

Étude des polymorphismes génétiques des gènes des cytokines dans les lymphomes hodgkiniens

Hervé Ghesquières

▶ **To cite this version:**

Hervé Ghesquières. Étude des polymorphismes génétiques des gènes des cytokines dans les lymphomes hodgkiniens. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10297 . tel-00846981

HAL Id: tel-00846981

https://theses.hal.science/tel-00846981

Submitted on 22 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 297-2010 Année 2010

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE MOLECULAIRE INTEGRATIVE ET CELLULAIRE (BMIC)

DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 17/12/2010
par

Hervé GHESQUIERES

Etude des polymorphismes génétiques des gènes des cytokines dans les lymphomes hodgkiniens

Directeur de thèse : **Professeur Gilles SALLES**

JURY
Président : **Professeur Gilles THOMAS**
Membres : **Professeur Marc MAYNADIE** *(Rapporteur)*
Professeur Fabrice JARDIN *(Rapporteur)*
Professeur Gilles SALLES
Professeur Laurence DE LEVAL
Professeur Eric WATTEL

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. le Professeur L. Collet**
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J-F. Mornex
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur G. Annat
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. Simon
Secrétaire Général	M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Faculté de Médecine Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. Locher
Institut des Sciences et Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Département de Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. Gieres
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur C. Gautier
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. Parrot
Département GEP	Directeur : M. N. Siauve
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Département Physique	Directeur : Mme S. Fleck
Département Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. Collignon
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. Guiderdoni
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur J. Lieto
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. Coulet
Institut de Science Financière et d'Assurance	Directeur : M. le Professeur J-C. Augros
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M R. Bernard

RESUME en français
Les cytokines sont d'importants médiateurs dans la physiopathologie des lymphomes hodgkiniens (LH). A partir d'une cohorte de 464 patients, nous avons évalué l'impact pronostique de onze SNPs parmi les gènes de cytokines : *IL10* (rs1800890, rs1800896, rs1800871, rs1800872), *TNFA* (rs1800629); *IL6* (rs1800795); *IL1B* (rs16944); *ILRN* (rs419598); *INFG* (rs2430561); *IL12* (rs3212227); *CCL17* (rs223828). Le génotypage du SNP de l'*IL12* montre une distribution différente de celle attendue dans la population générale selon le test de Hardy-Weinberg. Ce résultat suggère que les variations génétiques de l'*IL12* pourraient être impliquées dans la susceptibilité au LH. Les patients porteurs du génotype *IL10*-1082AA présentent un taux de rémission complète au traitement initial supérieur aux patients présentant un autre génotype (95% vs. 88% $P = .02$). Pour les patients de stade avancé III-IV, le taux de survie globale à 6 ans est statistiquement différent entre les génotypes *IL10*-592AA/CC/AC et *IL10*-819TT/CC/CT (100%, 94%, 78%, $P = .03$). Ce résultat est retrouvé pour les patients porteurs de LH n'exprimant pas l'EBV. Pour les LH EBV négatif, le taux de survie sans progression à 6 ans est différent en fonction du génotype du TNFA-308AA/GG/AG (100%, 84%, 68%, $P = .03$). Il n'a été pas retrouvé de corrélation entre les génotypes et les dosages plasmatiques de l'IL-10, TNFA, IL-1RA, IL-6. Cette étude montre que le ''fond génétique immun'' est important à prendre en considération pour définir le pronostic des patients. Le rôle des SNPs de l'*IL10* et du *TNFA* dans les LH EBV négatif devra être confirmé ainsi que l'influence des variations génétiques de l'*IL12* dans la susceptibilité au LH.

TITRE en anglais
Study of germline single nucleotide polymorphisms in cytokine genes of patients with Hodgkin Lymphoma

---

RESUME en anglais
Cytokines are important immune mediators implicated in Hodgkin lymphoma (HL) pathogenesis but little is known on the role of immune gene variations. We assessed prospectively the prognostic role of cytokine gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) in HL patients (pts): *IL10* (rs1800890, 448 pts; rs1800896, 459 pts; rs1800871, 446 pts; rs1800872, 447 pts), *TNFA* (rs1800629, 464 pts); *IL6* (rs1800795, 201 pts); *IL1B* (rs16944, 198 pts); *ILRN* (rs419598, 199 pts); *INFG* (rs2430561, 200 pts); *IL12* (rs3212227, 259 pts); *CCL17* (rs223828, 198 pts). *IL12* genotype distribution appears significantly different from what observed in general population according to Hardy-Weinberg test which was already observed in another published study. *IL10*-1082AA genotype was associated with better complete response than other *IL10* genotypes (95% vs. 88% $P = .02$). For patients with stage III-IV HL, the 6-year overall survival was statistically different between *IL10*-592AA/CC/AC and *IL10*-819TT/CC/CT genotypes (100%, 94%, 78%, $P = .03$). This prognostic effect was observed in EBV-negative but not in EBV-positive HL. In EBV-negative HL, *TNFA*.308AA/GG/AG genotypes had a different 6-year progression-free survival (100%, 84%, 68%, $P = .03$). No correlation was observed between genotypes and IL-10, TNFA, IL-1RA, IL-6 cytokine levels. This exploratory study suggests an effect of *IL10* and *TNFA* SNPs in predicting HL outcome but other studies are needed to decipher the role of the host immunogenetic background, in particular the relation with EBV. Regarding the *IL12* genotyping results, whether *IL12* polymorphism is implicated in HL susceptibility needs also to be clarify.

DISCIPLINE : Biologie cellulaire et moléculaire

MOTS-CLES en français : Lymphome Hodgkinien, SNP, cytokine, pronostic
MOTS-CLES en anglais : Hodgkin lymphoma, SNP, cytokine, prognosis

---

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :
CNRS & Université Lyon 1 : UMR5239 CNRS – UCB – ENS – HCL
Faculté de Médecine Lyon-Sud, 165, ch du Grand Revoyet
69495 Pierre Bénite cedex

Sommaire

Sommaire 1
Figures 3
Tableaux 5
Introduction 6
1. Intérêt de l'étude des polymorphismes génétiques 11
2. Etudes des variations génétiques au niveau des gènes de huit cytokines impliquées dans la physiopathologie des lymphomes Hodgkiniens 17
2.1. Physiopathologie des lymphomes Hodgkiniens 17
2.2. Etude des SNPs au niveau des gènes des huit cytokines IL1-B, IL1RN, IL-6, IL-10, TNFA, INFG, IL-12 et CCL17 19
2.2.1. Interleukines 1B et 1Ra 19
2.2.2. Interleukine 6 23
2.2.3. Interleukine 10 25
2.2.4. TNFA 30
2.2.5. Interferon gamma 33
2.2.6. Interleukine 12 35
2.2.7. Chimiokine CCL-17 37
3. Etudes de susceptibilité aux lymphomes hodgkiniens et polymorphismes au niveau des gènes des effecteurs du système immunitaire 40
4. Etudes cliniques évaluant le rôle pronostique des SNPs des gènes de cytokines dans les lymphomes hodgkiniens 43
5. Etudes de susceptibilité aux lymphomes non hodgkiniens et polymorphismes au niveau des gènes des effecteurs du système immunitaire 44
5.1. Etude de susceptibilité des LNH analysant de 12 à 9412 SNPs 44
5.2. Analyse de la région 6p21 47
5.3. Analyse du système HLA 50
5.4. Implication des SNPs de la région 2q33 (CTLA4) 51
5.5. Etude de susceptibilité impliquant les Toll-like receptors (TLR) 51
6. Etudes cliniques évaluant le rôle pronostique dans les lymphomes non hodgkiniens des SNPs des gènes des effecteurs du système immunitaire 53
6.1. TNFA 57
6.2. Interleukine 10 57
6.3. Récepteur à l'interleukine 4 58

6.4. Autres SNPs : implication des SNPs de l'IL8, IL2, IL12B et IL1RN dans le pronostic des lymphomes folliculaires 58
6.5. Tentative de synthèse sur les données biologiques, épidémiologiques et cliniques sur l'implication des SNPs des cytokines dans les lymphomes 60
6.6. Influence des polymorphismes des gènes des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines dans les lymphomes 61
6.7. Influence des polymorphismes des gènes du système du complément dans les lymphomes 63
7. Présentation du travail de Thèse 65
7.1. Méthodologie du projet 65
7.2. Analyse de l'impact pronostique des SNPs de six cytokines (TNFA, IL-10, IL-6, IL-1B, IL-1Ra, CCL-17) dans les LH. Article 1 soumis Blood. 66
7.3. Analyse de l'impact pronostique du SNP IL12+1188A>C dans les LH. 96
7.3.1. Rationnel de l'étude IL12 96
7.3.2. Caractéristiques cliniques et biologiques des Patients de l'étude IL12 98
7.3.3. Traitements réalisés 99
7.3.4. Réponse aux traitements, survie sans progression et survie globale 99
7.3.5. Résultats 101
8. Discussion des deux études 104
9. Perspectives 117
10. Conclusions 118
11. Annexes 120
Annexe N°1 120
Annexe N°2 122
12. Références 124

Figures

Figure 1 : Différentes classes de variants génétiques 11
Figure 2 : Effet des variants génétiques en cis ou trans sur l'expression des gènes 13
Figure 3 : Evolution du nombre de RefSNP (en millions) dans les bases de données 14
Figure 4 : Gènes de la famille de l'*IL1* sur le chromosome 2 19
Figure 5 : Médiane de CRP en fonction du génotype des gènes de la famille des l'*IL1* 22
Figure 6: a) SNPs connus au niveau du promoteur de l'*IL6*. b) Interaction possible entre le SNP en -6331 et le site de fixation de facteur de transcription 24
Figure 7 : Localisation génétique des SNPs du *TNFA* au niveau du chromosome 6 31
Figure 8 : Production d'IL-12 (PBMC stimulés) en fonction du génotype *IL12*+1188A>C ... 37
Figure 9 : Situation des SNPs de CCL22 et CCL17 39
Figure 10 : Hypothèses étiologiques immunologiques et environnementales dans les LH proposées par Cozen et al 41
Figure 11 : Localisation des 3 SNPs au niveau du gène BAFF 48
Figure 12 : Etude pangénome montrant l'implication de la région 6p21.32 dans la susceptibilité aux lymphomes folliculaires 50
Figure 13 : Score pronostique de patients porteurs de LF en fonction du nombre de SNPs ''délétères'' parmi 4 SNPs : *IL8*, *IL2*, *IL12B*, *IL1RN* 59
Figure 14: Evaluation de 297.086 SNPs génotypés chez 1522 patients porteurs d'une PR avec anticorps anti–CCP-positif et 1850 contrôles 63
Figure 15: Survie sans progression et survie globale des 253 patients porteurs de LH inclus dans l'étude IL-12 100
Figure 16: A. Survie sans progression ; B. Survie globale en fonction du génotype de l'*IL12*+1188A>C 102
Figure 17 : Taux de survie sans progression et survie globale à 6 ans de la série de 464 patients porteurs de LH 105
Figure 18: A. Echec au traitement en fonction du SNP *IL10*-592C>A B. en fonction du SNP IL6-174C>G 106
Figure 19 : Survie sans progression des patients présentant un stade III-IV en fonction du génotype de l'*IL10*-1082G 107
Figure 20: A) Survie sans progression ; B) survie globale des patients présentant un stade III-IV en fonction du génotype de l'*IL10*-819C>T 108
Figure 21: Différence de (A) survie globale et de (B) survie sans progression des LH en fonction du statut EBV de la tumeur 110

Figure 22: Différence de survie globale pour les patients de plus de 50 ans en fonction du statut EBV de la tumeur 111
Figure 23: Survie sans progression des patients EBV- en fonction du génotype du TNF-308G>A 112
Figure 24 : Différence des dosages plasmatiques du TNFA (A) et de TNF-R2 (B) entre les patients porteurs de LH EBV+ et – 113

Tableaux

Tableau 1 : Etudes fonctionnelles des polymorphismes de l'*IL10*..... 27
Tableau 2 : Etudes cliniques ayant analysé le pronostic des polymorphismes des gènes de cytokines dans les LNH..... 54
Tableau 3 : Génotypes de l'*IL12* en fonction du statut EBV des LH..... 101

Introduction

Les lymphomes malins représentent aujourd'hui le sixième cancer par ordre de fréquence en France, l'incidence de cette pathologie ayant doublée au cours des deux dernières décennies. Ces prolifération de la lignée lymphoïde sont hétérogènes, mais 85% d'entre elles sont issues de la lignée lymphoïde B, la plus fréquente de ces entités étant le lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB) (40 à 50% des cas). Le lymphome Hodgkinien (LH) est une autre entité bien individualisée dont l'élément pathognomonique est la mise en évidence de cellules de Hodgkin ou de Reed-Sternberg (RS). Les décisions thérapeutiques sont actuellement basées sur des éléments cliniques ou biologiques simples avec la définition de score pronostique comme l'Index Pronostique International (IPI) pour les LDGCB et des scores cliniques qui restent hétérogènes (scores de l'EORTC pour les stades localisés ou d'Hasenclever pour les stades avancés) pour les LH. L'intégration de score comme le FLIPI (Follicular Lymphoma IPI) en tant qu'élément thérapeutique décisionnel n'est actuellement pas encore couramment utilisé pour la prise en charge initiale des lymphomes folliculaires (LF). L'évolution des classifications des lymphomes a permis de démembrer ces pathologies complexes à partir d'éléments cliniques, morphologiques, cytologiques et cytogénétiques et pour la dernière classification publiée en 2008, également moléculaire. Ainsi, les LDGCB sont classés en profil biologique issu du centre germinatif (GC, Germinal Center) ou ayant un profil biologique proche de lymphocytes activés (ABC, Activated B-Cell like), post-germinatifs. L'analyse de la biologie de la tumeur va permettre le développement de thérapies dite ciblées. Pour reprendre le dernier exemple de lymphome, les LDGCB de profil ABC présentent une activation et des mutations de la voie NFkB. L'utilisation d'inhibiteur du protéasome pourrait permettre de cibler cette voie avec une efficacité potentielle dans les formes ABC. Un essai thérapeutique britannique va ainsi en première ligne de traitement dans les LDGCB randomiser les patients au diagnostic en fonction de statut GC ou ABC et traiter les LDGCB ABC soit par RCHOP soit par RCHOP associé au bortezomib. La découverte de voie d'activation spécifique permet de développer des inhibiteurs ciblés mais la multiplicité des altérations oncogéniques reste problématique. Ainsi, dans les lymphomes du manteau où la voie AKT-Pi3K-mTOR est surexprimée, l'utilisation d'une thérapie ciblée avec un inhibiteur de mTOR (temsirolimus) permet d'obtenir une survie sans progression de 4.8 mois, ce qui est statistiquement supérieur à l'utilisation de chimiothérapie en monothérapie.[1] La mise en évidence d'anomalie à l'origine plus directement de la transformation néoplasique comme cela est le cas dans la leucémie myéloïde chronique, avec l'utilisation spécifique d'inhibiteur de tyrosine kinase ciblant l'activation d'ABL par la fusion des gènes bcr-abl, est plus

complexe dans le cadre des hémopathies lymphoïdes. Paradoxalement, l'utilisation d'anticorps thérapeutiques se fixant sur des cibles non connues pour participer à la transformation oncogénique comme l'antigène CD20 a permis une évolution thérapeutique majeure dans le cadre des LDGCB. L'adjonction d'anticorps anti-CD20 (rituximab) a ainsi amélioré le pronostic des patients porteurs de lymphomes B et plus spécifiquement de LDGCB.[2] L'étude de la biologie de la cellule tumorale permet donc à l'évidence l'émergence de stratégie ciblée mais également une meilleure définition pronostic. Ainsi, comme déjà mentionné, le statut GC ou non GC défini deux groupes ayant un pronostic différent au sein du groupe des LDGCB. D'autres scores ont également été développés dans les LDGCB, intégrant des marqueurs comme FOXP1, MUM1/IRF4, BCL-6 ou c-myc.[3,4] Il est à noter que le pronostic des patients peut être évalué indépendamment des données biologiques de la cellule tumorale, à partir des informations fournies par les cellules non-tumorales du micro-environnement tumoral. Ceci a été mis en évidence dans les LF où une réponse immune dite de type 2 (IR-2), qui comprend des gènes hautement exprimés dans les macrophages et les cellules dendritiques, est associée à une évolution défavorable.[5] L'environnement immun semble également important puisque le pronostic des patients porteurs de LF et notamment le risque de transformation dépend de la présence de lymphocytes T régulateurs (LTreg), FOXP3+ et du type d'infiltration (Diffus vs. Folliculaire) des LTreg.[6] Plus surprenant, le pronostic des LDGCB peut également être évalué uniquement à partir des données du micro-environnement comme le montre l'étude de Lentz et al.[7] Enfin très récemment, une analyse de l'expression des gènes de tumeurs chez des patients porteurs de LH montre qu'un sous-groupe de patients dont le traitement initial n'a pas été efficace, présente une signature moléculaire associée aux monocytes/macrophages infiltrant la tumeur, ceci étant validé par une analyse immunohistochimique sur une cohorte de patients indépendante.[8] Ces données issues du micro-environnement sont importantes dans le sens où elles permettent d'ouvrir des pistes thérapeutiques sur des cibles présentes dans le micro-environnement tumoral, comme la néo-angiogénèse, la matrice extra-cellulaire et les cellules de l'immunité. Dans ce contexte où finalement la biologie de la tumeur et les éléments cliniques du patient au diagnostic ne vont pas permettre d'appréhender complètement le devenir de la pathologie, un des éléments essentiels qui peut être étudié est probablement le fond génétique du patient sur lequel va se développer la tumeur d'autant que les études sur le micro-environnement comportant des cellules ''normales'' peuvent permettre de définir le pronostic des patients.

Les premières données montrant l'importance de la génétique de l'hôte sont issues de la pharmacogénomique, basée sur l'hypothèse que le métabolisme des drogues de chimiothérapie propre de chaque individu, peut être variable ce qui peut conduire à une

efficacité moindre du traitement ou au contraire à un excès de toxicité. Les polymorphismes génétiques au sein des enzymes impliquées dans le métabolisme des produits de chimiothérapie sont nombreux et peuvent donc modifier leur pharmacodynamie. Les données les plus connues proviennent des études réalisées dans le cadre des traitements de leucémie aiguë lymphoblastique, notamment en pédiatrie avec l'utilisation de chimiothérapie comme les thiopurines. Ces composés sont métabolisés par la thiopurine S-méthyltransférase (TPMT) dont l'activité dépend en majorité de trois allèles TPMT 2 (G238C), TPMT 3A (G460C) et TPMT 3C (A719G) présentant des polymorphismes respectivement au niveau des exons 5, 7 et 10. Le génotypage de ces polymorphismes peut permettre une adaptation des doses du 6-mercaptopurine pour éviter des toxicités aiguës ou une efficacité réduite.

Dans le cadre de pathologies complexes comme les lymphomes, il n'existe pas de façon évidente, des gènes de prédisposition majeurs avec une pénétrance importante. Des analyses épidémiologiques montrent qu'il existe des facteurs de risque en fonction des antécédents familiaux d'hémopathie avec un risque accru de présenter un lymphome en cas d'antécédent familial de lymphome ou d'autres hémopathies avec une augmentation du risque par sous-type de lymphomes : le risque de présenter un LDGCB est multiplié par 10 en cas d'antécédents de LDGCB chez les ascendants, par 4 en cas de LF ou de LH.[9] Cela peut suggérer la présence d'une prédisposition génétique multifactorielle avec la nécessité de mettre en évidence ces gènes responsables et leurs variants qui augmenteraient la susceptibilité au lymphome. Les pathologies dysimmunitaires et les situations d'inflammation chronique constituent également un facteur de risque connu de survenue de lymphome.[10] Ainsi, le risque est augmenté de 2.6 en cas de présentation personnelle de pathologie auto-immune comme la polyarthrite rhumatoïde (PR), le syndrome de Sjogrën, le lupus ou la sclérodermie. Il existe également des risques par ‘‘organe’’ avec comme exemples classiques la thyroïdite d'Hashimoto et le lymphome du MALT thyroïdien ou la maladie cœliaque et le risque de survenue de lymphome T. On peut donc faire l'hypothèse d'effet additif ou synergique entre la présence de gènes de prédisposition dont la traduction phénotypique peut être mineure et des stimulations antigéniques issues de l'environnement comme des agents infectieux d'où de façon non surprenante la mise en évidence de gènes ‘‘immuns’’ de susceptibilité proches entre les pathologies inflammatoires comme la PR et les lymphomes.

Le système immunitaire joue un rôle majeur dans le développement des tumeurs. La présence de lymphocytes intra-tumoraux est par exemple associée à une diminution de la fréquence de développement de métastases dans certains cancers. Paradoxalement, la présence d'une inflammation chronique, de stimulations antigéniques chroniques ou un terrain d'immunosuppression, peuvent mener à un processus de cancérisation. Enfin, la tumeur peut

développer des mécanismes qui lui permettent d'échapper au système immun. Les cytokines jouent un rôle majeur dans la modulation de la réponse immune et dans la communication entre les cellules pathologiques et les cellules du micro-environnement. Le réseau de cytokines permet en situation normale de réguler la différenciation, la multiplication et l'activation des cellules du système immunitaire. L'étude du rôle des cytokines paraît donc essentielle pour mieux comprendre le développement tumoral, mais cela peut s'avérer complexe compte tenu des caractéristiques propres des cytokines, à savoir leur pléiotropie, la redondance de leur activité et leurs modes d'actions variés. L'effet d'une cytokine est donc toujours à moduler en fonction de l'activité des autres cytokines. Malgré ces difficultés, pouvoir influencer le déséquilibre de la balance entre le système immunitaire et la tumeur, est un enjeu thérapeutique majeur. Dans les lymphomes, le pronostic des patients peut être estimé par le taux sérique d'un certain nombre de cytokines et ceci de façon indépendante des variables cliniques habituellement pronostiques dans ces pathologies, comme le stade d'Ann Arbor, le taux de LDH et l'indice de performance. L'activité des cytokines et des autres médiateurs du système immunitaire peut être modulée par la présence au niveau de leur gène de variations génétiques. Ces variations génétiques qui n'ont a priori pas de conséquence phénotypique majeure, pourraient influencer leur expression, leur régulation ou compte tenu de l'interdépendance de ces médiateurs et de leur caractère intégré, favoriser un profil immun favorable au développement de pathologie lymphoïde.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier l'impact pronostique de substitutions nucléotidiques appelées SNPs (single nucleotide polymorphism) au niveau de l'ADN constitutionnel de patients porteurs de LH. Compte tenu de l'importance des cytokines dans la physiopathologie de ce lymphome, l'étude a porté sur les SNPs au niveau de leurs gènes et plus particulièrement au niveau de leurs séquences régulatrices. Ainsi, onze SNPs au sein de huit gènes de cytokines ont été étudiés à partir d'une population de 464 patients porteurs de LH, les prélèvements sanguins ayant été obtenus de façon prospective entre 1998 et 2002 dans le cadre d'une étude du Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) sur l'impact pronostique des cytokines plasmatiques dans cette pathologie.[11] Dans une première partie, les différents aspects composant la diversité génétique seront rappelés. Dans une seconde partie, après un rappel de la physiopathologie du LH, les données de la littérature des SNPs au niveau des gènes de 8 cytokines étudiées dans notre travail (TNFA, IL-10, IL-6, IL-1B, IL-1Ra, INFG, CCL-17, IL-12), en lien avec la physiopathologie des LH seront décrites, notamment les études qui se sont attachées à montrer un caractère fonctionnel de ces SNPs. Les données de la littérature sur le rôle des variations génétiques au niveau des gènes des

effecteurs du système immunitaire dans la susceptibilité au lymphome ou leur intérêt comme marqueur pronostique seront ensuite exposées. A partir de ces données de la littérature, notre travail sur l'impact pronostique des onze SNPs au sein de huit gènes de cytokines étudiés sur une série de 464 patients porteurs de LH, sera présenté et les résultats discutés.

1. Intérêt de l'étude des polymorphismes génétiques

La caractérisation et la compréhension des variations génétiques constituent un véritable challenge en génétique humaine tant pour les individus indemnes de toute pathologie que les personnes malades. Les progrès n'ont été possibles qu'à partir du séquençage de l'ensemble du génome et des avancées technologiques nécessaires à ces travaux. La variabilité génétique se présente sous différentes formes en sachant que les consensus concernant sa nomenclature évoluent. Le niveau le plus simple est représenté par des variations d'une seule base nucléotidique (A, T, G, C) correspondant aux substitutions nucléotidiques ou en langage anglo-saxon ''single nucleotide polymorphism'' ou SNP. Les variations de structure se caractérisent par toute variation entre les individus qui ne sont pas des SNPs. On distingue les séquences répétées (mini ou micro-satellites ou VNTR pour ''variable number of tandem repeats'') et les insertions/délétions (InDel) correspondant à la présence/absence d'une ou plusieurs bases alors qu'elles ne sont pas présentent dans un autre génome et dont la taille est inférieure à 1 kilobase (kb). Les altérations de structure correspondent aux délétions, duplications, insertions, inversions et translocations. Les variations de structures peuvent ainsi modifier la quantité d'ADN comme les CNV (copy number variant), qui intéressent des fragments d'ADN de plus de 1 kb (Figure N°1).

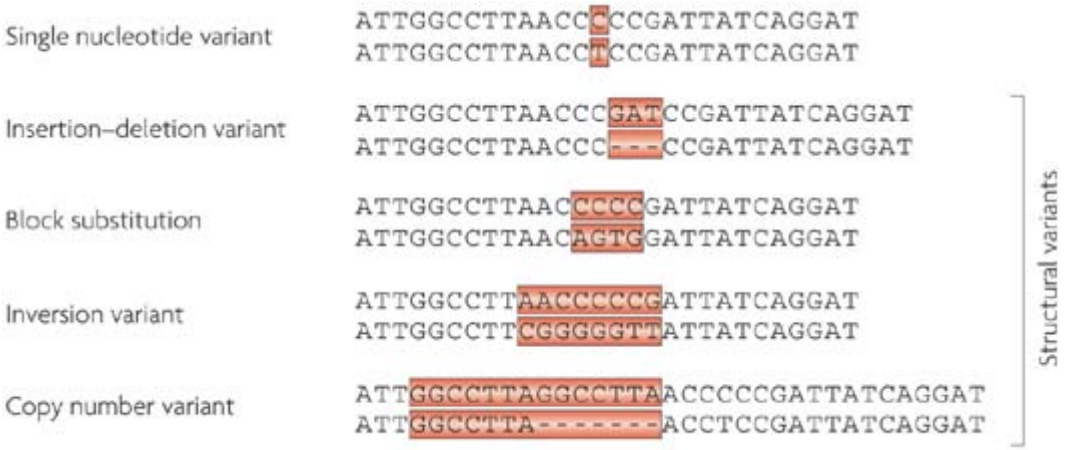


Figure 1 : Différentes classes de variants génétiques. D'après Frazer et al.[12]

Concernant les SNPs, ils peuvent être estimés à environ 11 millions répartis au sein du génome et surviennent toutes les 100 à 300 paires de bases. Pour ces SNPs, on peut définir des variants rares qui correspondent a moins de 1% de la population. On peut estimer à 7 millions de SNPs, le nombre de SNPs dont l'allèle mineur a une fréquence supérieure à 5%. Il est important de noter que les différences entre individus se porteront sur des variations reconnues comme fréquentes plutôt que rares. Ainsi pour un individu donné, la majorité des

variations seront situées à la même position que pour la majorité de la population. Cela est probablement en rapport avec le fait que des altérations du génome compatible avec la vie seront présentées par une majorité d'individus. L'analyse des SNPs sur des génomes entièrement séquencés (2 européens, 1 asiatique) montre que sur environ 3 à 4 millions de SNPs, 67% sont communs aux 3 génomes, 52% communs à au moins 2 génomes et 30% propres à chaque individu. Plusieurs SNPs localisés à une distance proche peuvent être corrélés entre eux, présentant un déséquilibre de liaison (LD, du terme anglo-saxon, linkage of desequilibrum). Les projets internationaux comme HapMap visent à établir des groupes de SNPs hautement corrélés qui sont donc transmis ensemble. L'intérêt est donc de définir ces LD qui pourraient permettre de ne rechercher que quelques SNPs ''taggés'' et connaître ainsi la majorité des SNPs. Cela pourrait permettre de réduire le nombre de SNPs ayant une fréquence allélique supérieure à 5% à 550.000 SNPs en LD. Les SNPs pourront être définis comme synonymes lorsqu'ils ne modifient pas l'acide aminé défini par le codon ou non synonymes lorsqu'il y a substitution de l'acide aminé. Des études peuvent ainsi ne se concentrer que sur l'étude des SNPs non synonymes supposés fonctionnels en altérant la séquence des acides aminés. Des bases de données se constituent pour prédire les effets de ces SNPs dits ''fonctionnels'' (Predicted Impact of Coding SNPs [PICS] database, Polymorphism Phentyping [PolyPhen], sifting intolerant from tolerant [SIFT]). Les CNVs correspondent à des variations du nombre de copies de segment de chromosomes et par conséquent à des variations du nombre de gènes situés au niveau de ces segments de chromosome. Les variations de structure correspondraient à au moins 20% de la variabilité du génome et seraient à l'origine de 70% des variations des bases nucléotidiques. Les CNV représenteraient 9 à 25 Mb soit 0.5 à 1% du génome et seraient soit acquis ou transmis somatiquement. En effet, de vrais jumeaux peuvent présenter des CNVs différents et pour un même individu les CNVs varient d'un tissu à l'autre. Par rapport à une seule copie de gène, la présence de CNVs va permettre une expression variable des gènes et des modifications de fonction puisqu'au cours des recombinaisons du génome, de nouvelles combinaisons d'exons peuvent être créées. Il existe des exemples de lien direct entre le nombre de CNVs, l'expression d'une protéine et un phénotype particulier comme les variations du gène de la chimiokine *CCL3L1* et la susceptibilité à l'infection par le VIH.[13] Cependant les ''avantages évolutifs'' de ce type de variation restent à être mieux étudiés puisque la majorité des CNVs sont, sur les données actuelles, retrouvés que sur une faible proportion de la population. Ce type de variations nécessite des modifications de structures des chromosomes par recombinaison homologue et non homologue et l'implication des enzymes de réparation de l'ADN. Cela peut être à l'origine de modifications génétiques délétères et de processus néoplasique.[14] Compte tenu du

fait que les CNVs représentent une proportion importante de la variabilité du génome, il semble nécessaire comme pour les SNPs de développer des outils qui permettent de mieux les caractériser d'autant que les déséquilibres de liaison avec les SNPs, qui pourraient simplifier leur étude, n'est pas formelle.

L'un des enjeux majeurs de l'étude des variants génétiques est de démontrer leur implication dans l'influence de l'expression des gènes et par conséquent de les mettre en relation avec l'expression d'un phénotype précis. En effet la plupart des variations peut être neutres et l'enjeu est de mettre en évidence celles qui ont un caractère fonctionnel. Ainsi il a été montré expérimentalement dans un contexte cellulaire identique permettant d'éviter toute influence extra-génétique, que l'expression des gènes a une variabilité inter-individuelle.[15] Comme nous le verrons dans de nombreuses expériences sur l'influence de l'expression des cytokines, les SNPs peuvent influencer l'expression de gène cible situé à proximité (''en cis'') soit en affectant la machinerie de réplication, soit en modifiant la fixation de facteurs de transcription. L'influence peut également se faire très à distance du gène cible voir sur un autre chromosome (''en trans'') (Figure N°2). Leur détermination est éminemment plus complexe mais leur présence a été suspectée par les études de liaison montrant que l'expression d'un gène varie en fonction de variant génétique à distance.

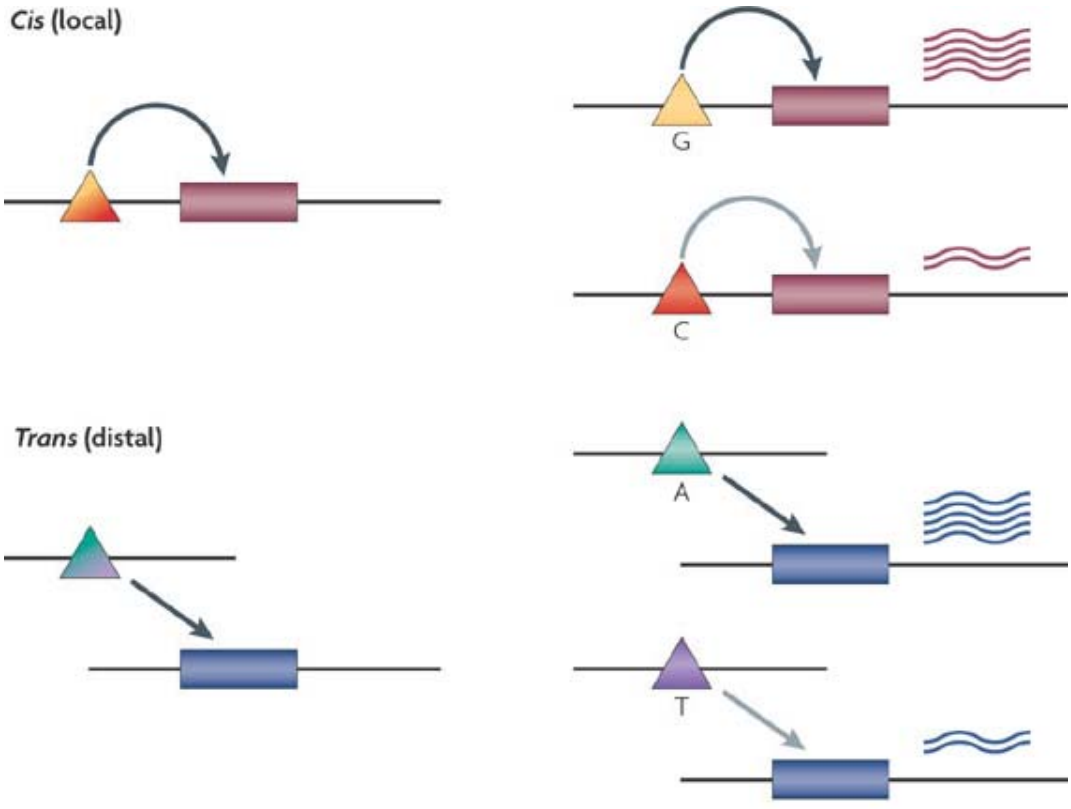


Figure 2 : Effet des variants génétiques en cis ou trans sur l'expression des gènes. D'après Cheung et al.[16]

Depuis la fin des années 90, l'essor dans la caractérisation des variants génétiques a été majeur passant de l'étude d'un SNP par SNP, à l'étude de millions de SNPs et d'autres variants génétiques plus complexes (Figure N°3).

