ et à une évolution clinique et biologique péjorative du LH (Kanakry et al., 2013 ; Hohaus et al., 2011). De ce fait, une charge virale importante pourrait constituer un risque potentiel pour une évolution vers un LH chez des enfants présentant une altération de la réponse immunitaire anti-EBV.

Plusieurs études se sont intéressées à l'exploration de la réponse T anti-EBV dans les syndromes lymphoprolifératifs. L'équipe de Chapman a étudié la réponse T cytotoxique spécifique de l'EBV dans le sang et au site de la tumeur de patients atteints de LH, afin d'explorer la possibilité d'une thérapie basée sur l'utilisation de CTLs. Par la technique d'Elispot et par des tests de cytotoxicité, ces chercheurs ont montré que la persistance de cellules de Reed Sternberg-EBV<sup>+</sup> en dépit de l'existence d'une réponse CTL spécifique de l'EBV pourrait s'expliquer par la quantité limitée de précurseurs de CTLs ayant pour cible les protéines de latence II (EBNA-1, LMP-1, LMP-2) exprimées par les cellules de Reed Sternberg d'où l'approche thérapeutique de ces lymphomes par des CTLs spécifiques (Chapman et al., 2001). En 2004, des chercheurs ont utilisé des CTLs activés

par des LCLs pour le traitement de patients atteints de LH-EBV<sup>+</sup> (Bollard et al., 2004). De plus, ils ont pu suivre le devenir *in vivo* des cellules injectées en les marquant génétiquement par la transduction du gène de résistance à la néomycine avec un vecteur rétroviral. Ils ont ainsi observé une expansion *in vivo* de ces cellules, leur persistance dans la circulation sanguine et leur présence au niveau des tumeurs et ceci jusqu'à plusieurs mois après leur injection. Les résultats de cette étude montrent que les CTLs ont une activité biologique et peuvent induire une régression des tumeurs avec une réponse parfois insuffisante et transitoire.

L'équipe de Heller s'est intéressée à la réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifique de la protéine EBNA-1 chez des patients atteints de lymphomes associés à l'EBV comme le LH, le lymphome T et NK (Heller et al., 2008). Ces chercheurs ont étudié la réponse spécifique de EBNA-1 car cette protéine est exprimée par tous les lymphomes associés à l'EBV. Pour l'étude de cette réponse, ces chercheurs ont utilisé des peptides EBNA-1 et ont observé la production d'IFN- $\gamma$  et d'IL-2 en réponse aux peptides par cytométrie en flux. Ils ont comparé les réponses obtenues chez les patients atteints de lymphomes associés à l'EBV, aux réponses obtenues chez des patients atteints de mêmes lymphomes mais non associés à l'EBV. Ils ont démontré une perte du contrôle CD4<sup>+</sup> spécifique de EBNA-1 chez les patients ayant développé un lymphome associé à l'EBV et notamment chez ceux atteints de LH. Enfin, une équipe de chercheurs s'est intéressée aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de certains peptides issus des protéines LMP-1 et LMP-2, et à leur capacité à contrôler la prolifération des LCLs (Haigh et al., 2008). Pour cette étude, ils ont généré des clones de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de peptides bien définis de LMP-1 et -2. Ils les ont mis en présence de LCL et ont analysé, par la technique d'Elispot et par cytométrie en flux, leur production de cytokine et leur cytotoxicité. Une production d'IFN- $\gamma$  et une activité cytotoxique ont été observées, surtout par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques de peptides dérivant de LMP-1 ainsi qu'une inhibition de la prolifération des LCLs. Ces cellules seraient donc des effecteurs clés pour le contrôle des LCLs et celles-ci pourraient avoir un fort potentiel thérapeutique contre les tumeurs exprimant les LMPs tels que le LH.

Une autre équipe a étudié la réponse T spécifique de l'EBV et la charge virale EBV chez des enfants atteints de lymphome post transplantation (PTLD) (Smets et al., 2002). Par l'analyse de cette réponse en utilisant la technique d'Elispot et par la quantification de la charge virale par PCR quantitative, l'équipe de Smets a montré que les patients qui étaient déjà positifs pour l'EBV avant la transplantation n'ont pas développé de PTLT contrairement à ceux qui étaient EBV-négatifs avant et qui ont développé la primo-infection à l'EBV après la transplantation. Les chercheurs ont montré que le nombre limité de lymphocytes T spécifiques de l'EBV ( $<2/\text{mm}^3$ ) associé à une charge virale EBV élevée constitue un risque accru de développer un PTLT. Ils montrent donc qu'il existe un lien entre

une faible réponse T vis-à-vis des LCLs combinée à la présence d'une charge virale élevée et la survenue de PTLD. L'équipe de Gasser s'est intéressée à la réponse T CD4<sup>+</sup> chez des patients VIH-positifs développant un lymphome primitif du système nerveux central (LCP) (Gasser et al., 2007). Cette étude a été réalisée à partir du sang de patients, prélevé six mois avant le diagnostic de LCP. Ces chercheurs ont utilisé des peptides EBV afin de stimuler une réponse et ont analysé cette réponse par Elispot. Ils ont observé un défaut de la réponse T CD4<sup>+</sup> vis-à-vis de l'EBV chez ces patients et ont déduit que ce défaut serait une base immunologique pour le développement de LCP chez les patients infectés par le VIH puisque les prélèvements testés ont été faits avant le diagnostic.

*Cytométrie de flux*- L'étude de la réponse T anti-EBV chez les enfants atteints de LH a été analysée d'abord par cytométrie en flux. Cette technique présente des avantages par rapport à la technique d'Elispot et aux tests de cytotoxicité déjà connus souvent utilisés dans l'étude de la réponse T anti-EBV. C'est une technique rapide, sensible et peu onéreuse permettant d'étudier le profil cytokinique (sécrétion d'IL-2 et/ou IFN- $\gamma$ ) de différentes populations lymphocytaires simultanément (lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup>) (Kuzushima et al., 1999). Après une phase de mise au point sur des témoins sains, trois groupes de patients ont été analysés par cytométrie en flux : 4 patients LH à sérologie EBV<sup>+</sup> avec une forte charge virale EBV, 6 patients LH à sérologie EBV<sup>+</sup> avec une faible charge virale EBV et 5 patients LH à sérologie EBV négative. Nos résultats sur ce nombre limité de patient montrent une tendance vers une baisse de la production d'IL-2 par les CD4 de patients atteints de LH avec une charge virale EBV élevée en réponse à une stimulation par des peptides EBV en présence de lignées autologues par rapport à celles de sujets témoins ou de sujets atteints de LH sans avoir rencontré l'EBV. Compte-tenu de la lourdeur de la technique car elle nécessite l'utilisation de lignées LCL autologues, nous avons appliqué une autre technique, l'ELISPOT.

L'ELISPOT permet de quantifier les cellules T activées par des antigènes spécifiques de l'EBV par détection de l'interféron gamma. Nos résultats n'ont pas montré globalement de déficit du contrôle de l'EBV. Mais une jeune patiente de 10 ans ayant une charge virale EBV très élevée n'a pas eu de réponse T anti-EBV efficace. Des explorations complémentaires vont être réalisées pour explorer plus avant ce défaut de réponse.

Notre étude est la première qui s'est intéressée à l'étude de la réponse T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> anti-EBV chez des enfants atteints de LH. Or le LH est un des lymphomes le plus fréquent chez l'enfant et les réponses immunitaires vis-à-vis de ce virus chez un adulte et un enfant ne sont pas forcément comparables. Il semblerait que les patients atteints de LH présentant une charge virale EBV fortement élevée présenteraient un déficit de sécrétion cytokinique par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ce

qui pourrait expliquer l'apparition d'un LH chez ces jeunes patients. Les résultats que nous avons obtenus restent à confirmer par l'inclusion d'un nombre plus important de patients dans chacun des trois groupes ce qui permettra d'approfondir les connaissances actuelles sur cette pathologie chez les enfants, notamment son association avec l'EBV et pourra servir de support pour l'adaptation de l'immunothérapie anti-lymphomateuse de plus en plus répandue en pédiatrie (Bollard et al., 2012). Enfin, d'autres modalités techniques pourraient être utilisées pour mesurer la réponse spécifique anti-EBV en particulier il serait intéressant d'étendre notre étude à la quantification de la production d'autres cytokines comme le granzyme B ou à d'autres types cellulaires comme les lymphocytes NK (Chijioke O. and al., 2013).

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abolhassani H, Sagvand BT, Shokuhfar T, Mirminachi B, Rezaei N, Aghamohammadi A. A review on guidelines for management and treatment of common variable immunodeficiency. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2013, Vol. 9, No. 6, Pages 561-575.
- Aghamohammadi A, Rezaei N, Gharagozlou M, Ramyar A, Mahjoub F, Rezaei-Kalantari K, Moin M. Hodgkin lymphoma in two siblings with common variable immunodeficiency. *Pediatr Hematol Oncol*. 2007;24:337-42.
- Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 2009;254(2):149-54.
- Allday MJ, Crawford DH. Role of epithelium in EBV persistence and pathogenesis of B-cell tumours. *Lancet*. 1988 Apr 16;1(8590):855-7.
- Aldinucci, D., Lorenzon, D., Cattaruzza, L., Pinto, A., Gloghini, A., Carbone, A., and Colombatti, A. (2008). Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. *Int J Cancer* 122(4), 769-76.
- Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods* 2004; 294(1-2):15-22.
- Amanzadeh A, Amirzargar AA, Mohseni N, Arjang Z, Aghamohammadi A, Shokrgozar MA, Shokri F. Association of HLA-DRB1, DQA1 and DQB1 Alleles and Haplotypes with Common Variable Immunodeficiency in Iranian Patients. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2012 Apr;4(2):103-12.
- Ambinder RF. The same but different: autologous hematopoietic stem cell transplantation for patients with lymphoma and HIV infection. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44:1-5.
- Anagnostopoulos I, Hummel M, Stein H. Frequent presence of latent Epstein-Barr virus infection in peripheral T cell lymphomas. A review. *Leuk Lymphoma*. 1995 Sep;19(1-2):1-12.
- Andriko JA, Aguilera NS, Nandedkar MA, Abbondanzo SL. Childhood Hodgkin's disease in the United States: an analysis of histologic subtypes and association with Epstein-Barr virus. *Mod Pathol*. 1997 Apr;10(4):366-71.
- Aspalter RM, Sewell WA, Dolman K, Farrant J, Webster AD. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol*. 2000 Sep;121(3):506-14.
- Ayoub JP, Palmer JL, Huh Y, Cabanillas F, Younes A. Therapeutic and prognostic implications of peripheral blood lymphopenia in patients with Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*. 1999 Aug;34(5-6):519-27.
- Azambuja D, Natkunam Y, Biasoli I, Lossos IS, Anderson MW, Morais JC, Spector N. Lack of association of tumor-associated macrophages with clinical outcome in patients with classical Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 2012; 23:736-42.
- Barros MH, Hassan R, Niedobitek G. Tumor-associated macrophages in pediatric classical Hodgkin lymphoma: association with Epstein-Barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact. *Clin Cancer Res*. 2012; 15:18:3762-71.
- Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15:535-62.
- Besson C, Amiel C, Le-Pendeven C, Brice P, Fermé C, Carde P, Hermine O, Raphael M, Abel L, Nicolas JC. Positive correlation between Epstein-Barr virus viral load and anti-viral capsid immunoglobulin G titers determined for Hodgkin's lymphoma patients and their relatives. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 47-50.
- Besson C, Amiel C, Le-Pendeven C, Plancoulaine S, Bonnardel C, Ranque B, Abbed K, Brice P, Fermé C, Carde P, Hermine O, Raphael M, Bresson JL, Nicolas JC, Gessain A, Dethe G, Abel L. Strong correlations of anti-viral capsid antigen antibody levels in first-degree relatives from families with Epstein-Barr virus-related lymphomas. *J Infect Dis*. 2009; 199:1121-7.
- Betts MR, Koup RA. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol*. 2004;75:497-512.
- Björkholm M, Sjöberg J, Nygell UA, Porwit A, Björck E. Development of Hodgkin lymphoma in homozygotic triplets with constitutional deletion in MKL1. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4807.

- Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, Gahn B, Huls MH, Rousseau A, Sixbey J, Gresik MV, Carrum G, Hudson M, Dilloo D, Gee A, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med.* 2004 Dec 20;200(12):1623-33.
- Bollard CM, Lim MS, Gross TG; on behalf of the COG Non-Hodgkin Lymphoma Committee. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Non-Hodgkin lymphoma. *Pediatr Blood Cancer.* 2012.
- Borer A, Gilad J, Haikin H, Riesenberk K, Porath A, Schlaeffer F. Clinical features and costs of care for hospitalized adults with primary Epstein-Barr virus infection. *Am J Med.* 1999 Aug;107(2):144-8.
- Brengel-Pesce, K., P. Morand, A. Schmuck, M. J. Bourgeat, M. Buisson, G. Bargues, M. Bouzid, and J. M. Seigneurin. 2002. Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J Med Virol* 66:360-9.
- Callan MF. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* 2004 Aug;6(10):937-45.
- Canale VC, Smith CH. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr.* 1967; 70: 891-9.
- Chang RS, Golden HD. Transformation of human leucocytes by throat washing from infectious mononucleosis patients. *Nature.* 1971 Dec 10;234(5328):359-60.
- Chang ET, Zheng T, Lennette ET, Weir EG, Borowitz M, Mann RB, Spiegelman D, Mueller NE. Heterogeneity of risk factors and antibody profiles in Epstein-Barr virus genome-positive and -negative Hodgkin lymphoma. *J Infect Dis.* 2004; 189: 2271-81
- Chang KC, Khen NT, Jones D, Su IJ. Epstein-Barr virus is associated with all histological subtypes of Hodgkin lymphoma in Vietnamese children with special emphasis on the entity of lymphocyte predominance subtype. *Hum Pathol.* 2005;36(7):747-55.
- Chapman AL, Rickinson AB, Thomas WA, Jarrett RF, Crocker J, Lee SP. Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocyte responses in the blood and tumor site of Hodgkin's disease patients: implications for a T-cell-based therapy. *Cancer Res.* 2001 Aug 15;61(16):6219-26.
- Chene, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A. O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K. I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M., and Bejarano, M. T. A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog* , 2007 : 3(6), e80.
- Christopoulos C, Papadaki T, Vlavianos P, Kokkini G. Hodgkin's disease in a patient with common variable immunodeficiency. *J Clin Pathol.* 1995; 48: 871-3.
- Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, Oohashi T, Howell GR, Bye JM, Cahn AP, Durham J, Heath P, Wray P, Pavitt R, Wilkinson J, Leversha M, Huckle E, Shaw-Smith CJ, Dunham A, Rhodes S, Schuster V, Porta G, Yin L, Serafini P, Sylla B, Zollo M, Franco B, Bolino A, Seri M, Lanyi A, Davis JR, Webster D, Harris A, Lenoir G, de St Basile G, Jones A, Behloradsky BH, Achatz H, Murken J, Fassler R, Sumegi J, Romeo G, Vaudin M, Ross MT, Meindl A, Bentley DR. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet.* 1998 Oct;20(2):129-35.
- Cohen JL. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med.* 2000; 343:481-92.
- Comoli P, Schilham MW, Basso S, van Vreeswijk T, Bernardo ME, Maccario R, van Tol MJ, Locatelli F, Veltrop-Duits LA. T-cell lines specific for peptides of adenovirus hexon protein and devoid of alloreactivity against recipient cells can be obtained from HLA-haploidentical donors. *J Immunother.* 2008 Jul-Aug;31(6):529-36.
- Corinne Miceli-Richard, Nicolas Gestermann, Corinne Amiel, Jérémie Sellam, Marc Ittah, Stephan Pavy, Alejandra Urrutia, Isabelle Girault, Guislaine Carcelain, Alain Venet, and Xavier Mariette. Effect of methotrexate and anti-TNF on Epstein-Barr virus T-cell response and viral load in patients with rheumatoid arthritis or spondylarthropathies. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(3): R77.
- Crucian, B.E., et al., Routine detection of Epstein-Barr virus specific T-cells in peripheral blood by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 2001; 247(1-2): 35-47;
- Cruz CR, Gerdemann U, Leen AM, Shafer JA, Ku S, Tzou B, Horton TM, Sheehan A, Copeland A, Younes A, Rooney CM, Heslop HE, Bollard CM. Improving T-cell therapy for relapsed EBV-negative Hodgkin lymphoma by targeting upregulated MAGE-A4. *Clin Cancer Res.* 2011 Nov 15;17(22):7058-66.
- Dalod M, Dupuis M, Deschemin JC, Sicard D, Salmon D, Delfraissy JF, Venet A, Sinet M, Guillet JG. Broad, intense anti-human immunodeficiency virus (HIV) ex vivo CD8(+) responses in HIV type 1-infected patients: comparison with anti-Epstein-Barr virus responses and changes during antiretroviral therapy. *J Virol.* 1999 Sep;73(9):7108-16.

- Dehee A, Asselot C, Piolot T, Jacomet C, Rozenbaum W, Vidaud M, Garbarg-Chenon A, Nicolas JC. Quantification of Epstein-Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR. *J Med Virol.* 2001 Nov;65(3):543-52.
- Delabie J, Tierens A, Wu G, Weisenburger DD, Chan WC. Lymphocyte predominance Hodgkin's disease: lineage and clonality determination using a single-cell assay. *Blood.* 1994; Nov 15; 84:3291-8.
- De Sousa M, Tan CT, Siegal FP, Filippa DA, Tan R, Good RA. Immunologic parameters in childhood Hodgkin's disease II. T and B lymphocytes in the peripheral blood of normal children and in the spleen and peripheral blood of children with Hodgkin's disease. *Pediatr Res.* 1978; 12(2):143-7.
- Dianzani U, Bragardo M, DiFranco D, Alliaudi C, Scagni P, Buonfiglio D, Redoglia V, Bonissoni S, Correr A, Dianzani I, Ramenghi U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood.* 1997 Apr 15;89(8):2871-9.
- Diepstra A, van Imhoff GW, Schaapveld M, Karim-Kos H, van den Berg A, Vellenga E, Poppema S. Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. *J Clin Oncol.* 2009 Aug 10; 27(23):3815-21.
- Dolcetti, R., and Boiocchi, M.. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Biomed Pharmacother.* 1998; 52(1), 13-25.
- Drouet, E., P. Brousset, F. Fares, J. Icart, C. Verniol, F. Meggetto, D. Schlaifer, H. Desmorat-Coat, F. Rigal-Huguet, A. Niveleau, and G. Delsol.. High Epstein-Barr virus serum load and elevated titers of anti-ZEBRA antibodies in patients with EBV-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *J Med Virol* 1999; 57:383-9.
- Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W., and Young, L. S.. 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(23), 16085-96.
- Enblad G, Sandvej K, Sundstrom C, Pallesen G, Glimelius B Epstein-Barr virus distribution in Hodgkin's disease in an unselected Swedish population. *Acta Oncol.* 1999;38:425-9.
- Epstein MA, Barr Y, Achong BG. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964;15: 702-703.
- Ersing, I., Bernhardt, K., and Gewurz, B. E. (2013). NF-kappaB and IRF7 Pathway Activation by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1. *Viruses* 5(6), 1587-606.
- Español T, de Gracia J, Caragol I, Sauleda S, Garcia X, Bertran JM. Malignancies in primary immunodeficient patients. *Immunodeficiency.* 1993; 4(1-4):197-9.
- Falletta JM, Ramanujam N, Starling KA, Fernbach DJ. Ig-positive lymphocytes in Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1973;288:581-2.
- Fesus SM, Hagemester FB, Manning J. Hodgkin disease in a patient with common variable immunodeficiency. *Am J Hematol.* 1989 Oct;3 2(2):138-42.
- Filipovich AH, Mathur A, Kamat D, Shapiro RS. Primary immunodeficiencies: genetic risk factors for lymphoma. *Cancer Res.* 1992 Oct 1; 52(19 Suppl):5465s-5467s.
- Filipovich AH, Mathur A, Kamat D, Kersey JH, Shapiro RS. Lymphoproliferative disorders and other tumors complicating immunodeficiencies. *Immunodeficiency.* 1994;5(2):91-112.
- Flavell, K. J., and Murray, P. G. Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol Pathol,* 2000; 53(5),262-9.
- Gallagher A, Armstrong AA, MacKenzie J, Shield L, Khan G, Lake A, Proctor S, Taylor P, Clements GB, Jarrett RF. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) genomes in the serum of patients with EBV-associated Hodgkin's disease. *Int J Cancer.* 1999;84:442-8.
- Gandhi MK, Tellam JT, Khanna R. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's lymphoma. *Brit J Haematol* 2004; 125: 267-281.
- Gasser O, Wolbers M, Steffen I, Hirsch HH, Battegay M, Hess C. Increased Epstein-Barr virus-specific antibody-levels in HIV-infected individuals developing primary central nervous system lymphoma. *AIDS.* 2007 Jul 31;21(12):1664-6.
- Gaspar HB, Sharifi R, Gilmour KC, Thrasher AJ. X-linked lymphoproliferative disease: clinical, diagnostic and molecular perspective. *Br J Haematol.* 2002 Dec;119(3):585-95.
- Gaulard P, Brousse N. Classical Hodgkin's lymphoma: biology and grey zones. *Ann Pathol.* 2004 Sep; 24(4):330-48.
- Gerber P, Lucas S, Nonoyama M, Perlin E, Goldstein LI. Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet.* 1972 Nov 11;2(7785):988-9.
- Geretti AM, Dings ME, van Els CA, van Baalen CA, Wijnholds FJ, Borleffs JC, Osterhaus AD. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)--and Epstein-Barr virus--specific cytotoxic T lymphocyte precursors exhibit different kinetics in HIV-1--infected persons. *J Infect Dis.* 1996 Jul;174(1):34-45.