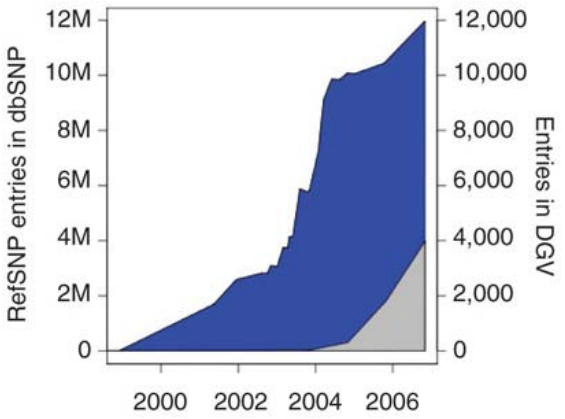


Figure 3 : Evolution du nombre de RefSNP (en millions) dans les bases de données en fonction du temps. D'après Conrad et al.[17]

L'évolution de l'analyse des polymorphismes a été considérable depuis les techniques dites de polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP, pour restriction fragment length polymorphism) faisant place aux techniques TaqMan® puis aux puces à haut débit. Les approches de recherche de SNPs se baseront sur le séquençage complet de tous ou d'une partie d'intérêt du génome ou l'utilisation de technologie ou l'hybridation se fera sur les SNPs déjà identifiés. A propos du séquençage systématique des génomes, il est ainsi prévu de faire l'analyse complète du génome de1000 individus. Ce projet lancé en 2008, va permettre de mieux cartographier les variants génétiques et notamment les polymorphismes complexes (CNV par exemple) ou rares. Initialement, les puces pangénomes permettaient de rechercher les SNPs situés à intervalle régulier au niveau du génome. Les puces actuelles permettent d'analyser un million de SNPs somatiques mais commencent également à décrire des variants plus complexes comme les CNV ou à décrire des SNPs sur des génomes moins étudiés comme l'ADN mitochondrial. Enfin, les SNPs peuvent être étudiés de façon plus ciblée avec des correspondances avec des bases de données comme HapMap qui décrivent les SNPs en LD. De multiples solutions technologiques deviennent ainsi disponibles pour des études ciblées sur quelques centaines SNPs ou pour des études pangénomes de susceptibilité. Actuellement, le nombre de SNPs analysables se situent à un million ce qui représente finalement que 20% de l'ensemble des SNPs estimés. Les objectifs précis des projets d'étude du génome sont donc essentiels à définir pour utiliser de manière efficace ces différentes solutions technologiques relativement nouvelles.

Les pathologies dont les déterminants génétiques sont complexes, ont fait l'objet d'étude de susceptibilité en comparant les variations génétiques des patients à des témoins. Les données générées par ces études peuvent être assez déconcertantes puisqu'elles modifient notre compréhension de la biologie en reliant ''génétiquement'' des pathologies a priori très différentes sur le plan phénotypique. Ainsi, des voies communes existent entre différentes pathologies inflammatoires et auto-immnunes comme par exemple l'implication de l'IL23R dans le psoriasis et la maladie de Crohn.[18,19] La méthodologie la plus couramment utilisée actuellement consiste à comparer les polymorphismes d'une série de patients la plus large possible à des témoins indemnes de la pathologie étudiée. Les données générées correspondant aux SNPs les plus significatifs (5 à 10%) sont ensuite validées sur une cohorte indépendante de patients et de témoins et il est habituel de refaire des analyses de confirmation sur des séries patients/témoins plus hétérogènes pour confirmer les associations retrouvées.[20] Les SNPs retrouvés comme significatifs ne sont pas forcement impliqués dans un processus physiopathologique, ceux-ci pouvant être en LD avec les SNPs fonctionnels pouvant être situés très à distance ou même sur d'autres chromosomes. Le lien biologique n'est donc pas forcement évident, nécessitant des séquençages de la région génétique d'intérêt et des études biologiques fonctionnelles. Au-delà de ces limites de principe de études pangénomes, la véracité des données générées nécessitent un niveau de significativité élevée au moins à 10^{-7} voir 10^{-10} pour obtenir des risques relatifs raisonnables (souvent proche de 1.2 à 1.5). Compte tenu du nombre de tests réalisés, des corrections statistiques sont donc nécessaires comme les corrections de type Bonferroni, FPRP (False Positive Report Probability) ou FDR (False Discovery Rate).[21] Cela nécessite donc la constitution de large cohorte dans le cadre de consortium ou des méta-analyses de plusieurs études. Pour cette dernière méthode, cela peut modifier la représentativité de la cohorte entière en fonction de la structure de chaque étude associée et faire diminuer la puissance de l'étude globale. La sélection des contrôles peut également être source de conclusion fausse, les résultats obtenus pouvant en fait correspondre à des structures de population très différentes entre les patients et les témoins. Des outils statistiques permettent en partie de détecter ce risque de stratification d'une population.[22] L'écueil contraire sera de sélectionner une population contrôle trop sélectionnée. La difficulté actuelle par rapport à ces études d'association est que jusqu'à présent, notamment dans les domaines de maladies fréquentes multifactorielles comme la cardiologie (hypertension artérielle, infartus), l'endocrinologie (diabète de type I), la neurologie (SEP, Alzheimer) et la rhumatologie (PR, spondylarthrite ankylosante), elles apportent actuellement des informations assez faibles sur leur caractère héréditaire. Cela peut en partie être expliqué par le fait que i) les données ne sont générées que sur une partie des

SNPs (20% du total des SNPs pour une puce à 1M de SNPs), ce qui pose le problème d'émettre des hypothèses sur les données incomplètes ii) d'autres types de polymorphismes ne sont pas ou peu étudiés comme les CNV iii) initialement, l'hypothèse de travail était que les variants fréquents pouvaient expliquer les maladies multigéniques fréquentes en étudiant les SNPs dont la fréquence de l'allèle mineur est supérieure à 5%. La question actuellement, serait d'étudier des SNPs plus rares ayant une fréquence allélique faible dont la chance qu'il soit fonctionnel est plus importante ce qui pourraient apporter d'avantage d'information sur le caractère héréditaire de ces pathologies multifactorielles.[23,24] Cela exigera des technologies différentes, notamment de séquençage, et des méthodologies différentes comme par exemple des analyses de pathologies familiales ou l'expression des ces variants rares peut être plus fréquentes.

Le nombre de SNPs mis en évidence au niveau des parties codantes et non codantes des cytokines, est considérable. Des bases de données ont ainsi été publiées avec les différents SNPs des gènes de cytokines comme celles de Bidwell et al. avec un lien internet dont la dernière actualisation date de 2005 (http://www.nanea.dk/cytokinesnps/).[25] Ce site spécifique aux SNPs des cytokines permet d'avoir quelques données sur le caractère fonctionnel de tel ou tel SNP. Actuellement, de nombreuses banques de données ont été constituées comme dbSNP du National Center for Biotechnology Information (NCBI), HapMap, SNP500, EGP (the Environmental Genome Project), Seattle SNPs, HGMD (The Human Gene Mutation Database), UCSC Genome Browser de l'Université de Californie (Santa Cruz), et CGAP (Cancer Genome Anatomy Project) du NCI. Le projet de NCBI (dbSNP) référence ainsi plus de 10 millions de SNPs avec environ la moitié validée. HapMap étudient les variations génétiques de population d'origine génétique diverse et proposent l'identification des SNPs en LD. Le projet SNP500 est centré sur l'étude des SNPs étudiés dans le cancer, avec des informations des séquences d'ADN validées et les conditions expérimentales. EGP et Seattle SNPs propose l'identification de SNPs de domaine spécifiques comme ceux impliqués dans la réparation de l'ADN, l'apoptose pour EGP et l'inflammation pour Seattle SNPs. L'intérêt du projet HGMD est qu'il décrit également d'autres variants que les SNPs comme par exemple les insertions/délétions, le rôle physiopathologique supposé des variants décrits et leur caractère ou non fonctionnel. Comme déjà discuté, des bases d'approche fonctionnelle se sont créées pour prédire les conséquences sur la protéine des SNPs. Il s'agit des bases PolyDoms, PolyPhen, SNPs3D.

2. Etudes des variations génétiques au niveau des gènes de huit cytokines impliquées dans la physiopathologie des lymphomes Hodgkiniens

2.1. Physiopathologie des lymphomes Hodgkiniens

La physiopathologie du LH est complexe.[26] Cette tumeur a ceci de remarquable qu'elle ne présente qu'un très faible nombre de cellules tumorales, les cellules de Reed-Sternberg (RS), entourées d'un infiltrat cellulaire réactionnel hétérogène comportant des lymphocytes, des macrophages, des plasmocytes, des éosinophiles. La cellule d'origine des cellules de RS est restée longtemps inconnue mais l'analyse des parties variables des gènes des immunoglobulines montre qu'elle dérive d'un lymphocyte B issu du centre germinatif que l'on peut qualifier de pré-apoptotique.[27] Les mutations au sein des parties variables de gènes des immunoglobulines auraient dû aboutir à l'apoptose de ce lymphocyte B très modifié. La cellule tumorale du LH n'exprime donc pas de Récepteur B (BCR), a perdu les marqueurs de différenciation B (perte du CD20, CD79) avec des voies de signalisation du BCR altérées (syk, Blk) et une perte d'expression des facteurs de transcription des cellules B (Oct-2, Bob1, Pu1). D'autres facteurs de transcription qui participent au programme de différenciation des cellules B comme EBF1 (Early B-cell Factor) et PAX5 sont sous-exprimés. On retrouve l'expression de facteurs de transcription impliqués dans l'expression des lignées T comme NOTCH1 qui participe à la dérégulation de PAX5 et l'inhibition d'EBF1 ou de marqueurs de cellules dendritiques comme CCL-17 ou encore de la lignée myéloïde comme l'alpha 1-antitrypsine. On peut donc considérer que la cellule de RS présente une reprogrammation profonde de l'expression de ses gènes modifiant de façon majeure son phénotype. Les cellules de RS présentent de nombreuses anomalies cytogénétiques, ce qui témoigne d'une instabilité génétique importante sans pour autant que des anomalies génétiques récurrentes soient retrouvées.[28,29] L'hypothèse actuelle est que les cellules de RS correspondent à un lymphocyte B ayant ''échappé'' à l'apoptose. Les cellules de RS vont exprimer un phénotype de résistance à l'apoptose médiée par Fas avec parfois la présence de mutations au niveau du récepteur CD95.[30] La voie extrinsèque de l'apoptose est également altérée avec la surexpression de molécules inhibitrices de l'apoptose comme c-FLIP.[31,32] La voie intrinsèque de l'apoptose est également marquée par la surexpression de BCL-2 qui confère aux patients un pronostic défavorable.[33,34] Le gène de suppresseur de tumeur P53 ou MDM2 est également parfois altéré dans les cellules de RS.[35-37]

Les deux voies oncogéniques les plus importantes dans les cellules de RS sont les voies NFkB et JAK-STAT. La voie oncogénique NFkB est surexprimée dans les cellules tumorales via les récepteurs de la famille du TNF à la surface de la cellule (CD30, CD40, TACI, RANK,

BCMA, NOTCH1) mais également par des mutations des membres inhibiteurs de cette voie (IKB, IKϵ).[38-42] Dans les LH exprimant le virus de l'Epstein-Barr (40% de LH EBV+), l'activation de NFkB peut s'effectuer via la protéine LMP1 exprimée à la surface de la cellule de RS. Plus récemment, des mutations d'un gène codant pour la protéine A20 (*TNFAIP3*), inhibiteur de la voie NFkB ont été mises en évidence dans 30 à 40% des cas de LH.[43] La voie JAK2 est également surexprimée dans 40% des tumeurs avec des mutations ou délétions d'inhibiteurs de la voie JAK-STAT comme SOCS1.[44,45] Hormis les lésions génétiques observées au niveau des membres de ces deux voies, on retrouve une activation des protéines STAT par des facteurs autocrines comme l'interleukine 13.[46] D'autres voies oncogéniques comme PI3K/AKT, Erk, JUN ou des récepteurs à tyrosine kinase comme PDGFR peuvent également présenter des anomalies.[47-50] L'environnement immunologique de la cellule de RS joue cependant aussi un rôle majeur dans le développement tumoral.[51] Les patients présentent un déficit de l'immunité cellulaire, une réponse exagérée de type Th2 et une inhibition de la réponse cytokinique Th1 favorisant un environnement favorable à la prolifération tumorale. L'infiltrat réactionnel est composé entre autres de lymphocytes T CD4+ dont une fraction correspond à de LTreg aux propriétés immunosuppressives sur les lymphocytes T cytotoxiques. Paradoxalement, une expression importante de LTreg serait corrélée à un pronostic favorable, peut-être en lien avec une activité immunosuppressive des LTreg sur les cellules de RS ou les autres cellules inflammatoires.[52,53] Les interactions entre les cellules de RS et les cellules du micro-environnement se font par l'intermédiaire de cytokines, chimiokines et des formes solubles des récepteurs de la famille du TNF (CD30, CD40, RANK). Récemment, le rôle pronostique du micro-environnement a été renforcé par une étude du profil d'expression des gènes sur le matériel tumoral de patients porteur de LH. Dans cette étude, est montré que les patients en échec de traitement présentent, par rapport aux patients n'ayant pas présenté de rechute, une tumeur avec une hyperexpression des gènes habituellement associés aux macrophages. Une étude en immunohistochimie sur une série indépendante montre qu'en présence d'une infiltration importante de macrophages marqués par l'anticorps anti-CD68, le pronostic est effectivement défavorable.[8]

2.2. Etude des SNPs au niveau des gènes des huit cytokines IL1-B, IL1RN, IL-6, IL-10, TNFA, INFG, IL-12 et CCL17

Nous ne considérerons dans cette partie que les SNPs les mieux caractérisés au niveau des gènes des cytokines, ayant un rôle important dans la physiopathologie des LH. Ainsi 11 SNPs ont été étudiés parmi huit cytokines : IL-10 (4 SNPs), TNFA, IL-6, IL-1B, IL1-Ra, INFG, IL-12 et CCL17.

2.2.1. Interleukines 1B et 1Ra

L'IL1-B et l'IL1-Ra appartiennent à une famille de 11 membres dont les plus récemment découverts sont l'IL-33 et l'IL-18. Bien que mise en évidence dans les années 80, de nouvelles propriétés des membres de la famille IL-1 sont explorées comme la participation de l'IL-1 à la maturation des cellules T naïves en cellules Th17. Les gènes codant pour les membres de la famille IL-1, excepté IL-18 et IL-33 sont situés au niveau du chromosome 2 au niveau d'une région de 400kB (Figure N°4).

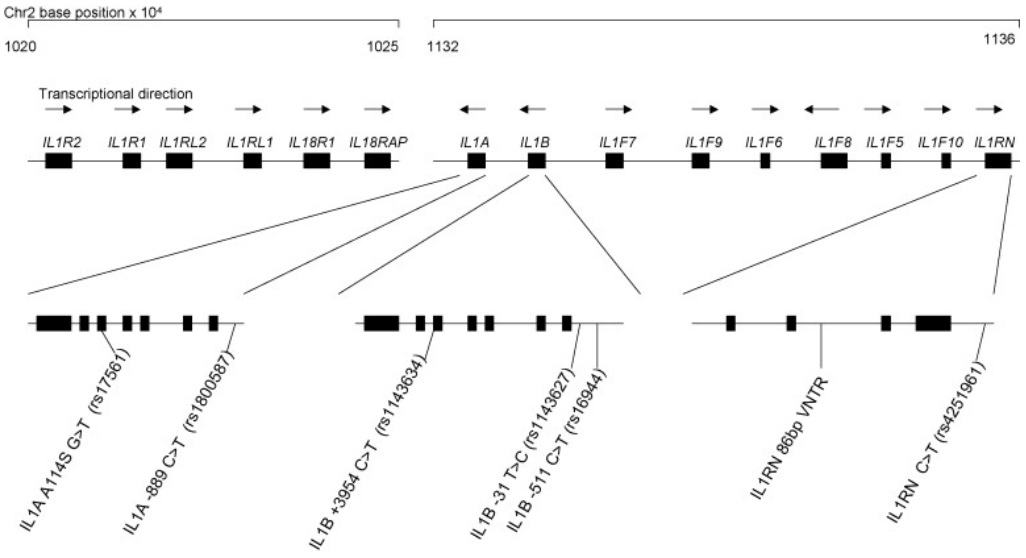


Figure 4 : Gènes de la famille de l'IL-1 sur le chromosome 2 et principaux SNPs fonctionnels. D'après Smith et al.[54]

L'IL-1B nécessite un clivage enzymatique d'un pro-domaine au niveau amino-terminal et le gène *IL1RN* de IL-1Ra code pour un peptide signal maintenant la protéine au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi. Les gènes codant pour les récepteurs des cytokines sont également situés au niveau du chromosome 2. Ces récepteurs ont une structure extra-cellulaire proche de celle des immunoglobulines. La fixation du ligand sur son récepteur spécifique permet le recrutement d'une seconde sous-unité puis la formation d'un

hétérodimère qui permet la transduction du signal. IL-1A et IL-1B se fixent sur le même récepteur et ont *in vitro* les mêmes activités biologiques. *In vivo*, l'IL-1B a une diffusion systémique alors que l'IL-1A agit sur un mode paracrine. Il en résulte une contribution différente au sein du système immunitaire avec par exemple un effet pyrogène de l'IL-1B au niveau cérébral alors que l'IL-1A va participer à l'activation des lymphocytes T au cours d'un processus immuno-allergique. De plus, l'IL-1B est essentiellement sécrétée par les monocytes et les macrophages alors que la sécrétion de l'IL-1A est beaucoup plus pléomorphe. Le mécanisme physiologique d'inhibition de l'IL-1 est assuré par l'inhibiteur de l'IL-1, IL-1Ra codé par le gène *IL1RN* qui se lie au récepteur de l'IL-1, IL-1R1 qui ne permet ainsi pas le recrutement de l'hétérodimère (IL-1RAP). L'expression d'IL-1Ra est contrôlée par l'IL-1 mais aussi par des cytokines anti-inflammatoires comme IL-4, IL-6, IL-10 et IL-13. Un second récepteur IL-1R2 qui se lie à IL-1RAP, entre également en compétition avec IL-1R1 mais ne permet pas la transduction du signal, régulant ainsi négativement l'activité de l'IL-1. L'affinité de ce récepteur avec IL-1Ra est faible, ce qui permet d'amplifier l'activité d'inhibition de l'IL-1. L'IL-1 est sécrétée par de nombreux types cellulaires notamment les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et épithéliales. Seuls les lymphocytes B et T sécrètent l'IL-1 mais pas les autres membres de la famille de l'IL-1. Il est important de noter que les récepteurs de l'IL-1 ont une homologie avec les récepteurs TOLL, ces derniers activant la sécrétion d'IL-1. L'IL-1 a donc un rôle crucial de relais entre les acteurs de l'immunité innée, en relation avec les pathogènes extérieurs et l'immunité adaptative. En effet, l'IL-1 va d'une part agir sur les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, macrophages, neutrophiles, basophiles, mastocytes) mais également sur l'immunité adaptative B et T. En effet, l'IL-1 permet d'amplifier la réponse cellulaire T notamment Th2 et a un rôle fondamental dans la différenciation des cellules Th17. L'IL-1 peut également permettre la prolifération des cellules T même en présence des LTreg. L'IL-1peut permettre également la prolifération des lymphocytes B et favorise via son action sur les lymphocytes T et l'expression de CD40L et la commutation isotypique. L'expression de cette cytokine inflammatoire a été mise en évidence par hybridation in situ ou immunohistochimie dans environ 58% des cas de LH principalement les cellules de RS.[55-59] Les dosages sériques d'IL-1Ra sont significativement plus importants chez les patients porteurs de LH que chez les témoins, le taux d'IL-1Ra étant corrélé au pronostic des patients.[11]

L'IL1-B est codée par un gène de 7.5kb comprenant sept exons. Les deux SNPs les plus étudiés sont situés au niveau du promoteur en -511C>T (rs16944) et -31T>C (rs1143627) en

sachant que ces deux SNPs présentent un LD. Des analyses d'affinité sur l'ADN (EMSA) ont rapporté des résultats contradictoires par rapport au nucléotide C ou T en -511. L'analyse du niveau d'expression *in vitro* de l'IL-1B mesuré par luciférase en fonction de la présence du nucléotide C ou T au niveau du promoteur en -511, montre une augmentation de 12% avec l'allèle T.[60] Cette étude a été confirmée par une autre étude qui a analysé quatre SNPs au niveau du promoteur (-3737, -1464, -511, -31) dans laquelle une légère augmentation d'activité du promoteur a été mise en évidence en présence de l'allèle T en –511, mais une diminution d'activité avec l'allèle C en -31.[61] Les allèles T en -511 et C en -31 étant majoritairement liés, il est difficile d'avoir une preuve précise de l'activité fonctionnelle de ces SNPs. Dans une dernière étude, l'IL-1B était mesurée dans le fluide gingival et analysée en fonction de l'haplotype -3737, -1464 et -511. L'homozygotie CC en -511 (en lien avec -31T) conférait un taux d'IL-1B plus important.[62] Le gène de l'IL-1Ra comprend quatre exons avec des variants de cinq ou six exons. Une séquence répétée (VNTR) de 86 paires de base se situe au niveau de l'intron 2.[63] Les allèles les plus fréquents comportent respectivement 1 ou 2 séquences répétées alors que les allèles 3, 4 ou 5 sont beaucoup plus rares. La production d'IL-1Ra a été étudiée en fonction du nombre de séquences répétées. L'allèle 2 semble, dans une étude *in vitro* et chez des donneurs sains, permettre une production plus importante de la cytokine, avec dans l'étude *in vitro* une diminution de production par les monocytes, d'IL-1A.[64] Dans une étude publiée en 2009 sur 1256 donneurs sains, les taux circulants d'IL-1Ra sont significativement augmentés en présence de 5 SNPs sur 7 analysés qui représentent 69% des variations génétiques du gène de l'IL1-Ra.[65] Le niveau de significativité est le plus important pour le SNP rs4251961 avec pour les homozygotes TT un taux plus élevé que l'allèle CC. De façon intéressante, ce SNP est en LD avec d'autres SNPs en 3'UTR mais également avec le polymorphisme correspondant à la séquence répétée de 86pb au niveau de l'intron 2. Dans une étude biologique *ex vivo*, la production d'IL-1Ra est diminuée après stimulation de sang total en présence de l'allèle CC du SNP rs4251961 ce qui va dans le même sens que l'étude réalisée à partir de prélèvements d'IL-1Ra plasmatiques.[66] Un SNP en position +2018T>C au niveau de l'exon 5 a également été étudié, ce dernier étant en LD avec le SNP de l'intron 2. La construction d'haplotype est de plus possible entre les différents SNPs de l'IL-1A, B et RN, les gènes de la famille IL-1 étant situés sur une portion de 430-kb au niveau du bras long du chromosome 2. Ainsi, dans une étude chez des donneurs sains, l'effet de l'allèle 2 du SNP de l'intron 2 du gène de l'IL-1Ra se retrouve surtout en présence du SNP de IL-1B -511T et en absence de l'IL-1B +3954T.[67] De façon intéressante, dans les pathologies cardiovasculaires (coronaropathies) il est possible de définir un profil inflammatoire des patients avec un taux plus ou moins élevé de CRP, en fonction de

l'haplotype construit à partir des SNPs en +4845 ou -889 de *IL1A*, +3954 de *IL1B*, -511 ou -31 de *IL1B* et +2018 ou VNTR de *IL1RN* (Figure N°5).[68]

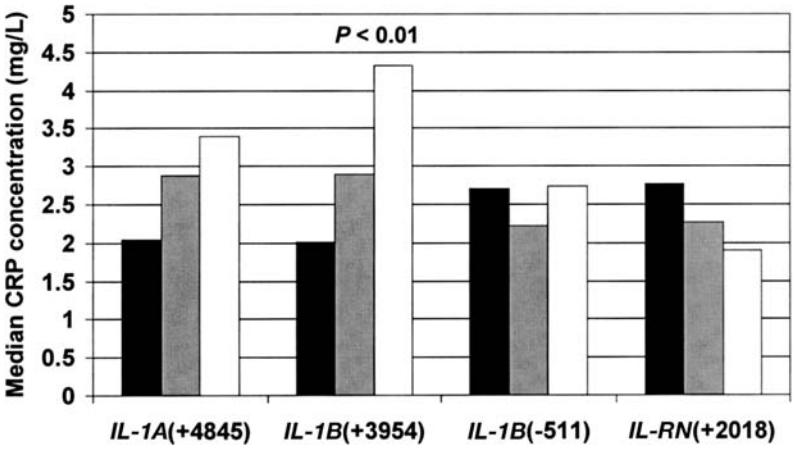


Figure 5 : Médiane de CRP en fonction du génotype des gènes de la famille de l'*IL1* (Patients en bilan de coronaropathie). D'après Berger et al.[68]

Ces données *in vitro* et *in vivo* obtenues à partir des études cible par cible où des haplotypes reliant un nombre faible de SNPs, montrent qu'il est tout à fait possible que les variations génétiques de ce cluster de gène de la famille de l'*IL1* influencent la réponse inflammatoire et dans ce contexte multifactoriel puissent favoriser l'émergence de pathologie autoimmune ou néoplasique. Ainsi, des études de susceptibilité montrent l'implication de variants des gènes de la famille de l'*IL1* dans les pathologies inflammatoires comme la spondylarthrite ankylosante, la PR[69-71] et les pathologies coronariennes.[72] En cancérologie, plusieurs études retrouvent une implication des SNPs des gènes de l'IL-1 dans la susceptibilité aux cancers gastriques ou état précancereux.[73,74]

2.2.2. Interleukine 6

L'interleukine 6 a des propriétés pro et anti-inflammatoires. Cette cytokine est sécrétée par de nombreux types cellulaires (fibroblastes, monocytes/macrophages, lymphocytes, cellules épithéliales et endothéliales, ostéoblastes, cellules stromales). Elle agit sur la maturation des lymphocytes B et la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques. L'IL-6 est l'un des plus importants médiateurs de la réponse inflammatoire avec l'induction des protéines de l'inflammation et un rôle pyrogène endogène. Son activité anti-inflammatoire passe par son effet inhibiteur du TNF et de l'IL-1 et l'activation de l'IL-1Ra et l'IL-10. Elle agit en se fixant sur son récepteur, composé de deux sous-unités, IL6Rα et de la glycoprotéine gp130. Les taux sériques d'IL-6 sont considérés comme pronostiques dans les cancers du sein et du rein métastatiques mais également dans les cancers du pancréas et gastriques en ne considérant que les études observationnelles.[75] Dans les pathologies lymphoïdes, le taux d'IL-6 a une valeur pronostique dans les LH.[11] Des études rétrospectives montrent également la valeur pronostique dans les LNH.[76-78] On retrouve une expression de l'IL-6 au niveau des cellules de RS dans 65% à 100%,[79-83] avec de façon intéressante une expression plus importante dans les LH EBV+ (84% vs. 51%) par rapport aux taux retrouvés dans les LH n'exprimant pas l'EBV.[81] Les taux d'IL-6 sont dans les LH au diagnostic, corrélés à la présence de symptômes B, du stade de Ann Arbor, à la présence d'une forte masse tumorale ainsi qu'à la présence d'une anémie, d'une hypo-albuminémie et logiquement d'un syndrome inflammatoire.[11]

Le gène de l'IL-6 est situé sur le chromosome 7. Le SNP le plus étudié au niveau du gène de l'IL-6 est situé au niveau du promoteur en -174G>C (rs1800795). Les analyses après construction de gène rapporteur de -550 à +61 étudiant l'expression de l'IL-6 en fonction de l'allèle G ou C en -174, montrent une diminution basale de l'expression en présence de l'allèle C et une absence d'augmentation de l'expression de l'IL-6 en cas de stimulation par le LPS ou l'IL-1 alors que l'IL-6 augmente en présence de l'allèle G.[84] Dans une autre étude, avec un gène rapporteur plus grand (-641, +13), il n'y a pas de différence d'expression d'IL-6 en fonction des différents haplotypes même après stimulation par IL-1 ou LPS, entre les différents allèles G et C.[85] Une étude récente sur 5659 participants ne retrouve pas de différence au niveau du dosage sérique de l'IL-6 en fonction de l'allèle G ou C en -174.[86] Le caractère fonctionnel de ce SNP peut donc dépendre d'autres SNPs présents au niveau de ce gène ou même à distance et probablement de la situation clinique. Ainsi, une analyse des taux d'IL-6 sériques en situation de stress chez des nouveau-nés, montre une corrélation entre les allèles en -174 et le taux circulant mais dans le sens inverse aux études biologiques *in vitro* (augmentation de l'IL-6 en présence de l'allèle CC) alors qu'en situation ''non

inflammatoire'' les taux d'IL-6 ne varient pas.[87] Une seconde étude chez des patients ayant présenté un infarctus du myocarde, montre que l'allèle mineur de 4 SNPs dont rs1800795 (avec rs2069832, rs1554606, rs2069845) augmente le taux circulant d'IL-6 et ceci est confirmé par la construction d'un haplotype de six SNPs, qui intègre les quatre allèles mineurs.[88] Cet haplotype représente 30% des patients et entraîne une augmentation du taux d'IL-6 de 9% alors que l'allèle CC en -174 serait à l'origine d'une augmentation de 6.3% du taux d'IL-6. Comme souligné par les auteurs de cette étude, le taux d'IL-6 a un cycle circadien variant en fonction du cycle du cortisol. Des dosages longitudinaux ont été réalisés dans cette étude et il est intéressant de noter que les variations intra-patients en fonction de l'haplotype sont relativement stables dans le temps ce qui renforce l'impression d'une influence génétique du taux circulant de l'IL-6 même si les quatre SNPs étudiés ne sont pas forcement les SNPs fonctionnels mais peuvent être que de simples marqueurs. C'est dans ce contexte qu'a été mis en évidence un nouveau variant beaucoup plus distal en -6331 T>C (rs10499563) qui influencerait les taux sériques d'IL-6 en situation inflammatoire aiguë.[89] En effet un site de régulation de l'expression de l'IL-6 a été mis en évidence en -5307/-5202 à très grande distance du site de transcription. L'analyse de l'expression de l'IL-6 intégrant le variant en -6331 situé à proximité du site de régulation, montre que celle-ci est augmentée en présence de l'allèle T. La construction d'un haplotype -6331, -572, -174 montre que les deux derniers SNPs auraient peu d'impact sur la variation de l'IL-6. L'hypothèse serait que la transcription serait influencée par la présence de l'allèle T en -6331 qui permettrait l'interaction entre la machinerie transcriptionnelle et le site de fixation du facteur transcriptionnel Oct-1 (Figure N°6).[90]

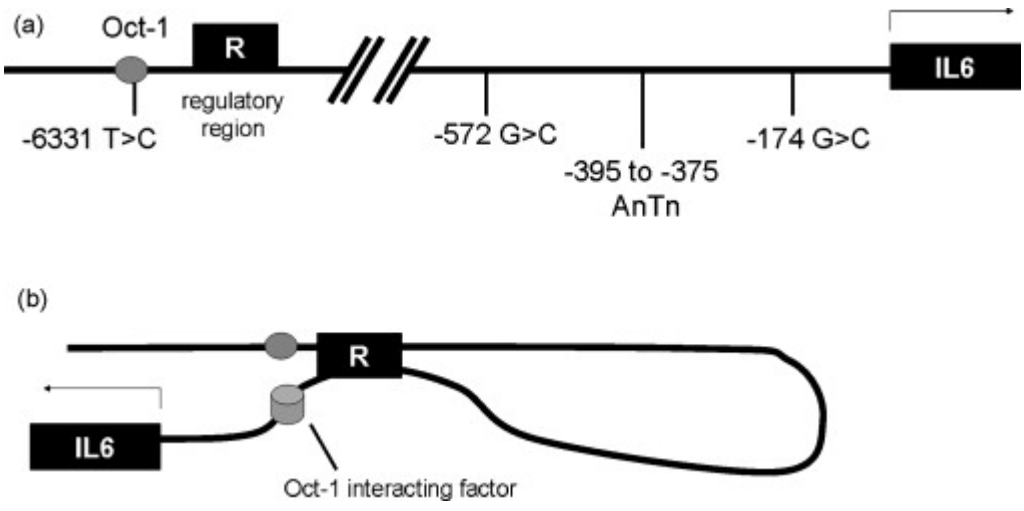


Figure 6: a) SNPs connus au niveau du promoteur de l'*IL6*. b) Interaction possible entre le SNP en -6331 et le site de fixation de facteur de transcription. D'après Smith al.[54]

Ces études montrent que i) les études fonctionnelles *in vitro* dépendent beaucoup de la construction du vecteur, du type de stimulation et ne prennent pas en compte l'environnement chromatinien ii) l'influence génétique des taux d'IL-6 dépend surtout du contexte clinique et semble s'exprimer surtout en cas de situation inflammatoire iii) la détermination précise d'un SNP fonctionnel ne parait pas possible et est trop simpliste. Les études du SNP en -174 sont très hétérogènes et l'étude sur le SNP en -6331 doit être confirmée iv) ces données suggèrent tout de même que dans un contexte de stress inflammatoire, l'engagement de la voie IL-6 peut être différent entre certains groupes de patients en fonction des variants génétiques au niveau des promoteurs proximal et distal. Ainsi les études d'association montrent une fréquence plus élevée de pathologie inflammatoire comme la polyarthrite juvénile, le lupus, le syndrome de Sjogrën en fonction de certains variants au niveau du promoteur de l'*IL6*.[84,91,92]

2.2.3. Interleukine 10

L'interleukine 10 (IL-10) est probablement avec le TNFA la cytokine dont les variants génétiques ont été les plus étudiés. C'est une cytokine cruciale dans la réponse anti-inflammatoire et dans la prévention des pathologies auto-immunes. Elle a été décrite initialement comme une cytokine appartenant à la réponse Th2 mais les données récentes montrent qu'il s'agit d'une cytokine exprimée par les quatre types de réponse T adaptatives, Th1, Th2, Treg et Th17 mais aussi par les lymphocytes T CD8+ et les lymphocytes B.[93] Les cellules de l'immunité innée notamment les macrophages et les cellules dendritiques myéloïdes sécrètent de l'IL-10 mais pas les cellules dendritiques plasmocytoïdes en réponse à la présence d'un agent pathogène par exemple. Les mastocytes, les cellules NK, les eosinophiles et les neutrophiles sécrètent également de l'IL-10. La sécrétion de l'IL-10 dépendra donc du contexte cellulaire, comme de la présence d'autres cytokines qui permet par exemple d'orienter la réponse Th1, Th2 ou Th17. L'IL-10 se fixe sur son récepteur et activera la voie STAT. La régulation de l'expression de l'IL-10 se fait au niveau transcriptionnel avec la fixation de facteurs de transcription au niveau de son promoteur, qui permettent le contrôle de son expression au niveau des différents types cellulaires. Cette régulation implique des modifications de la chromatine qui influence également l'expression de l'IL-10. Une régulation post-transcriptionnelle avec des mécanismes de dégradation de l'ARNm de l'IL-10 a été décrite ainsi qu'une régulation via les micro-ARN avec la mise en évidence du miR-106a qui permet la dégradation du transcrit de l'IL-10.

L'expression de l'IL-10 dont le gène est situé en 1q31-32, peut également être influencée au niveau génétique par la présence de SNPs dont les plus étudiés se situent au niveau du promoteur avec de nombreuses études fonctionnelles du fait de l'influence possible de ces

SNPs sur la fixation et l'activité des facteurs de transcription. Dans le cadre des lymphomes, cette cytokine a surtout été étudiée comme facteur pronostique au diagnostic des patients. Un taux élevé est donc prédictif d'un pronostique défavorable dans les LDGCB et les LF, mais la plupart de ces études sont rétrospectives.[94-97] Dans les LH, l'analyse prospective du taux de sept cytokines montre que le taux d'IL-10 est prédictif du pronostic des patients mais uniquement en analyse univariée.[11] En IHC, l'expression de l'IL-10 est retrouvée de 21% à 36% dans deux études[79,98] avec une expression différente entre les LH EBV+ (66%) et les EBV- (16%).[98] Le tableau N°1 résume les différentes études fonctionnelles réalisées pour analyser l'influence des SNPs sur l'expression de l'IL-10.

Auteurs	Contexte expérimental	Position des SNPs étudiés	Conséquences fonctionnelles en fonction du génotype ou de l'haplotype
Turner[99] 1997	Donneurs sains *In vitro* PBMC	-1082, -819, -592	-1082 non A : 1720 pg/mL IL-10 -1082 A : 1292 pg/mL IL-10 (P = .03)
Crawley[100] 1999	Polyarthrite rhumatoïde *In vitro* Sang total, ELISA, LPS	-1082, -819, -592	ATA : ↓ IL-10
Koss[101] 2000	Pathologie inflammatoire digestive *In vitro* Sang total, ELISA, LPS	-1082, -819, -592	ATA : ↓ IL-10 chez les témoins de l'étude -1082 A : ↓ IL-10 chez les patients de l'étude
Edwards-Smith[102] 1999	Hépatite C *In vitro* PBMC, ELISA, PBS	-1082, -819, -592	Haplotype : Bas : ATA/ATA ; ACC/ATA ; ACC/ACC Intermédiaire : GCC/ACC ; GCC/ATA Haut : GCC/GCC Meilleure réponse à INFγ thérapeutique pour l'haplotype ATA
Eskdale[103] 1998	Donneur sain *In vitro* Sang total, LPS, ELISA	*IL10*.R3 *IL10*.R3/*IL10*.G7 *IL10*.R2/*IL10*.G7	↓ IL-10 ↓ IL-10 ↑ IL-10
Gibson[104] 2001	Donneur sain *In vitro* LPS, analyse de l'ARNm de *IL10*	Distal : -3775, -2763	AA : ↓ IL-10
Hulkkonen[105] 2001	Syndrome de Sjögren IL-10 plasmatique ELISA	-1082, -819, -592	GCC vs. autres : ↑ IL-10 ATA+ vs. ATA- : pas de différence
Rieth[106]	Donneur sain PBMC LPS, ELISA	Distal -7400 INDEL	-7400 del/del : ↑ IL-10
Yilmaz[107] 2005	Donneur sain *In vitro* PBMC, PPD, SAC, LPS	Distal : -3575, -2763 Proximal : -1082, -819, -592	Pas d'influence -1082A : ↓ IL-10 après PPD et SAC mais pas LPS Haplotype ATA/ATA : pas de différence
Miteva[108] 2008	Donneur sain *In vitro* PBMC, LPS, PHA	Proximal : -1082	AA : ↓ IL-10 après LPS et PHA

Tableau 1 : Etudes fonctionnelles des polymorphismes de l'*IL10*

La plupart des études *in vitro* vont dans le même sens avec une diminution de la sécrétion de l'IL-10 pour l'haplotype ATA. Dans l'étude de Hulkkonen et al., l'analyse a porté sur l'IL-10 plasmatique et non sur la sécrétion à partir de cellules isolées et stimulées.[105] On remarque que les patients porteurs de l'haplotype proximal GCC ont de façon significative un taux d'IL-10 augmenté par rapport aux taux des autres haplotypes. Par contre l'haplotype ATA n'influence pas la sécrétion de l'IL-10 plasmatique, ce qui diffère des autres études réalisées *in vitro*. Suarez et al. ont étudié l'ARNm de l'IL-10 chez des donneurs sains et retrouvent une expression augmentée pour l'haplotype GCC/GCC par rapport aux haplotypes ATA/ATA ou ATA/ACC pour les SNPs en -1082, -819 et -592 avec une différence qui dépend surtout du SNP en -1082.[109] L'analyse protéique sérique confirme une représentation plus importante de l'allèle G en -1082 pour les taux élevés d'IL-10. L'analyse a été complétée pour 29 patients par des dosages d'IL-10 après stimulation par LPS de PBMC avec une cohérence avec l'analyse de l'ARNm et de la protéine concernant l'allèle G. L'étude de Edwards-Smith et al. résument dans une situation clinique pathologique (hépatite C chronique) les différents haplotypes qui permettent la production basse, intermédiaire ou élevée d'IL-10.[102] Cette étude a la caractéristique de monter l'influence des SNPs sur la réponse clinique à l'INFγ après ajustement aux caractéristiques clinico-biologiques comme l'âge, le sexe, le génotype et la fibrose hépatique. Les haplotypes GCC et ATA qui respectivement permettent une production élevée et basse d'IL-10, ont une distribution opposée de répondeurs au traitement avec une meilleure réponse en cas de production basse d'IL-10.

L'analyse des SNPs au niveau du promoteur distal (-3575 et -2763) montre que l'haplotype AA diminuerait la sécrétion d'IL-10 dans l'étude de Gibson et al. alors que Yilmaz et al. ne montrent pas d'influence de cet haplotype sur la production d'IL-10.[104,107] L'analyse de variation beaucoup plus distale en 5' en -7400 du promoteur de l'*IL10*, où une délétion de trois nucléotides GCA peut être observée (-7400del), montre que le génotype -7400del/del est corrélé à une production accrue d'IL-10.[106] Cette étude a été réalisée après stimulation de cellules mononuclées par du LPS. Il est intéressant de constater que l'analyse des SNPs -7400/-1082 montre que l'haplotype -7400del/-1082G a une sécrétion augmenté d'IL-10, ce que rejoint les études précédentes par rapport au génotype GG en -1082 qui est corrélé à une augmentation de la production d'IL-10. L'influence des variations nucléotidiques devient complexe lorsque l'on prend en compte les dinucléotides répétés CA au niveau proximal (*IL10*.G) ou distal (*IL10*.R) ou par exemple, dans l'étude de Mörmann et al. la présence de 22, 24 et 26 dinucléotides au niveau proximal est en LD avec l'allèle G en -1082, donc lié à une production accrue d'IL-10.[110] Kube et al. ont approfondi l'influence des SNPs en recherchant la correspondance entre les séquences de facteurs de transcription et la séquence du promoteur

de l'*IL10*.[111] Dans cette étude, la majorité des sites de fixation se retrouve entre -3000 et -4500, avec des facteurs de transcription comme NFkB, Oct1, CREB, AP1 et GM-CSF. Il n'y a cependant pas eu dans cette étude de véritable analyse fonctionnelle. Crawley et al. ont analysé l'expression de l'IL-10 avec un vecteur ne comportant que le promoteur proximal jusqu'à -1137 et ceci après stimulation par l'AMPc. Cette étude montre que l'haplotype ATA engendre une expression significativement plus basse que l'haplotype GCC confortant les études de la production d'IL-10 *in vitro* après stimulation.[100] L'hypothèse serait que les facteurs de transcription en réponse à l'AMPc verraient leur fonction modifiée par la présence des SNPs. Ainsi, CREB/ATF (c-AMP-responsive element binding protein/activating transcription factor) se fixe en réponse à l'AMPc sur le promoteur de l'*IL10* au niveau de sites spécifiques CRE 1 et 4 (cAMP responsive element).[112] Un autre facteur de transcription C/EBP5 (CCAAT/enhancer-binding proteins) se fixant entre le codon d'initiation et TATA box (-43/-30) a un rôle important dans la réponse de l'AMPc et sa mutation spécifique inhibe l'activité du promoteur de l'*IL10*.[113] Cependant, l'analyse des localisations de fixation de ces différents facteurs de transcription montre qu'il n'y a pas de correspondance exacte avec les SNP connus (ex : CRE1 : -1272/-1265 ; CRE4 : -411/-404) même si le site de fixation est très proche ce qui témoigne d'un effet des SNPs surement plus complexe.[112] Larsson et al. ont étudié la fixation de trois facteurs de transcription PU.1, Spi-B, et Sp1 au niveau du promoteur de l'*IL10*.[114] Cette équipe montre que la fixation de PU.1 et Spi-B est possible quelque que soit l'allèle G ou A en -1082 par contre Sp1 ne se fixe qu'en présence de l'allèle G. Cela influence la synthèse de l'ARNm mais aussi la synthèse protéique et ceci apparemment de façon spécifique puisque l'utilisation d'un ARN interférence de Sp1 reproduit les résultats pour l'allèle G. L'ensemble des données générées analysant la relation entre les variations nucléotidiques au niveau du promoteur de l'*IL10* et les domaines de fixation des facteurs de transcription est important mais il parait difficile de véritablement définir un mécanisme précis qui expliquerait les variations de l'IL-10 d'autant que ces données ne prennent pas en compte l'aspect épigénétique de la régulation de la synthèse de l'IL-10.

2.2.4. TNFA

Le TNFA est une cytokine majeure dont le spectre d'action est très large puisqu'elle intervient dans l'inflammation, les réponses immunitaires innée et acquise, le sepsis et le développement des cancers avec des activités paradoxales d'induction de la mort cellulaire ou de prolifération cellulaire.[115] Son rôle dans l'inflammation notamment dans les pathologies auto-immunes a permis l'essor de molécules antagonistes du TNFA notamment dans les pathologies inflammatoires rhumatismales, cutanées et digestives. Le TNFA est une protéine transmembranaire de 26 kDa qui va être clivée par une convertase (TNFA-converting enzyme, TACE) permettant la libération de la forme soluble de 17 kDa. Les formes solubles vont alors former des homotrimères. Les macrophages sont une source importante de TNFA mais cette cytokine est également sécrétée par de nombreux types cellulaires et par les cellules cancéreuses. On retrouve l'implication du TNFA dans toutes les étapes de la cancérogénèse, la transformation, la prolifération, l'angiogénèse et l'invasion. L'activité du TNFA est médiée par les récepteurs du TNF qui appartiennent à une famille de 29 récepteurs ayant une structure commune avec un domaine extra-membranaire riche en cystéine. TNF-R1 est exprimé sur pratiquement tous les types cellulaires alors que TNF-R2 est uniquement exprimé sur les cellules immunes et endothéliales. La fixation du TNFA va permettre la trimérisation du récepteur et le recrutement de TRADD (TNF-R1 associated death domain protein) qui va se fixer au domaine de mort (DD, death domain) au niveau de la partie intra-cytoplasmique. Différentes voies intra-cellulaires pourront alors être activées permettant l'apoptose ou le développement d'une réponse inflammatoire ou de prolifération via les voies JNK, MEKK et NFkB. Les récepteurs du TNFA peuvent être également à l'état soluble, permettant une inhibition du TNFA. Il est mis en évidence dans le micro-environnement tumoral, la présence de TNFA et compte tenu du caractère ubiquitaire de ces récepteurs son action est amplifiée par le recrutement d'autres cellules inflammatoires par des chimiokines et d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-1. Dans le cadre de l'immunité innée, le TNFA joue un rôle majeur dans les cascades biologiques permettant le recrutement et l'activation des polynucléaires, des macrophages et des lymphocytes au niveau du site d'infection après l'engagement des TLR en présence des agents pathogènes. Dans le cadre de l'immunité acquise, le TNF-R1 est un co-activateur des lymphocytes T. Les taux de TNFA sériques sont habituellement plus important au diagnostic de patients porteurs d'hémopathies lymphoïdes que les sujets témoins et peuvent constituer un élément pronostique. Dans le cadre des LH, l'analyse prospective de l'impact pronostique du dosage plasmatique de cytokines comme le TNFA, TNF-R1 et R2, montre un pronostic défavorable pour les patients

ayant un taux élevé de ces cytokines mais cela n'est pas significatif en analyse multivariée.[11] La plupart des lignées cellulaires de LH expriment le TNFA ou la LTA avec une expression de 69% de TNF et 77% de LTA au niveau des cellules de RS.[55-57,80,116,117] L'expression de la LTA semble limitée aux cellules de RS alors que le TNFA est également exprimé au niveau des cellules réactionelles.[80]

Le gène du TNFA est situé au niveau du bras court du chromosome 6 entre 6p21.1 et 6p31.3 et comporte 3.6 kB. Le gène de la LTA est situé dans la même région à 1.2 kB du gène du TNFA. Il s'agit de la région HLA de classe III.

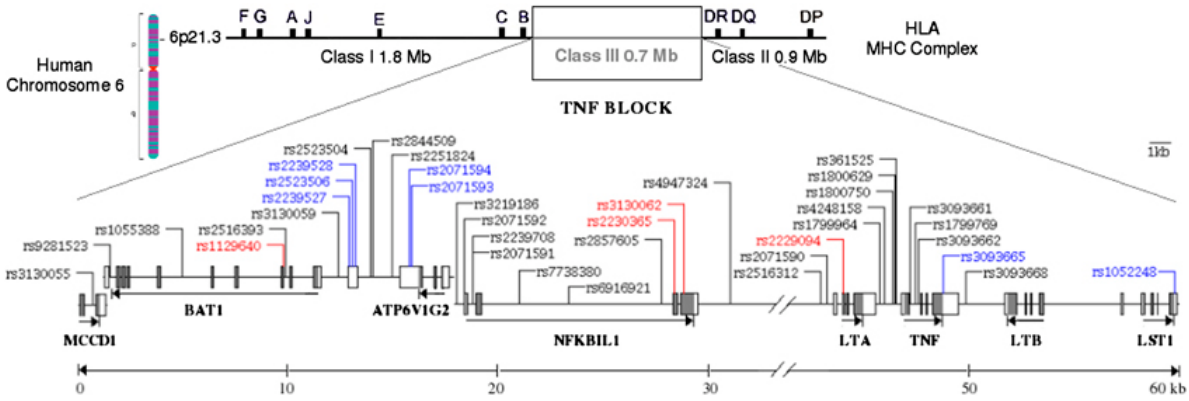


Figure 7 : Localisation génétique des SNPs du *TNFA* au niveau du chromosome 6. D'après Valente et al.[118]

Les situations génétiques du *TNFA* et *LTA* rendent complexe les analyses de susceptibilité des variants de ces deux gènes puisque ces analyses doivent prendre en compte le lien de certaines pathologies notamment auto-immunes avec le système HLA. Ainsi dans une étude récente de susceptibilité à la PR, il a été possible de mettre en évidence un SNP (rs3761847) au niveau du chromosome 9 proche des gènes *TRAF1* et *C5* en ''soustrayant'' l'effet du système HLA, dont l'impact dans la susceptibilité à la PR est connu.[119] Le nombre de SNPs au niveau de cette région est extrêmement important. Il semble cependant qu'il soit possible de retrouver des haplotypes communs au niveau de population d'origine très diverse, européenne, d'Asie ou d'Australie. Dans cette dernière étude comportant 999 personnes, 38 SNPs au niveau de la région du HLA de classe III ont été étudiés et la construction des haplotypes a permis de retrouver quatre haplotypes communs dans ces populations d'origine très diverse.[118] Le SNP le plus étudié est celui en -308G>A au niveau du promoteur du gène du *TNFA* avec des nombreuses études de susceptibilité aux pathologies auto-immunes notamment de réponse au traitement par anti-TNF et des études fonctionnelles pour savoir si ce SNP influence ou non la production de TNFA. Les analyses *in vitro* extrêmement nombreuses réalisées dans des

contextes très différents (sujets sains, patients greffés…) avec des protocoles de stimulation des PBMC variables ne permettent pas de conclusion évidente quant au caractère fonctionnel du SNP -308 avec huit études non significatives,[120-127] deux études en faveur d'une augmentation de la synthèse de TNFA en présence de l'allèle G[128,129] et une étude montrant des résultats inverses en faveur d'un effet avec l'allèle A.[130] L'affinité avec les facteurs de transcription en fonction du variant présent, a également été étudiée notamment au niveau du SNP -863C>A. L'analyse de la fixation des homodimères p50 ou des hétérodimères p65-p50 de la famille de NFkB au niveau de ce site montre que la fixation de p50-p50 en présence de l'allèle A est dix fois inférieur par rapport à p65-p50. Les auteurs montrent les conséquences fonctionnelles avec une réduction de l'expression de TNFA après stimulation par LPS en présence du variant sur lequel se fixe l'homodimère p50-p50.[131] Pour le SNP en -308, Baseggio et al. montrent que des complexes protéiques se fixent de façon différentielle en fonction de l'allèle A ou G, mais que l'analyse spécifique de AP-2 (activating protein 2) et MZF-1 (myeloid zinc finger gene 1) ne montre pas de différence.[132]

Knight et al. ont par une nouvelle technique de quantification de l'ARN polymérase II (haploChIP) qui prend en compte le faite que la machinerie de réplication pourrait se fixer différemment sur l'ADN en fonction de la présence d'un variant au niveau des promoteurs, examiné l'effet des SNPs au niveau de la région du *TNFA* et *LTA*.[133] Cette technique permet une analyse *in vivo* dans un contexte cellulaire précis qui intègre un état ''physiologique'' de la chromatine. Dans cette étude, il n'y a aucune différence de niveau de phosphorylation de la polymérase II en fonction de l'allèle A ou G en *TNFA*-308. Sur la région de 10kB intégrant le *TNFA* et *LTA*, 14 SNPs ont été étudiés et regroupés en trois haplotypes. Le SNP *TNF*-308A s'associe à *LTA*+10A, +252G et 723A. L'analyse par haploChIP montre une différence de phosphorylation de la polymérase II en fonction du SNP en +252G>A qui est donc considéré comme le SNP fonctionnel. Cette technique est confirmée par RT-PCR et va dans le sens des études précédentes montrant que LTA+252G est à l'origine d'une augmentation du taux de LTA.[134,135] Cette étude est importante dans le sens où elle identifie un SNP fonctionnel à distance du gène et que cette expérience se fait dans un contexte cellulaire qui prend en compte l'ensemble de la machinerie de transcription et notamment les modifications épigénétiques. Par contre, cela ne donne pas d'information sur la mécanistique des SNPs mais uniquement une information sur la présence un marqueur qui peut sembler dans cette étude assez robuste. Les limites de la technique peuvent venir du fait que l'on ne peut pas trouver le SNP fonctionnel s'il est très distant du site de transcription. En 2004, dans une revue de Genes and Immnunity sur les SNP du *TNF*, Bayley et al. titraient ''is there a future for *TNF* promoter polymorphisms'' en concluant que le SNP *TNFA*-308A>C n'était pas

fonctionnel.[136] L'analyse de cette région chromosomique s'avère effectivement extrêmement complexe avec des résultats contradictoires. Par exemple, trois études publiées en 2009 et 2010 donnent des résultats opposés concernant le rôle du SNP *TNFA*-308A>C dans la prédiction de la réponse aux anti-TNF dans la PR avec un effet probablement nul lorsque l'on étudie un grand nombre de patients.[137-139] Il est notable de constater qu'actuellement dans la revue des études d'association génétique mise à jour par le NCI et qui ont un niveau statistique suffisant ($p<10^{-8}$) pour ce type d'analyses, ne figure pas les SNPs du *TNFA* proprement dit. On retrouve par contre l'implication de SNPs de la famille du *TNFA* comme *TNFAIP3* et *TNFSF4* en relation avec respectivement la susceptibilité à la PR (odds ratio de 1.2) et la sclérose en plaques (odds ratio de 1.28).[140,141]

2.2.5. Interferon gamma

L'interféron gamma (INFG) joue un rôle majeur dans la défense anti-infectieuse notamment virale. Les patients qui présentent un défaut du récepteur à l'INFG ont une susceptibilité accrue aux infections avec des infections létales dans l'enfance notamment au Bacille de Calmette et Guérin. L'INFG a également un rôle dans l'immunosurveillance des cancers avec la survenue de cancer spontané ou induit en cas de déficit de INFG ou INFGR. L'INFG appartient à la famille des interférons de type II. Le gène de 5.4 kb est situé en 12q24.1 et comprend quatre exons. L'INFG est une cytokine sécrétée par les lymphocytes T, NKT, B et les cellules présentatrices d'antigène, qui se fixe sous la forme de dimères sur les récepteurs INFGR1 et 2 permettant l'activation de la voie JAK-STAT. La fixation d'homodimères de STAT1 sur des séquences spécifiques permet une réponse primaire avec la synthèse de facteurs de transcription de type IRF (Interferon Regulatory Factor) qui à leur tour vont permettre une réponse secondaire en permettant la transcription d'autres facteurs transcriptionnels. D'autres voies de signalisation peuvent également être activées comme la voie des MAPK, Pi3K ou NFkB en coopération avec la voie JAK-STAT. Les études IHC retrouvent une expression de 47% d'INFG pour les LH classiques avec une expression qui peut varier de 1% à 90% au niveau des cellules de RS.[142] L'expression d'INFG semble plus importante pour les sous-types à cellularité mixte que scléro-nodulaire. Au niveau du profil génétique, il est intéressant de noter qu'une signature moléculaire impliquant les gènes induits par l'INFG est retrouvée principalement au niveau des LH EBV+.[143] L'hypothèse émise par les auteurs de cette étude est qu'une réponse Th1 est présente dans ce type de LH lié à l'EBV sans ''efficacité'' anti-virale, ce qui pourrait conduire à des possibilités d'immunothérapie d'autant que le pronostic des LH EBV+ semblent plus péjoratif après 50 ans.[144]

Les SNPs les mieux étudiés au niveau du gène de l'INFG se situent au niveau de l'intron 1 en +874A>T (rs2430561) avec également une séquence répétée CA et un SNP au niveau du promoteur en -179G>T (rs2069709).[145,146] Quatre allèles ont pu être déterminés en fonction du nombre de séquence répétée CA, l'allèle 2 ayant 12 CA étant en LD avec l'allèle T en +874. Concernant les conséquences fonctionnelles de ces deux variants, des études réalisées *in vitro* après par exemple stimulation de PBMC, montrent des résultats très disparates avec cinq études montrant une augmentation de l'INFG en présence de l'allèle T[124,129,145,147] et trois études avec des résultats non significatifs.[148-150] Dans des études réalisées en contexte clinique, il semble que la présence de l'allèle 2 corrélé à une augmentation du taux d'INFG soit associée à un rejet aigu de greffe de rein plus important (54% vs. 44%).[151] Un autre SNP en -764C>G (rs2069707) semble lui associé à une réponse virale après infection par l'hépatite C où une disparition spontanée du virus avec dans cette étude une analyse de la fonctionnalité de ce SNP avec un vecteur de -1058 à +128 montrant que l'allèle G entraîne une activité du promoteur plus importante que l'allèle C.[152] Le SNP influencerait la fixation d'un facteur transcriptionel HSP1 (heat shock protein 1).[152] Pour le SNP situé en -179 G>T l'expression d'INFG est plus importante en présence de l'allèle T après stimulation par TNFA. Sur le plan fonctionnel cela pourrait être lié à la formation d'un site de fixation de facteur de transcription de type récepteur à l'œstrogène (RE) en présence de l'allèle T.[153] Les analyses fonctionnelles en présence de REα confirment ces données. Enfin, les analyses fonctionnelles du SNP en +874A>T au niveau de l'intron 1 montrent une fixation différente de NFkB en fonction de l'allèle et plus importante pour l'allèle A.[146] Compte tenu de l'importance de l'INFG dans la réponse immunitaire notamment Th1, l'analyse de variants génétiques qui pourraient influencer cette réponse parait importante. Les données biologiques décrites sur quelques SNPs ne permettent pas de dégager des données robustes qui permettent de façon évidente de définir un SNP précis qui influence la sécrétion de la cytokine. Il semble cependant que l'influence génétique soit importante dans les pathologies associées à des pathogènes comme celle mentionnée précédemment, suspectant un lien entre réponse virale à HCV et SNP de l'*INFG*. Les variants de INFG ont logiquement été étudiés dans les cancers du col liés à HPV ou des pathologies infectieuses comme les rickettsies ou les pathologies parasitaires.[154-157] Dans le cadre des pathologies auto-immunes, une étude d'association montre une susceptibilité accrue au lupus en fonction d'un SNP au niveau du promoteur de l'*INFG* (rs2069705).[158] Le SNP en +874 (rs2430561) où se fixe NFkB avec une plus importante affinité pour l'allèle A, est également significatif. L'expression d'INFG par les lymphocytes CD4+ serait plus importante chez les patients porteurs de lupus, le lien formel entre ces données et le terrain génétique des patients restant à démontrer. Compte tenu des données sur

les variations génétiques de l'*INFG* dans les pathologies associées au virus et les données suggérant un profil moléculaire particulier des LH EBV+ avec une signature ''interferon pathway'', l'impact des variants génétiques d'INFG et leurs conséquences physiopathologiques dans ces LH EBV+ nécessitent d'être approfondis.

2.2.6. Interleukine 12

L'IL-12 a un rôle majeur dans l'activation de l'immunité innée (cellules NK et NKT) et adaptative (lymphocytes T CD4+ et CD8+) en permettant l'activation, la survie des effecteurs du système immunitaire et l'activation de leur propriété cytotoxique notamment la sécrétion d'INFG.[159] L'IL-12 permettrait ainsi de faire le lien entre l'immunité innée et adaptative en étant sécrétée par les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques activées par la présence de pathogènes et engagement des TLR.[160] L'IL-12 agit sur son récepteur (IL-12R) et oriente la réponse Th1. L'IL-12 permet également l'activation des macrophages et leur production de nitrites.[161] Le système IL-12/IL-12R parait extrêmement important pour le contrôle tumoral avec des échappements tumoraux en cas de perte d'expression de IL-12RB2 notamment par des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN).[162] L'IL-12 a également un rôle dans le contrôle du micro-environnement tumoral en inhibant l'angiogénèse et le remodelage de la matrice extra-cellulaire lors des phénomènes d'invasion.[159] L'IL-12 permettrait également via la sécrétion d'INFG l'inhibition des LTreg. L'IL-12 est une cytokine composée de deux sous-unités p35 et p40 et seul le dimère appelé p70 est biologiquement actif. Elle appartient à une famille de cytokine avec l'IL-23, IL-27 et IL-35. IL-12 et IL-23 ont en commun la sous-unité p40 et IL-12 et IL-35 la sous-unité p35. Alors que l'IL-12 permet l'activation de la réponse Th1 et la sécrétion d'INFG, L'IL-23 oriente la réponse immunitaire Th17 avec la sécrétion d'IL-17 de TNFA et d'IL-22. l'IL-27 bloque la réponse Th17 et favorise la réponse inflammatoire avec l'induction de la sécrétion d'INFG.[163]
Dans le cadre des LH, l'expression de l'IL-12 est retrouvée en IHC essentiellement par les cellules réactionnelles dans 28 cas sur 34 (82%) mais pas par les cellules de RS avec une expression prédominante pour les LH EBV+ (22 cas sur 22 +, contre 5 cas sur 10 pour les LH EBV-).[164] De façon intéressante dans cette étude, il ne semble pas que l'on retrouve d'expression d'IL-12 dans les LDGCB. L'analyse des taux sériques d'IL-12 dans les LH est contradictoire. Dans une première étude de Bien et al., ils sont significativement plus élevés chez les patients porteurs de LH par rapport aux témoins avant traitement.[165] Par contre dans l'étude de Cozen et al., les patients et leur jumeaux (non atteints par le LH) ont un taux respectivement de 60.6% et 49% plus bas que les témoins en sachant que la date du prélèvement pour les patients n'est pas bien précisée dans cette étude.[166] Des taux élevés d'IL-

12 au diagnostic sont associés à un meilleur pronostic dans les tumeurs solides. Bien et al. confirment ces données dans les tumeurs pédiatriques comme les LAL, les sarcomes et les LH, mais il n'y a pas eu d'analyses spécifiques aux LH. Dans cette étude, l'IL-12 et l'IL-10 ont un profil inverse avec la possibilité de prédire le pronostic des patients par le ratio IL-10/IL-12 ce qui va dans le sens des études biologiques montrant un contrôle de l'expression de l'IL-12 par l'IL-10.[165] Compte tenu de propriété immunologique de l'IL-12 et ces données biologiques, des études thérapeutiques d'IL-12 IV ou SC ont été réalisées dans les LH en rechute ou réfractaire au CT, avec cependant des premiers résultats très décevants.[167]

Le gène de l'unité p35 est situé sur le chromosome 3 en q12-13.2 et celui de la sous-unité p40 au niveau 5q31-33. Les variations génétiques et leurs liens avec la production d'IL-12 ont surtout été étudiées pour la sous-unité p40 qui permet l'activité biologique de la protéine finale. Le gène de l'IL-12 comprend huit exons. Le séquençage du gène de l'IL-12B a mis en évidence de nombreux polymorphismes au niveau des régions introniques, du promoteur ou des séquences régulatrices notamment en 3'.[168] C'est un SNP au niveau 3'UTR (rs3212227) qui a été le plus étudié par rapport à son influence sur la sécrétion de la cytokine avec des résultats contradictoires. Morahan et al. ont ainsi montré qu'il existait un déséquilibre de fréquence allélique pour ce SNP entre les patients porteurs de diabète de type I et les témoins.[169] L'analyse de l'effet *in vitro* de ce SNP montre dans des lignées EBV+, une expression accrue de l'ARNm de IL-12B pour le génotype AA. Ces auteurs concluent à la fonctionnalité de ce SNP qui par l'augmentation du taux d'IL-12 augmenterait l'activité Th1 et la destruction des îlots B du pancréas. Une étude plus récente d'un consortium a réévalué la question sur plus de 11.000 individus et ne retrouve pas d'effet global de ce SNP avec cependant un effet protecteur de l'allèle mineur sur l'âge de survenue du diabète et cela uniquement chez les femmes.[170] Cela introduit le concept que de tels variants peuvent influencer la sévérité d'une pathologie avec un effet temps associé à d'autres facteurs prédisposants et non en ayant un effet simplement ''on/off''. Une seconde étude montre chez des donneurs sains, qu'après stimulation des PBMC par C3bgp, la production d'IL-12p40 est augmentée en présence du génotype AA ce qui va dans le sens de l'étude de Morahan et al.[108] Dans cette étude, le lien entre la production d'IL-12 et d'IL-10 a été étudié sous l'angle de l'effet des SNPs au niveau du promoteur de l'*IL10* et du SNP au niveau 3'UTR. La production de l'IL-12 ne semble pas influencée par l'IL-10 mais la production d'IL-10 chez les porteurs de l'allèle G en –1082 est influencée par le SNP de l'IL-12 qui est à l'origine d'une production accrue d'IL-12 (AA). Cette étude montre que l'effet sur la sécrétion d'une cytokine d'un SNP, doit intégrer d'autre ''effet'' génétique suggérant que les variations génétiques ne peuvent s'analyser que dans un système plus global que SNP par SNP. La

même équipe, dans le même contexte expérimental (PBMC stimulés) montre une augmentation proportionnelle de l'IL-12 entre les génotypes AA, avec le génotype CC par rapport au génotype AA/AC.[107,171]

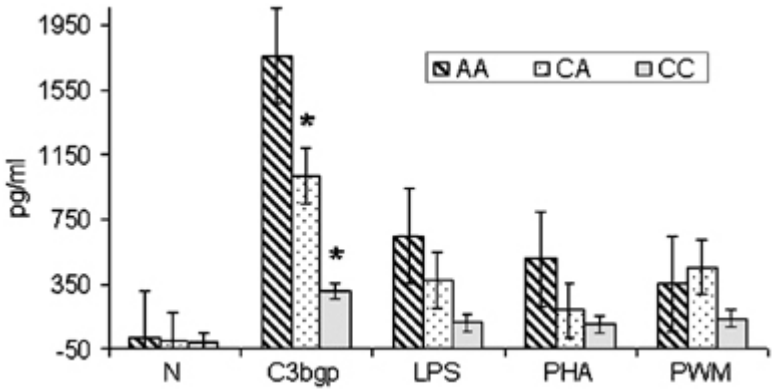


Figure 8 : Production d'IL-12 (PBMC stimulés) en fonction du génotype *IL12*+1188A>C. On remarque la sécrétion intermédiaire pour le hétérozygote, augmenté pour le génotype AA et basse pour CC. D'après Stanilova et al.[172]

L'implication des SNPs du gène de l'IL-12p40 dans la susceptibilité aux pathologies dont la régulation de la réponse immune est altérée comme le psoriasis, semble assez importante puisqu'une étude récente pangénome (438.670 SNPs) retrouve le SNP rs2082412 comme significatif comme HLA-C, des SNPs au sein des gènes TNIP1 et IL-23A et IL-23R.[19] Enfin, deux études récentes montrent une susceptibilité au cancer du col en fonction du SNP de l'*IL12*, rs3212227.[173,174] Dans l'étude de Chen et al., il est intéressant de voir que c'est la combinaison de SNP de *IL12*A et B (rs568408 GA/AA, rs3212227 AC/CC) qui évalue le mieux le risque, les deux sous-unités A (p35) et B (p40) étant nécessaire à l'activité biologique de l'IL-12.[173] Dans ces études, il n'y a cependant pas eu de corrélation avec des dosages de l'IL-12 permettant un lien entre génotype et phénotype, ni d'analyse en fonction de la présence d'HPV. La nécessaire intégration des SNPs des deux sous-unités, explique peut être les différences retrouvées dans les études *in vitro* analysant le lien entre le génotype d'un SNP et la sécrétion de la protéine p70.