- Glaser SL, Lin RJ, Stewart SL, Ambinder RF, Jarrett RF, Brousset P, Pallesen G, Gulley ML, Khan G, O'Grady J, Hummel M, Preciado MV, Knecht H, Chan JK, Claviez A. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer*. 1997;70:375-82.
- Glocker E, Ehl S, Grimbacher B. Common variable immunodeficiency in children. *Curr Opin Pediatr*. 2007 Dec;19(6):685-92.
- Goedert JJ, Cote TR, Virgo P, Scoppa SM, Kingua DW, Gail MH, Jaffe ES, Biggar RJ. Spectrum of AIDS-associated malignant disorders. *Lancet* 1998; 1833-1839.
- Goedert JJ, Bower M. Impact of highly effective antiretroviral therapy on the risk for Hodgkin lymphoma among people with human immunodeficiency virus infection. *Curr Opin Oncol*. 2012 Sep; 24(5):531-6.
- Grierson H, Purtilo DT. Epstein-Barr virus infections in males with the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med*. 1987; 106(4):538-45.
- Grifoni V, Del Giaco GS, Manconi PE, Tognella S. Surface immunoglobulins on lymphocytes in Hodgkin's disease. *Lancet* 1972. 1: 848.
- Haan KM, Kwok WW, Longnecker R, Speck P. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol*. 2000 Mar;74(5):2451-4.
- Haigh TA, Lin X, Jia H, Hui EP, Chan AT, Rickinson AB, Taylor GS. EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4+ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines. *J Immunol*. 2008 Feb 1;180(3):1643-54.
- Haioun C, Besson C, Lepage E, Thieblemont C, Simon D, Rose C, Tilly H, Sonet A, Lederlin P, Attal M, Brière J, Reyes F. Incidence and risk factors of central nervous system relapse in histologically aggressive non-Hodgkin's lymphoma uniformly treated and receiving intrathecal central nervous system prophylaxis: a GELA study on 974 patients. *Groupe d'Etudes des Lymphomes de l'Adulte. Ann Oncol*. 2000; 11:685-9.
- Hallee TJ, Evans AS, Niederman JC, Brooks CM, Voegtly jH. Infectious mononucleosis at the United States Military Academy. A prospective study of a single class over four years. *Yale J Biol Med*. 1974 Sep;47(3):182-95.
- Harrington DS, Weisenburger DD, Purtilo DT. Malignant lymphoma in the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Cancer*. 1987; 59:1419-29.
- Heller KN, Arrey F, Steinherz P, Portlock C, Chadburn A, Kelly K, Munz C. Patients with Epstein Barr virus-positive lymphomas have decreased CD4(+) T-cell responses to the viral nuclear antigen 1. *International Journal of Cancer* 2008; 123(12):2824-31.
- Henle W, Henle G. Epstein-Barr virus and blood transfusions. *Prog Clin Biol Res*. 1985;182:201-9.
- Herbst, H., Foss, H. D., Samol, J., Araujo, I., Klotzbach, H., Krause, H., Agathangelou, A., Niedobitek, G., and Stein, H. (1996). Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood* 87(7), 2918-29.
- Hinz, M., Loser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dorken, B., and Scheidereit, C. (2001). Constitutive NFkappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* 97(9), 2798-807.
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., and Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 25, 587-617.
- Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K, Hamilton-Dutoit S, Frisch M, Zhang JS, Madsen M, Rosdahl N, Konradsen HB, Storm HH, Melbye M. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med*. 2003 Oct 2;349(14):1324-32.
- Hjalgrim H, Engels EA. Infectious aetiology of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiological evidence. *J Intern Med*. 2008 Dec; 264(6):537-48.
- Hjalgrim H, Rostgaard K, Johnson PC, Lake A, Shield L, Little AM, Ekstrom-Smedby K, Adami HO, Glimelius B, Hamilton-Dutoit S, Kane E, Taylor GM, McConnachie A, Ryder LP, Sundstrom C, Andersen PS, Chang ET, Alexander FE, Melbye M, Jarrett RF. HLA-A alleles and infectious mononucleosis suggest a critical role for cytotoxic T-cell response in EBV-related Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 6; 107(14):6400-5.
- Hochberg D, Souza T, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol*. 2004 May;78(10):5194-204.
- Hohaus S, Santangelo R, Giachelia M, Vannata B, Massini G, Cuccaro A, Martini M, Cesarini V, Cenci T, D'Alo F, Voso MT, Fadda G, Leone G, Larocca LM. The viral load of Epstein-Barr virus (EBV)

- DNA in peripheral blood predicts for biological and clinical characteristics in Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2011 May 1;17(9):2885-92.
- Holmes RD, Sokol RJ. Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatr Transplant.* 2002 Dec; 6(6):456-64.
- Huang, X., Kushekhar, K., Nolte, I., Kooistra, W., Visser, L., Bouwman, I., Kouprie, N., Veenstra, R., van Imhoff, G., Olver, B., Houlston, R. S., Poppema, S., Diepstra, A., Hepkema, B., and van den Berg, A. (2012). HLA associations in classical Hodgkin lymphoma: EBV status matters. *PLoS One* 7(7), e39986.
- Huck K, Feyen O, Niehues T, Rüschenhoff F, Hübner N, Laws HJ, Teliëps T, Knapp S, Wacker HH, Meindl A, Jumaa H, Borkhardt A. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest.* 2009 May;119(5):1350-8.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press 2001.
- Jarrett RF, Krajewski AS, Angus B, Freeland J, Taylor PR, Taylor GM, Alexander FE. The Scotland and Newcastle epidemiological study of Hodgkin's disease: impact of histopathological review and EBV status on incidence estimates. *J Clin Pathol.* 2003;56:811-6.
- Jopling CL, Yi MK, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science.* 2005;309:1577-1581.
- Josting A, Rueffer U, Franklin J, Sieber M, Diehl V, Engert A. Prognostic factors and treatment outcome in primary progressive Hodgkin lymphoma: a report from the German Hodgkin Lymphoma Study Group. *Blood.* 2000 Aug 15; 96(4):1280-6.
- Kanakry JA, Li H, Gellert LL, Lemas MV, Hsieh WS, Hong F, Tan KL, Gascoyne RD, Gordon LI, Fisher RI, Bartlett NL, Stiff P, Cheson BD, Advani R, Miller TP, Kahl BS, Horning SJ, Ambinder RF. Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American co-operative group trial. *Blood.* 2013
- Kanzler H, Kuppers R, Hansmann ML, Rajewski K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumour clone derived from crippled germinal center B cells. *J Exp Med* 1996;184 : 1495-1505.
- Kapp, U., Yeh, W. C., Patterson, B., Elia, A. J., Kagi, D., Ho, A., Hessel, A., Tipsword, M., Williams, A., Mirtsos, C., Itie, A., Moyle, M., and Mak, T. W. (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *J Exp Med* 189(12), 1939-46.
- Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol.* 2007 Dec; 60(12):1342-9.
- Karajannis MA, Hummel M, Anagnostopoulos I, Stein H. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood.* 1997 Apr 15;89(8):2856-62.
- Kazimiera J, Gajl-Peczalska A, John A, Hanse N, Clara D, Bloomfield D, Robert A, Good. B Lymphocytes in Untreated Patients with Malignant Lymphoma and Hodgkin's Disease. *The Journal of Clinical Investigation* 1973; 52: 3064-3073
- Kersten MJ, Klein MR, Holwerda AM, Miedema F, van Oers MH. Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell responses in HIV-1 infection: different kinetics in patients progressing to opportunistic infection or non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest.* 1997 Apr 1;99(7):1525-33.
- Kim DN, Chae HS, Oh ST, et al. Expression of viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Virol.* 2007;81:1033-1036.
- Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol.* 2002 Aug;2(8):557-68.
- Kuppers R, Hansmann ML, Rajewski K. Clonality and germinal centre B-cell derivation of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Ann Oncol* 1998 ; 9 (suppl. 5) : S17-20.
- Kuppers R, Rajewski K. The origin of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu Rev Immunol* 1998; 16 : 471-93.
- Küppers R, Schwering I, Bräuninger A, Rajewski K, Hansmann ML. Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol.* 2002; 13:11-8.
- Küppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol.* 2003 Oct;3(10):801-12.

- Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009;491-6.
- Kuzushima K, Hoshino Y, Fujii K, Yokoyama N, Fujita M, Kiyono T, Kimura H, Morishima T, Morishima Y, Tsurumi T. Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T-cell frequencies by flow cytometry. *Blood*. 1999 Nov 1;94(9):3094-100.
- Latour S, Veillette A. Molecular and immunological basis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. 2003 Apr;192: 212-24.
- Lim MS, Straus SE, Dale JK, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W, Sneller MC, Puck JM, Lenardo MJ, Elenitoba-Johnson KS, Lin AY, Raffeld M, Jaffe ES. Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Pathol*. 1998 Nov;153(5):1541-50.
- Lin X, Gudgeon NH, Hui EP, Jia H, Qun X, Taylor GS, Barnardo MC, Lin CK, Rickinson AB, Chan AT. CD4 and CD8 T cell responses to tumour-associated Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2008 Jul;57(7):963-75.
- Ma CS, Nichols KE, Tangye SG. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:337-79.
- Malphettes M, Oksenhendler E, Galicier L, Fieschi C. Granulomatous disease in common variable immunodeficiency. *Rev Med Interne*. 2008 Jan;29(1):28-32.
- Mellemkjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, Bjorkander J, Olsen JH. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol*. 2002 Dec;130(3):495-500.
- Merlo A, Turrini R, Dolcetti R, Martorelli D, Muraro E, Comoli P, Rosato A. The interplay between Epstein-Barr virus and the immune system: a rationale for adoptive cell therapy of EBV-related disorders. *Haematologica*. 2010 Oct;95(10):1769-77.
- Miceli-Richard C, Gestermann N, Amiel C, *et al*. Effect of methotrexate and anti-TNF on Epstein-Barr virus T-cell response and viral load in patients with rheumatoid arthritis or spondylarthropathies. *Arthritis Research & Therapy* 2009; 11(3):9.
- Michel M, Chanet V, Galicier L, Ruivard M, Levy Y, Hermine O, Oksenhendler E, Schaeffer A, Bierling P, Godeau B. Autoimmune thrombocytopenic purpura and common variable immunodeficiency: analysis of 21 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2004 Jul; 83(4):254-63.
- Morra M, Silander O, Calpe S, Choi M, Oettgen H, Myers L, Etzioni A, Buckley R, Terhorst C. Alterations of the X-linked lymphoproliferative disease gene SH2D1A in common variable immunodeficiency syndrome. *Blood*. 2001 Sep 1;98(5):1321-5.
- Mueller N, Evans A, Harris NL, Comstock GW, Jellum E, Magnus K, Orentreich N, Polk BF, Vogelmann J. Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med*. 1989;320:689-95.
- Navarro A, Gaya A, Martinez A, Urbano-Ispizua A, Pons A, Balagué O, Gel B, Abrisqueta P, Lopez-Guillermo A, Artells R, Montserrat E, Monzo M. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2825-32.
- Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M. T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M. G. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer*,1994; 57(2), 240-4.
- Nichols KE, Harkin DP, Levitz S, Krainer M, Kolquist KA, Genovese C, Bernard A, Ferguson M, Zuo L, Snyder E, Buckler AJ, Wise C, Ashley J, Lovett M, Valentine MB, Look AT, Gerald W, Housman DE, Haber DA. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13765-70.
- Niedobitek G, Agathangelou A, Steven N, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) in infectious mononucleosis: detection of the virus in tonsillar B lymphocytes but not in desquamated oropharyngeal epithelial cells. *Mol Pathol*. 2000 Feb;53(1):37-42.
- Niens M, Jarrett RF, Hepkema B, Nolte IM, Diepstra A, Platteel M, Kouprie N, Delury CP, Gallagher A, Visser L, Poppema S, te Meerman GJ, van den Berg A. HLA-A\*02 is associated with a reduced risk and HLA-A\*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2007 Nov 1;110(9):3310-5.
- Oksenhendler E, Fieschi C. Common variable immunodeficiency. *Rev Prat*. 2007 Oct 15; 57(15):1687-90.
- Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, Rieux-Laucat F, Siegel RM, Su HC, Teachey DT, Rao VK. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune

- lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010 Oct 7;116(14):e35-40.
- Pasquier B, Yin L, Fondanèche MC, Relouzat F, Bloch-Queyrat C, Lambert N, Fischer A, de Saint-Basile G, Latour S. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):695-701.
- Pereira MS, Field AM, Blake JM, Rodgers FG, Bailey LA, Davies JR. Evidence for oral excretion of E.B. virus in infectious mononucleosis. *Lancet*. 1972 Apr 1;1(7753):710-1.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., and Ben-Neriah, Y. (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431(7007), 461-6.
- Purtilo DT, Cassel CK, Yang JP, Harper R. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet*. 1975 Apr 26;1(7913):935-40.
- Purtilo DT, Sakamoto K, Barnabei V, Seeley J, Bechtold T, Rogers G, Yetz J, Harada S. Epstein-Barr virus-induced diseases in boys with the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP): update on studies of the registry. *Am J Med*. 1982 Jul; 73(1):49-56.
- Ramenghi U, Bonissoni S, Migliaretti G, DeFranco S, Bottarel F, Gambaruto C, DiFranco D, Priori R, Conti F, Dianzani I, Valesini G, Merletti F, Dianzani U. Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations is a familial trait predisposing to development of autoimmune diseases and cancer. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3176-82.
- Rao VK, Oliveira JB. How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2011 Nov 24;118(22):5741-51.
- Rea TD, Russo JE, Katon W, Ashley RL, Buchwald DS. Prospective study of the natural history of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus. *J Am Board Fam Pract*. 2001 Jul-Aug;14(4):234-42.
- Redchenko, I.V. and A.B. Rickinson, Accessing Epstein-Barr virus-specific T-cell memory with peptide-loaded dendritic cells. *J Virol* 1996. 70(4): 334-42
- Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. *Fields Virology*, (eds Knipe D M & Howley PM) (Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia . 2001) p2511-2574.
- Rieux-Laucat F, Le Deist F, Fischer A. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):124-33.
- Rieux-Laucat F. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: an inherited or a somatic defect of apoptosis. *Med Sci (Paris)*. 2006 Jun-Jul; 22(6-7):645-50.
- Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, Galicier L, Le Deist F, Rieux-Laucat F, Revy P, Fischer A, de Saint Basile G, Latour S. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006 Nov 2; 444(7115):110-4.
- Sawyer RN, Evans AS, Niederman JC, McCollum RW. Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis. *J Infect Dis*. 1971 Mar;123(3):263-70.
- Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, van Schaik S, Notarangelo L, Geha R, Roncarolo MG, Oettgen H, De Vries JE, Aversa G, Terhorst C: The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998; 395:462.
- Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, Cachero TG, Shulga-Morskaya S, Dobles M, Frew E, Scott ML. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science*. 2001; 293:2111-4.
- Schmitz R, Stanelle J, Hansmann ML, Küppers R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol*. 2009; 4:151-74.
- Schwaller, J., Tobler, A., Niklaus, G., Hurwitz, N., Hennig, I., Fey, M. F., and Borisch, B.). Interleukin-12 expression in human lymphomas and nonneoplastic lymphoid disorders. *Blood*, 1995; 85(8), 2182-8.
- Sharifi R, Sinclair JC, Gilmour KC, Arkwright PD, Kinnon C, Thrasher AJ, Gaspar HB. SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3821-7.
- Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*. 1984 May 10;310(19):1225-30.
- Smets F, Latinne D, Bazin H, Reding R, Otte JB, Buts JP, Sokal EM. Ratio between Epstein-Barr viral load and anti-Epstein-Barr virus specific T-cell response as a predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation*. 2002;73:1603-10.
- Smith C, Khanna R. A new approach for cellular immunotherapy of nasopharyngeal carcinoma. *Oncology*. 2012 Nov 1;1(8):1440-1442.

- Spacek, M., Hubacek, P., Markova, J., Zajac, M., Vernerova, Z., Kamaradova, K., Stuchly, J., and Kozak, T. (2011). Plasma EBV-DNA monitoring in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin lymphoma patients. *APMIS* 119(1), 10-6.
- Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J, Weisenburger DD, Bast MA, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Rimsza LM, Campo E, Delabie J, Braziel RM, Cook JR, Tubbs RR, Jaffe ES, Lenz G, Connors JM, Staudt LM, Chan WC, Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010 Mar 11; 362(10):875-85.
- Stein H, Delsol G, Pileri S, Said G: Classical Hodgkin lymphoma. In WHO classification of tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues, IARCpress, Washington. 2001 p244-253.
- Stepensky P, Weintraub M, Yanir A, Revel-Vilk S, Krux F, Huck K, Linka RM, Shaag A, Elpeleg O, Borkhardt A, Resnick IB. IL-2-inducible T-cell kinase deficiency: clinical presentation and therapeutic approach. *Haematologica*. 2011 Mar;96(3):472-6.
- Straus SE, Sneller M, Lenardo MJ, Puck JM, Strober W. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med*. 1999 Apr 6;130(7):591-601.
- Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rösen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CM, Lin AY, Bäuml C, Siegert E, Marx A, Vaishnav AK, Grodzicky T, Fleisher TA, Lenardo MJ. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*. 2001 Jul 1; 98(1):194-200.
- Tan, LC, et al., A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol*,1999. 162(3): 1827-35.
- Tattevin P, Crémieux AC, Descamps D, Carbon C. Transfusion-related infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis*. 2002;34(10):777-8.
- Tesch H, Diehl V, Lathan B, Hasenclever D, Sieber M, Rüffer U, Engert A, Franklin J, Pfreundschuh M, Schalk KP, Schwieder G, Wulf G, Dölken G, Worst P, Koch P, Schmitz N, Brunsch U, Tirier C, Müller U, Loeffler M. Moderate dose escalation for advanced stage Hodgkin's disease using the bleomycin, etoposide, adriamycin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, and prednisone scheme and adjuvant radiotherapy: a study of the German Hodgkin's Lymphoma Study Group. *Blood*. 1998 Dec 15; 92(12):4560-7.
- Triboulet R, Mari B, Lin YL, et al. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*. 2007;315:1579-1582.
- Uehara T, Miyawaki T, Ohta K, Tamaru Y, Yokoi T, Nakamura S, Taniguchi N. Apoptotic cell death of primed CD45RO+ T lymphocytes in Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *Blood*. 1992 Jul 15;80(2):452-8.
- Urayama KY, Jarrett RF, Hjalgrim H, Diepstra A, Kamatani Y, Chabrier A, Gaborieau V, Boland A, Nieters A, Becker N, Foretova L, Benavente Y, Maynadié M, Staines A, Shield L, Lake A, Montgomery D, Taylor M, Smedby KE, Amini RM, Adami HO, Glimelius B, Feenstra B, Nolte IM, Visser L, van Imhoff GW, Lightfoot T, Cocco P, Kiemeny L, Vermeulen SH, Holcatova I, Vatten L, Macfarlane GJ, Thomson P, Conway DI, Benhamou S, Agudo A, Healy CM, Overvad K, Tjønneland A, Melin B, Canzian F, Khaw KT, Travis RC, Peeters PH, González CA, Quirós JR, Sánchez MJ, Huerta JM, Ardanaz E, Dorronsoro M, Clavel-Chapelon F, Bueno-de-Mesquita HB, Riboli E, Roman E, Boffetta P, de Sanjosé S, Zelenika D, Melbye M, van den Berg A, Lathrop M, Brennan P, McKay JD. Genome-wide association study of classical Hodgkin lymphoma and Epstein-Barr virus status-defined subgroups. *J Natl Cancer Inst*. 2012 Feb 8;104(3):240-53.
- Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood* 2008 Jan 1; 111(1):77-85.
- Wistinghausen, B., Gross, T. G., and Bollard, C. Post-Transplant Lymphoproliferative Disease in Pediatric Solid Organ Transplant Recipients. *Pediatr Hematol Oncol*. 2013.
- Yoshimoto, T., Nagase, H., Yoneto, T., Inoue, J., and Nariuchi, H. Interleukin-12 expression in B cells by transformation with Epstein-Barr virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998; 252(3), 556-60.

Young, L. S., and Murray, P. G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 2003; 22(33), 5108-21.

Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus : 40 years on. *Nature Rev Cancer* 2004. 4: 757-768.

Zenone T. Hodgkin's disease and common variable immunodeficiency. *J Clin Pathol*. 1996 ;49:1021.

<http://www1.imperial.ac.uk/departmentofmedicine/divisions/infectiousdiseases/viro/epsteinbarr/>

# Lymphopénie et lymphome de Hodgkin : impact pronostique et physiopathologie

## *Lymphopenia and Hodgkin lymphoma: Prognosis and physiopathological significance*

Leila Hamdi<sup>1,2,3,a</sup>, Rita Creidy<sup>4,a</sup>,  
Martine Raphael<sup>3</sup>, Ridha Khelifa<sup>5</sup>,  
Roman Krzysiek<sup>1,3,6,a</sup>,  
Caroline Besson<sup>1,2,3,7,a</sup>

<sup>1</sup> Hématologie et immunologie biologiques, hôpitaux universitaires Paris-Sud (AP-HP), Le Kremlin-Bicêtre

<sup>2</sup> Inserm U1012

<sup>3</sup> Faculté de médecine, Université Paris Sud (Paris XI)

<sup>4</sup> Laboratoire de thérapie cellulaire et génique – Hôpital Necker Enfants Malades, APHP

<sup>5</sup> Unité de diagnostic viral et moléculaire des tumeurs, hôpital Habib Thameur, Tunis, Tunisie

<sup>6</sup> Inserm UMR996

<sup>7</sup> Service d'hématologie, CHU Bicêtre. 78 rue du Général Leclerc, 94375 Le Kremlin Bicêtre

<sup>a</sup>Les auteurs ont contribué de façon équivalente à la rédaction de l'article.

<caroline.besson@bct.aphp.fr>

### Résumé

Le lymphome de Hodgkin (LH) est une hémopathie lymphoïde caractérisée par une infiltration, le plus souvent ganglionnaire, par des cellules tumorales de Hodgkin et de Reed-Sternberg (RS). Ces cellules sont fréquemment infectées par le virus Epstein-Barr (EBV). Plusieurs facteurs immunologiques sont associés au pronostic de la maladie, comme le nombre de lymphocytes totaux périphériques, le profil et les quantités de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) et de macrophages infiltrant la tumeur (TAM). Les TIL associés au LH sont majoritairement orientés vers une réponse immunitaire T de type auxiliaire à profil cytokinique Th2. Leur proportion au sein de l'infiltrat est corrélée positivement à la survie alors que la proportion de TAM est corrélée négativement à la survie. L'infection par l'EBV agit aussi sur le profil et les caractéristiques de l'infiltrat inflammatoire du microenvironnement tumoral, la présence du génome de l'EBV dans les RS étant associée à une augmentation des TAM.

Les patients ayant un LH présentent fréquemment une lymphopénie et celle-ci est corrélée avec le stade ainsi qu'avec le pronostic de la maladie. Les cellules de RS et celles de l'infiltrat inflammatoire sécrètent de nombreux facteurs solubles impliqués dans le recrutement cellulaire local, le contrôle de l'activation et de la différenciation lymphocytaire ou dans la mort de ces cellules par apoptose. La diminution des lymphocytes B survient dès les stades les plus précoces du LH alors que les lymphopénies T semblent survenir plutôt dans des contextes de lymphopénie globale et à des stades avancés de la maladie. Nous verrons que la lymphopénie B pourrait être favorisée principalement par une destruction accrue des lymphocytes B en périphérie, voire par l'altération de la production centrale de lymphocytes B. Enfin, des mécanismes similaires contribuant à l'apparition d'une lymphopénie sont observés dans d'autres pathologies malignes ou inflammatoires.