2.2.7. Chimiokine CCL-17

Les chimiokines sont des facteurs chimiotactiques de petite taille, de 70 à 100 acides aminés. Le nombre et l'espace des deux premiers résidus cystéines permettent de regrouper les chimiokines en quatre familles CXC, CC, CX3C et XC. Les récepteurs aux chimiokines comportent 7 hélices transmembranaires et sont couplés aux protéines G. Les fonctions des chimiokines et leurs récepteurs sont complexes puisqu'il existe une redondance fonctionnelle

importante avec, pour une chimiokine, l'expression du récepteur par de nombreux types cellulaires, la constitution d'homo ou hétérodimères et la présence de multiples voies de transduction du signal. La protéolyse des chimiokines peut également générer d'autres formes actives. La fonction première est d'assurer le chimiotactisme, avec comme propriété, des interactions de faible affinité notamment aux structures glycosylées des endothéliums.

Dans le cadre du LH, les chimiokines et leurs récepteurs les plus étudiés sont CCL17 (TARC), CCL5 (RANTES), CCL20, CCL22 (MDC) et CCL28. Par exemple CCL5, CCL17, CCL20 et CCL22 permettent le recrutement de cellules Th2 et de LTreg au niveau du microenvironnement tumoral. Les éosinophiles sont attirés par CCL5, CCL28 et CCL11 (Eotaxin 1). On peut retrouver une expression plus importante de certaines chimiokines dans les LH EBV+, comme CCL3 (MIP1alpha), CCL5, CCL20, CCL22 et CXCL10 (IP10) et Mig (monokine induce by INFg). [175-178] Niens et al. ont analysé huit chimiokines chez 163 patients porteurs de LH comparés à 334 témoins (CCL2, CCL3, CCL5, CCL11, CXCL9, CXCL10, CCL17, CCL22).[179] Les taux de CCL17 et CCL22 sont significativement plus élevés chez les patients par rapport aux témoins et de façon intéressante plus basse pour les formes EBV- par rapport aux EBV+ alors que le taux de CXCL10 est plus élevé dans les formes exprimant l'EBV. Les taux de CCL17 et CCL22 sont plus élevés dans les stades II, III, IV par rapport au stade I. Les taux des autres chimiokines ne sont pas différents entre les patients et les témoins. Au niveau IHC, c'est les cellules de RS qui expriment dans 77% et 75% respectivement CCL17 et CCL22. Après traitement, il est noté dans cette étude, une baisse des deux chimiokines. Ce dernier point a également été décrit par Weihrauch et al. qui retrouvent également une valeur pronostique en terme de survie globale pour les patients qui gardent un taux de CCL17 élevé en fin de traitement.[180]

La complexité des chimiokines et de ces récepteurs provient également de la présence de SNP au niveau de leurs gènes. Dans un contexte de séropositivité VIH, les variants de *CCR5* semblent protecteurs contre la survenue de lymphome alors que des variants de *CXCL12* en augmenteraient le risque.[181,182] Les résultats pour *CCR5*Δ32 ont été confirmés dans une étude de susceptibilité aux LNH comparant 486 cas à 757 témoins (VIH-), uniquement pour les hommes avec un risque similaire pour les LF et LDGCB.[183] La présence d'un SNP de *CCL5* en position -403G>A réduirait le risque de LF et de leucémie lymphoïde chronique (LLC). Sur le plan fonctionnel, les auteurs suggèrent que, compte tenu de la diminution d'expression du CCR5 (rétention au niveau du réticulum endoplasmique), le ligand se fixerait préférentiellement sur CCR3 favorisant une réponse Th2. De façon similaire, l'allèle A en *CCL5*-403 favoriserait l'hyperexpression de CCL5. Ce SNP a déjà été montré comme favorisant l'émergence de pathologie Th2 comme la dermatite atopique.[184,185] L'effet

différentiel observé dans cette étude entre les hommes et les femmes pourrait être expliqué par un profil différent des chimiokines influencé par les hormones (oestrogène, testosterone).[186] Une étude ayant analysée l'impact des SNPs au niveau de *CCL17* et *CCL22* dans les LH n'a pas retrouvé de différence de distribution allélique entre les patients et les témoins (Figure N°9).[179]

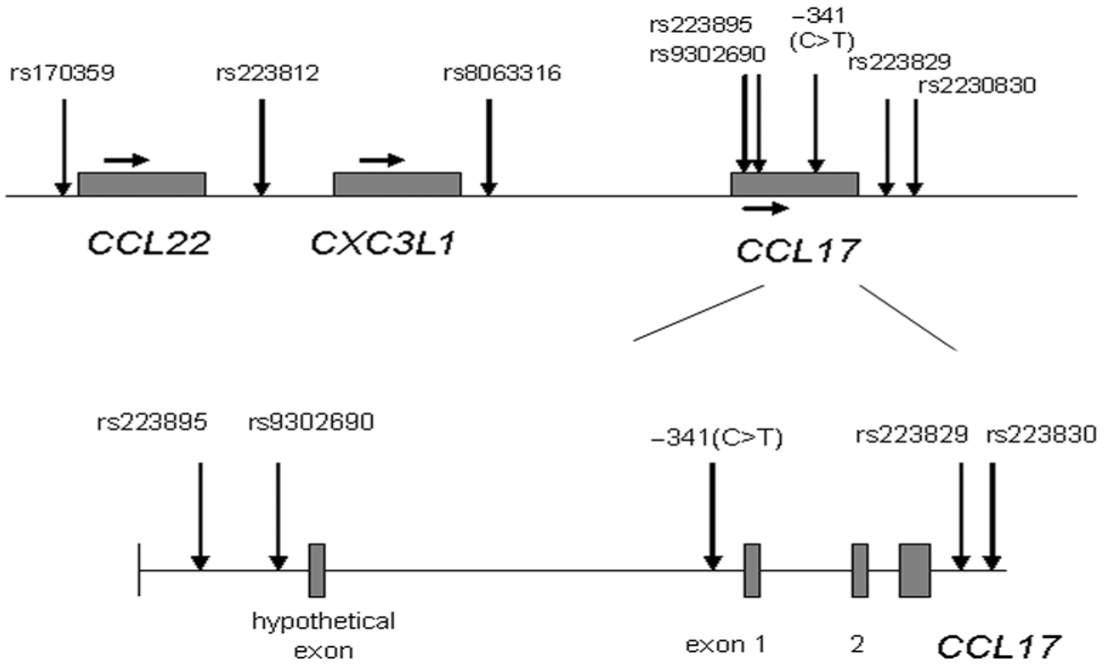


Figure 9 : Situation des SNPs de CCL22 et CCL17. D'après Niens et al.[187]

3. Etudes de susceptibilité aux lymphomes hodgkiniens et polymorphismes au niveau des gènes des effecteurs du système immunitaire

Seulement six études ont spécifiquement analysé le rapport entre les SNPs au niveau de gènes d'effecteurs du système immunitaire et la susceptibilité au LH. Une étude de susceptibilité beaucoup plus importante que les six précédentes va prochainement être publiée dans Nature Genetics.[188] Les gènes étudiés sont ceux de l'*IL6*, *IL10*, *IL12*, *INFG*, *CCL17*, *CCL22*, *TLR9* et *MYD88*.[166,179,189-192] Pour l'*IL6*, deux études ont étudié le SNP au niveau du promoteur en –174G>C. L'étude de Cozen et al. montre que le risque de présenter un LH diminue proportionnellement en fonction du nombre d'allèle C au niveau du SNP de *IL6* en –174.[190] Le génotype CC est ainsi associé à une diminution de 71% du risque de présenter la maladie, les hétérozygotes ayant un risque intermédiaire par rapport au génotype GG. L'analyse à porter cependant sur un nombre faible de patients (N=88) et de témoins (N=87). Par rapport au sous-groupe histologique, cet effet semble surtout vrai pour les LH scléro-nodulaires. L'intérêt de cette étude est qu'une analyse des taux d'IL-6 a pu être corrélée aux génotypes et ceci chez les patients, leurs jumeaux sains et chez les témoins. Les taux d'IL-6 sont significativement plus bas pour le génotype CC et il est mis en évidence que les vrais jumeaux non porteurs du LH ont un taux plus élevé l'IL-6 que les témoins. Ceci va dans le sens d'un déterminant génétique du taux d'IL-6 et que le génotype CC associé à un taux plus faible d'IL-6 serait protecteur du LH. Cela va dans le sens d'une étude *in vitro*[84] mais pas dans celui d'études cliniques hors contexte de lymphome ou le génotype CC était plutôt associé à une augmentation d'IL-6,[87,88] cela dépendant probablement également d'autres SNPs sur le gène de l'*IL6*[90] ou du tissu étudié. Cardano et al. ont analysé le même SNP parmi 408 patients et 349 témoins et ne montre pas de différence de répartition des génotypes en sachant que la population témoin de cette étude à une fréquence allélique proche de celle de Cozen et al.[189] Aucune différence n'est également retrouvée en fonction de l'expression de l'EBV par contre une différence de répartition des génotypes est retrouvée pour les lymphomes de Poppema avec des chiffres cependant très petits.

Une analyse chez 114 patients porteurs de LH et 84 témoins ne retrouve pas d'influence des SNP en –592 et –1082 au niveau du promoteur de l'*IL10* ni du polymorphisme au niveau de l'intron 1 (séquence répétée de CA) de l'INFG.[192] Aucune corrélation n'est également retrouvée entre le génotype et les taux d'IL-10 et d'INFG analysés dans cette étude, chez 26 patients. Cozen et al. ont analysé à partir d'un registre de patients porteurs de LH et leur jumeaux, les dosages de trois cytokines, l'IL-2, IL-12 et l'INFG dans ces deux cohortes.[166] Cette étude montre que les patients et leur vrai jumeau non malade ont respectivement un taux

d'IL-12 60.6% et 49% plus faible que les témoins, ce qui est en faveur d'un contrôle génétique de cette cytokine. L'analyse du SNP *IL12*+1188A>C en 3'UTR montre une différence de distribution des génotypes à la fois chez les patients et les jumeaux par rapport aux témoins avec un risque accru pour les génotypes AC/CC. La corrélation entre les génotypes et les dosages de l'IL-12 n'a cependant pas pu être réalisée, mais certaines études biologiques entièrement décrites seraient en faveur d'une sécrétion accrue d'IL-12 pour le génotype AA.[108,169,172] Cozen et al. font l'hypothèse que la diminution de synthèse de l'IL-12 ''d'origine génétique''serait favorable à l'émergence de LH. Cette sécrétion inappropriée d'IL-12 pourrait être également environnementale. En effet, une faible exposition aux pathogènes oro-fécaux dans l'enfance ne permettrait pas la mise en place d'une voie de l'IL-12 efficace. Les auteurs proposent cette hypothèse dans une seconde étude montrant par une série de questionnaires sur les habitudes de vie, que les risques d'infection par des germes oro-fécaux sont diminués chez les patients porteurs de LH (sucer son pouce, objet à la bouche, se ronger les ongles, contact avec les animaux…).[193] Un contrôle indirect de la variable génétique est proposé dans cette étude puisque les différences sont mises en évidence au sein de la fratrie avec les mêmes questionnaires pour les jumeaux non malades. A noter que l'on retrouve également dans cette étude, comme facteur de risque les antécédents d'appendicectomie, le tabagisme et les antécédents d'eczéma dans l'enfance. Les auteurs font l'hypothèse que ces deux dernières ''étiologies'' sont associées à un profil cytokinique Th2 et que l'appendicectomie serait le ''reflet'' d'une réponse immunitaire inadaptée. (Figure N°10).

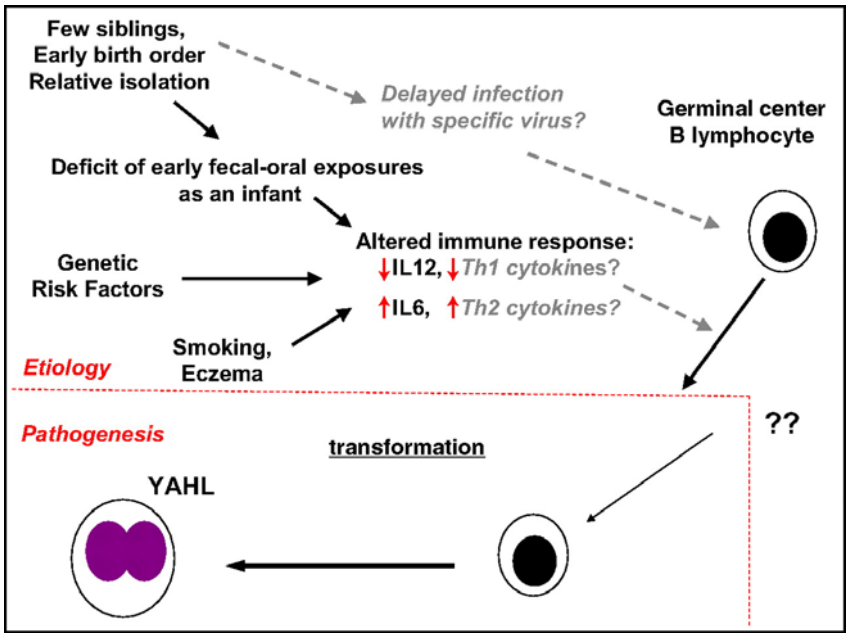


Figure 10 : Hypothèses étiologiques immunologiques et environnementales dans les LH proposées par Cozen et al.[193]

Dans le sens d'une relation entre pathogènes environnementaux et réponse immunologique inadaptée favorable à l'émergence d'un LH, deux études montreraient une susceptibilité accrue au LH en fonction de SNPs au niveau de gènes codant pour TLR9 et TLR4.[187,191] Dans la première étude, l'allèle –1237T et 2848A du gène *TLR9* sont associés à une augmentation du risque de LH.[191] L'analyse des variants de *MyD88* ne montre pas de modification du risque. Les limites de cette étude sont la taille des effectifs (90 patients et 92 contrôles) et le fait que l'ADN des patients est extrait de tissus pathologiques comparé à de l'ADN issu de prélèvements sanguins pour les témoins. Dans la seconde étude incluant aussi les LNH, Nieters et al. montre une augmentation du risque de LH associé à un variant de *TLR4* Asp299Gly A>G (9% versus 5.3%).[187] Une dernière étude ne retrouve pas de risque de développement de LH associé à un génotype particulier de huit SNPs au niveau du gène des chimiokines *CCL17* et *CCL22* (-341C>T, rs8063316, rs223895, rs223829, rs223830, rs170359, rs223812, rs9302690).[179] L'analyse de susceptibilité aux LH en cours de publication a utilisé une puce pan-génome de 660K comparant dans un premier temps 589 patients porteurs de LH à 5199 contrôles.[188] Les régions génétiques d'intérêt sont la région HLA de classe II (chromosome 6) ainsi que 10 SNPs sur les chromosomes 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11 et 19. Ces données générées ont été analysées sur une série de validation de 524 patients et 1533 contrôles permettant de confirmer l'implication de 6 SNPs ($p<10^{-4}$). Trois séries indépendantes de validation puis une analyse sur l'ensemble de la cohorte permettent de retrouver 6 SNPs au niveau des chromosome 2 (2p16.1), 6 (6p21.32), 8 (8q24.21 ; 2 SNPs) et 10 (10p14 ; 2 SNPs) impliquant respectivement les gènes *REL*, *HLA-DRA*, *PVT1*, *GATA3*. Les SNPs en 6q21, 2p16.1 et un des SNPs en 8q24.21 semblent surtout avoir un effet dans les LH EBV-. Sur le plan physiopathologique, ces SNPs sont situés sur des gènes important impliqués dans les lymphomes : *REL* et la voie NFkB, la région HLA, *c-myc* au niveau du chromosome 8 et *GATA3*, facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse. Ces données devront bien sur être confirmées sur des séries indépendantes.

4. Etudes cliniques évaluant le rôle pronostique des SNPs des gènes de cytokines dans les lymphomes hodgkiniens

En 2007, Holaus et al. ont analysé le rôle pronostique chez 180 patients porteurs de LH de cinq SNPs au niveau du promoteur de l'*IL10* (-3575, -2849, -2763, -1082, -592), deux SNPs au niveau du promoteur du *TNFA* (-863, -308) et un SNPs au niveau du promoteur de l'*IL6* (-174). Les résultats de cette étude sont en faveur d'un rôle défavorable sur la survie sans rechute pour le génotype GG de l'*IL6* en position -174 et le génotype AA de l'*IL10* en position -592. Un haplotype des SNPs de l'*IL10* est également délétère (-3575T, -2849G, -2763C, -1082A, -592A) mais dans l'analyse multivariée, le SNP en -592 semble le plus important. La valeur pronostique des deux SNPs de l'*IL6* et *IL10* est dans cette étude indépendante du stade de Ann Arbor. A noter que pour 46 patients, l'ADN utilisé est issu de prélèvements tumoraux. En 2009, à partir des même patients, cette équipe a étudié la corrélation entre les dosages plasmatiques d'IL-10 et le génotype de l'*IL10*, montrant que les variants -592AA et -1082GG sont à l'origine d'une sécrétion accrue d'IL-10. Cardano et al. ne retrouvent pas de valeur pronostique du SNP de l'*IL6* en position -174 sur la survie spécifique et la survie globale dans une cohorte de 408 patients. Dans une dernière étude ayant analysé l'impact pronostique des SNPs de l'*IL10* dans les lymphomes comportant 472 patients, l'analyse d'un sous-groupe de LH de 61 patients, ne montre pas de différence de survie en fonction du génotype en -3575.[194]

5. Etudes de susceptibilité aux lymphomes non hodgkiniens et polymorphismes au niveau des gènes des effecteurs du système immunitaire

5.1. Etude de susceptibilité des LNH analysant de 12 à 9412 SNPs

La plus importante étude concernant les SNPs localisés au niveau des gènes des effecteurs immuns a été publiée en 2006. L'étude a analysé 3586 patients porteurs de lymphomes et 4018 témoins provenant de 8 groupes qui ont participé au consortium international Interlymph. Un ajustement était fait sur l'âge, le sexe et le centre de l'étude et deux sous-types de lymphomes ont pu être individualisés, les LF (19% des lymphomes) et les LDGCB (27% des lymphomes). Douze SNPs ont pu être étudiés parmi 9 gènes de cytokines (*TNFA*, *LTA*, *IL10*, *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL2*, *IL6*, *CARD15*). Cette étude montre que la présence au niveau du promoteur du *TNFA* d'un SNP -308G>A, est associée à une augmentation du risque de lymphome. L'analyse montre que le risque est beaucoup plus marqué pour les LDGCB mais pas pour les LF ou pour les autres types de lymphomes non classés sur le plan histologique.[195] Les auteurs montrent que ces résultats restent vrais lorsque chaque étude est enlevée de l'analyse l'une après l'autre et lorsque les deux études pour lesquelles l'équilibre de HW n'est pas respecté sont également soustrait de l'analyse. A noter que toutes les études prises individuellement vont dans le même sens. L'analyse de l'haplotype AG entre le *TNFA*-308G>A et *LTA*+252A>G montre que la présence de l'haplotype AG augmente le risque de LDGCB. Cet haplotype correspond dans cette étude à 16% des patients. Cette étude montre également l'impact de SNP au niveau du promoteur de l'*IL10* en -3575 et -1082 sur le risque de survenue de LDGCB. Il existe un LD entre ces deux SNPs et l'haplotype AG augmentent le risque de LDGCB. Le fait que l'haplotype TG ne montre pas de risque accru serait en faveur d'un rôle plus important du SNP en -3575. A noter qu'il n'y a pas de LD entre le *TNFA* et l'*IL10* et que le risque s'accumule avec un risque qui double en cas de génotype *TNFA*-308AA et *IL10*-3575 TA ou AA. Ce sous-groupe représente 3% des patients porteurs d'un LDGCB. Une étude de confirmation a été publiée en 2009 en regroupant 14 études permettant un nombre de patients et de témoins très important (7999 témoins et 8452 patients).[196] Cette étude confirme l'augmentation du risque de LDGCB en présence des SNPs du *TNFA*-308G>A et *LTA*+252A>G et de l'haplotype AG ainsi que du SNP *IL10*-3575A. Le *TNFA*-308A augmente aussi le risque de lymphome de la zone marginale et de mycosis fongoïde et confirme l'absence d'implication de ces SNPs par rapport au risque de LF.

Cerhan et al. vont dans une étude publiée en 2008 dédiée aux SNPs de la voie NFkB postérieure à l'étude InterLymph, confirmer l'implication de l'haplotype AG (*TNF/LTA*) par

rapport au risque de survenue de lymphome dans une série de 441 patients et 475 témoins, pour les LDGCB mais pas les LF.[197] L'analyse retrouve également un lien avec les lymphomes lymphocytiques/LLC non évalué dans la série InterLymph.

Lan et al. ont étudié parmi 518 patientes porteurs d'un lymphome et 597 témoins, la susceptibilité aux lymphomes en fonction de la présence d'allèle de 39 SNPs présent au niveau de 20 gènes de l'immunité regroupé dans cette étude en Th1 et Th2.[198] A noté que la majorité des patientes et des témoins font partie de la cohorte InterLymph. Les lymphomes étudiés sont les lymphomes B, T, les LDGCB et LF. Le risque de LNH B dépend de SNPs au niveau du promoteur de l'*IL10* (-1082, -3575) et de l'*IL5* et pour les LNH T de SNPs au niveau des gènes de l'*IL4*, *IL4R* et *IL6*. Il est possible de construire un haplotype avec 4 SNPs du promoteur de l'*IL10* (-3575, -1082, -819, -592) et les haplotypes A-G-C-C et T-A-T-A représentant 8.8% et 23.5% des patientes sont associés à un risque accru de lymphome aussi bien les LDGCB que LF. Comme dans l'étude InterLymph, il semble que le risque soit surtout lié au génotype en -3575 puisque l'haplotype T-G-C-C n'augmente pas le risque de lymphome. Les résultats pour l'haplotype T-A-T-A sont plus surprenant mais cet haplotype est peut être lié à d'autres variations génétiques qui augmente le risque de lymphome. A noter que dans cette étude, l'augmentation du risque de LNH en rapport avec le SNP en -308 du *TNFA* n'est pas retrouvée.

Dans une étude australienne portant sur des patients (N=545) et des témoins (N=498) d'origine européenne, 36 SNPs au sein de 23 gènes de l'immunité ont également été étudiés.[199] A noté que 11 SNPs dont ceux de l'*IL10* et du *TNFA* ont été inclus dans l'étude InterLymph. Cette étude va dans le même sens que la métaanalyse InterLymph par rapport au SNP de l'*IL10* et le risque de développement de LDGCB avec un poids prédominant du SNP en -3575A par rapport à -1082G. L'analyse de l'haplotype *TNFA*-308/*LTA*+252 ne retrouve pas les résultats de la cohorte InterLymph avec par contre l'implication du SNP *TNFA*-863A et *LTA*-91C par rapport au risque de LDGCB. En effet, l'augmentation du risque de survenue de LDGCB est en lien avec présence de l'haplotype *LTA*-91C, *LTA*252A, *TNFA*-863A, *TNFA*-857C, *TNFA*-308G, *TNFA*-238G. Il est également retrouvé une réduction du risque de LNH et de LF en présence de l'allèle *TNFA*-857T. A la limite de la significativité, est également mise en évidence dans cette étude, l'implication des SNPs au niveau des gènes de *INFGR2*, *FCGR2A* et *IL4* par rapport au risque de survenue LDGCB et un SNP de *TGFB1* pour les LF.

Une troisième étude ‘‘globale’’ de variation génétique au sein des gènes de l’immunité a été proposée par Wang et al. comparant 1172 patients et 982 témoins.[200] L’haplotype *LTA*-91C, *LTA*+252G, *TNFA*-857C, *TNFA*-308A, *TNFA*-238G confère un risque augmenté de survenue de lymphome (lymphome T, LDGCB, lymphome de la zone marginale). Ces résultats sont cohérents avec l’étude InterLymph par rapport aux haplotypes *LTA*+252G et *TNFA*-308A. Pour les autres cytokines étudiées, un SNP au niveau du gène de *IL4R* (C-29429T) augmente le risque de LDGCB. Ce SNP est différent de l’étude de Lan et al. Le risque de lymphome de la zone marginale et lymphocytique est augmenté respectivement en présence d’un SNP de *JAK3*, *IL12B* et *IL13* (2 SNPs). Le risque de survenue de lymphome, LDGCB et de LF, est diminué respectivement en présence d’un SNP de *IL8RB* et de *IL15RA*. Comme dans l’étude de Purdue et al., un SNP au niveau du gène du *RFCG2A* (rs1801274) a été étudié. Le risque est augmenté pour les LNH B, T, les LF mais pas les LDGCB comme ce que l’étude de Purdue et al. retrouve avec cependant une différence de génotypes à risque entre les 2 études, (AG/AA dans l’étude de Wang et al. GG dans l’étude de Purdue et al.)

La quatrième étude proposée par Cerhan et al. utilise une puce Affymetrix permettant d’étudier 9412 SNPs de gènes de l’immunité et a donc comparé 458 patients à 484 témoins.[201] La méthode statistique est proche de celle des études d’expression génétique de micro-arrays avec au final la sélection de 6 SNPs sur les gènes *ITGB3*, *TLR6*, *SELPLG*, *UNC84B*, *B3GNT3*, *BAT2*. A noter que les SNPs des gènes du *TNFA* et de *LTA* n’ont pas été inclus dans cette analyse. A noter un ‘‘poids’’ statistique important de *TLR6* avec des odds ratios (OR) de 8.7 pour la LLC/lymphome lymphocytique, 4.5 pour les LF et 4.3 pour les LDGCB. La significativité est également importante (OR de 2 à 3 pour les trois types de lymphomes) pour un autre SNP (rs7300972) au sein du gène du ligand de la sélectine P qui est impliquée dans la migration des leucocytes.

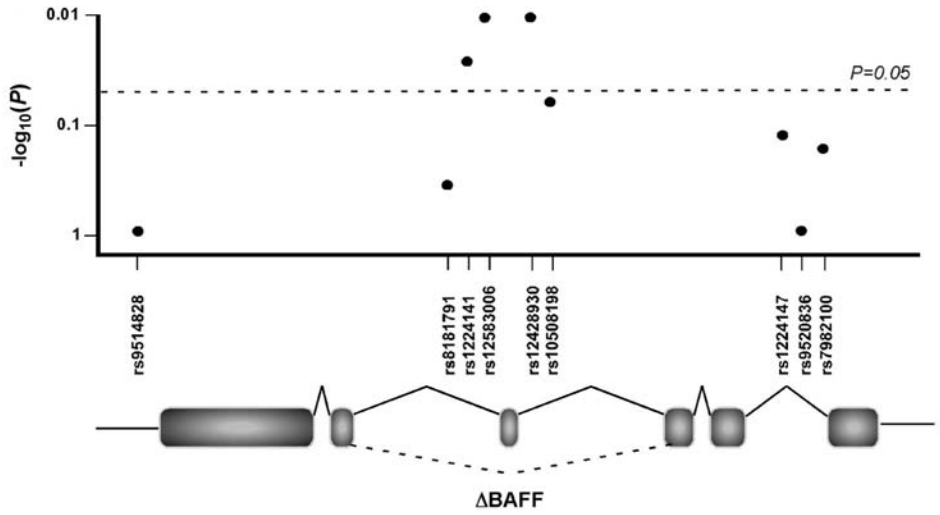
5.2. Analyse de la région 6p21

Compte tenu des résultats montrant l'importance des SNPs au niveau du promoteur du *TNFA* et de l'interaction entre les SNPs du *TNFA* et de *LTA*, l'analyse des SNPs a été étendue à l'ensemble des autres membres des gènes de la famille du *TNFA* et de ces récepteurs. Dans la région 6p21.3, sont également présents les gènes de récepteur de mort et le ligand Fas, les gènes *TRAF* et les gènes de la famille NFkB. Wang et al. ont donc étudié 1946 lymphomes avec une analyse plus précise des sous types histologiques (LDGBC, LF, lymphocytique/leucémie lymphoïde chronique, lymphome de la zone marginale) que l'étude de 2006.[202] L'étude a porté sur 500 SNPs de la région 6p21.3. L'étude confirme l'importance des SNPs de *TNFA*/*LTA* notamment les SNPs en -308 et +252 et montre également l'implication de SNPs au niveau des gènes *FAS*, *TNFSF13B* (*BAFF*), *TNFSF7*, *TNFRSF13C* (*BAFF-R*), *TANK* et du gène du facteur de transcription IRF4 et d'un SNP au niveau d'un inhibiteur de la voie NFkB, *NFkBIE*. Pour le sous-groupe des LDGCB, les SNPs d'intérêt sont *TNFA*/*LTA*, *TNFSF7*, *TNFSF13B*, *FAS* et *IRF4*. Pour les LF, les SNPs ayant un lien significatif sont *TNFSF7*, *FAS*, *TANK*. Pour les lymphomes lymphocytiques et LLC les SNPs d'intérêt sont *IRF4* et *TANK* et pour les lymphomes de la zone marginale, *IRF4* et *LTA*. Cette étude a l'intérêt avec un nombre de patients conséquents, de confirmer l'implication des SNPs au niveau des gènes de la famille du *TNFA*. Elle suggère ainsi le rôle de SNPs au niveau de *BAFF*.

Novak et al. ont étudié parmi une population de 441 lymphomes et 475 témoins, 9 SNPs au niveau du gène *TNFSF13B* différent du SNP (rs2582869) de l'étude de Wang et al précédemment citée.[203] Trois SNPs de par et d'autre de l'exon 3 sont significativement corrélés à un risque de lymphome. Il est possible de construire avec ces 3 SNPs (rs1224141, rs12583006, rs12428930), un allèle à haut risque TTA qui est significativement associé à un risque de survenue de LDGCB et de LF mais pas de lymphome lymphocytique/LLC. Dans cette étude, BAFF a pu être dosé au niveau du sérum et de façon attendue le taux est plus élevé dans les LDGCB. Les LF n'ont pas un taux de BAFF significativement plus élevé que les témoins. La corrélation entre le taux de BAFF sérique et l'haplotype construit à partir des trois SNPs montre que l'allèle associé à un haut risque de survenue de lymphome est corrélé à un taux de BAFF sérique plus important. Le caractère fonctionnel supposé de ces SNPs est appuyé par le fait que l'expression d'ARNm de BAFF variant (protéine tronquée) dont le gène ne comprend pas les trois SNPs, n'est pas modifiée en fonction de l'allèle à haut ou bas

risque de survenue de lymphome. Il n'y a cependant pas eu d'analyse par ELISA de ΔBAFF sérique (Figure N°11).

A)



B)

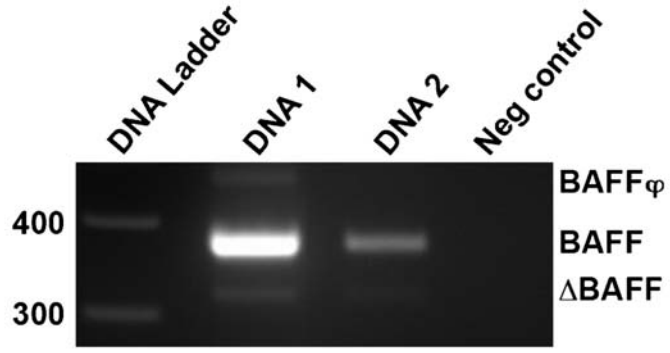


Figure 11 : A. Localisation des 3 SNPs au niveau du gène BAFF. B. Le caractère fonctionnel des SNPs est suspecté en raison de l'expression différentielle de BAFF et BAFF variant, ce dernier ne comprenant pas les 3 SNPs. D'après Novak et al.[203]

L'équipe de Skibola et al. a étudié parmi les membres de la famille du *TNFA*, les SNPs au niveau des gènes de *TNFRSF5* et *TNFSF5* codant respectivement pour CD40 et CD154 dont les mutations sont associées à des déficits immunitaires correspondant à un syndrome d'hyper IgM.[204] Les SNPs analysés se situent au niveau du promoteur de *TNFRSF5* en -1C>T (rs1883832) et pour le gène *TNFSF5* en +6809 (rs3092933) et +3005G>A (rs715762). Parmi 1776 lymphomes et 2482 témoins, l'analyse montre une augmentation du risque de LF en présence du variant T en -1 de *TNFRSF5*. Ce risque augmente proportionnellement en présence d'un allèle (30%) ou de deux allèles (60%). Ce SNP a également été étudié dans des cas de LH, montrant une augmentation par deux du risque. Les données sont plus contradictoires pour les LDGCB entre les différentes populations qui composent cette étude

mais cela peut refléter l'hétérogénéité des LDGCB avec peut être une augmentation du risque pour les LNH ayant une origine du centre germinatif (LH, LF, LDGCB de profil GC). L'analyse épidémiologique de cette étude a été complétée par une analyse biologique. Il apparaît que les témoins et les patients surtout ceux présentant un LF avec un génotype TT en position -1 du *TNFRSF5* ont un taux sérique de sCD40 significativement plus bas. Une analyse fonctionnelle montre de plus que l'expression de CD40 à la surface de cellules dendritiques stimulées par du LPS est 2.7 fois plus faible pour les patients TT. Ces données sur le sCD40 semblent plutôt contradictoires avec des études antérieures. L'interprétation physiopathologique de ces données peut être que les individus TT présentent un syndrome d'hyper IgM ''à minima'' avec au niveau du centre germinatif un ''défaut'' d'expression de CD40 pouvant être associé à une réponse immunitaire défectueuse qui favorise l'émergence de clones pathologiques.

La région 6q21.33 semble d'autant plus importante qu'une analyse globale avec une puce Illumina 550K sur une population de patients porteurs de LF, LDGCB et lymphome lymphocytique avec trois séries de validation (645 LF, 783 LDGCB, 3377 témoins) montre cinq SNPs associés à la susceptibilité au LF (rs6457327, rs2517448, rs13286028, rs11158098, rs16940565), deux associés aux LDGCB (rs9936269, rs29605) et aucun à la LLC/lymphome lymphocytique.[205] La validation de six de ces SNPs (rs6457327 et rs2517448 ayant un LD à 1) sur deux séries confirment l'importance sur le risque de présentation de LF de rs6457327 et ceci après correction en fonction du nombre d'analyse ($P = 10^{-9}$). Ce SNP se situe proche du gène *STG* et du gène *PSORS1* décrit comme étant un gène de susceptibilité aux LF. L'analyse des SNPs au niveau de cette région confirme également les résultats par rapport au SNP rs6457327. Celui-ci est également en LD avec un autre SNP rs1265054. Par contre ses SNPs semblent indépendant de HLA-C situé à proximité. A noter que le rôle de la protéine STG est mal connu et que des études plus poussées sont nécessaires pour décortiquer l'aspect fonctionnel de cette découverte.

Dans ce sens, une nouvelle analyse a à nouveau été réalisée à partir de la cohorte américaine, avec deux nouvelles séries de validation notamment avec une cohorte européenne.[206] La première analyse confirme l'impact du SNP au niveau de la région *PSORS1* mais également 18 autres SNPs. A partir de cette cohorte, 40 SNPs ont été analysés dans deux cohortes de validation, permettant de mettre en évidence deux SNPs d'intérêt rs10484561 et rs7755224 avec des niveaux de significativité important ($P = 10^{-5}$) (Figure N°12). Les principaux SNPs des cohortes précédentes et enfin la métaanalyse sur l'ensemble de la population confirme

l'importance de ces deux SNPs (respectivement $P = 10^{-29}$ et $P = 10^{-19}$). A noter que le SNP rs10484561 n'est pas en LD avec le premier SNP décrit au niveau du locus *PSORS1*, ce qui est en faveur d'un rôle indépendant de ce SNP. La région HLA de classe II 6q21.32 où se situe ce SNP semble donc une région d'intérêt dans la susceptibilité au LF.

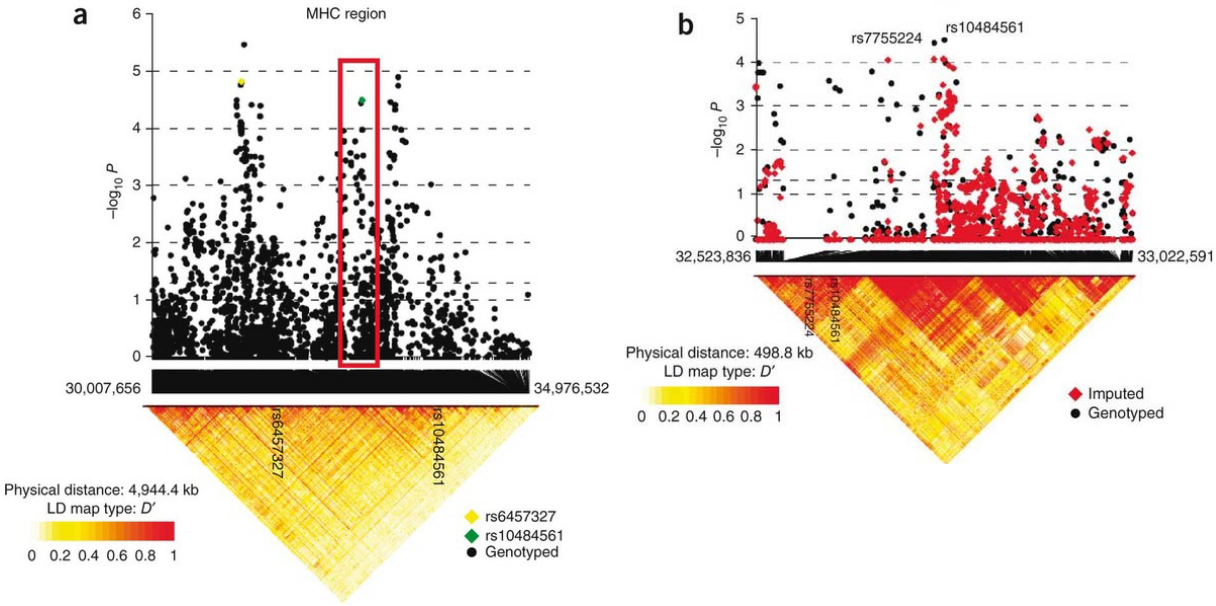


Figure 12 : A) Etude pangénome montrant l'implication de la région 6p21.32 dans la susceptibilité aux LF. B) L'analyse à ensuite été 'centré' sur la région du SNP rs10484561. D'après Conde et al. [206]

5.3. Analyse du système HLA

Compte tenu de la possibilité du caractère confondant du système HLA pour montrer une implication des locus du *TNFA*, l'équipe de Wang et al. a recherché la susceptibilité au LNH en prenant en compte l'haplotype HLA-A*01-B*08-DR*3 qui dans des études antérieures a été décrit comme associé à un risque accru de développement de pathologies auto-immunes.[207,208] Il semble donc que le risque associé de développement de LNH et surtout de LDGCB en rapport avec l'allèle *TNFA*-308G>A soit maintenu, indépendamment de la présence ou non de l'haplotype HLA-A*01-B*08-DR*3. La présence de HLA-B*08 semble aussi associée à un risque de développement de LNH indépendamment du statut du *TNFA*. Une étude complémentaire de la même équipe publiée en 2010, confirme l'importance du risque de lymphome en fonction du système HLA de classe II avec une augmentation du risque de LF avec HLA-DRB1*0101 et de LDGCB avec HLA-DRB1*0401.[209] Les auteurs font le lien avec le risque de présenter des pathologies auto-immunes et ces mêmes groupes HLA. Ainsi, le risque de LF est diminué en présence de l'allèle HLA-DRB1*13, comme cela

à déjà été montré dans des pathologies auto-immunes comme la PR. Comme le souligne les auteurs, ces résultats méritent d'être validés sur une autre série et l'analyse devra être complétée en intégrant l'ensemble des composantes du système HLA.

5.4. Implication des SNPs de la région 2q33 (CTLA4)

Parmi les effecteurs immuns impliqués dans la réponse T, Piras et al. ont montré que le nombre de séquence répétée AT en 3'UTR de *CTLA4*, est impliqué dans la susceptibilité au LNH.[210] Il existe un LD avec les SNPs en +49 et -318. L'haplotype à risque est *CTLA4*-318C/+49A/$(AT)_{82}$. A noter que dans une étude de susceptibilité au LNH de MALT, c'est l'haplotype *CTLA*-318C/+49G qui est à risque.[211]

5.5. Etude de susceptibilité impliquant les Toll-like receptors (TLR)

Les TLR jouent un rôle majeur dans la reconnaissance des micro-organismes et notamment les pathogènes et par conséquence l'activation des cellules de l'immunité innée. Ils permettent également de faire le lien entre l'immunité innée et acquise. Ces molécules sont d'expression membranaire à la surface des cellules (TLR1, 2, 4, 6) ou au niveau des endosomes et lysosomes (TLR3, 7, 8, 9). Ces récepteurs vont permettre la reconnaissance de ligands exogènes microbiens de nature diverse (lipidique, protéique ou nucléotidique) mais également endogènes comme l'ADN génomique associé à des anticorps anti-DNA, des molécules de choc thermique (HPS). La transduction du signal est assurée par des molécules cytoplasmiques comme MyD88 qui possède un domaine de mort et dont les SNPs du gène ont été étudiés dans le LH.[191] Les facteurs de transcription comme NFkB permettront l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNFA) et immunostimulatrices (IL-12 et IL-18) tandis que les facteurs de transcription de type IRF sont impliqués dans l'expression d'INFB et G. Compte tenu de l'importance que joue les TLR et des molécules impliquées dans la transduction du signal comme MyD88 dans la balance tolérance et activation du système immun, on comprend aisément que des variations génétiques somatiques au niveau de leur gène qui affecteraient leur fonction puissent modifier la réponse inflammatoire et influencer la survenue de lymphome. C'est le sens de l'hypothèse défendue par Cozen et al. par rapport aux SNPs de l'*IL12* et de *TLR4* et *TLR9*.[166] Une autre hypothèse serait que les cellules B malignes qui expriment les TLR aient une sensibilité variable en fonction des SNPs présentés, aux ligands endogènes ou exogènes (bactéries, virus, produits de dégradation de la matrice extra-celluaire) qui sont à l'origine de la croissance tumorale.

Purdue et al. ont analysé 36 SNPs au niveau des gènes de *TLR2* (11 SNPs), *TLR4* (14 SNPs) et de *TLR10-1-6* (11 SNPs) localisés au niveau de la même région du chromosome 4 parmi une cohorte 1946 patients porteurs de lymphomes et 1808 témoins, regroupant 3 études du NCI, du Connecticut et du New South Wales.[212] Deux SNPs, rs10008492 et rs4833103 au niveau de *TLR10-1-6* sont associés à une augmentation du risque de survenue de LNH, la corrélation étant retrouvée pour le premier SNP avec les LF et le second avec les LDGCB et les lymphomes de la zone marginale. Un SNP au niveau de *TLR2* (rs3804100) est associé au risque de survenue des lymphomes de la zone marginale. L'équipe de Nieters et al. retrouve un lien statistique avec un SNP de *TLR2* (rs4696480) et *TLR4* (Asp299Gly A>G) et respectivement une augmentation du risque de survenue de FL et de LNH du MALT.[187] Deux autres études montrent plutôt une diminution du risque de LDGCB et de lymphomes de MALT en fonction du SNP de *TLR4* 1063A>G (rs4986760).[213,214] A noter que le SNP au niveau de TLR6 (rs5743815) étudié par Cerhan et al. est différent de celui mis en évidence par Purdue et al.[201] Une analyse plus complète des SNPs au niveau des TLRs avec des études fonctionnelles pourrait être extrêmement prometteuse pour mieux comprendre l'influence des SNPs dans la réponse aux pathogènes qui engagent la voie des TLRs. Il a ainsi déjà été observé que le SNP *TLR4* 1063A>G (rs4986790) peut influencer la signalisation de TLR4 et donc moduler la réponse inflammatoire.

6. Etudes cliniques évaluant le rôle pronostique dans les lymphomes non hodgkiniens des SNPs des gènes des effecteurs du système immunitaire

Comme discuté dans l'introduction de ce travail, les facteurs pronostiques cliniques et biologiques ''conventionnels'' ne permettent pas de discriminer de façon parfaite les patients qui auront un pronostic différent. Compte tenu de l'influence possible des polymorphismes somatiques au sein des gènes des effecteurs du système immunitaire et des données épidémiologiques sur la susceptibilité au lymphome, des études ont intégré ces données aux analyses pronostiques des patients porteurs de lymphome. Les études ont analysé les SNPs des gènes de cytokines déjà présentées et impliquées dans la physiopathologie des lymphomes à savoir le plus souvent le *TNFA*, l'*IL10*, l'*IL6*, l'*IL4R*. Ces études sont résumées dans le Tableau N°2.

Tableau 2 : Etudes cliniques ayant analysé le pronostic des polymorphismes des gènes de cytokines dans les LNH

Auteurs	Contexte	SNPs étudiés	Résultats/Remarques
Warzocha[215] 1998	273 LNH 126 LDGCB	*TNFA*-308 *LTA*-252	Etude du taux plasmatique de TNFA et LTA en fonction des allèles du *TNFA* et *LTA* Haplotype à bas risque : 0-1 allèle associé à une production accrue de cytokines Haplotype à haut risque : 2-4 allèles associés à une production accrue de cytokines Survie globale et survie sans progression différente entre les deux groupes de bas et haut risque de LNH. Survie sans progression plus courte pour les LDGCB mais survie globale non significative pour les DLBCL. SSP indépendante de l'IPI. Non significatif pour les lymphomes folliculaires
Juszczynski[216] 2002	204 LNH 104 LDGCB	*TNFA*-308, -376 *LTA*+252 HLA DRB1	*TNFA*-308A associé à une sécrétion augmentée de TNF *TNFA*-308A associé à un taux de RC inférieur et un pronostic défavorable (EFS et OS) L'allèle HLA DRB1*02 nul associé à un pronostic défavorable (EFS et OS) Significatif en analyse multivariée pour *TNFA*-308 et HLA1*02
Lech-Maranda[94] 2004	DLBCL 199 patients	*IL10*-1082 *IL10*-819 *IL10*-592	Fréquence allèlique déséquilibrée pour le SNP en -1082 : allèle G plus fréquent chez les témoins Amélioration de la réponse, la FFP et OS pour les patients AA en -1082 Indépendant en analyse multivariée -819C et -592C : sécrétion plus importanted'IL-10 -1082 : pas d'effet Effet pronostique de l'IL-10 sérique sur la réponse, FFP et OS
Berglund[217] 2005	244 patients	*IL10*-1082 *IL10*-819 *IL10*-592	Pas de différence de distribution allèlique avec les témoins. Pas de différence en survie globale en fonction du génotype

Tableau 2 : suite

Auteurs	Contexte	SNPs étudiés	Résultats/Remarques
Kube[218] 2007	409 patients 256 LDGCB	*IL10*-3575 *IL10*-1354 *IL10*-1082 *IL10*-819 *IL10*-592	Pas de différence de distribution allèlique avec les témoins Pas de différence en survie globale en fonction du génotype pour l'ensemble de la cohorte et le sous-groupe des DLBCL
Lee[219] 2007	108 patients LNH T	*IL10*-1082 *IL10*-819 *IL10*-592	Pas de corrélation entre la réponse au traitement et l'haplotype de l'*IL10*. Survie globale et survie sans progression défavorable pour le groupe ACC/ACC (16% des patients) Etude Coréenne avec un génotype 100% AA pour *IL10*-1082. Difficile à comparer aux études occidentales
Domingo-Domenech[194] 2007	472 patients Syndrome lymphoprolifératif de différentes histologies	*IL10*-3575 *IL10*-1082	Survie globale améliorée pour le groupe -1082 GG (15% des pts) *P* = .05 Survie globale améliorée pour le groupe -3575 AA (7% des pts) *P* = .002 Survie globale améliorée pour les LNH (253 pts) : -3575 AA (20% des pts) / TT/AT *P* = .056 Diplotype -1082G-3575A/G-A : meilleur pronostique (5.6% des patients) Même sens statistique que l'étude de Lech-Maranda et al. avec un meilleur pronostic de l'allèle G en -1082. Pas d'analyse en sous-groupe histologique précis.
Kube[220] 2008	500 patients Essai B1/B2 CHOP/CHOEP	-597AC rs1800872 -1087AG rs1800896 -3538AT rs1800890 -6208CG rs10494879 -6752AT rs6676671 -7400indel	Pas de différence de fréquence allélique par rapport aux témoins Pas de différence en EFS et OS à 3 ans pour les différents génotypes sauf en -7400 : le groupe DelDel (3% des patients) : pronostique défavorable : 43% vs. 76% OS à 3 ans. 39% vs. 60% EFS à 3 ans. -6752TT de pronostique défavorable : OS (p=0.05) EFS (*P* = .06). Un haplotype -6752/-6208/-3538 : TCA/TCA de pronostique défavorable en OS (*P* = .06) et EFS (p=0.04). -7400Del/Del pronostic en analyse multivariée

Tableau 2 : suite

Auteurs	Contexte	SNPs étudiés	Résultats/Remarques
Habermann[221] 2008	365 LDGCB	73 SNPs étudiés parmi 44 gènes	Modèle Pronostique à 4 SNPs 0-1 (20% des pts) vs. 2-3 (68%) vs. 4 (12%) parmi SNPs (défavorables) de : *IL1A* rs1800587 : CT/TT *IL8RB* rs1126580 : AG/GG *IL4R* rs2107356 : CC/CT *TNF* rs1800629 : AG/AA Haplotype *TNF/LTA* AG : HR=1.36 *P* = .09 0-2 allèles vs. 3-4 (10% des patients) HR=1.72 Haplotype *IL10* TATA : 26% des pts HR=1.59 *P* = .04 TGCC : 7% des pts HR=2.44 *P* = .003
Park[222] 2009	235 LDGCB 110 traités par CHOP 125 traités par RCHOP	*IL10*-592 *IL10*-819 *Bcl2* -938C>A rs2279115 *Bcl2* +21A>G rs1801018	Corrélation à la réponse au traitement : CHOP : rôle défavorable des génotypes CC des 2 SNPs de l'*IL10*. Pas de différence sous R-CHOP et en fontion des SNPs de Bcl2 Impact sur la survie sans progression de l'haplotype CC d'*IL10* et du génotype AA de Bcl2 sous CHOP et non sous R-CHOP.
Schoof[223] 2009	228 LDGCB Essai B1/B2	*IL4*-524CT rs2243250 *IL4R* : I75V rs1805010 S503P rs1805015 Q576R rs1800925 *IL13*-1069CT rs1800925	Variant *IL4R* I75/I75 AA (31% des patients) : meilleur OS (*P* = .05) et EFS (*P*= .04) que les génotypes AG et GG Analyse confirmée en multivariée pour l'OS incluant l'IPI dans le modèle statistique. Pas d'impact des autres SNPs de *IL4R*, *IL4*, *IL13* Analyse du taux sérique de l'IL4R, prédictif de l'OS et EFS. Cut off à 115pg/ml L'analyse conjointe du taux d'IL4R sérique et du génotype montre un pronostique meilleur pour les patients ayant un taux IL4R bas (<115) et de génotype AA. Les patients AA et IL4Rs >115 ont un pronostique défavorable. L'analyse multivariée qui inclut le dosage de l'IL4R, confirme l'importance du génotype, l'IL4Rs n'étant pas un facteur indépendant.

Ces études centrées sur les SNPs au sein des gènes des cytokines sont toutes des études rétrospectives incluant pour la plupart différents sous-types de lymphomes. A noter que la plupart de ces études ont été réalisées avant l'intégration des anticorps monoclonaux comme le rituximab dans la stratégie thérapeutique.

6.1. TNFA

Deux études ayant analysé le rôle pronostique des variants du *TNFA* et *LTA* vont dans le même sens, à savoir un rôle délétère de l'haplotype *TNF*-308A/*LTA*+252G.[215,221] Dans l'étude d'Habermann et al. les patients porteurs de l'haplotype *TNFA*-308A/*LTA*+252G représentant 19% ont par rapport à l'haplotype GA (62% des patients) un risque accru mais non significatif de décès (P = .09). Warzocha et al. montrent que la présence de 2 à 4 allèles ''délétères'' de cet haplotype (A pour le *TNFA* et G pour *LTA*) est associée à une augmentation du taux de TNFA et LTA sériques en lien avec une survie globale et une survie sans progression plus courte. Ceci est surtout vrai pour la survie sans progression de LDGCB et indépendant des données de l'IPI. A noter que la répartition des patients ayant un nombre d'allèle ''délétères'' est relativement proche dans les deux études (38% et 33%) et qu'Habermann et al. retrouvent les résultats de l'étude de Warzocha et al. en utilisant la même méthodologie de répartition des allèles à risque. L'étude de Juszczynski et al. montre la difficulté de connaître le rôle pronostique des différent variants de la région 6p21.3 avec, dans cette étude le maintien du rôle pronostique du *TNFA*-308A associé au HLA DRB*02 et non à *LTA*-252.[216] Dans cette étude, la différence pour les 104 LDGCB est vraie pour la réponse complète, la survie sans progression et la survie globale. Le groupe de mauvais pronostic représente 28% des patients.

6.2. Interleukine 10

Les données concernant la valeur pronostique des SNPs de l'*IL10* sont extrêmement contradictoires. Les études de Lech-Maranda et al. et Domingo-Domenech et al. vont dans le même sens avec un pronostic favorable de l'allèle G en -1082, en sachant que la seconde étude a porté sur un ensemble de syndrome lymphoprolifératifs alors que l'étude de Lech-Maranda et al. porte uniquement sur les LDGCB.[94,194] Ces études sont contredites par l'étude de Berglund et Kube qui ne retrouvent pas de valeur pronostique pour cet allèle.[217,218] Alors que dans l'étude de Lech-Maranda et al. les caractéristiques des patients ne sont pas différentes en fonction du génotype de l'*IL10*-1082, une étude de 55 patients porteurs de lymphome retrouve une présentation plus agressive notamment des LDH plus élevées au diagnostic des patients porteurs du génotype *IL10*-1082AA.[224] Dans l'étude de Kube et al. l'intégration de l'allèle en -3575 à un haplotype distal montre que l'allèle A serait lié à un pronostique défavorable alors que les résultats sont inverses dans l'étude de Domingo-

Domenech.[194,220] Finalement ces résultats contradictoires sont expliqués dans l'étude de Habermann et al. qui a évalué le risque sur la survie globale de l'haplotype -3575, -1082, -819, -592. Les deux haplotypes à risque sont, TATA représentant 26% des patients avec un OR à 1.59 et l'haplotype TGCC représentant 7% des patients avec un OR à 2.44. Au niveau du promoteur distal, Kube et al. retrouvent le rôle pronostique d'un variant correspondant à une Insertion-Delétion (InDel) en -7400 mais qui ne correspond qu'à 3% des patients.[220] Dans une étude ayant évalué la valeur pronostique de l'haplotype formé de deux SNPs du promoteur de l'*IL10*, -592 et -819, Park et al. montrent un effet différent entre les patients traités par CHOP et R-CHOP.[222] Les génotypes CC sur ces deux SNPs sont associés à un taux de rémission complète, et des survies sans échec et globale inférieures pour les patients traités par CHOP et non par R-CHOP. Les auteurs font l'hypothèse que le rituximab pourrait gommer la valeur pronostique de cet haplotype. Ils retrouvent également une interaction de cet haplotype de l'*IL10* avec un SNP de Bcl-2 (-938 C>A, rs2279115). Il est reconnu que la valeur pronostique péjorative de Bcl-2 est valable sous CHOP et non sous R-CHOP. Le lien physiopathologique entre ces différentes données reste à démontrer.

6.3. Récepteur à l'interleukine 4

Deux études ont analysé les SNPs au niveau de l'*IL4R* (rs2107356, 1805010, 1805015, 1800925).[221,223] L'étude d'Haberman et al. montre que les génotypes CC/CT (rs2107356) ont un pronostic défavorable. Ce SNP est intégré à un modèle pronostique qui comprend le *TNFA* (rs1800629), l'*IL1A* (rs1800587) et l'*IL8RB* (rs1126580), la survie globale étant corrélée au nombre de génotypes présents et associée à une survie plus courte en analyse multivariée. Schoof et al. retrouvent que les patients porteurs du génotype AA (rs1805010) ont une survie globale et une EFS plus favorable par rapport aux patients de génotypes AG et GG. L'analyse multivariée de cette étude qui intègre le dosage de l'IL-4R montre que le génotype à une valeur indépendante dans l'évaluation du pronostic. Les variants de l'*IL4*, *IL13* analysés dans cette étude n'ont pas de valeur pronostique.

6.4. Autres SNPs : implication des SNPs de l'IL8, IL2, IL12B et IL1RN dans le pronostic des lymphomes folliculaires

Une étude de Cerhan et al. ayant analysé le pronostic de 73 SNPs parmi 44 gènes impliqués dans le système immunitaire chez 278 patients porteurs de LF traité sans rituximab, montre l'implication de 14 SNPs parmi 11 gènes ayant un $P<.15$.[225] Le SNP ayant une valeur pronostique la plus ''forte'' est l'*IL12B* rs3212227 (génotype AC/CC). Un modèle statistique montre qu'un modèle à quatre SNPs comprenant l'*IL8* (rs4073), *IL2* (rs2069762), *IL12B* (rs3212227), *IL1RN* (rs454078) peut prédire la survie des patients. A noter que les SNPs de

l'*IL10* et du *TNFA* n'ont pas de valeur pronostique comme cela est retrouvé dans une étude de méthodologie similaire dans les LDGCB.[221]

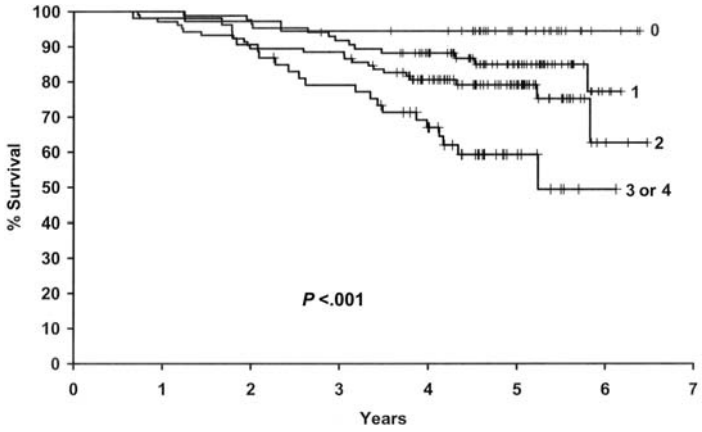


Figure 13 : Score pronostique de patients porteurs de LF en fonction du nombre de SNPs ''délétères'' parmi 4 SNPs : *IL8* (rs4073), *IL2* (rs2069762), *IL12B* (rs3212227), *IL1RN* (rs454078). D'après Cerhan et al.[226]

Cela confirme en tout cas deux autres études dont celle de Warzocha et al. qui ne retrouvaient non plus pas de valeur pronostique aux SNPs du *TNFA* et *LTA*.[215,227] Parmi les 14 SNPs, les SNPs de l'*IL10* ne sont pas non plus impliqués, ce qui pourrait suggérer un rôle différent des variants des gènes immuns dans la physiopathologie des LF et DLBCL. Le SNP au niveau de 3'UTR de l'*IL12* a été également décrit comme impliqué dans la susceptibilité au LH. Concernant le SNP de *IL1RN* (rs454078) son rôle est difficile à comprendre puisque l'allèle T du SNP est en LD avec l'allèle 2 (VNTR) au niveau de l'intron 2 d'*IL1RN* et associé dans différentes études vues précédemment, soit à l'augmentation de l'IL1Ra, soit à sa diminution. Les explications physiopathologiques sont également complexes pour le SNP de l'*IL8* (rs4073) puisque l'allèle TT à risque dans cette étude est plutôt associé à une baisse du taux d'IL-8 ce qui signifierait que des taux élevés d'IL-8, cytokine proinflammatoire serait un élément de bon pronostic, ce qui n'est pas cohérent avec des études réalisées en cancérologie.[228]

6.5. Tentative de synthèse sur les données biologiques, épidémiologiques et cliniques sur l'implication des SNPs des cytokines dans les lymphomes

La synthèse des données de la littérature concernant les SNPs au niveau des huit cytokines étudiées est complexe. Sur les données *in vitro*, on peut retenir que la majorité des études biologiques sont en faveur d'une sécrétion accrue d'IL-10 en présence de l'haplotype GCC en position -1082, -819, -592 au niveau promoteur du gène. Sur le plan épidémiologique, le SNP qui semble le plus impliqué est le *IL10*-3575A, et au niveau clinique, l'étude la plus convaincante est celle d'Habermann et al. qui a permis de montrer que la survie globale des patients peut être influencer par l'haplotype regroupant les quatre SNPs du promoteur de l'IL-10. Les analyses pronostiques montrent que les variations très distales en -7400 sont également importantes à prendre en compte, ce qui pourrait faire discuter un séquençage de l'ensemble de cette région pour définir les polymorphismes d'intérêt et ceux en LD. Dans les grandes études de susceptibilité des pathologies auto-immunes, il est intéressant de constater qu'actuellement aucun variant génétique de la région de l'*IL10* n'est impliqué (revue de la littérature dans Xavier et al.[229]). La dernière étude épidémiologique sur la susceptibilité aux LDGCB confirme l'implication de l'haplotype AG des SNPs *TNFA*-308G>A et *LTA*+252A>G avec cependant des études biologiques fonctionnelles très disparates pour générer des hypothèses fonctionnelles.[196] Cette région génétique semble majeure à étudier sous l'angle de la lymphomagénèse avec des données sur l'implication du système HLA et sur les membres de la famille du TNFA comme BAFF et CD40. Sur le plan clinique, l'étude de Habermann et al. confirme celle de Warzocha et al. avec un effet délétère sur la survie globale de l'haplotype AG permettant d'identifier un sous-groupe de patients (10% des patients) ayant un pronostic défavorable. Il apparaît extrêmement important dans le cadre des futures études de démembrer le groupe des LDGCB en GC et non-GC pour connaître l'impact respectif des SNPs dans ces deux entités de physiopathologies différentes. Les données issues d'études hors lymphome (coronaropathies principalement) pourraient suggérer un rôle plus global des SNPs au niveau des gènes de la famille de l'*IL1* et de l'*IL6* avec peut être une réponse inflammatoire différente (augmentation modérée de l'IL-6 et de la CRP) entre les individus en fonction des polymorphismes présents. Cet effet à priori non spécifique sur la réponse inflammatoire en fonction du fond génétique des patients serait intéressant à approfondir dans les lymphomes. Les SNPs de l'*INFG* et de l'*IL12* pourraient intervenir dans la capacité du système immunitaire à interagir avec les pathogènes avec des premiers résultats concernant l'influence que peut avoir les polymorphismes de l'INFG dans la réponse anti-virale à l'hépatite C, et ceux de l'*IL12* dans la susceptibilité aux LH et aux cancers du col liés à HPV.

On retrouve par exemple l'implication de SNPs de l'*IL23R* (rs11209026) dans les pathologies inflammatoires digestives comme la maladie de Crohn où il existe un déséquilibre entre les pathogènes digestifs et le système immunitaire à l'origine des lésions inflammatoires.[18,230] On peut donc se poser la question dans le cadre des LH de l'implication des SNPs de l'*IL12* et l'*INFG* par rapport au statut EBV de ce lymphome.

6.6. Influence des polymorphismes des gènes des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines dans les lymphomes

Les récepteurs au fragment Fc des anticorps et le système du complément jouent un rôle majeur dans l'induction de la réponse immunitaire. La fixation des anticorps au récepteur Fc va permettre la phagocytose, la cytotoxicité (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) par le système monocytes/macrophages et les cellules NK, le relargage de facteurs solubles (cytokines, substances chimioattractives et vasoactives) et, via les cellules dendritiques, permettre la présentation antigénique. Le développement des anticorps monoclonaux dont l'activité est médiée par la fixation du fragment Fc aux récepteurs des cellules effectrices et par le système du complément, rend l'analyse des polymorphismes des gènes FCGR et du système du complément intéressante car pouvant influencer la réponse thérapeutique si ces SNPs sont fonctionnels. Les polymorphismes les mieux étudiés par rapport aux conséquences fonctionnelles sur l'affinité pour les immunoglobulines sont situés sur les gènes de *FGRIIA* (131H ou R), *FCGRIIIA* (158F ou V) et *FGGRIIIB* (NA1, NA2, SH).[231] Pour le gène de FGRIIIA, une substitution d'un nucléotide en position 559 entraîne la modification de l'acide aminé 158 au niveau du domaine proximal, site de fixation de l'immunoglobuline. L'affinité sera modifiée et augmentée pour l'allèle V par rapport à l'allèle F pour les IgG1, G2 et G3.[232] Un second SNP existe en position 48 influençant le type d'acide aminé avec soit une leucine, soit une arginine ou une histidine.[232] Un polymorphisme au niveau du gène *FCGRIIA* modifie le type d'acide aminé au niveau de la partie distale du récepteur, avec soit une arginine, soit une histidine. Cela modifie l'affinité du récepteur aux IgG1, G2 et G4 mais pas G3.