■ **Mots clés** : lymphopénie, lymphome de Hodgkin, EBV, environnement tumoral, pronostic

**L**e lymphome de Hodgkin (LH) est une hémopathie lymphoïde caractérisée par une infiltration, le plus souvent ganglionnaire, par des cellules tumorales de Hodgkin et de Reed-Sternberg (RS) minoritaires au sein d'un fond inflammatoire non tumoral réactionnel, riche en lymphocytes, plasmocytes, histiocytes et

éosinophiles. La classification de l'OMS des tumeurs hématopoïétiques de 2008 reconnaît deux entités clinicopathologiques de LH : Le LH classique et le LH nodulaire à prédominance lymphocytaire [1]. Cette dernière entité, anciennement appelée paragranelome de Poppema et Lennert, est considérée comme

### Hématologie

Tirés à part : C. Besson

Pour citer cet article : Hamdi L, Creidy R, Raphael M, Khelifa R, Krzysiek R, Besson C. Lymphopénie et lymphome de Hodgkin : impact pronostique et physiopathologie. *Hématologie* 2013 ; 19 : 334-339. doi : 10.1684/hma.2013.0841

doi : 10.1684/hma.2013.0841

Tableau 1. Récapitulatif des études évaluant l'impact pronostique d'une lymphopénie au cours du LH

Articles Références	Population d'étude	Nombre de sujets	Seuil de lymphopénie (10 <sup>9</sup> /L)	Proportion de lymphopénie (%)	Impact pronostique de la lymphopénie	Corrélation avec les autres facteurs pronostiques
Hancock BW, 1982 [30]	Tous stades	181	1,5	49,7	OS	Stade
Hasenclever D, 1998 [8]	Stades avancés	2478	1,5 0,6 ou 8 % des GB*	49 21	DM OS, EFS	DM DM
Ayoub JP, 1999 [9]	Tous stades	267	Moyenne (± écart-type)	34 (66/196)	Non pronostique	Stade
Porrata L, 2012 [10]	Tous stades	476	0,6 Ratio Ly/Mo < 1,1	18 (86/476) 30 (141/476)	OS, EFS OS, PFS	DM Âge, sexe, stade, albumine
Koh YW, 2012 [20]	Tous stades	312	1,1 Ratio Ly/Mo < 2,9	DM 49 (154/312)	OS OS	DM Stade, signes généraux, IPS, albumine, hémoglobine

DM donnée non renseignée, EFS : survie sans événement, GB : leucocytes, IPS : index pronostique international, Ly : lymphocytes, Mo : monocytes, OS : survie globale, PFS : survie sans progression.

une forme rare et indolente de lymphome non hodgkinien. Les LH classiques sont classés en quatre sous-types morphologiques en fonction de la population cellulaire réactionnelle. Le LH scléronodulaire est la forme la plus fréquente : elle est identifiée dans 60 à 70 % des LH. Le LH à cellularité mixte regroupe environ 20 à 30 % des LH et constitue la forme la plus fréquemment rencontrée chez les patients immunodéprimés, chez les sujets âgés et chez les jeunes enfants (de moins de 10 ans). Les formes « riche en lymphocytes » et « à déplétion lymphocytaire » sont plus rares, et représentent chacune moins de 5 % des LH. Les cellules de RS ont une signature transcriptionnelle traduisant leur appartenance à la lignée lymphoïde B. Elles proviennent d'un précurseur lymphoïde B du centre germinatif (CG) ou d'un stade de différenciation post-CG suggéré par la présence des mutations somatiques des gènes codant les régions variables des immunoglobulines (IgV). Elles ont la particularité d'être fréquemment infectées de façon latente par le virus d'Epstein-Barr (EBV) [2]. L'EBV peut être détecté dans les cellules tumorales par hybridation *in situ* (EBER) ou immunohistochimie vis-à-vis de la protéine de latence membranaire de l'EBV (LMP1). L'EBV est plus fréquemment détecté dans les LH à cellularité mixte (40 à 90 % des cas) que dans les LH scléronodulaires (10 à 30 % des cas). Il est aussi plus fréquemment détecté chez le jeune enfant et chez le sujet âgé [3]. Chez le sujet âgé, la présence de l'EBV est un facteur pronostique défavorable [4]. Plusieurs autres facteurs intratumoraux sont associés au pronostic de la

maladie, comme la proportion de macrophages infiltrant la tumeur (TAM) [5, 6] et le profil et la proportion de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) [7].

### Lymphopénies au cours du lymphome de Hodgkin : fréquence et impact pronostique

Dès la mise au point de techniques permettant de quantifier les populations lymphocytaires dans le sang périphérique, il a été montré que les patients atteints d'un LH présentent fréquemment une lymphopénie périphérique [8-11] et que celle-ci était plus fréquente chez les patients ayant un stade avancé de la maladie. L'impact pronostique péjoratif d'une lymphopénie au cours du LH est confirmé par plusieurs études (tableau 1). Les autres facteurs pronostiques péjoratifs de LH sont le sexe masculin, l'âge de plus de 45 ans, un stade étendu, un taux d'albumine sérique abaissé, un taux d'hémoglobine abaissé, une hyperleucocytose. La lymphopénie constitue un facteur pronostique indépendant après ajustement sur ces facteurs et est intégrée dans le score pronostique international (IPS) [8]. Dans cette étude de Hasenclever et Diehl, menée chez des patients ayant un stade avancé de la maladie, le nombre de lymphocytes avait été déterminé pour près de 2 500 patients. Près de 50 % d'entre eux avaient une lymphopénie inférieure à 1,5 G/L. Les seuils de lymphopénie retenus dans le score IPS

sont plus bas (0,6 G/L ou moins de 8 % des leucocytes totaux) ce qui représente 21 % des patients [8].

Plusieurs études ont quantifié les sous-populations lymphocytaires au cours du LH. Il semble, d'après des études assez anciennes, que les lymphopénies B soient plus fréquentes que les lymphopénies T, chez l'adulte [11] comme chez l'enfant [12]. La diminution des lymphocytes B survient à un stade plus précoce que les lymphopénies T qui sont, elles, observées dans des contextes de lymphopénie globale et surtout à des stades avancés de la maladie [9, 11]. Chez l'enfant, une diminution significative du nombre de lymphocytes B chez les sujets atteints de LH par rapport à des sujets témoins a aussi été montrée [12]. Dans le cadre du protocole thérapeutique européen pédiatrique Euronet, nous avons analysé soixante-dix enfants atteints de LH au diagnostic [13]. Leur âge médian était de 13 ans, les extrêmes étant de 5 et 18 ans. Une proportion élevée de lymphopénies B a été détectée chez les enfants (28 %, 20/70). La lymphopénie B est accompagnée d'une lymphopénie T dans 40 % des cas (8/20 patients). Ces anomalies quantitatives des lymphocytes B ne sont pas corrélées avec l'âge ou le sexe, mais le sont avec le stade de la maladie ( $p < 0,02$ ) et le taux d'hémoglobine ( $p < 0,03$ ). Les lymphopénies B paraissent donc, chez l'enfant comme chez l'adulte, plus fréquentes que les lymphopénies globales ou que les lymphopénies T au moment du diagnostic de LH, et sont corrélées avec les facteurs pronostiques de LH.

### Impact des lymphocytes et macrophages intratumoraux au cours du lymphome de Hodgkin

Certaines caractéristiques de l'infiltrat lymphocytaire tumoral sont aussi associées avec le pronostic au cours du LH. Deux composantes de l'infiltrat inflammatoire constituent des facteurs pronostiques majeurs dans le LH classique : les TIL et les TAM. Les TIL sont répartis en :

- lymphocytes T-CD4 auxiliaires à profil cytokinique Th1 (T-CD4-Th1) qui sécrètent de manière prépondérante de l'IL-2, du TNF- $\alpha$  et de l'IFN- $\gamma$ ,
- lymphocytes T-CD4-Th2, qui sécrètent de manière prépondérante de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IL-13,
- lymphocytes T régulateurs Foxp3+ (T-regs) à fort pouvoir suppressif envers les réponses lymphocytaires physiologiques et délétère pour la réponse antitumorale.

De façon caractéristique, les TIL associés au LH sont préférentiellement orientés vers une réponse immunitaire de type Th2 et le nombre des lymphocytes Th2 au sein de l'infiltrat est positivement associé à la survie sans rechute [7]. De plus, un ratio T-regs/Th2 augmenté est corrélé à une diminution de la survie sans rechute. Par ailleurs, il a été

montré que la présence de l'EBV *in situ* modifiait le microenvironnement tumoral avec une augmentation des lymphocytes Th1 [15].

D'autres études ont montré que le nombre augmenté de TAM était associé de façon indépendante à une diminution de la survie [4, 16]. Les TAM dérivés des monocytes circulants, sont recrutés dans l'environnement tumoral sous l'effet de facteurs chimiotactiques solubles d'origine tumorale. Leur quantification est réalisée par un immunomarquage *in situ* anti-CD68 [5]. Les TAM agiraient en sécrétant dans le microenvironnement tumoral des facteurs favorisant directement la croissance et la survie des cellules tumorales et/ou en exprimant des molécules impliquées dans l'inhibition de l'immunité cellulaire antitumorale [16]. Une association positive a été montrée entre le nombre de cellules CD68<sup>+</sup> dans le tissu tumoral et certaines caractéristiques clinicopathologiques comme l'âge avancé, le type anatomopathologique à cellularité mixte ou la présence de l'infection par l'EBV [17, 18]. De façon complémentaire, une étude transcriptomique a montré qu'une forte expression de gènes associés au lignage monocyto/macrophagique (CD68, CD163, CD14) fait partie de la signature transcriptionnelle des LH associés à la présence de l'infection latente par l'EBV [15]. Des résultats similaires ont été observés chez l'enfant : corrélation entre infiltration par des TAM et présence du génome de l'EBV *in situ* et impact pronostique négatif de cette infiltration sur la survie sans progression [19]. Les mécanismes biologiques et moléculaires impliqués dans la relation entre le nombre de macrophages et la présence de cellules tumorales infectées par l'EBV dans le LH restent à élucider.

Enfin, une corrélation positive a été mise en évidence entre le nombre de TAM et le nombre de monocytes dans le sang périphérique [20]. Récemment, des études ont cherché à combiner les facteurs pronostiques que constituent les lymphocytes et monocytes périphériques et la présence des macrophages tissulaires. Ainsi, le ratio du nombre absolu de lymphocytes périphériques sur le nombre absolu de monocytes circulants est corrélé négativement avec le nombre de TAM [19]. Quand ce ratio est supérieur ou égal à 1,1, il constitue un facteur pronostique favorable indépendant de la survie globale et de la survie sans rechute [10]. Ces deux études montrent donc que ce ratio constitue un facteur pronostique de l'évolution clinique et de la réponse au traitement, et reflète indirectement l'infiltration de la tumeur par les TAM.

### Physiopathologie de la lymphopénie au cours du lymphome de Hodgkin (figure 1)

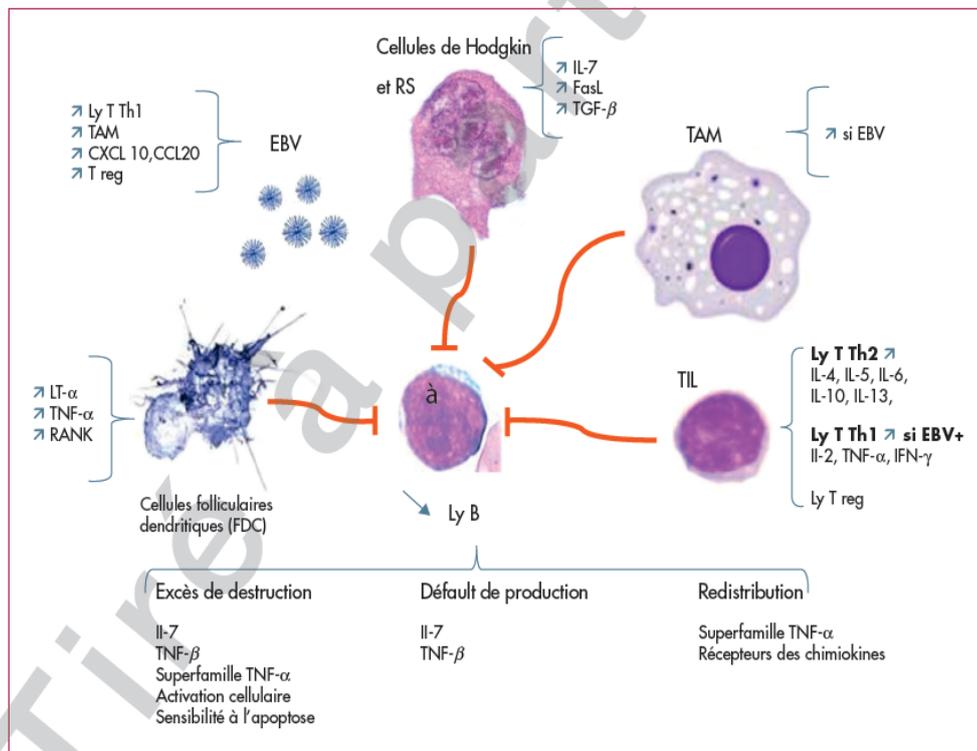
Nous avons vu que les lymphopénies chez les patients atteints de LH étaient fréquentes et touchaient plus

précocement et plus souvent la lignée B. La lymphopénie pourrait résulter d'un défaut de production médullaire (ontogénèse), d'une redistribution entre le sang et les tissus lymphoïdes secondaires ou d'un excès de mort cellulaire. Différents facteurs solubles produits par les cellules RS et/ou par l'infiltrat réactionnel peuvent agir sur l'ontogénie B. Parmi eux, l'IL-7 est sécrétée par les cellules de RS et son taux sérique est fréquemment augmenté chez les patients. Son récepteur, IL-7R, est exprimé par les progéniteurs communs lymphoïdes [21]. Il a été montré que l'IL-7 peut sensibiliser les lymphocytes B à la mort induite par l'engagement du récepteur Fas/CD95 dès les stades précoces de la lymphopoïèse B [21]. Un taux élevé d'IL-7 pourrait ainsi freiner la lymphopoïèse B.