Les conséquences cliniques de ces polymorphismes ont été étudiées. La qualité de la réponse aux anticorps anti-CD20 est améliorée en présence du variant *FCGRIIIA* 158VV pour des patients présentant un LF traité par rituximab.[233-236] Il n'y a par contre pas d'influence de la réponse ni du devenir des patients en cas de traitement par chimiothérapie seule dans l'étude de Weng et al. montrant de façon indirecte que l'effet est surtout thérapeutique et non pas en lien avec l'environnement immunologique tumoral.[237] Concernant le devenir des patients, seules deux études montrent que les patients porteurs du génotype *FCGRIIIA* 158VV ont une

survie sans progression plus longue après monothérapie par Rituximab.[234,236] Les résultats sont plus contradictoires concernant l'impact du SNP de *FCGRIIIA* en cas de traitement par immunochimiothérapie (R-CHOP), avec un taux de RC plus important en présence de l'allèle V dans l'étude de Kim et al. incluant des LDGCB, mais ces résultats ne sont pas retrouvés dans deux autres études incluant des LDGCB et des lymphomes folliculaires.[238-240] L'analyse de l'influence du SNP au niveau du gène codant pour *FCGRIIA* est contradictoire par rapport à l'influence de la réponse au rituximab dans les deux premières études princeps. L'étude de Cartron et al. ne retrouve pas d'influence de ce SNP contrairement à l'étude de Weng et al.[233,236] L'une des explications possibles est qu'il existe un LD entre les SNPs de *FCGRIIIA* et *FCGRIIA* et que l'effet retrouvé pour le génotype *FCGRIIA* 131HH est le reflet du génotype *FCGRIIIA* 158FF.[241] Les disparités entre les populations étudiées dans ces deux études peuvent expliquer ces différences en sachant que la coopération entre les différents FGRs peut rendre l'interprétation des effets de chaque FCGR pris individuellement difficile. Par contre ce SNP ne semble pas influencer la réponse à la combinaison de chimiothérapie et anti-CD20.[238-240] Une étude récente montre par contre que le SNP du *FCGR3A* influence la survie des lymphomes post-transplantation d'organe (rein, cœur, foie) avec une survie prolongée pour le génotype *FCGR3A* VV.[242] Cet effet semble ''endogène'' puisque visible avant 1997, avant l'utilisation des anticorps anti-CD20. Ce résultat semble également indépendant de la présence ou non d'une réactivation EBV. L'analyse du SNP du gène du *FCGRIIIB* codant pour un récepteur présent sur les polynucléaires neutrophiles montre qu'il n'influence pas la réponse au Rituximab, la phagocytose médiée par les polynucléaires neutrophiles ne semblant pas jouer un rôle majeur dans l'activité de cet anticorps monoclonal.[243] Sur le plan fonctionnel, les études *in vitro* montrent bien la différence de lyse des cellules lymphomateuses par le Rituximab via l'ADCC médié par les cellules NK issues de donneurs ayant un génotype VV ou FF. Dans cette étude, cette donnée est vraie pour la concentration qui entraîne la lyse de 50% des cellules avec une activité quatre fois supérieure pour le génotype VV par rapport à FF, mais la lyse maximale ne semble pas différente entre les deux génotypes, ce qui suggèrerait que l'effet maximal peut être obtenu pour les deux génotypes mais avec des adaptations des doses de l'anticorps.[244,245] Plus récemment ont été décrites des variations du nombre de copies de gènes des *FCGR* qui pourraient influencer la réponse aux anticorps monoclonaux. En effet, les études génétiques à large échelle montrent la présence de CNV au niveau de la région 1q23-24, où se localise les gènes codant pour les *FCGR*.[246] Le nombre de copie de gène de *FGRIIIB* serait ainsi associé à une augmentation de la susceptibilité aux pathologies auto-immunes.[247] Des variations de copies de gènes sont retrouvées pour *FCGRIIC*, *IIIA* et *IIIB* mais pas *IIA* et *IIB*. Cependant, le nombre d'individus

ayant une variation de copies de gènes de *FCGRIIIA* est faible (6%). L'évaluation de l'ADCC en fonction du nombre de copies de gènes serait en faveur d'une activité plus faible pour les individus présentant une seule copie par rapport à ceux ayant deux ou trois copies avec une corrélation de l'expression du récepteur à la surface des cellules NK.[246]

6.7. Influence des polymorphismes des gènes du système du complément dans les lymphomes

Les protéines du système du complément jouent un rôle important dans la réponse immune, avec un rôle de médiateur de l'inflammation, de chimiotactisme et d'effecteur de la réponse immune T, notamment comme inducteur de la lyse tumorale. Le système du complément comprend plus d'une trentaine de protéines plasmatiques ou fixées aux membranes cellulaires. Les protéines s'activent par clivage et forment des complexes actifs. Des mutations germinales des gènes codant pour les protéines du système du complément sont associées à une susceptibilité pour des pathologies inflammatoires et des infections. Des déficits en C5b-C9 sont ainsi associés à une susceptibilité accrue aux infections à *Neisseria*. Un des exemples récents les plus frappants est l'étude de Plenge et al. qui, en réalisant une étude pan génome de 317.503 SNPs retrouve en présence d'un variant (rs3761847) au niveau du locus *TRAF1-C5* (chromosome 9) une augmentation de risque de PR à anticorps anti-CCP.[248] (Figure N° 14).

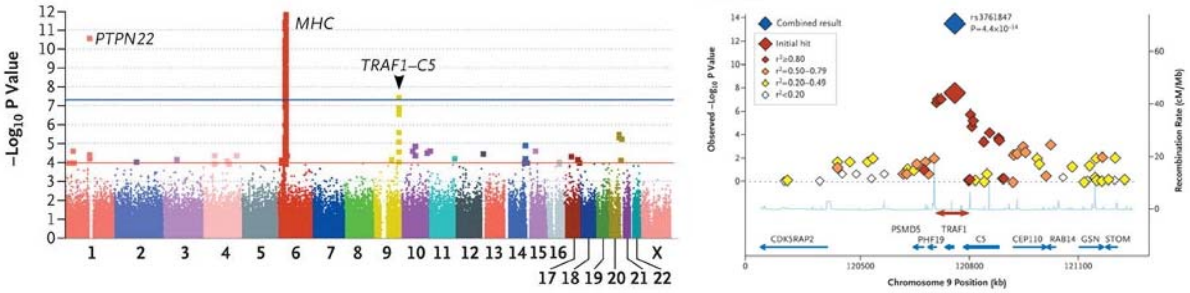


Figure 14: La figure de gauche montre l'évaluation de 297.086 SNPs génotypés chez 1522 patients porteurs d'une PR avec des anticorps anti–CCP-positifs et 1850 contrôles. On remarque l'implication déjà largement connue du système HLA dans la PR mais aussi le gène PTPN22 et le locus TRAF1–C5. La figure de droite montre que le SNP le plus significatif est le SNP rs3761847 dans la région TRAF1-C5. D'après Plenge et al. [119]

Cerhan et al. ont étudié parmi 441 patients porteurs de lymphomes et 475 témoins, le risque de lymphome en fonction de 167 SNPs au niveau de 31 gènes codant pour les protéines de la voie du complément.[249] L'analyse montre une augmentation du risque liée à des SNPs au niveau des gènes *C5* (rs7026551 et rs2416810) et de *C9* (rs187875). A noter que Cerhan et

al. retrouvaient dans l'étude de 1253 gènes de l'immunité, une association entre un SNP (rs2269059) au niveau du gène *TRAF1* et la susceptibilité aux lymphomes.[201] Cette région de 100-kb avoisinant les gènes *TRAF1* et *C5* représente donc une région d'intérêt dans la lymphomagènèse et le développement de pathologies auto-immunes. Kurreeman et al., par une approche SNP-candidat plus ciblée sur cette région (40 SNPs étudiés), ont ainsi pu montrer que le SNP rs10818488 localisé dans une région entre *TRAF1* et *C5*, est associé au risque de PR.[250] Cette étude qui initialement a comparé 290 patients et 254 témoins a ensuite été confirmée pour le SNP d'intérêt sur une population européenne plus large.[251]

Sur le plan clinique, l'équipe de Cerhan et al. a recherché l'impact pronostique de 166 SNPs de 32 gènes impliqués dans la cascade du complément montrant que la survie sans évènement peut être influencée par des variations génétiques au niveau des gènes *CFH* (complement Factor H), *CD55*, *CFHR5* (Complement Factor H-related 5), et *CFHR1* (Complement Ractor H-related 1) localisés en 1q32. Les SNPs de susceptibilité sont donc très différents de ceux qui ont un impact clinique. Ces données présentées en abstract à l'ASH 2009 ont pu être validées sur une autre cohorte de patients. Des études biologiques seront nécessaires pour mieux comprendre l'impact de ces SNPs sur la régulation de la cascade du complément. Sur le plan thérapeutique, il sera extrêmement intéressant de comprendre s'ils modifient la réponse aux anticorps monoclonaux dont l'action est médiée par l'ADC.

7. Présentation du travail de Thèse

Compte tenu de l'importance du micro-environnement tumoral dans le LH, nous avons analysé l'impact de SNPs au niveau des gènes des effecteurs du système immunitaire que sont les cytokines et les chimiokines. L'hypothèse de travail est que ces SNPs peuvent avoir un caractère fonctionnel comme nous l'avons décrit précédemment d'après les données de littérature et influencer la fonction des cytokines. Cela aboutit au concept selon lequel le fond génétique ''immunologique'' des patients pourrait influencer l'évolution tumorale, montrant qu'il doit être pris en considération dans la prise en charge des patients. L'importante limite de notre travail est que le nombre de SNPs étudiés est très limité par rapport à l'ensemble des SNPs présents au niveau des gènes des effecteurs du système immunitaire et qu'il peut donc être difficile de mettre en évidence un effet statistique majeur. Il s'agit donc avant tout d'une étude exploratoire avec des possibilités de recherche future importantes par rapport à la collection d'ADN somatiques disponibles.

7.1. Méthodologie du projet

La collection d'ADN a été constituée entre 1998 et 2002 lors de l'étude biologique Hodgkin du GELA (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte) dont l'objectif principal était d'étudier l'impact pronostique des cytokines, des récepteurs solubles du TNFA et du CD30 soluble. Initialement, en 1998, l'impact des SNPs était mal connu, et dans le consentement éclairé initial, il était prévu de faire des études limitées au SNP du *TNFA* en -308, qui était l'un des SNPs les mieux décrits et déjà étudiés dans les LNH. L'un des premiers travaux de ce projet a été de déposer une demande au Comité de Protection des Personnes (CPP) pour étendre les études de SNPs sur l'ADN constitutionnel des patients. Cet accord a été obtenu le 26 mars 2009 par le CPP de Lyon. La base d'ADN constitutionnelle comprend donc 464 patients, en sachant qu'elle pourra par la suite être élargie, des centres du GELA (Dijon, Lyon) ayant poursuivi la collecte d'ADN de patients porteurs de LH. Le second travail a consisté à actualiser les données cliniques des patients, notamment les données de rechute, de décès et les causes de décès. Pour le troisième travail ayant pour objet l'analyse de l'impact des SNPs en fonction de l'expression d'EBV du LH, nous avons pu obtenir le statut EBV des tumeurs de 242 patients.

7.2. Analyse de l'impact pronostique des SNPs de six cytokines (TNFA, IL-10, IL-6, IL-1B, IL-1Ra, CCL-17) dans les LH. Article 1 soumis Blood.

Cytokine gene polymorphisms and outcome of patients with Hodgkin lymphoma: an exploratory study of the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)

Hervé Ghesquières[1], Olivier Casasnovas[2], Marion Fournier[3], David G. Cox[4], Pauline Brice[5], Richard Delarue[6], Franck Morschhauser[7], Anne-Laure Borrel[8], Eva Lech-Maranda[8], Jean Gabarre[9], Annie Brion[10], Catherine Sebban[11], Vincent Ribrag[12], Isabelle Gaillard[13], Pierre Feugier[14], Aspasia Stamatoullas[15], Christophe Ferme[12] and Gilles Salles[16]

1 : University of Lyon; Centre Léon Bérard ; UMR 5239 CNRS, Lyon, France
2 : CHU le Bocage, Dijon, France
3 : Hospices Civils de Lyon; GELA-RC; Lyon, France
4 : University of Lyon; Centre Léon Bérard ; UMR590 INSERM, Lyon, France
5 : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint Louis, Paris France
6 : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Paris France
7 : CHU de Lille, France
8 : University of Lyon; Hospices Civils de Lyon; UMR5239 CNRS, Lyon, France
9 : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Hôpital Pitié Salpétrière, Paris France :
10 : CHU de Besançon, France
11 : University of Lyon, Centre Léon Bérard, Medical Oncology Unit, Lyon, France
12 : Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
13 : CHU Henri Mondor, Créteil, France
14 : CHU Nancy, France
15 : Centre Henri Becquerel, Rouen, France
16 : University of Lyon, Hospices Civils de Lyon, UMR 5239 CNRS, Lyon, France

Corresponding author:
Gilles Salles, MD, PhD

Service d'Hématologie, Centre Hospitalier Lyon-Sud

165, chemin du Grand Revoyet

69495 Pierre-Bénite Cedex

Tel: +33 4 78 86 43 02; fax: +33 4 78 86 43 55

email: gilles.salles@lyon-chu.fr

Word count: Abstract: 195; Text: 3567

Number of tables: 4; Number of figures: 3; Number of references: 55.

Keywords: Hodgkin lymphoma, cytokines, polymorphism, survival

This work was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC 1998 and 2002).

Presented in part at the 50th annual meeting of the American Society of Hematology, San Francisco, CA, December 6-9, 2008.

ABSTRACT

Cytokines are important immune mediators implicated in Hodgkin lymphoma (HL) pathogenesis but little is known of the role of inherited gene variations influencing their production in this disease. We prospectively assessed in 464 HL patients the prognostic role of cytokine gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) *IL10* (rs1800890, rs1800896, rs1800871, rs1800872), *TNFA* (rs1800629); *IL6* (rs1800795); *IL1B* (rs16944); *ILRN* (rs419598); *INFG* (rs2430561); *CCL17* (rs223828). In the whole cohort, *IL10*-1082AA genotype was associated with a higher complete response rate than other *IL10* genotypes (95% versus 88% $P = .02$). Focusing on stage III-IV disease patients, who presented a higher number of events, the 6-year overall survival was statistically different between $IL10_{-592AA/CC/AC}$ and $IL10_{-819TT/CC/CT}$ genotypes (100%, 94%, 78%, $P = .03$). This prognostic effect was observed in patients with EBV-negative tumors but not in those with EBV-positive HL. In EBV-negative HL, $TNFA_{-308AA/GG/AG}$ genotypes also conferred a different 6-year progression-free survival (100%, 84%, 68%, $P = .03$). No correlation was observed between genotypes and IL-10, TNFA, IL-1RA, IL-6 cytokine levels. This exploratory study suggests that SNPs in *IL10* and *TNFA* are associated with HL patients outcome, but may play a distinct role according to the EBV status of the tumor.

INTRODUCTION

Hodgkin's lymphoma (HL) is a lymphoid malignancy that is highly curable. However, about 15% and 30% of patients with respectively localized and disseminated disease do not respond or relapse after an optimal initial therapeutic strategy and may deserve adapted first line treatment. Another important consideration for patients with favorable outcome with a high chance of cure is to avoid long-term treatment related toxicities by limiting the duration or intensity of chemotherapy or radiation therapy. Therefore, several scoring systems using conventional biological and clinical parameters have been developed for discriminating prognostic groups of patients in order to adapt the therapeutic strategy.[252-254] These indexes are useful in clinical practice but parameters used to build them probably reflect the biological heterogeneity of the tumor. Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells create an immunologically favorable environment and interaction between neoplastic cells and reactive cells is mediated by cytokines, chemokines and soluble receptors.[255] In particular, the balance between T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) immune responses is in favor of anti-inflammatory and immunosuppressive responses that inhibit immune response to cancer. HRS cells could produce interleukin (IL)-10, IL-6, IL-5, IL-13, IL1-RA, or pro-inflammatory cytokines like interferon-gamma (INFG), TNF-alpha (TNFA), IL-1, IL-2, IL-12, which are also known to stimulate tumor cell proliferation. Members of the TNF receptor family, i.e. CD30, CD40 and RANK, as well as secreted chemokines involved in the attraction of reactive cells in the HRS environment, also play an important role in the pathogenesis of HL.[175] Furthermore, EBV status in the tumor may delineate distinct biological entities with specific microenvironment and immune regulations.[143,256] As shown in previous studies, the evaluation of cytokine plasma levels at diagnosis in HL could provide prognostic information independently of classical biological and clinical data.[11,179,180,257-263]

The human genome contains gene variations corresponding to about 11 million single nucleotide polymorphisms (SNPs).[12] The functional consequences of some SNPs are

alterations of gene regulation or modifications of the gene products. Germline polymorphisms have been described in immune genes with, for instance, genotypes that modify cytokine production in vitro and in vivo.[215,264] In the context of non-hodgkin lymphoma (NHL), epidemiologic and clinical studies demonstrated the role of immune SNPs on disease occurrence and evolution. A population–based case-control study has established that susceptibility to NHL is influenced by cytokine polymorphisms in *IL10* and *TNFA* promoter.[195,196] Large retrospective clinical studies in follicular lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) have indicated that overall survival (OS) could be influenced by a panel of cytokine SNPs.[19,221,226] However, little is known regarding the role of cytokine gene polymorphisms in HL. Only three studies have explored the prognostic value of SNPs in *IL10, TNFA* and *IL6* genes[189,194,265] and six have assessed the influence of polymorphisms in *IL6*, *IL10*, *IL12*, *INFG*, the chemokine *CCL17*, *CCL22* and *Toll-like receptor 9 (TLR9)* genes on susceptibility to HL.[166,179,189-192] Therefore, the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) designed a prospective study to explore the prognostic role of plasma levels of cytokines in HL and the potential correlations between cytokine levels, cytokine gene polymorphisms and outcome.[11] We decided to first investigate gene polymorphisms in cytokines known to be implicated in the pathogenesis of HL,[175] with a particular focus to SNPs being relevant in NHL susceptibility or outcome (*IL10*, *TNFA*),[195,221] and those identified in previous studies in HL (*IL10, TNFA, IL6, INFG*, *CCL17*).[189,190,192,265]

PATIENTS, MATERIALS AND METHODS

Patient characteristics and treatment

Between 1998 and 2002, the prognostic values of four plasma cytokines (IL-10, IL-6, IL-1B, IL-1Ra) and three soluble receptors (TNFA, TNF-R1, TNF-R2) were assessed in a prospective multicentric study of the GELA.[11] This study was also designed to investigate the role of SNPs in cytokine genes. A specific sample of peripheral blood lymphocytes was collected before treatment from HL patients included in this study. Disease stage was determined according to the Ann Arbor classification after clinical examination, chest radiograph, CT scan of chest, abdomen and pelvis, and bone marrow biopsy. Presence of B symptoms was assessed and classical biological parameters were collected before treatment (complete blood count with differential, erythrocyte sedimentation rate, serum albumin and lactate deshydrogenase levels). The international prognostic score (IPS) was defined. All patients were negative for human immunodeficiency virus. As mentioned in a previously published study including 519 patients, 88% of cases were reviewed by two independent GELA pathologists and were classified as classical HL according to the 2001 OMS classification. Patients were included in collaborative trials of the EORTC (Organisation for Research and Treatment of Cancer) and the GELA (H34, H8, H9)[266-269] or treated according to the GELA recommendations: patients with localized stage disease received anthracycline-based chemotherapy (4 to 6 courses) followed by involved field radiotherapy; those with disseminated disease received eight courses of anthracycline-based chemotherapy. A consent form was signed by all patients for participation in this specific study of cytokine germline polymorphisms approved by the Dijon and Lyon University Hospital ethics committee.

Laboratory analysis

Genotyping analyses

DNA was extracted from peripheral blood mononuclear leukocytes using High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany). DNA quantification was done using a Gene Quant II Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, U.K.). SNPs were named according to the SNP500Cancer database (http://snp500cancer.nci.nih.gov/home.cfm) and identified according to the ID numbers of the NCBI dbSNP database. SNPs of *IL10*, *TNFA, IL6, IL1B*, *IL1RN*, *INFG* and *CCL17* were analyzed using specific fluorescent dye-labeled (FAM and VIC) MGB probes (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). Real-time PCR analysis was performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using a total volume of 25 µl with 4µL of DNA (5ng/µl). The forward and reverse primer pairs and MGB probes are provided at the SNP500Cancer database. PCR conditions were as follows: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles at 92°C for 15 seconds and 60°C for 60 seconds. All analyses were performed in duplicate.

Plasma cytokine dosage

Plasma cytokine levels were assessed and available for IL-10, TNFA, IL-6 and IL1-RA, as previously described[16] and correlation between genotype and plasma cytokine level were investigated. Briefly, plasma samples collected before any treatment (including corticosteroid administration) were immediately stored at -80°C in sterile EDTA-containing tubes. Dosage was performed in duplicate using ELISA kits obtained from Biosource (Nivelles, Belgium) for TNF-alpha, R&D system (Minneapolis, NM, USA) for IL-1RA and Beckman-Coulter for IL-6 and IL-10. The detection limit of the test was 5 pg/ml for IL-10, 3 pg/ml for TNFA, 3 pg/ml for IL-6 and 22 pg/ml for IL-1Ra.

Epstein Barr Virus (EBV) status of the tumor

EBV status of HL samples was established by the hematopathologist of the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte Pathologie (GELA-P) network for 242/464 patients (52%). EBV status was considered positive or negative for 53 (21%) and 189 (79%) patients, respectively. It was obtained by immunohistochemical detection of latent membrane protein-1 (LMP-1) in 186 patients (77%), by in situ hybridation of EBER in 48 patients (20%) or by other techniques in the remaining 8 patients (3%).

Statistical analysis

Each polymorphism was tested for the Hardy-Weinberg equilibrium. The haplotype for the *IL10* promoter region with the four analyzed SNPs was constructed using the haplo.stats (version 1.4.0) package in the R environment (http://mayoresearch.mayo.edu/mayo/research/schaid_lab/software.cfm). Response to initial treatment was assessed according to Cheson criteria. OS was calculated from the date of initiation of therapy to the date of death of any cause or the date of last follow-up. Progression Free Survival (PFS) was measured from the date of initiation of therapy to the date of relapse, progression or the date of death of any cause or the date of last follow-up. Fisher's exact test was used to examine associations between patient genotypic characteristics, treatment response and EBV status. Survival was estimated by the Kaplan-Meier product limit method and comparisons for each cytokine genotype were made by the Log-rank test Correlations between each plasma cytokine level and the corresponding genotype were assessed by the Kruskal-Wallis test.

RESULTS

Patients, genotype frequencies of immune SNPs

The initial study which explored the prognostic value of plasma cytokine levels included 519 patients between 1998 and 2002.[11] We prospectively assessed germline cytokine polymorphisms in 464 patients with available peripheral blood samples which could be determined in the following cases (Table 1): *IL10* rs1800890 (-3575T>A), n=448; *IL10* rs1800896 (-1082A>G), n=459; *IL10* rs1800871 (-819C>T), n=446; *IL10* rs1800872 (-592C>A), n=447 pts; *TNFA* rs1800629 (-308G>A), n=464 pts. In a subset of 201 patients, genotype of *IL6* rs1800795 (-174G>C), n=201; *IL1B* rs16944 (-511T>C), n=198; *ILRN* rs419598 (+2018T>C) n=199; *INFG* rs2430561 (+874A>T), n=200; *CCL17* rs223828 (-431T>C), n=198 were also determined. *IL10* haplotypes based on the four *IL10* SNPs tested were assessable for 464 patients; six haplotypes could be constructed but two of these were infrequent (Table 1). Polymorphisms distribution was consistent with Hardy-Weinberg equilibrium. Clinical characteristics of the 464 patients are given in Table 2. Median age was 32 years (range, 15 – 93), 201 (43%) patients were female and 263 (57%) were male. Ann Arbor stage I-II was diagnosed in 335 patients (72%) and 206 patients (44%) had B-symptoms at diagnosis. Nodular sclerosis was the main HL subtype (384 patients, 84%). We observed no correlation between the characteristics of patients and each of the ten SNPs analyzed regarding age, gender, histology, stage, B-symptoms and Hasenclever score (data not shown).

Correlation between genotype and cytokine secretion

Based on results of the initial prospective study of the prognostic value of plasma cytokine levels,[11] we analyzed the correlation between plasma IL-10, TNFA, IL-6, IL-1RA levels and their relative genotype. We found no correlation between median plasma levels and each described genotype for *IL10* (4 SNPs), *TNFA, IL6, IL1B*, and *IL1RN*. The previous study has

proposed quantitative prognostic thresholds for IL-10 (30pg/ml), TNFA (46pg/ml), IL-6 (30pg/ml) and IL-1Ra (668pg/ml). Fisher's exact test did not identify any genotype associated to plasma levels higher or lower than these prognostic cut-off points (Table 3).

Correlation of immune SNPs, response and outcome

All patients were treated with anthracycline-based chemotherapy: 277 (60%) with ABVD (doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine), 102 (22%) with EBVP (epirubicin, bleomycin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone), 60 (13%) with BEACOPP (bleomycin, etoposide, doxorubin, cyclophosphamide, vincristin, procarbazine, prednisone) and 25 (5%) with other anthracycline-based regimens. Two hundred and forty-six (53%) patients were included in EORTC/GELA clinical trials (1 in H34, 5 in H8, and 240 in H9 trials). Complete response (CR) and uncertain CR (uCR) were observed in 417 patients (90%), partial response (PR) in 15 (3%), stable and progressive disease in 32 (7%). Treatment failure (progression or relapse) occurred in 78 patients (17%) and 45 patients (10%) died. Of these, 33 (73%) died of HL, whereas others died of first line treatment-related toxicity (3 pts, 7%), secondary neoplasia (6 pts, 13%), suicide (2 pts in CR, 5%) and unknown cause for one patient (2%). After a median follow-up of 6.3 years (range, 0.3–8.2), the 6-year PFS and OS were 81.5 % (95% CI, 74.1-84.1) and 89.5% (95% CI, 85-92.7), respectively.

Analysis of response to treatment according to gene polymorphism showed that only the AA genotype of *IL10* at position -1082 was associated with a better response to treatment than genotypes AG and GG (CR + Cru, 95% versus 88%, respectively ; P = .02) (Table 3). We next assessed patient survival according to gene polymorphism. We found no association between the ten individual SNPs or the *IL10* haplotypes and an increased risk of relapse or death when considering the whole patients series (Tables 3 and 4). As the majority of patients in this series had limited Ann Arbor stage (72%), we explored the prognosis of gene SNPs for disseminated stage patients, presenting a higher risk of treatment failure. For stages III-IV

patients, a significant OS difference was observed only for two SNPs in the *IL10* promoter, -819 and -592 which were in complete disequilibrium (LD). The 6-year OS rate was 100%, 94% and 78% for patients with respectively the AA, CC and AC genotypes in *IL10*-592C>A (P = .03) and TT, CC and CT genotypes in *IL10*-819C>T (P = .03) (Figure 1). A trend was observed for a better 6-year PFS in *IL10*-1082AA, -819TT or -592AA carriers versus other genotypes (P = .08). No PFS difference was observed for advanced stage HL between the different genotypes in *IL10*-3575T>A. We constructed an haplotype with the four SNPs in *IL10* promoter (Table 4). No clear OS or PFS difference could be detected between the different IL10 haplotypes for the whole series or after analysis by stage subgroups (I-II and II-IV).

Correlation between EBV status genotype and outcome

In this series, 53 (22%) and 189 (78%) of the 242 available tumors were considered to be associated or not to EBV, respectively. The 6-year OS (91% vs. 88% P = .3) and PFS (81% vs. 79% P = .3) rates were not statistically different between the EBV-negative and positive cohorts. For the seven SNPs studied, no difference in terms of genotype distribution was observed between EBV-positive and negative tumors (Table 2). Analysis of the PFS and OS associated with each SNP in EBV-positive and negative populations confirmed the OS difference for *IL10*-592 and -819 SNPs in EBV-negative patients. For *IL10*-592C>A SNP, the 6-year OS was 95%, 94% and 84% for CC, AA and AC genotypes, respectively (P = .02). Evaluation of the 6-year OS was similar for TT, CC and CT genotypes of the *IL10*-819C>T SNP (P = .02) (Figure 2). No prognostic difference was observed for other *IL10* SNPs (-3575 and -1082) and between the different *IL10* haplotypes in the EBV-negative population. For other SNPs, a PFS difference was observed for patients with SNP at *TNF*-308G>A: 6-year PFS rates were 100%, 84% and 68% for patients with AA, GG and AG genotypes, respectively (P = .03). (Figure 3). However, the AA genotype is rare, with only three patients

with this genotype in the cohort of EBV-negative HL. When excluding these three patients from the analysis, the difference between GG and AG genotypes remained significant (P = .01). No OS difference was observed for this *TNFA* SNP in the EBV-negative population. OS and PFS were also not statistically different between genotypes of the other SNPs tested, *IL1B*, *IL1RN, IL6*, *INFG*, *CCL17* in EBV-negative HL and all SNPs in EBV-positive HL. Not surprisingly, given the low number of events, multivariate analysis was unable to identify SNPs independently associated with Response, PFS or OS, in the whole population, stage III-IV patients or EBV negative cases.

DISCUSSION

The favorable prognosis of HL patients and the heterogeneity of the tumor result in a situation where biological prognostic parameters are still uneasy to identify. Our series is representative of HL usual clinical presentation, with a predominance of localized stage disease patients with a favorable outcome and represents the largest prospective cohort of HL patients treated with modern chemotherapy regimens examined for cytokine gene polymorphisms. We analyzed SNPs in peripheral blood leucocytes obtained before treatment to prevent the detection of any disequilibrium that could be observed when SNPs are identified on tumor tissue where chromosomal changes may occur. The allele frequencies of all SNPs evaluated in this HL prospective cohort were all in Hardy-Weinberg equilibrium and were close to those found in other HL series analyzed for *IL10, TNFA*, and *IL6* SNPs.[189,265] An effect of germline *IL10* SNPs in predicting the outcome of HL patients was observed, although this may appear restricted to patients subgroups with advanced-stage disease or EBV-negative tumors. We first observed in the whole population that the AA genotype at position -1082 of the *IL10* promoter gene was associated with a better response to initial treatment, with a trend for better outcome in advanced-stage disease *IL10*-1082AA carriers who presented a 6-year PFS of 85% compared to 71% for *IL10*-1082G patients (P = .08). This effect on PFS was also

marginally observed for *IL10*-819 and IL-592 SNPs, but the 6-year OS was statistically different between the different genotypes. The prognostic value of these two SNPs appeared restricted to the EBV-negative population, likely to be distinguishable from EBV-positive tumors in term of biology. Datas previously reported in a series of 184 patients (46 of them being analyzed in tumor tissue) were found to be different, with an apparent opposite effect of *IL10*-592AA polymorphisms and (-3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-592A) *IL10* haplotype.[26] The *IL10* haplotype distribution observed in our study is similar to that described in DLBCL patients,[23] where several studies also reported conflicting results regarding patients outcome, some reporting an unfavourable effect of *IL10* haplotype (-3575, -1082, -819, -592) [23] or *IL10*-1082AA genotype[39] while others failed to identify *IL10* gene variations associated with patients outcome.[38,40] In addition, although the number of patients with EBV-positive tumors was small, our findings also suggest that *IL10* polymorphisms may have distinct effects according to the role of EBV in HL. *IL10* polymorphisms has been previously shown to influence the susceptibility to EBV primary infection,[270,271] but no difference in IL10 genotype distribution between EBV-positive and EBV-negative populations was found in the present study. This is in line with another patient series,[265] and limits the validity of a previous report on a small cohort of 65 patients.[272] The findings that EBV primary infection increases the risk of EBV associated HL[273] and that genetic variability in the HLA-class I locus determines susceptibility to both EBV infection and EBV associated tumors[274] indicate that other genetic factors could account for the development of EBV associated HL. Finally, we did not observe a correlation between IL10 cytokine plasma levels at diagnosis and *IL10* gene polymorphisms, in opposite to our previous findings in DLBCL patients[39] and to that reported in a series of 95 HL patients.[48] Furthermore, *in vitro* studies[275,276] or clinical investigations in inflammatory or auto-immune diseases[105,277-280] suggest that the ATA haplotype, defined by three SNPs in the proximal promoter of the *IL10* gene (-1082, -819, -592) and the *IL10*-3575A[278] allele, is associated with low IL-10 secretion. Altogether, these discordant results

may be explained by the complexity of *IL10* locus genomic variability, resulting in a subtle regulation of this cytokine, where some polymorphisms may have different impact on gene transcription according to the cellular and inflammatory environment.[103,110,281]

Regarding other cytokines involved in HL pathogenesis, our study essentially identifies the impact of *TNFA*-G308G>A that is associated with a poorer PFS (84% in GG carriers versus 68% in heterozygous at 6 years) in patients with EBV-negative tumors. This finding is reminiscent of studies in DLBCL patients where *TNFA*-308G>A confers a significantly higher susceptibility to lymphoma development[196] and is associated with a poor outcome for patients[215,221] . Although this allele was found to be associated with higher TNFA cytokine production in lymphoma patients both *in vivo*[19] and *in vitro*[282] the *TNFA*-308 genotype was not associated in the present study with plasma levels of this cytokine evaluated at diagnosis. Again, the fact that *TNFA*-308G>A polymorphism appear to be associated with outcome only in EBV-negative patients underlines the particularity of EBV-positive HL. Beside the limitation due to the limited number of EBV-positive cases, these data suggest that immune mechanisms related to *TNFA* and *IL10* may be distinct in EBV–negative and -positive HL, and that those tumors would probably have different pathogenesis and clinical outcomes, especially in older patients,[143,144]

We confirm the lack of prognostic impact of *IL6*-174GG SNPs on patient outcome,[24] in opposite to an earlier report.[265] IL6 cytokine levels were not associated to this *IL6* polymorphism, again in line with the largest series published.[24] However, IL-6 may play a role in the development of HL in young patients[27] or those with a nodular lymphocyte predominance,[24, 27] a small subset that could not be examined in our series. Several studies have identified supernatant levels of IL1-B, IL1Ra and the chemokine *CCL17* at diagnosis as prognostic factors at diagnosis of HL,[11,180] but the role of SNPs in their genes was not previously investigated. We could not identify any association between SNPs in *IL1B*, *IL1RN* and *INFG* genes and patients outcome, or IL1Ra levels and the *IL1RN*+2018T>C SNP. These

findings could be explained by previous studies showing the lack of correlations between cytokine production in HL and *IFNG* and *CCL17* polymorphisms.[179,192]

Our series may be limited the number of patients analyzed and their good outcome, precluding the identification of adverse effects of immune-gene variations that may affect a defined subset of HL patients. Indeed, some of our findings underline the need to further delineate the heterogeneity of this disease, which could be related to EBV infection, age or presently unknown factors, when considering prognostic biomarkers in this disease. Moreover the numbers of SNPs that can be involved in the regulation of a given gene is high, and their comprehensive analysis may need complete genome sequencing. This is highlighted by recent results regarding *IL10* that identify gene variations in the distal promoter of this gene influencing DLBCL patient outcome[220]. Finally, the cytokine targets we have chosen, although previously identified in several reports as good candidate for prognostication of HL patients, can probably not fully reflect the complex network of immune mediators involved in the pathogenesis of HL.[26,283] Finally, some other genetic factors can account for the variability of patients outcome, as recently demonstrated in the same HL patients cohort for the UGT1A1 enzyme, involved in drug metabolism.[53]

In conclusion, in this study based on a prospective cohort representative of the global population of HL patients, SNPs in *IL10* and *TNFA* promoters could be identified to influence patients outcome for EBV-negative HL and advanced stage patients. Given the complexity of immune interactions in HL, further studies, using whole-genome scans or sequencing in large cohorts are needed to determine the prognostic impact of inheritable factors in this disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank MD Reynaud for editorial assistance and the GELARC (Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adultes Recherche Clinique) for the clinical management of this work.