Les lymphocytes matures circulent constamment entre le sang et les organes lymphoïdes secondaires. La présence d'un infiltrat lymphocytaire mixte dans le microenvironnement du LH classique témoigne d'un recrutement lymphocytaire préservé dans un ganglion lymphatique atteint. Les lymphopénies B périphériques des patients atteints de LH pourraient aussi résulter d'une redistribution des lymphocytes B entre le sang périphérique et les

compartiments tissulaires. Le microenvironnement tumoral des formes classiques du LH contient de quantités importantes du LT- $\alpha$ , du TNF- $\alpha$  et de RANK, des facteurs contrôlant l'expression des chimiokines essentielles pour le positionnement des lymphocytes B et T circulants au sein du tissu lymphoïde secondaire (CXCL13 et CCL21, respectivement) [22]. Cependant, il a été montré qu'une faible infiltration du microenvironnement par les lymphocytes B [15] était, comme la lymphopénie B périphérique, un facteur de mauvais pronostic. De même, dans notre étude, l'examen comparatif des coupes histologiques n'a pas mis en évidence de corrélation entre le nombre de lymphocytes B circulants et l'infiltrat lymphocytaire B intratumoral ou encore la présence de follicules B résiduels préservés. Ces résultats vont à l'encontre de l'hypothèse que la lymphopénie B liée au LH résulterait d'une redistribution des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires.

En revanche, lors de leur passage à travers le tissu lymphoïde tumoral, les lymphocytes B circulants non tumoraux subissent de façon répétitive des signaux pouvant agir sur leur maturation et leur différenciation,



**Figure 1.** EBV : virus d'Epstein-Barr. RS : cellules de Hodgkin et de Reed-Sternberg. Ly : lymphocytes. TAM : macrophages associés à la tumeur. TGF- $\beta$  : transforming growth factor-beta. TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor-alpha. IFN- $\gamma$  : interferon gamma. T-reg : lymphocytes T régulateurs. TH1 : T helper 1 (lymphocytes T auxiliaires à profil cytokinique Th1). TH2 : T helper 2 (lymphocytes T auxiliaires à profil cytokinique Th2). TIL : tumor infiltrating lymphocyte (lymphocytes infiltrant la tumeur). RANK : receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B). IL : interleukines. FDC : cellules folliculaires dendritiques.

dont les cytokines de type Th2 telles que l'IL-13, l'IL-10 et l'IL-5 et les chimiokines CCL17, CCL22 ou CCL11 produites par les cellules RS et par les cellules de l'infiltrat inflammatoire [23]. De plus, le tissu tumoral exprime plusieurs membres de la superfamille du TNF- $\alpha$  tels que LT- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , CD30L, CD40L ou Fas/CD95, qui sont fortement impliqués dans la régulation de l'activation et la survie des lymphocytes B. L'activation lymphocytaire B chronique entraîne une augmentation de l'expression de récepteurs de mort cellulaire comme le récepteur Fas/CD95 [24]. Les cellules de RS expriment FasL, ce qui rend possible l'induction de la mort lymphocytaire B lors d'un contact direct avec ces cellules. La sécrétion par les cellules tumorales du TGF- $\beta$ , un puissant inducteur de la mort des lymphocytes B [25], est également impliquée dans ce processus. Enfin, nous avons vu que l'IL-7 sensibilisait aussi les lymphocytes B à la mort cellulaire par apoptose [21, 26]. L'ensemble de ces données font privilégier la mort cellulaire accrue comme mécanisme privilégié de ces lymphopénies. Une étude comparative du transcriptome du microenvironnement tumoral entre des sujets lymphopéniques ou non pourrait permettre d'explorer plus avant les voies impliquées.

## Lymphopénie et autres pathologies chroniques

Une lymphopénie est fréquemment observée chez les patients atteints d'autres cancers, et est alors, comme pour le LH, un facteur pronostique péjoratif [27]. Ainsi, la valeur pronostique de la lymphopénie a été déterminée sur la survie globale et sans progression de patients atteints de cancer du sein métastatique, de lymphomes non hodgkiniens (LNH) ou de sarcomes à des stades avancés. Cette étude montre que la prévalence des lymphopénies au diagnostic est comparable dans les trois groupes de patients atteints de cancers (24 à 27 % des patients présentant au diagnostic une numération des lymphocytes inférieure à 1 G/L). De plus, la lymphopénie est corrélée avec l'indice de performance ainsi qu'avec les facteurs pronostiques spécifiques de chaque type de cancer étudié. Ainsi, dans les LNH, les lymphopénies sont associées :

- à des valeurs élevées de la  $\beta$ -2-microglobuline et à la présence de symptômes « B »,
- dans le cancer du sein : au nombre de sites métastatiques,
- dans le sarcome : à la présence de métastases osseuses [27].

La lymphopénie, en particulier B, est aussi une anomalie fréquente chez les patients atteints de maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique [28]. Il existe, là encore, une relation inverse entre le nombre de lymphocytes et l'activité de la maladie. Cette lymphopénie

pourrait, comme pour le LH, résulter en partie d'une apoptose FasL-dépendante des lymphocytes activés favorisée par certaines cytokines comme l'IL10 [29], ou d'autres facteurs proapoptotiques et/ou modulateurs de la mort cellulaire comme certains membres de la superfamille du TNF- $\alpha$  comme le TRAIL.

En conclusion, la lymphopénie, notamment la lymphopénie B isolée, est fréquente au cours du LH et corrélée au pronostic de la maladie. D'autres maladies, malignes ou non, comme le lupus, sont fréquemment associées à une lymphopénie. Au cours du LH, elle semble être intrinsèquement liée aux caractéristiques de l'environnement tumoral du LH, riche en facteurs solubles et membranaires à forte activité sur le compartiment lymphocytaire notamment en favorisant la mort cellulaire. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués chez les patients atteints de LH pourrait permettre de mieux expliquer la survenue des lymphopénies dans d'autres contextes.

**Remerciement** Nous remercions l'association Recherche et formation en hématopathologie (RFH), ainsi que Judith Landman-Parker, Sabah Boudjema et Aurore Coulomb-L'Herminé (hôpital Trousseau), et Yassine Taoufik (hôpital Bicêtre).

**Conflits d'intérêt** : Aucun. ■

## Références

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (eds). *World Health Organization classification of tumours* Vol 2. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press. 2008.
2. Küppers R, Schwering I, Bräuninger A, Rajewsky K, Hansmann ML. Biology of Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002 ; 13 : 11-8.
3. Jarrett RF. Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol* 2002 ; 13 : 23-9.
4. Diepstra A, van Imhoff GW, Schaapveld M, et al. Latent Epstein-Barr virus infection of tumor cells in classical Hodgkin's lymphoma predicts adverse outcome in older adult patients. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 3815-21.
5. Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2010 ; 362 : 875-85.
6. Deau B, Bachy E, Ribrag V, et al. Macrophage, mast cell and T lymphocyte infiltrations are independent predictive biomarkers of primary refractoriness or early relapse in classical Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2013 ; 54 : 41-5.
7. Schreck S, Friebel D, Buettner M, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol* 2009 ; 27 : 31-9.
8. 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 : 1506-14.
9. Ayoub JP, Palmer JL, Huh Y, Cabanillas F, Younes A. Therapeutic and prognostic implications of peripheral blood lymphopenia in patients with Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* 1999 ; 34 : 519-27.
10. Porrata LF, Ristow K, Colgan JP, et al. Peripheral blood lymphocyte/monocyte ratio at diagnosis and survival in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2012 ; 97 : 262-9.

- 11.** Bobrove AM, Fuks Z, Strober S, Kaplan HS. Quantitation of T and B lymphocytes and cellular immune function in Hodgkin's disease. *Cancer* 1975 ; 36 : 169-79.
- 12.** De Sousa M, Tan CT, Siegal FP, Filippa DA, Tan R, Good RA. Immunologic parameters in childhood Hodgkin's disease II. T and B lymphocytes in the peripheral blood of normal children and in the spleen and peripheral blood of children with Hodgkin's disease. *Pediatr Res* 1978 ; 12 : 143-7.
- 13.** Hamdi L, Creidy R, Rincé P, et al. Recherche de facteurs de susceptibilité immunitaires au Lymphome Hodgkinien de l'enfant. Congrès SFH 2010. (000578).
- 14.** Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, De Filippi R, Carbone A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J Pathol* 2010 ; 221 : 248-63.
- 15.** Chetaille B, Bertucci F, Finetti P, 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 : 2765-3775.
- 16.** Wilcox RA, Wada DA, Ziesmer SC, et al. Monocytes promote tumor cell survival in T-cell lymphoproliferative disorders and are impaired in their ability to differentiate into mature dendritic cells. *Blood* 2009 ; 114 : 2936-44.
- 17.** Tan KL, Scott DW, Hong F, et al. Tumor-associated macrophages predict inferior outcomes in classic Hodgkin lymphoma: a correlative study from the E2496 Intergroup trial. *Blood* 2012 ; 120 : 3280-7.
- 18.** Kamper P, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Honoré B, Nyengaard JR, d'Amore F. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* 2011 ; 96 : 269-76.
- 19.** Barros MH, Hassan R, Niedobitek G. Tumor-associated macrophages in pediatric classical Hodgkin lymphoma: association with Epstein-Barr virus, lymphocyte subsets, and prognostic impact. *Clin Cancer Res* 2012 ; 18 : 3762-71.
- 20.** Koh YW, Kang HJ, Park C, et al. The ratio of the absolute lymphocyte count to the absolute monocyte count is associated with prognosis in Hodgkin's lymphoma: correlation with tumor-associated macrophages. *Oncologist* 2012 ; 17 : 871-80.
- 21.** Levy Y, Benlagha K, Buzyn A, Colombel M, Brouet JC, Lassoued K. IL-7 sensitizes human pre-B cells but not pro-B cells to Fas/APO-1 (CD95)-mediated apoptosis. *Clin Exp Immunol* 1997 ; 110 : 329-35.
- 22.** Pereira JP, Kelly LM, Cyster JG. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int Immunol* 2010 ; 22 : 413-9.
- 23.** Rousset F, Peyrol S, Garcia E, et al. Long-term cultured CD40-activated B lymphocytes differentiate into plasma cells in response to IL-10 but not IL-4. *Int Immunol* 1995 ; 7 : 1243-53.
- 24.** Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell* 1996 ; 87 : 319-29.
- 25.** Lømo J, Blomhoff HK, Beiske K, Stokke T, Smeland EB. TGF-beta 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. *J Immunol* 1995 ; 154 : 1634-43.
- 26.** Sammicheli S, Dang VP, Ruffin N, et al. IL-7 promotes CD95-induced apoptosis in B cells via the IFN-gamma/STAT1 pathway. *PLoS One* 2011 ; 6 : e28629.
- 27.** Ray-Coquard I, Cropet C, Van Glabbeke M, et al. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 5383-91.
- 28.** Mirzayan MJ, Schmidt RE, Witte T. Prognostic parameters for flare in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2000 ; 39 : 1316-9.
- 29.** Georgescu L, Vakkalanka RK, Elkon KB, Crow MK. Interleukin-10 promotes activation-induced cell death of SLE lymphocytes mediated by Fas ligand. *J Clin Invest* 1997 ; 100 : 2622-33.
- 30.** Hancock BW, Dunsmore IR, Swan HT. Lymphopenia: a bad prognostic factor in Hodgkin's disease. *Scand J Haematol* 1982 ; 29 : 193-9.