All authors have read and approved the final version of the manuscript.

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

Table 1. Genotype and allele frequency of cytokine gene polymorphisms in the whole series and in EBV-negative and EBV-positive Hodgkin lymphoma

			Whole series of HL patients		HL Patients with EBV status		
Gene	**Polymorphism**		**Genotypes (%)**	**Allele frequency***	**EBV-negative HL**	**EBV-positive HL**	***P*-value†**
IL10	**-3575T>A**	Total	448		182	49	
	rs1800890	TT	200 (44)	0.67	86 (47)	22 (45)	.78
		TA	204 (46)		81 (45)	23 (47)	
		AA	44 (10)		15 (8)	4 (8)	
IL10	**-1082A>G**	Total	459		186	52	
	rs1800896	AA	154 (34)	0.59	69 (37)	17 (33)	.69
		AG	232 (50)		91 (49)	27 (52)	
		GG	73 (16)		26 (14)	26 (15)	
IL10	**-819C>T**	Total	446		181	49	
	rs1800871	CC	251 (56)	0.75	99 (55)	26 (53)	.62
		CT	165 (37)		66 (36)	20 (41)	
		TT	30 (7)		16 (9)	3 (6)	
IL10	**-592C>A**	Total	447		182	49	
	rs1800872	CC	251 (56)	0.75	99 (54)	26 (53)	.62
		AC	166 (37)		67 (37)	20 (41)	
		AA	30 (7)		16 (9)	3 (6)	
TNFA	**-308G>A**	Total	464		189	53	
	rs1800629	GG	357 (77)	0.87	148 (78)	41 (77)	.85
		AG	98 (21)		38 (20)	12 (23)	
		AA	9 (2)		3 (2)	0 (0)	
IL6	**-174C>G**	Total	201		84	24	
	rs1800795	GG	85 (42)	0.63	35 (42)	10 (42)	.89
		CG	85 (42)		35 (42)	12 (50)	
		CC	31 (16)		14 (16)	2 (8)	
IL1B	**-511T>C**	Total	198		82	23	
	rs16944	CC	93 (47)	0.70	37 (45)	12 (52)	.47
		CT	91 (46)		36 (44)	11 (48)	
		TT	14 (7)		9 (11)	0 (0)	
IL1RN	**+2018T>C**	Total	199		83	23	
	rs419598	TT	109 (55)	0.74	45 (54)	13 (57)	.99
		TC	78 (39)		32 (39)	9 (39)	
		CC	12 (6)		6 (7)	1 (4)	
IFNG	**+874A>T**	Total	200		83	24	
	rs2430561	AA	54 (27)	0.51	24 (29)	7 (30)	.95
		TA	97 (48)		38 (46)	12 (50)	
		TT	49 (25)		21 (25)	5 (20)	
CCL17	**-431C>T**	Total	198		82	24	
	rs223828	CC	178 (90)	0.95	75 (91)	22 (92)	.92
		TC	19 (9.5)		7 (9)	2 (8)	
		TT	1 (0.5)		0 (0)	0 (0)	

HL indicates Hodgkin lymphoma; * Allelic frequency is given for the major allele; †*P*-value comparing genotype distribution of EBV-positive and EBV-negative Hodgkin Lymphoma

Table 2. Characteristics of patients with Hodgkin lymphoma

	N (%)
Age ≥45 years	101 (22)
Male	263 (57)
Performance status	
0-1	
2-4	
Histological subtype	
Nodular sclerosis	384 (84)
Mixed cellularity	40 (9)
Diffuse lymphocyte predominance	5 (1)
Unclassified	24 (5)
EBV tumor status*	
Negative	189 (78)
Positive	53 (22)
Ann Arbor Stage	
I-II	335 (72)
III	62 (13)
IV	67 (14)
B symptoms	206 (44)
Hemoglobin level <10.5 g/dl	64 (14)
Erythrocyte sedimentation rate ≥ 50	196 (44)
White-cell count ≥ 15.000/mm^3	86 (19)
Lymphocyte count < 600/mm^3	40 (9)
Albumin level < 40 g/l	191 (45)
Hasenclever score	
0	60 (14)
1	139 (33)
2	110 (26)
3	65 (15)
4	32 (8)
≥5	15 (4)

* Only 242/464 patients were evaluated for EBV status

Table 3. Correlation between cytokine SNP genotyping and response, patient outcome and cytokine production

Polymorphisms	Genotype	CR and uCR		6-year PFS		6-year OS		Cytokine levels			
		N (%)	N (%)	*P*	%	*P*	%	*P*	N (%)*	Median†	Range	*P*§
***IL10*-3575T>A**												
n = 448	TT	200 (44)	184 (92)	.34	81	.69	91	.80	196 (44)	12	0-2952	.29
	TA	204 (45)	181 (89)		83		91		202 (46)	10.7	0-247.6	
	AA	44 (10)	38 (96)		74		93		44 (10)	5.5	0-136.7	
***IL10*-1082A>G**												
n = 459	AA	154 (34)	146 (95)	05‡.	82	.79	92	.46	151 (33)	10.7	0-2952	.76
	AG	232 (50)	204 (88)		83		90		229 (51)	11	0-931.8	
	GG	73 (16)	64 (88)		77		94		72 (16)	8.6	0-166.3	
***IL10*-819C>T**												
n = 446	CC	251 (56)	226 (90)	.11	83	.17	93	.06	249 (57)	10.8	0-931.8	.79
	CT	165 (37)	146 (88)		77		87		161 (36)	8.8	0-2952	
	TT	30 (7)	30 (100)		87		93		30 (7)	13.8	0-183.2	
***IL10*-592C>A**												
n = 447	CC	251 (56)	226 (90)	.10	83	.18	93	.06	249 (56)	10.8	0-931.8	.80
	AC	166 (37)	146 (88)		77		87		162 (37)	8.9	0-2952	
	AA	30 (7)	30 (100)		87		92		30 (7)	13.8	0-183.2	
***TNFA*-308G>A**												
n = 464	GG	357 (77)	321 (90)	1	81	.74	90	.41	357 (77)	27	6-248	.17
	AG	98 (21)	88 (90)		81		95		98 (21)	26	8-236	
	AA	9 (2)	8 (89)		89		100		9 (2)	21	11-36	
***IL6*-174C>G**												
n = 201	GG	85 (42)	70 (82)	.38	77	.96	89	.65	84 (43)	15	0-390.1	.33
	CG	85 (42)	76 (89)		80		87		84 (43)	14.5	0-99	
	CC	31 (16)	28 (90)		79		89		29 (14)	21.7	2-300	
***IL1B* -511T>C**												
n = 198	CC	93 (47)	81 (87)	1	80	.22	88	.74	-	-	-	-
	CT	91 (46)	79 (87)		74		87		-	-	-	
	TT	14 (7)	12 (86)		93		93		-	-	-	
***IL1RN* +2018T>C**												
n = 199	TT	109 (55)	94 (86)	.78	76	.82	88	.85	108 (55)	500	20-5000	.85
	TC	78 (39)	69 (88)		82		87		77 (39)	540	26-4000	
	CC	12 (6)	10 (83)		75		92		12 (6)	523	242-1300	
***IFNG* +874A>T**												
n = 200	AA	54 (27)	49 (91)	.40	77	.94	85	.77	-	-	-	-
	TA	97 (49)	84 (87)		79		89		-	-	-	
	TT	49 (24)	40 (82)		79		89		-	-	-	
***CCL17*-431C>T**												
n = 198	CC	178 (90)	154 (87)	.74	78	.82	88	.61	-	-	-	-
	TC + TT	20 (10)	17 (85)		80		90		-	-	-	

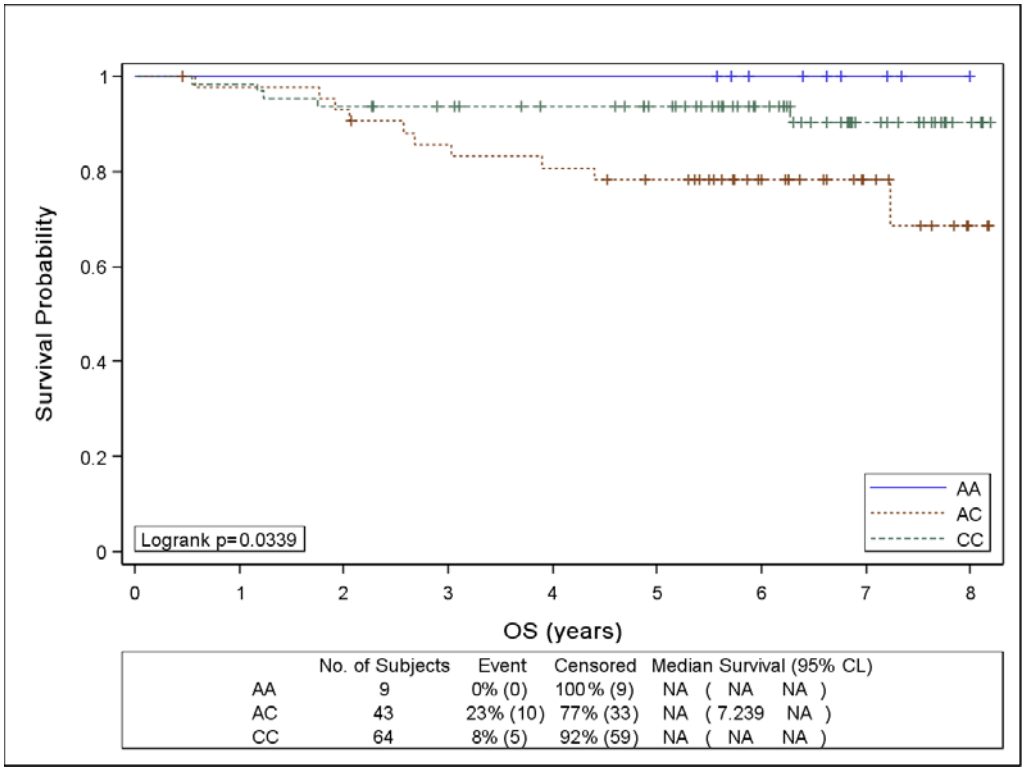
CR, complete response, uCR, uncertain complete response; PFS, progression-free survival; OS, overall survival.
*Number of patients evaluated for cytokine dosage.
†IL-10, TNF-alpha, IL-6, IL-1Ra levels are given in pg/ml.
§*P*-value evaluated by Kruskal-Wallis test.
‡CR and uCR associated with AA *IL10* genotype vs. other genotypes, *P*-value = .02.

Table 4. IL10 haplotype

				Haplotype, %	OS			PFS		
rs1800890 -3575T>A	**rs1800896 -1082A>G**	**rs1800871 -819C>T**	**rs1800872 -592C>A**		HR	95%, CI	*P*	HR	95% CI	*P*
T	A	C	C	34	1.00	reference		1.00	reference	
A	G	C	C	32	1.04	(0.58, 1.86)	.51	1.15	(0.78, 1.71)	.70
T	A	T	A	25	1.44	(0.83, 2.49)		1.20	(0.80, 1.78)	
T	G	C	C	9	1.36	(0.61, 3.03)		1.34	(0.76, 2.35)	
A	A	C	C	<1	-	-		-	-	
A	A	C	C	<1	-	-		-	-	

Figure 1. Overall survival in stage III-IV patients with different *IL*10-592C>A and *IL10-819C>T* genotypes

A. *IL10*-592C>A



B. *IL10*-819C>T

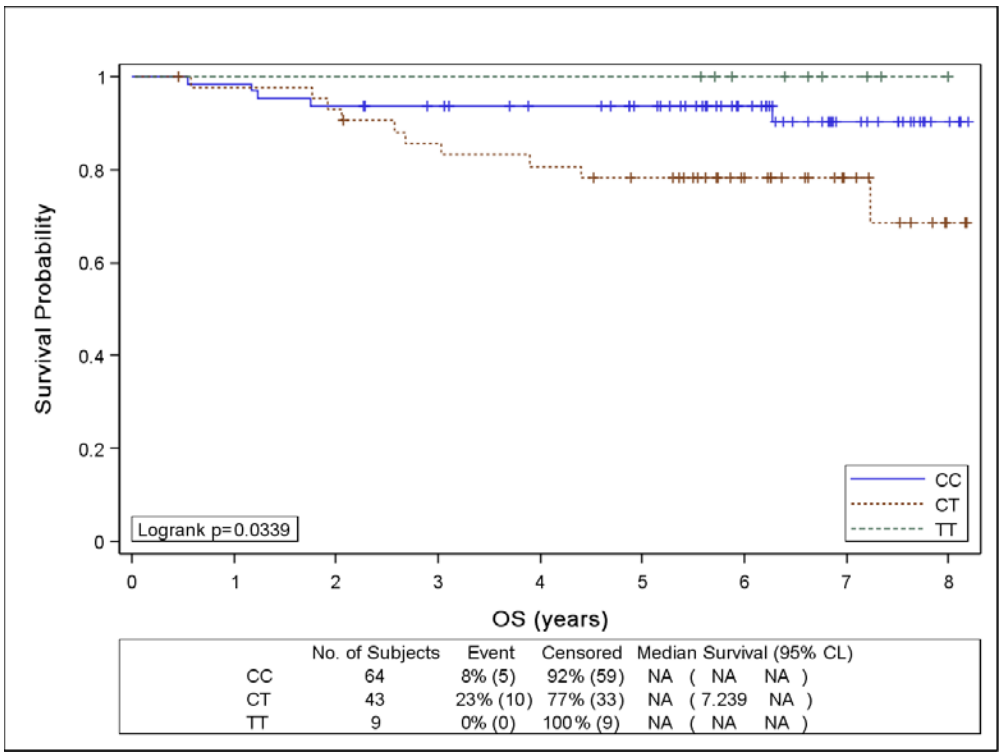
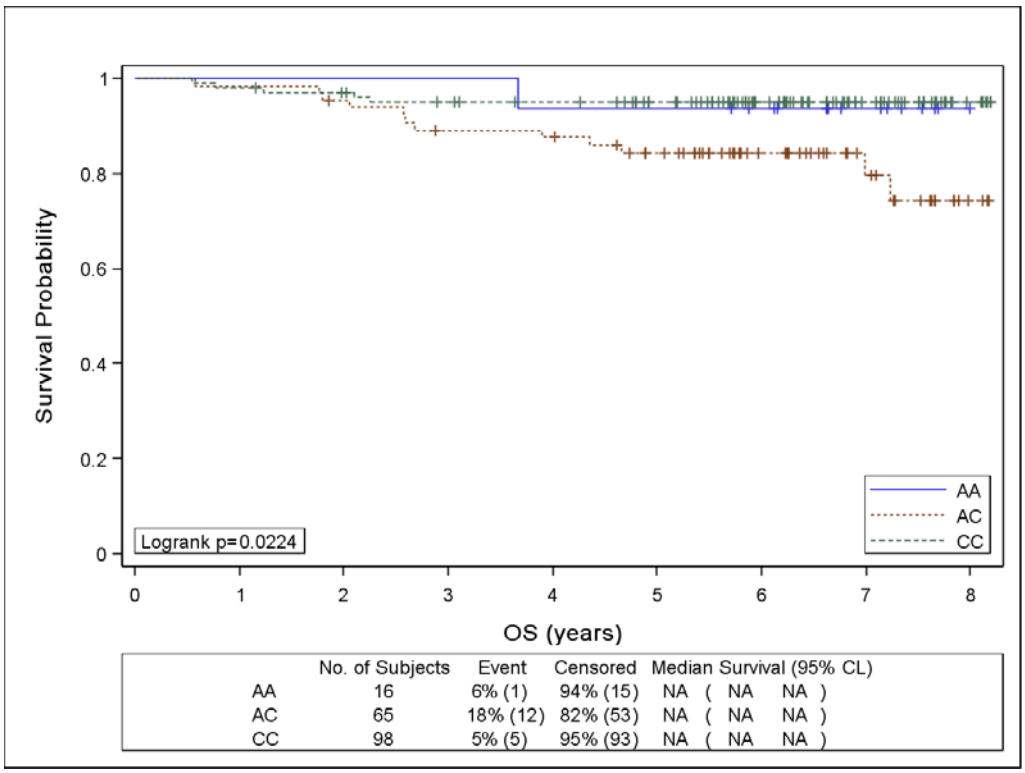


Figure 2. Overall survival in EBV-negative Hodgkin lymphoma patients with different *IL10*-592, -819 genotypes.

A. *IL10*-592C>A



B. IL10-819C>T

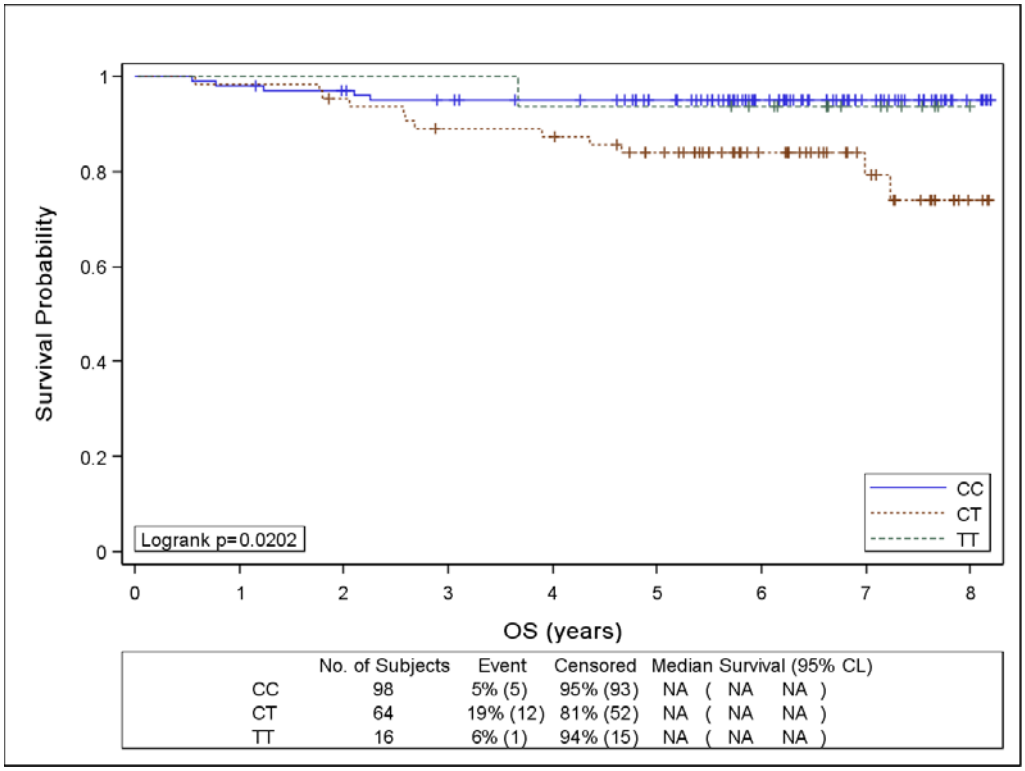
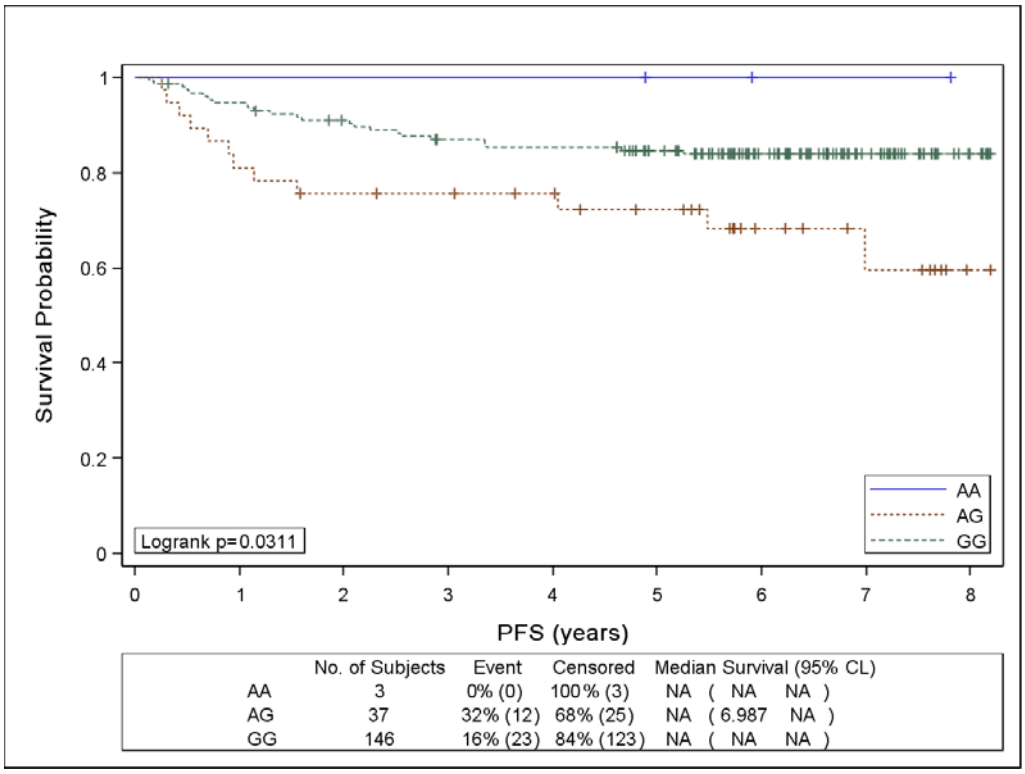


Figure 3. Progression free survival in EBV-negative Hodgkin lymphoma patients with *TNFA*-308G>C genotypes



References of Article 1

(1) Eghbali H, Raemaekers J, Carde P. The EORTC strategy in the treatment of Hodgkin's lymphoma. Eur J Haematol Suppl. 2005;135-140.

(2) Gisselbrecht C, Mounier N, Andre M et al. How to define intermediate stage in Hodgkin's lymphoma? Eur J Haematol Suppl. 2005;111-114.

(3) Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med. 1998;339:1506-1514.

(4) Re D, Kuppers R, Diehl V. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2005;23:6379-6386.

(5) Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2002;99:4283-4297.

(6) 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.

(7) Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. J Clin Pathol. 2007;60:1342-1349.

(8) Axdorph U, Sjoberg J, Grimfors G et al. Biological markers may add to prediction of outcome achieved by the International Prognostic Score in Hodgkin's disease. Ann Oncol. 2000;11:1405-1411.

(9) Casasnovas RO, Mounier N, Brice P et al. Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol. 2007;25:1732-1740.

(10) Gruss HJ, Dolken G, Brach MA, Mertelsmann R, Herrmann F. High concentrations of the interleukin-1 receptor antagonist in serum of patients with Hodgkin's disease. Lancet. 1992;340:968.

(11) Nadali G, Tavecchia L, Zanolin E et al. Serum level of the soluble form of the CD30 molecule identifies patients with Hodgkin's disease at high risk of unfavorable outcome. Blood. 1998;91:3011-3016.

(12) Niens M, Visser L, Nolte IM et al. Serum chemokine levels in Hodgkin lymphoma patients: highly increased levels of CCL17 and CCL22. Br J Haematol. 2008;140:527-536.

(13) Seymour JF, Talpaz M, Hagemeister FB, Cabanillas F, Kurzrock R. Clinical correlates of elevated serum levels of interleukin 6 in patients with untreated Hodgkin's disease. Am J Med. 1997;102:21-28.

(14) Vener C, Guffanti A, Pomati M et al. Soluble cytokine levels correlate with the activity and clinical stage of Hodgkin's disease at diagnosis. Leuk Lymphoma. 2000;37:333-339.

(15) Visco C, Vassilakopoulos TP, Kliche KO et al. Elevated serum levels of IL-10 are associated with inferior progression-free survival in patients with Hodgkin's disease treated with radiotherapy. Leuk Lymphoma. 2004;45:2085-2092.

(16) Warzocha K, Bienvenu J, Ribeiro P et al. Plasma levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features and outcome of Hodgkin's disease patients. Br J Cancer. 1998;77:2357-2362.

(17) Weihrauch MR, Manzke O, Beyer M et al. Elevated serum levels of CC thymus and activation-related chemokine (TARC) in primary Hodgkin's disease: potential for a prognostic factor. Cancer Res. 2005;65:5516-5519.

(18) Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. Nat Rev Genet. 2009;10:241-251.

(19) Baseggio L, Bartholin L, Chantome A et al. Allele-specific binding to the -308 single nucleotide polymorphism site in the tumour necrosis factor-alpha promoter. Eur J Immunogenet. 2004;31:15-19.

(20) Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J et al. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. Blood. 1998;91:3574-3581.

(21) Rothman N, Skibola CF, Wang SS et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. Lancet Oncol. 2006;7:27-38.

(22) Skibola CF, Bracci PM, Nieters A et al. Tumor Necrosis Factor (TNF) and Lymphotoxin-{alpha} (LTA) Polymorphisms and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma in the InterLymph Consortium. Am J Epidemiol. 2010.

(23) Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ et al. Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. Blood. 2007;109:5439-5446.

(24) Habermann TM, Wang SS, Maurer MJ et al. Host immune gene polymorphisms in combination with clinical and demographic factors predict late survival in diffuse large B-cell lymphoma patients in the pre-rituximab era. Blood. 2008;112:2694-2702.

(25) Cordano P, Lake A, Shield L et al. Effect of IL-6 promoter polymorphism on incidence and outcome in Hodgkin's lymphoma. Br J Haematol. 2005;128:493-495.

(26) Domingo-Domenech E, Benavente Y, Gonzalez-Barca E et al. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. Haematologica. 2007;92:1475-1481.

(27) Hohaus S, Giachelia M, Di Febo A et al. Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol. 2007;18:1376-1381.

(28) Cozen W, Gill PS, Ingles SA et al. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. Blood. 2004;103:3216-3221.

(29) Cozen W, Gill PS, Salam MT et al. Interleukin-2, interleukin-12, and interferon-gamma levels and risk of young adult Hodgkin lymphoma. Blood. 2008;111:3377-3382.

(30) Munro LR, Johnston PW, Marshall NA et al. Polymorphisms in the interleukin-10 and interferon gamma genes in Hodgkin lymphoma. Leuk Lymphoma. 2003;44:2083-2088.

(31) Mollaki V, Georgiadis T, Tassidou A et al. Polymorphisms and haplotypes in TLR9 and MYD88 are associated with the development of Hodgkin's lymphoma: a candidate-gene association study. J Hum Genet. 2009;54:655-659.

(32) Ferme C, Eghbali H, Meerwaldt JH et al. Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease. N Engl J Med. 2007;357:1916-1927.

(33) Somers R, Carde P, Henry-Amar M et al. A randomized study in stage IIIB and IV Hodgkin's disease comparing eight courses of MOPP versus an alteration of MOPP with ABVD: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group and Groupe Pierre-et-Marie-Curie controlled clinical trial. J Clin Oncol. 1994;12:279-287.

(34) Noordijk EM, Thomas J, Ferme C. First results of the EORTC-GELA H9 randomized trials: The H9-F trial (comparing 3 radiation dose levels) and H9-U trial (comparing 3 chemotherapy schemes) in patients with favorable or unfavorable early stage Hodgkin's lymphoma (HL). J Clin Oncol. 2008;23.

(35) Ferme C, Divine M, Vranovsky A. Four ABVD and involved-field radiotherapy in unfavorable supradiaphragmatic clinical stages (CS) I-II Hodgkin's lymphoma (HL): Preliminary results of the EORTC-GELA H9-U trial. Blood. 2005;106, abstr 813.

(36) Helminen M, Lahdenpohja N, Hurme M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. J Infect Dis. 1999;180:496-499.

(37) Helminen ME, Kilpinen S, Virta M, Hurme M. Susceptibility to primary Epstein-Barr virus infection is associated with interleukin-10 gene promoter polymorphism. J Infect Dis. 2001;184:777-780.

(38) da Silva GN, Bacchi MM, Rainho CA, de Oliveira DE. Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. Arch Pathol Lab Med. 2007;131:1691-1696.

(39) Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. N Engl J Med. 2003;349:1324-1332.

(40) Diepstra A, Niens M, Vellenga E et al. Association with HLA class I in Epstein-Barr-virus-positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virus-negative Hodgkin's lymphoma. Lancet. 2005;365:2216-2224.

(41) Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:9465-9470.

(42) Turner DM, Williams DM, Sankaran D et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet. 1997;24:1-8.

(43) Crawley E, Kay R, Sillibourne J et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999;42:1101-1108.

(44) Gibson AW, Edberg JC, Wu J et al. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2001;166:3915-3922.

(45) Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J et al. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum. 2001;44:176-179.

(46) Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. Lancet. 1998;352:113.

(47) Mormann M, Rieth H, Hua TD et al. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. Genes Immun. 2004;5:246-255.

(48) Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:9465-9470.

(49) Mormann M, Rieth H, Hua TD et al. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. Genes Immun. 2004;5:246-255.

(50) Sacks D. BAC talk about cell type-specific regulation of human IL-10. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:16895-16896.

(51) Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C et al. Higher LPS-stimulated TNF-alpha mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from non-Hodgkin's lymphoma patients. Exp Hematol. 2001;29:330-338.

(52) 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;27:3815-3821.

(53) Kube D, Hua TD, von Bonin F et al. Effect of interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study. Clin Cancer Res. 2008;14:3777-3784.

(54) Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4:11-22.

(55) Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009;491-496.

7.3. Analyse de l'impact pronostique du SNP IL12+1188A>C dans les LH.

Présenté en poster à l'European Hematology Association (EHA) 2009. (Annexe 1)

Article 2 en cours de rédaction : Relation between Interleukin-12 polymorphism in 3'UTR, plasma cytokine levels of IL-12, IL-23, IL17A and outcome of patients with Hodgkin lymphoma: a study of the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)

7.3.1. Rationnel de l'étude IL12

Nous avons vu dans les données de la littérature l'importance de l'IL-12 dans l'induction de la réponse Th-1 et ses propriétés anti-tumorales via l'induction de la sécrétion d'INFG. L'IL-12 fait partie d'une famille de cytokines à laquelle appartient l'IL-23 qui a en commun avec l'IL-12 la chaîne p40. L'IL-23 a des propriétés opposées à l'IL-12 permettant la sécrétion d'IL-17A par les lymphocytes CD4+. On rappelle donc que le SNP *IL12*+1188A>C (rs3212227) situé au niveau de la région 3'UTR du gène de p40 pourra donc avoir une influence fonctionnelle sur IL-12 et IL-23. Comme discuté précédemment les études *in vitro* sont contradictoires par rapport à l'impact du SNP rs3212227 sur la sécrétion d'IL-12 avec trois études en faveur d'une augmentation de la sécrétion d'IL-12 en présence de l'allèle A et deux études qui retrouvent ce résultat en présence de l'allèle C.[107,108,170-172] Dans le cadre des LH, les études en IHC montrent une surexpression d'IL-12 au niveau des cellules du microenvironnement tumoral avec une relative spécificité de l'expression de l'IL-12 dans les LH, puisque l'on ne retrouve pas par exemple d'hyperexpression d'IL-12 dans les LDGCB.[164] Deux études ont analysé les taux sériques d'IL-12 des patients porteurs de LH au diagnostic, avec des résultats discordants puisque Cozen et al. retrouvent un taux abaissé d'Il-12 par rapport aux témoins alors que pour Bien et al. ils sont augmentés.[165,166] Dans l'étude de Cozen et al. les taux d'IL-12 sont aussi significativement plus bas chez les jumeaux des patients, indemne de toute pathologie lymphomateuse, d'où l'hypothèse d'un terrain génétique régulant la sécrétion d'IL-12. Cozen et al. montrent effectivement un LD entre les patients/jumeaux sains et les témoins pour le SNP *IL12*+1188A>C. Cependant la relation entre cette distribution génotypique particulière chez les patients et leur jumeau et les taux d'IL-12 sériques n'a pas pu être étudiée.