# The 9<sup>th</sup> International Symposium on Hodgkin Lymphoma

Cologne from October 12<sup>th</sup> to October 15<sup>th</sup> 2013.



**UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11**  
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

**Hodgkin Lymphoma subtypes and peripheral lymphopenia are associated with EBV status in children and adolescents in France: A preliminary report of the EuroNet LH EPI project**

**C BESSON, S BOUDJEMAA, L HAMDY, R CREIDY, T LEBLANC, A LAMBILLIOTE, L DAINESE, B DOUKOURE, R KRZYSIEK, A COULOMB, J LANDMAN-PARKER**



**Hôpitaux universitaires Paris-Sud**

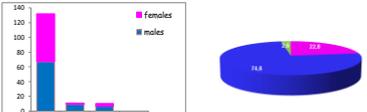
---

### INTRODUCTION

- Hodgkin's Lymphoma (HL) is one of the most frequent lymphomas occurring in childhood.
- In young children, **there is a high** predominance in boys and frequent association with Epstein-Barr Virus (EBV).
- Lymphopenia is a negative prognostic factor of HL.

### RESULTS (1)

#### Pathology



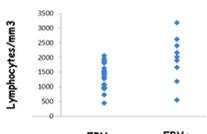
**Fig 2. HL subtypes and EBV distribution**

- Nodular sclerosis (NS): 86% (132/153) Without gender predominance
- Mixed cellularity (MC): 7% (11/153) with high male predominance (90%)
- *In situ* EBV: 23% of cases (35/153), Higher association with MC subtype (5/11, 45%) than the NS subtype (25/132, 19%) p = 0.04
- Strongly correlated with EBV load (p<0.01)

### RESULTS (2)

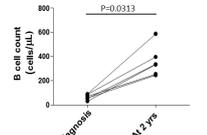
#### B-cell counts:

- No correlation with morphology (histological subtype, amount of tumor cells, B and T lymphocytes, necrosis)
- *In situ* EBV associated with higher B-cell counts (p<0.05)



**Fig4. B-cell counts and in situ EBV**

- B-cell lymphopenia regresses at distance from HL disease.

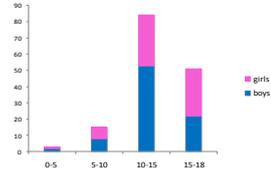


**Fig5. B-cell counts at diagnosis and after 2 years from diagnosis (n=6)**

---

### STUDIED POPULATION

- Multicentric study
- Patients under 18 years and their parents
- Ancillary study to the European protocol : EuroNet-Paediatric Hodgkin's Lymphoma Group



**Fig1. Age and gender distribution**

- Median age : 13.5 yr (5 to 18)
- Gender ratio M/F : 1.2:1

### METHODS

#### Pathological studies (n=153)

- Conventional staining with HPS,
- Immunohistochemical staining: Antibody panel/cHL: CD3, CD20, CD15, CD30, PAX5, CD68
- Antibody panel/differential diagnosis : ALK-1, EMA, BCL-6
- EBV detection: Immuno histochemistry (LMP-1), in situ hybridization (EBER)

#### Blood studies (n=84)

- Lymphocyte sub-populations analysed by flow cytometry.
- Frozen blood cells for DNA extraction.
- Plasma for immunoglobulin and IgG subclasses quantification and anti-tetanus serology.
- EBV load in plasma.

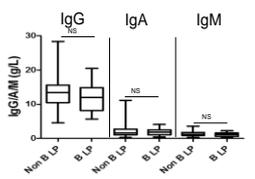
### B-cell lymphopenia

High frequency of B-cell lymphopenia in children with HL: 31 out of 84 patients (37%), correlation with negative risk factors (Table1).

	Number of patients	B Lymphocytes	p
Sex	F 42	135.45 (84.96)	0,42
	M 41	150.56 (85.94)	
Age	<=10 14	173.14 (101.49)	0,22
	>10 69	136.78 (81.06)	
Stage	I-II 37	169.72 (82.24)	<b>0,04</b>
	III-IV 35	115.42 (70.36)	
Hemoglobin	<=10,5 22	112.90 (62.85)	<b>0,06</b>
	>10,5 61	153.73 (90.02)	
Albumin	<=40 39	136.17 (82.97)	0,38
	>40 38	153.28 (87.98)	
Erythrocyte Sedimentation	VS<=30 15	170.4 (92.45)	0,18
Rate (ESR)	VS>30 57	134.70 (83.26)	
B symptoms	no 47	158.63 (86.34)	<b>0,01</b>
	yes 23	116.69 (69.72)	
Leukocytosis	<15000 64	140.9 (87.74)	0,67
	>=15000 19	149.68 (78.16)	

**Table 1. B-cell lymphopenia and HL prognostic factors**

B-cell lymphopenia did not correlate with Ig levels (Fig 3).



**Fig3. B-cell lymphopenia and Ig level**

---

### CONCLUSION and PERSPECTIVES

- NS subtype is predominant in children and adolescents in France.
- Low detection of EBV at this age, association with MC subtype and male gender.
- Peripheral B cell lymphopenia in pediatric and adolescent HL patients is frequent and associated with adverse prognosis factors.
- Correlations between in situ EBV detection and EBV load and between in situ EBV detection and B-cell counts.

Further analyses needed:

- to define the impact of HL tumor-associated microenvironment on lymphocyte homeostasis in HL patients
- to correlate these morphological / biological data with clinical outcome

Altered distribution of peripheral B lymphocyte subsets in paediatric and adolescent patients  
with Hodgkin lymphoma:  
Data from the EuroNet-Paediatric Hodgkin's Lymphoma Group

**Leila Hamdi, Rita Creidy, Sabah Boudjemaa, Anne-Aurelie Mazet, Houria Chavez, Patricia Rincé,  
Ridha Khelifa, Martine Raphael, Aurore Coulomb, Yassine Taoufik, Dirk Hasenclaver, Thierry  
Leblanc, Judith Landman-Parker, Roman Krzysiek, Caroline Besson**

**Abstract**

**Background.** Hodgkin lymphoma (HL) is a malignancy of B lymphocytes characterized by clonal Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) tumor cells surrounded by a non-neoplastic mixed inflammatory infiltrate. The cHL tumor microenvironment is typically associated with Th2-type polarization of local cytokine production. The impact of this cytokinic milieu on the normal counterpart of B cell compartment in HL patients remains to be defined.

**Methods.** Here we characterized peripheral B cell compartment in a prospective cohort of 83 paediatric and adolescent HL patients. Their clinical characteristics were compared among B-cell lymphopenic and non-lymphopenic patients. The impact of B-cell lymphopenia on HL prognosis was analyzed. To explore the mechanisms of B cell lymphopenia, serum levels of IL7 and BAFF were measured in a subgroup of B lymphopenic and non B lymphopenic HL patients. Pathological data such as CD30+ tumour cell burden, infiltrating CD68+ cells were correlated with B-cell count.

**Results.** A significant decrease in the number of B-lymphocyte count was observed in 31 out of 83 patients (37%) (Median 64 cells / $\mu$ l, IQR 38-79) (14-92). Mixed T/B cell type and selective B cell lymphopenia were present in 18/31 (58%) and 13/31 (42%) of cHL patients. B lymphopenic HL patients exhibited significant decrease in peripheral IgD<sup>high</sup>IgM+CD27<sup>-</sup> naïve B cell pool and increased pool of transitional (CD19+CD38<sup>high</sup>IgM<sup>high</sup>), circulating marginal zone (IgM+IgD+CD27+), isotype-switched memory (IgD-IgM-CD27+) and CD38<sup>low</sup>CD21<sup>low</sup> B cells when compared to non lymphopenic patients. No difference in serum IgG/A/M levels was found between B lymphopenic and non B lymphopenic cHL patients. As compared to non B lymphopenic HL patients, mean plasma IL7 level was elevated in B lymphopenic HL patients ( 10 pg/L vs 7 pg/L, respectively, p=0,063) (Median 11 vs 5 ) and increased serum levels of IL7 were associated with higher percentage of naïve B cells in B lymphopenic HL patients. B-cell lymphopenia was not correlated with in situ characteristics except presence of EBV which was associated with normal B-cell counts. B cell lymphopenia and subpopulation abnormal distribution regressed in patients in long term remission of HL. Peripheral B cell lymphopenia was associated with poor prognostic factors (more advanced stages, low hemoglobin) and there was a trend for an association with a poor outcome.

**Conclusions.** We show that peripheral B cell lymphopenia in paediatric and adolescent HL patients is associated with changes of distribution of major peripheral B cell subsets. Our findings support the concept that HL tumor-associated factors interfere with peripheral distribution of B cell subsets. Further analyses are needed to assess the impact of cHL tumor-environment on B cell pool homeostasis in cHL patients.



## A search for immunological factors of susceptibility to Hodgkin Lymphoma in children

L Hamdi\*, R Creidy\*, P Rincé, K Abbed, AA Mazet, A Coulomb, M Raphael, J Landman-Parker and C Besson  
 APHP, Univ Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France ; Inserm, U1012, F-94270



### INTRODUCTION

Hodgkin's Lymphoma (HL) is one of the most frequent lymphoma occurring in childhood. It predominates strongly in boys and it is more frequently associated with Epstein-Barr Virus (EBV). There is accumulating evidence for an inherited susceptibility to HL based on many reports of familial aggregation of the disease in adults and in childhood. The prevalence of immune deficiencies among incident cases of HL is unknown.

### AIM OF THE STUDY

We intend to search for qualitative and quantitative immune deficiencies as susceptibility factors to child's HL.

### POPULATION CRITERIA

- Multicenter study
- Patients under 18 years and their parents were included
- Study included in a European protocol : EuroNet-Paediatric Hodgkin's Lymphoma Group
- Clinical research supported by the epidemiologic study, ESTELLE

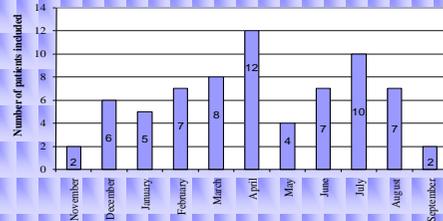


Figure 1- Studied population

70 patients were included in one year at HL diagnosis

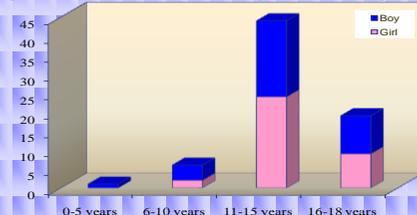


Figure 2- Age and gender distribution

Gender-ratio B/G = 1.1,

Male predominance below 11 years

### METHODS

- PBMC were prepared in order to establish for each patient an EBV-immortalized lymphoblastoid B-cell line (LCL).
- PBMC were also frozen for exploration of T-cell response against EBV.
- Frozen stored blood cells were conserved for DNA extraction.
- Serum was used for immunoglobulin and IgG subclasses quantification and anti-tetanus serology.
- Lymphocyte sub-populations were freshly analysed by flow cytometry.

Quantification of the various lymphocyte populations (T, B and NK lymphocytes)	CD45, CD3, CD19 et CD56-CD16
Analysis of the T lymphocyte population	CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ (DN)
Analysis of T lymphocyte sub-populations	CD3, CD45RA
Analysis of the NKT lymphocyte population	CD3, CD16, CD57 et CD56-CD16
Analysis of B lymphocyte sub-populations	CD19, CD5, kappa, lambda, CD27, IgM, IgD, CD21 et CD38

Table 1- Panels of monoclonal antibodies used for flow cytometry

### RESULTS

- Seventy samples of patients at diagnosis of HL have been analyzed.
- Median age of the study population is 13 years, ranging from 5 to 18 years old.
- We did not detect any qualitative defect of specific B-cell subpopulations.
- A high frequency of **B-cell lymphopenia** was detected, 20 out of 70 patients (28.5%) (median 68 cells/ $\mu$ l) (Table 2).
- B-cell lymphopenia did not correlate with age or gender and was not associated with either low Ig levels nor with low B-cell counts in parents (Table 2).
- Preliminary analysis of pathological specimen of children with or without low B-cell counts suggests a correlation between blood and lymph nodes B-cell populations (Figure 4).
- We detect a **moderate expansion of DN T cells** CD4-/CD8- and TCR $\alpha\beta$ + in the peripheral blood of 5 out of 70 patients (ranging from 2.5%-4.2% of CD3+ lymphocytes). This possible functional deficit of Fas/FasL pathway being explored by molecular analysis.

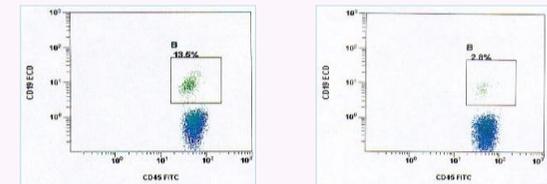


Figure 3- Illustration of B-cell lymphopenia detected by flow cytometry

### RESULTS

Patient	Age	Gender	B-cells (10 <sup>6</sup> /L) (NV : 100-500)	T-cells (10 <sup>6</sup> /L) (NV : 600-2400)	IgM (g/L) (NV : 0.4-2.3)	IgG (g/L) (NV : 7-16)	IgA (g/L) (NV : 0.7-4.0)
1	16	F	53	1740	2.2	13.1	2.0
2	12	F	90	546	2.2	14.2	1.9
3	15	M	64	916	1.7	9.8	1.0
4	15	F	56	406	0.6	15.9	1.8
5	16	M	88	720	0.4	10.2	1.1
6	14	F	82	986	2.3	11.5	3
7	18	M	80	489	0.72	16.4	2.41
8	17	M	79	744	0.51	8.21	0.56
9	10	M	48	783	1.88	20.5	2.8
10	17	M	58	718	0.81	11.90	2.17
11	15	M	77	522	0.60	6.06	1.04
12	17	M	90	454	1.51	13.80	2.56
13	17	M	34	480	1.47	8.60	1.53
14	13	M	19	744	1.54	21.70	5.88
15	14	F	92	671	1.36	9.42	1.76
16	14	F	71	857	1.47	18.10	4.12
17	12	M	85	1651	1.00	10.70	2.0
18	7	M	71	1475	1.69	18.90	2.53
19	16	F	82	349	1.22	14.90	2.88
20	18	M	38	527	1.56	13.40	2.75

Table 2- Summary of patients with B-cell lymphopenia



(A) Patient with a normal number of B-cells 13,5% (163,10<sup>6</sup>/L)

(B) Patient with marked lymphopenia 2,8% (53,10<sup>6</sup>/L)

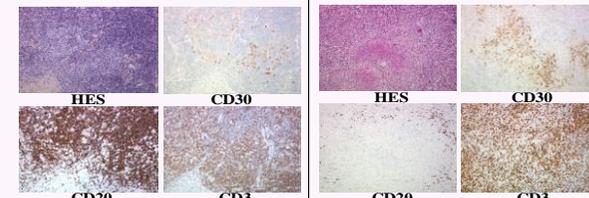


Figure 4- Immunophenotyping and histological correlation

### CONCLUSION and PERSPECTIVES

- Immune analysis of 70 children with HL showed a high frequency of B-cell lymphopenia at diagnosis and a possible functional deficit of Fas/FasL pathway is being explored in 5 patients.
- Other techniques such as molecular analysis could be assessed in order to search for atypical immune defects in children included in the Euronet study.

### INTRODUCTION

La plupart des cas de lymphome Hodgkinien (LH) de l'enfant surviennent entre l'âge de 10 et 15 ans et ressemblent au LH de l'adulte jeune. Le LH du jeune enfant, avant 10 ans, a des caractéristiques particulières ; prédominance chez le garçon et association préférentielle avec le virus Epstein-Barr (EBV). Plusieurs arguments font suspecter l'existence de facteurs génétiques de susceptibilité au LH notamment l'agrégation familiale de la maladie chez l'adulte et chez l'enfant. Certains déficits immunitaires innés prédisposent au LH mais aucune étude n'a analysé leur prévalence chez les patients atteints de LH. Le but de l'étude est de rechercher des défauts qualitatifs et/ou quantitatifs de l'immunité comme facteurs de susceptibilité au LH de l'enfant.

### PATIENTS et METHODES

- Etude multicentrique adossée au protocole Européen de traitement des LH de l'enfant, Euronet (*EuroNet-Paediatric Hodgkin's Lymphoma Group*).  
 - Il est proposé aux enfants atteints, âgés de moins de 18 ans, et à leurs parents de participer à l'étude lors de l'inclusion dans le protocole.

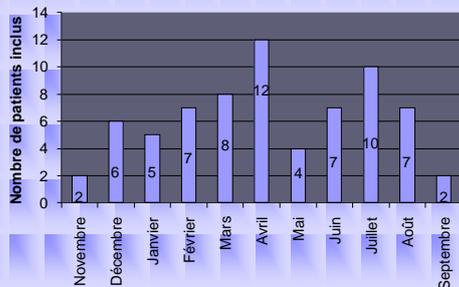


Figure 1- Population étudiée

70 patients ont été inclus au diagnostic en un an

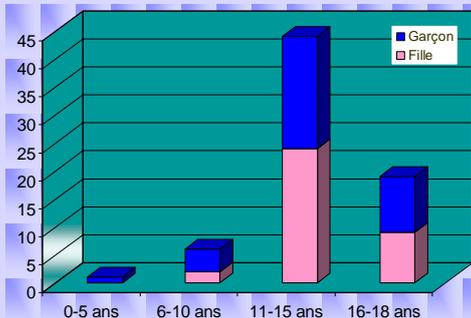


Figure 2- Répartition Age/Sexe  
Sexe-ratio G/F = 1,2

L'âge médian est de 13 ans, compris entre 5 et 18 ans.

- A partir d'un prélèvement sanguin, sont conservés de l'ADN, des cellules mononucléées et du sérum.  
 - Les sous-populations lymphocytaires sont analysées par cytométrie de flux (Tableau 1).

Quantification des lymphocytes sanguins totaux sur le Sysmex-XE	
Quantification des différentes populations lymphocytaires (Ly T, Ly B et Ly NK)	CD45, CD3, CD19 et CD56-CD16
Etude de la population T	CD3, CD4, CD8, TCRαβ, TCRγδ (DN)
Etude des sous-populations T	CD3, CD45RA
Etude des Ly NKT	CD3, CD16, CD57 et CD56-CD16
Etude des sous-populations B	CD19, CD5, kappa, lambda, CD27, IgM, IgD, CD21 et CD38

Tableau 1- Panels des anticorps monoclonaux utilisés pour la caractérisation des sous-populations lymphocytaires par cytométrie de flux

- Pour chaque patient, une lignée lymphoblastoïde B infectée par l'EBV est établie dans le but d'étudier ultérieurement la réponse T anti-EBV autologue.  
 - L'étude immunitaire est complétée par des dosages des classes et sous-classes d'immunoglobulines (Ig) et IgG anti-tétanos.

### RESULTATS

- Les prélèvements de 70 enfants au diagnostic de LH sont présentés.  
 - Leur âge médian est de 13 ans, Une fréquence élevée de **lymphopénies B** est détectée, 20 patients / 70 (28%) (méd. 68 Ly B/μl, 19-90) (Tableau 2).  
 - Les dosages d'Ig et sous-classes et d'IgG anti-tétanos sont normaux chez ces cas (Tableau 2).

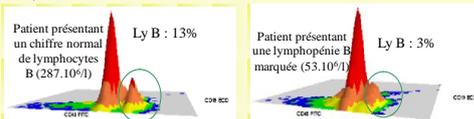


Figure 3- Illustration d'un immunophénotypage sans et avec une lymphopénie B

- L'étude de 26 parents de ces cas lymphopéniques n'a pas montré de diminution de leurs lymphocytes B.  
 - Une lymphopénie T a été observée chez 3 cas/70 (4,3%).  
 - Ces anomalies quantitatives des lymphocytes B et T ne sont pas corrélées avec l'âge ou le sexe mais avec le stade de la maladie ( $p = 0,02$ ), la lymphocytose globale et le taux d'hémoglobine ( $p = 0,03$ ).  
 - Par contre, nous n'avons détecté aucune anomalie qualitative des sous-populations lymphocytaires B et T, en particulier évocatrice de syndrome lymphoprolifératif lié à l'X, de déficit fonctionnel de la voie Fas/FasL ou de déficit immunitaire commun variable.

Patient	Age	Sexe	Lymphocytes B (10 <sup>9</sup> /L) (VN: 100-500)	Lymphocytes T (10 <sup>9</sup> /L) (VN: 500-2000)	IgM (g/L) (VN: 0,4-2,5)	IgG (g/L) (VN: 7-16)	IgA (g/L) (VN: 0,7-4,0)
1	16	F	53	1740	2,2	13,1	2,0
2	12	F	90	546	2,2	14,2	1,9
3	15	M	64	916	1,7	9,8	1,0
4	15	F	96	406	0,6	13,9	1,8
5	16	M	88	720	0,4	10,2	1,1
6	14	F	62	986	2,3	11,5	3
7	18	M	80	489	0,72	16,4	2,41
8	17	M	79	744	0,51	8,21	0,96
9	10	M	46	789	1,88	20,5	2,3
10	17	M	58	718	0,81	11,90	2,17
11	15	M	77	522	0,60	6,06	1,04
12	17	M	90	454	1,51	13,80	2,56
13	17	M	34	480	1,47	8,60	1,53
14	13	M	10	744	1,54	21,70	5,88
15	14	F	62	671	1,36	9,42	1,78
16	14	F	71	857	1,47	18,10	4,12
17	12	M	85	1651	1,00	10,70	2,0
18	7	M	71	1475	1,60	16,90	2,53
19	16	F	62	346	1,22	14,90	2,88
20	18	M	38	527	1,58	13,40	2,75
21	16	M	115	379	0,88	13,9	1,3
22	16	M	105	354	0,52	11,3	3,11

Tableau 2- Récapitulatif des patients présentant une lymphopénie B

- L'étude par immunohistochimie d'échantillons tumoraux de 10 enfants présentant ou non une lymphopénie B, suggère une corrélation entre les lymphocytes B circulants et les lymphocytes B ganglionnaires (Figure 4).

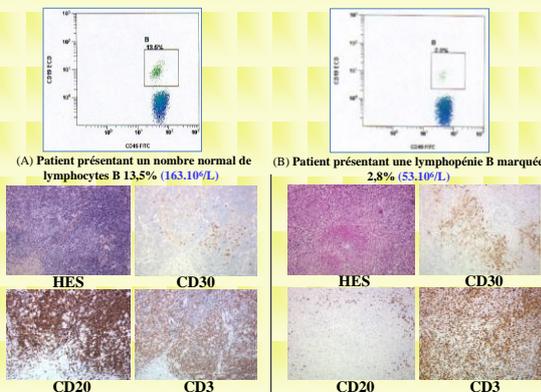


Figure 4- Corrélation immunophénotypique et histologique

### CONCLUSION

- L'analyse immunitaire de 70 enfants atteints de LH n'a détecté aucun défaut qualitatif évoquant un déficit immunitaire inné.  
 - Notre étude a détecté une fréquence de 28% de lymphopénie B au diagnostic de LH.  
 - Puisque nous n'avons pas trouvé d'anomalie qualitative des populations lymphocytaires B ni de diminution des dosages d'Ig ni des IgG anti-tétaniques ni de défaut similaire chez leurs parents, nous émettons l'hypothèse que ces anomalies quantitatives sont secondaires au LH et fait l'objet d'explorations complémentaires.