L'objectif de cette étude a donc été d'analyser i) la distribution du SNP rs3212227 dans une cohorte de 259 patients suivis prospectivement dans le cadre de l'étude ''cytokine – Hodgkin'' du GELA. Comme dans l'étude précédente, le génotypage a été fait par une double technique Taqman (ABI Prism 7000) ii) la relation avec les données clinico-biologiques iii) l'impact pronostique de ce SNP sur le taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale iv) le rôle de ce SNP dans les LH exprimant ou non l'EBV v) la relation entre ce SNP et les taux d'IL-12, IL-23 et IL-17A sériques. Cela permettra également de définir l'impact pronostique des taux sériques de ces trois cytokines dans les LH. Les dosages sériques de ces trois cytokines sont en cours au CHU de Dijon en collaboration avec le laboratoire d'immunologie (Pr Bonnotte/ Dr Casasnovas).

7.3.2. Caractéristiques cliniques et biologiques des Patients de l'étude IL12

	N (%)
Age ≥45 ans	64 (25)
Male	145 (56)
Performance status	
0-1	233 (98)
2-4	5 (2)
Sous-type histologique	
Scléro-nodulaire	208 (80)
Cellularité mixte	25 (10)
Predominance lymphocytaire	2 (1)
Non classé	20 (8)
Expression de l'EBV*	28 (20)
Stade Ann Arbor	
I-II	187 (72)
III	37 (14)
IV	35 (14)
Symptômes B	116 (45)
Hémoglobine <10.5 g/dl	41 (16)
VS ≥ 50	108 (43)
Leucocytes ≥ 15.000/mm^3	51 (20)
Lymphocytes < 600/mm^3	24 (9)
Albumine < 40 g/l	104 (44)
Score d'Hasenclever	
0	28 (12)
1	79 (34)
2	65 (28)
≥3	62 (26)
Genotype *IL12*+1188A>C	
AA	166 (64)
AC	73 (28)
CC	20 (8)

* Seulement 137/259 patients ont été évalués pour EBV.

7.3.3. Traitements réalisés

Cent cinquante-sept patients (61%) ont été traités par ABVD (doxorubicine, bleomycine, vinblastine, dacarbazine), 52 (20%) par EBVP (epirubicine, bleomycine, cyclophosphamide, vincristine, prednisone), 30 (12%) par BEACOPP (bleomycine, etoposide, doxorubine, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine, prednisone) et 20 (8%) par un autre protocole comprenant des anthracyclines. La majorité des patients (180, 70%) ont bénéficié ensuite d'une radiothérapie.

7.3.4. Réponse aux traitements, survie sans progression et survie globale

Une réponse complète ou réponse complète incertaine a été observée chez 228 patients (88%), une réponse partielle chez 11 (4%) et une maladie stable ou progressive chez 20 patients (8%). Avec un délai médian de suivi de 7 ans (0.5 – 8.2), la survie sans progression et survie globale à 6 ans des 259 patients sont respectivement de 74% et 89.5% (Figure N°15).

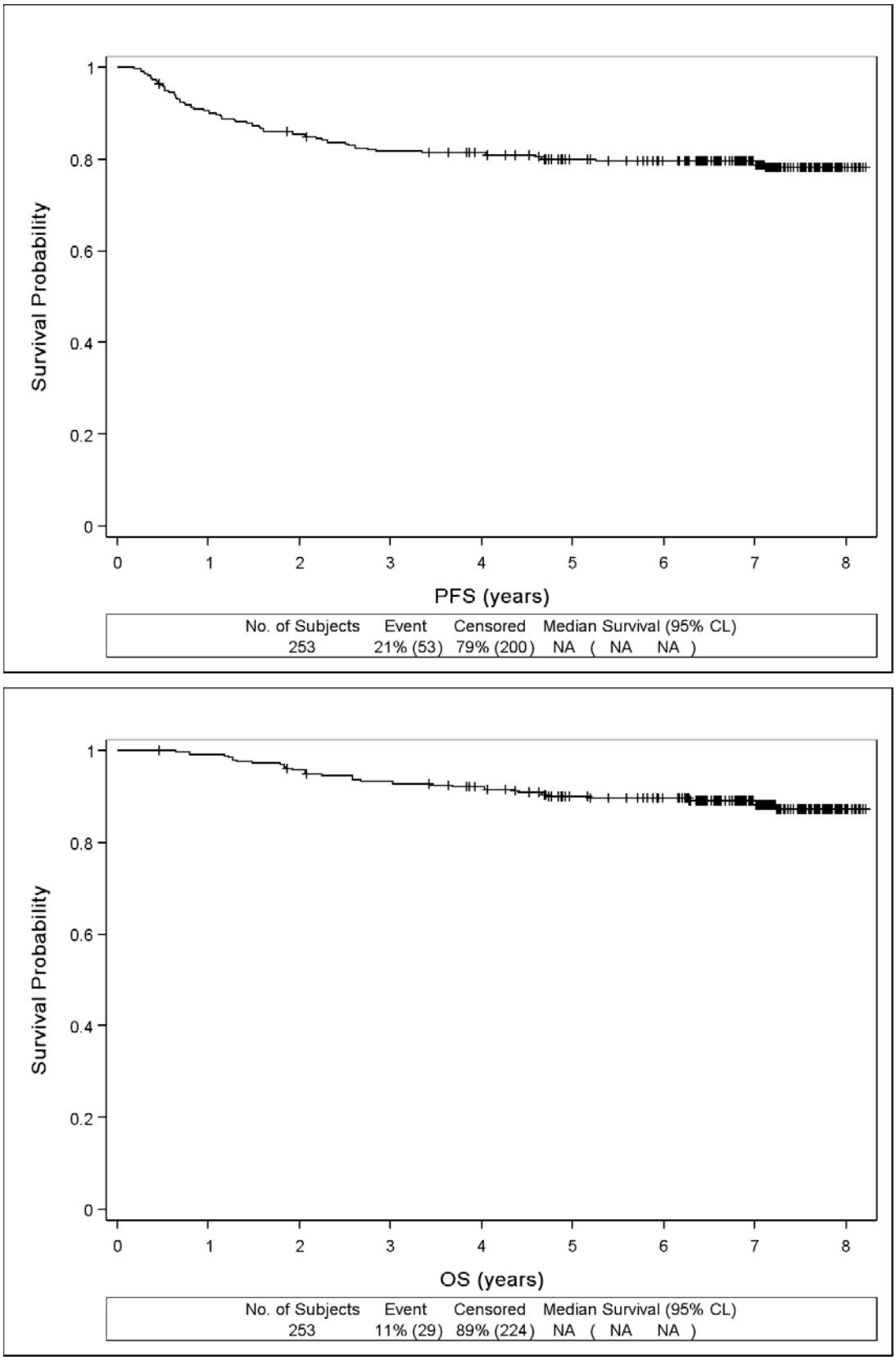


Figure 15: Survie sans progression et survie globale des 253 patients porteurs de LH inclus dans l'étude IL-12

7.3.5. Résultats

Le génotypage du SNP en +1188A>C des 259 patients porteurs d'un LH montre une distribution qui ne respecte pas l'équilibre de HW (*P* = .005) avec un excès d'allèle CC par rapport à une population générale. Nous avons pu séquencer la région du SNP de 18 des 20 ADN ''CC'' pour s'assurer de nos résultats obtenus en doublon par Taqman et le séquençage a bien confirmé les résultats du Taqman. Pour deux patients, la quantité d'ADN était insuffisante.

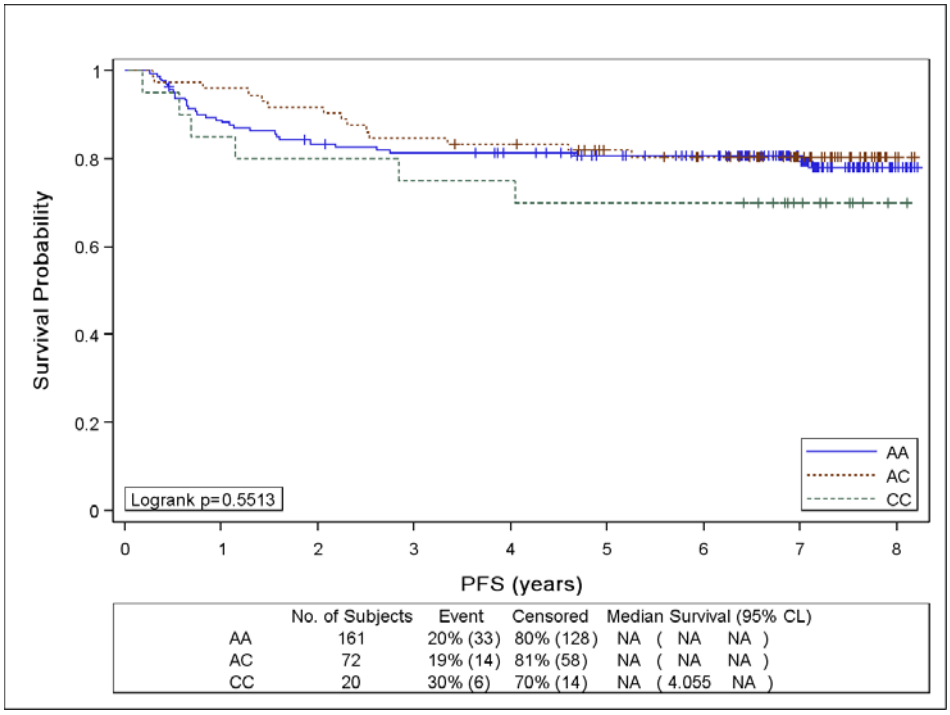
Aucune corrélation entre les données cliniques et biologiques initiales (âge, sexe, sous-type histologique, stade, présence de symptôme B, PS, taux d'hémoglobine, de leucocytes, de lymphocytes, d'albumine, de LDH et score d'Hasenclever) et les génotypes du SNP *IL12*+1188A>C n'a été retrouvé. La distribution allélique n'est pas différente entre les LH EBV+ (20% des patients évaluables) et EBV- (*P* = .52) (Tableau N°3)

	***IL12* (+1188A>C)**					
	AC		**AA**		**CC**	
	N	**%**	**N**	**%**	**N**	**%**
Status EBV						
EBV-négatif	31	28	73	67	5	5
EBV-positif	7	25	19	68	2	7

Tableau 3 : Génotypes de l'*IL12* en fonction du statut EBV des LH

Le génotype du SNP *IL12*+1188A>C n'influence pas la réponse au traitement initial, ni la survie sans progression ni la survie globale pour l'ensemble de la cohorte (Figure N°16).

A.



B.

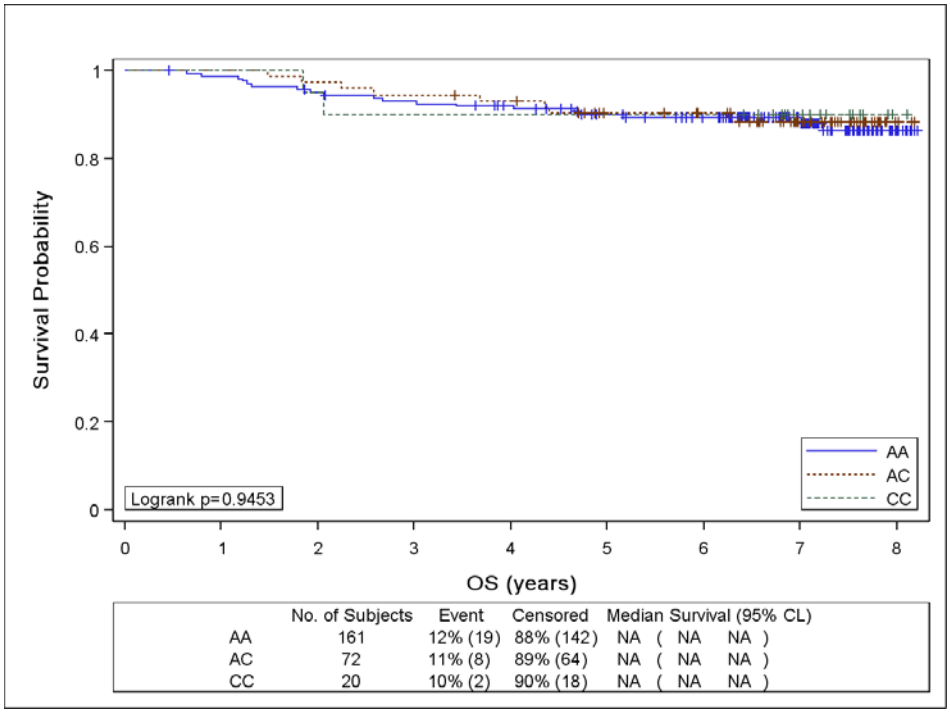


Figure 16: A. Survie sans progression ; B. Survie globale en fonction du génotype de l'*IL12*+1188A>C

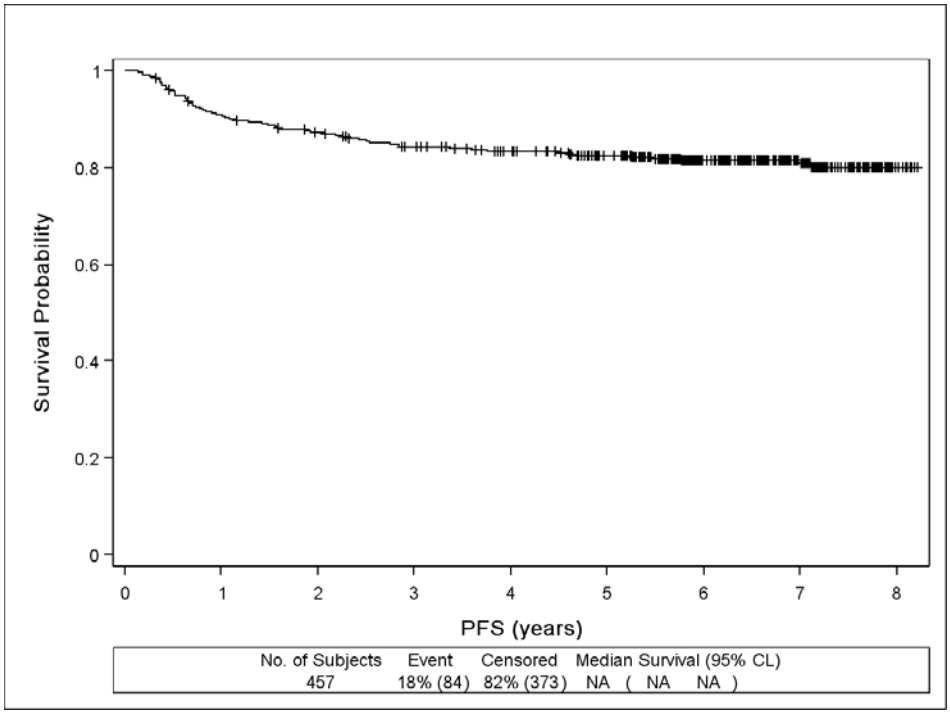
A noter que les analyses en sous-groupes (Stade I-II vs. III-VI et EBV+ vs. EBV-) ne montrent pas non plus d'influence sur le pronostic des patients en fonction du SNP de l'*IL12*

analysé. La relation entre le génotype de l'*IL12* des patients et les taux sériques de l'IL-12p40, p70, IL-23 et IL-17A est donc en cours d'étude de même que l'impact pronostique des taux sériques de ces cytokines.

8. Discussion des deux études

Actuellement, ce travail constitue la plus importante série de patients porteurs de LH ayant attrait à l'impact pronostique des SNPs des effecteurs du système immunitaire. C'est aussi l'étude qui comprend le plus grand nombre de SNPs étudiés dans les LH. L'intérêt du travail est i) qu'il est basé sur une collection obtenue de façon prospective avec les données cliniques initiales collectées avec soin ; ii) l'étude de l'ADN somatique des patients a fait l'objet d'un consentement éclairé spécifique ; iii) les données de suivi ont pu être actualisées avec un suivi médian des patients de 6 ans ; iv) Cette étude a permis de faire un lien entre les SNPs et les taux plasmatiques de sept cytokines (TNFA, IL-10, IL-6, IL-1RN, IL-12, IL-23, IL-17A) et le statut EBV des tumeurs ; v) les caractéristiques de la cohorte correspondent à une population de LH non sélectionnée, c'est-à-dire avec un pronostic globalement favorable (Figure N°17) ; vi) enfin, les traitements réalisés pour les patients de cette cohorte sont encore d'actualité en 2010.

A.



B.

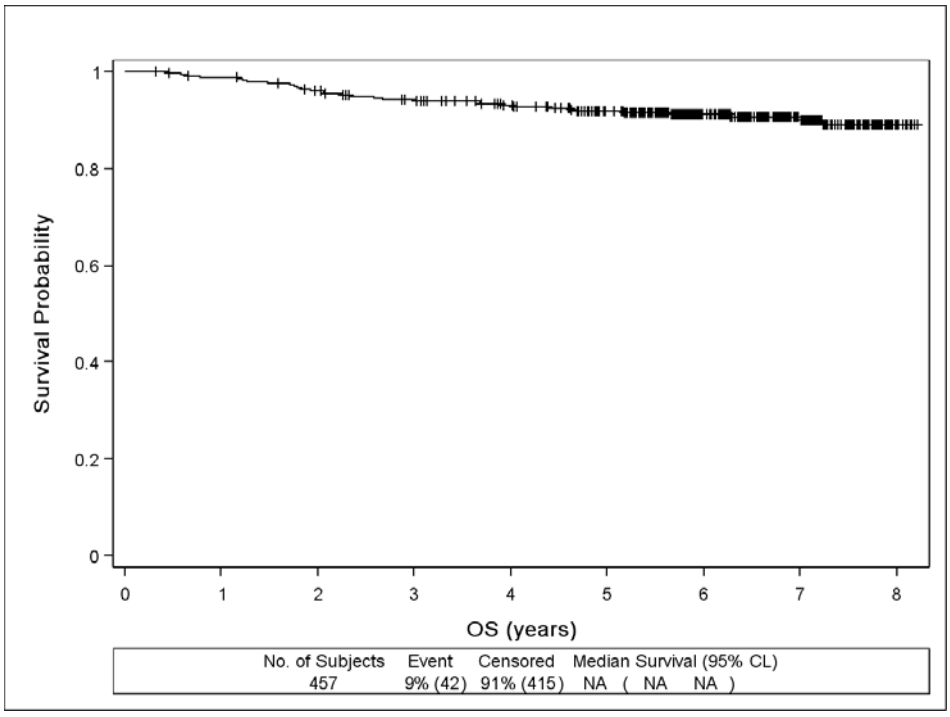


Figure 17 : A. Taux de survie sans progression à 6 ans : 81.5% ; B. Taux de survie globale à 6 ans : 91%.

Globalement, on ne retrouve pas d'impact pronostique fort des SNPs étudiés sur la survie globale ou la survie sans progression des patients contrairement aux études pronostiques rétrospectives des SNPs ‘‘immuns’’ dans les LDGCB où il a pu être proposé un score pronostique uniquement à partir de la présence ou non de génotype délétère de quatre SNPs

(*IL1A*, *IL8RB*, *IL4R*, *TNFA*) ou l'haplotype de 4 SNPs situés au niveau du promoteur de l'*IL10*.[221] On ne retrouve pas non plus les résultats de Holaus et al. qui, à partir d'une série de 184 patients porteurs de LH, retrouvent que le SNP au niveau de *IL10* en -592 et de l'*IL6* en -174 a un impact pronostique sur la survie sans progression des patients.[265] Dans notre premier article, les résultats statistiquement ''significatifs'' obtenus ne le sont qu'à partir de sous-groupes notamment pour les patients présentant des stades avancés et dans le sous-groupe des patients dont le LH n'exprime pas l'EBV. Cela souligne la difficulté de mettre en évidence un facteur pronostique d'un élément biologique complexe dans une population de patients de bon pronostic avec peu d'évènements (17% de rechutes et 10% de décès dans cette série). A ce titre, la série de Holaus et al. ne semble pas tout à fait correspondre à une population représentative de LH avec une proportion importante de stades avancés (63% de stade IIB à IV), d'où un nombre plus important de rechutes et décès (Figure N°18).

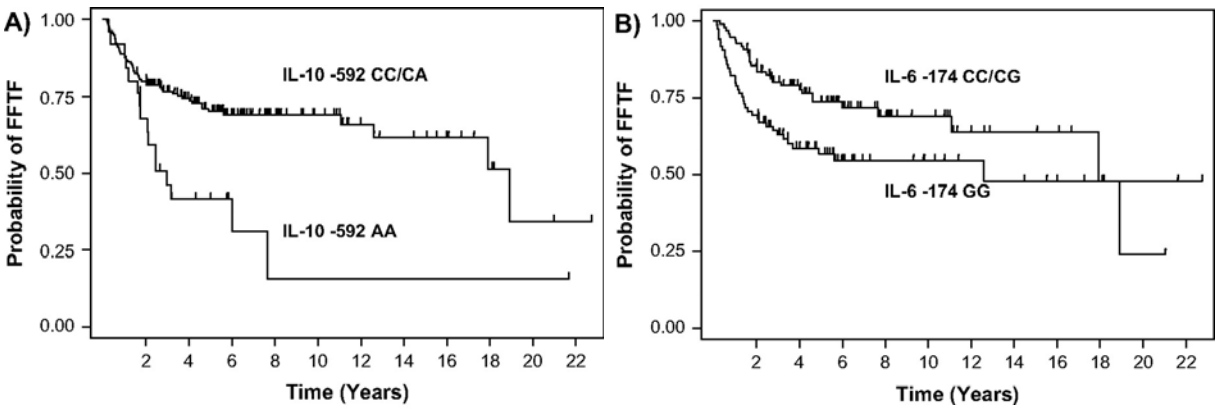


Figure 18 : A. Echec au traitement en fonction du SNP *IL10*-592C>A B. En fonction du SNP IL6-174C>G. D'après Hohaus et al.[265]

Notre étude montre donc que les patients porteurs du génotype *IL10*-1082AA présentent un taux de rémission complète significativement plus important (95% vs. 88% *P* = .02) avec une survie sans progression à 6 ans de 85% pour cet allèle comparée à 71% pour les patients porteurs de l'allèle *IL10*-1082G patients (*P* = .08).

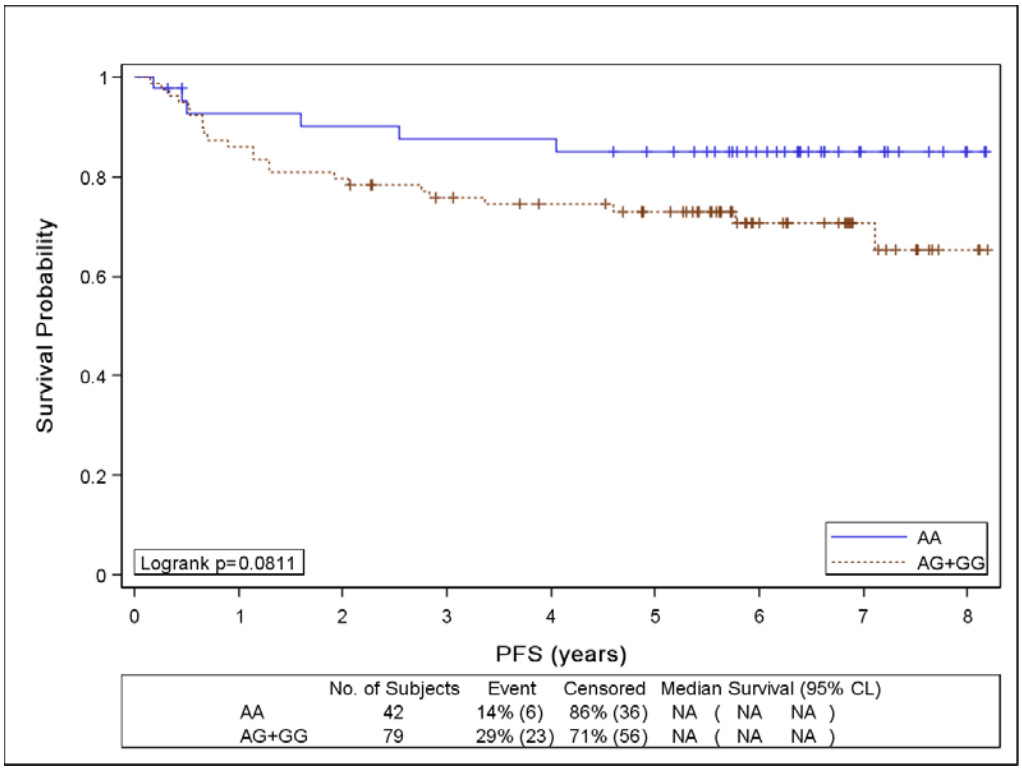
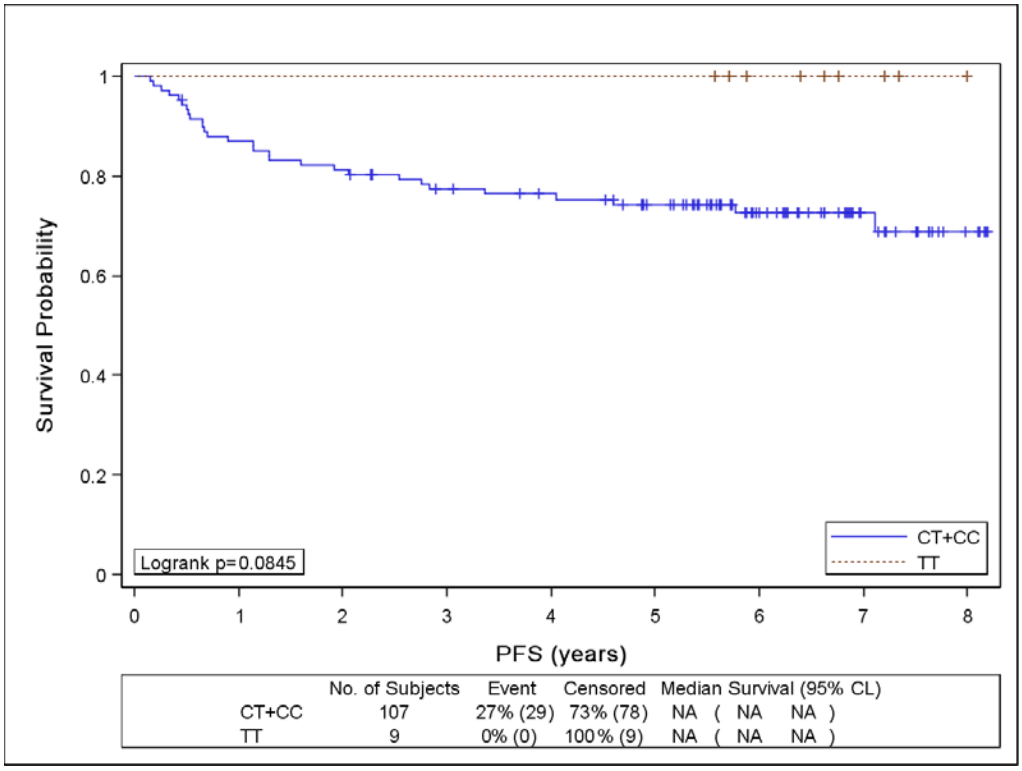


Figure 19 : Survie sans progression des patients présentant un stade III-IV en fonction du génotype de l'*IL10*-1082G

Les patients porteurs des génotypes *IL10*-819TT et -592AA ont également une survie sans progression plus longue par rapport aux patients porteurs des autres génotypes (*P* = .08). La survie globale de ce sous-groupe de patients est de 100% et significativement plus importante que les autres génotypes (*P* = .03). (Figure N°20). Le SNP plus distal de l'*IL10* en -3575 n'a pas d'effet pronostic.

A)



B)

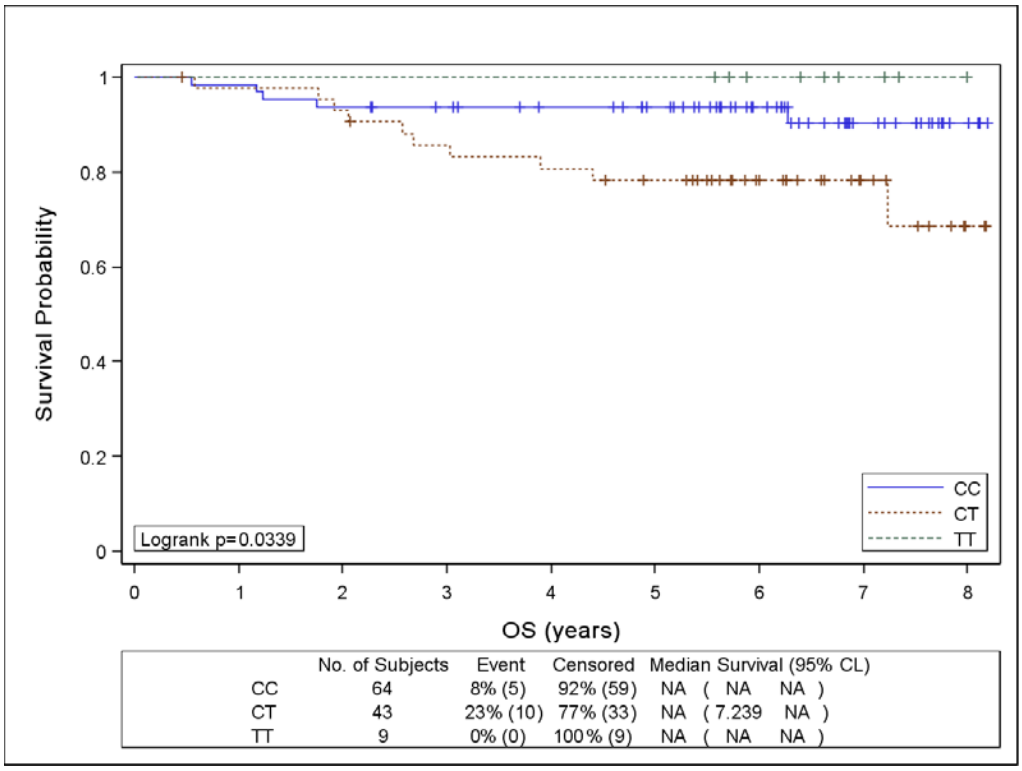
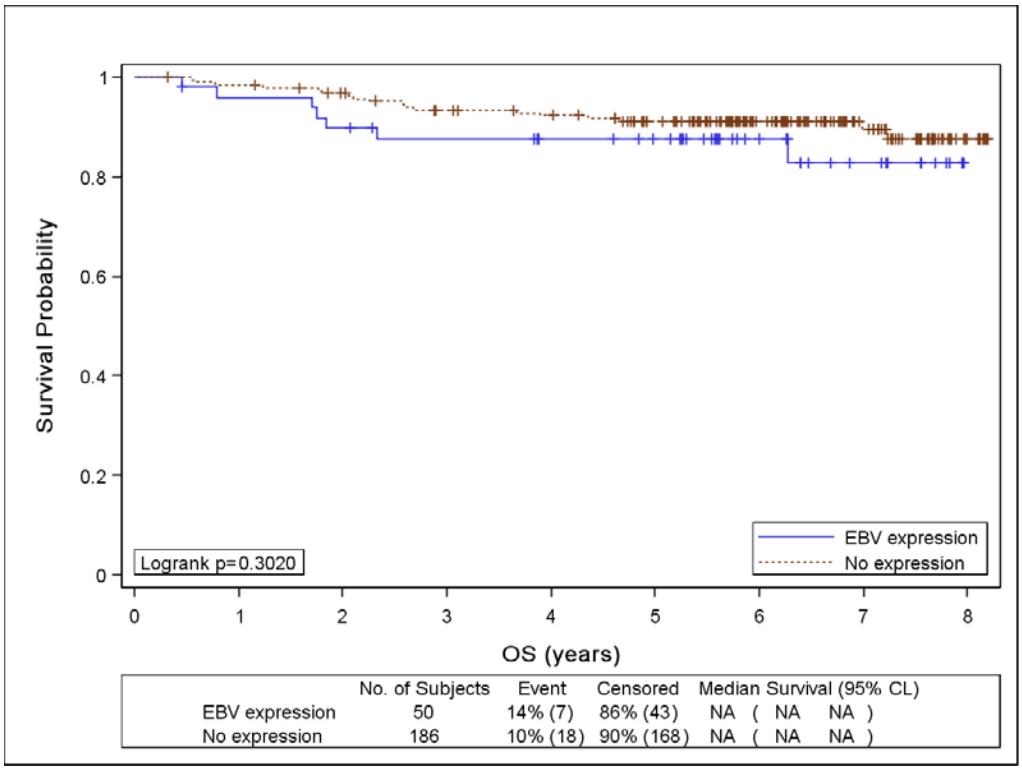


Figure 20: A) Survie sans progression ; B) Survie globale des patients présentant un stade III-IV en fonction du génotype de l'*IL10*-819C>T

A noter que, puisqu'il s'agissait d'une étude exploratoire, nous n'avons pas fait de correction statistique par rapport au nombre de tests statistiques réalisés (type Bonferroni par exemple) d'autant que le niveau de significativité est déjà très faible. Si nos résultats sur une cohorte plus importante s'avéraient exacts, cela pourrait être cohérent avec les études biologiques où l'haplotype ATA en -1082, -819, -592 de l'*IL10* semble corréler à une sécrétion basse d'IL-10 et aux résultats cliniques de la série d'Habermann et al. où les patients présentant un LDGCB porteurs de l'haplotype inverse TGCC (-3575, -1082, -819, -592) ont une survie globale plus courte (HR = 2.44 *P* = .003).[221] Ces résultats sont cependant complexes à interpréter puisque les patients porteurs de l'haplotype TATA dans cette dernière étude ont aussi une survie globale plus courte (HR = 1.59 *P* = .04) par rapport à la population de référence (Haplotype CCAT). A noter que les patients porteurs de LH de notre étude ou de LDGCB dans l'étude de la Mayo Clinic, ont une distribution pour chaque haplotype relativement similaire. Par rapport aux dosages plasmatiques des cytokines, on ne retrouve pas de corrélation entre les taux d'IL-10 et les différents génotypes des SNPs étudiés. Holaus et al. trouvent pour 95 patients porteurs de LH avec le génotype AA en -592 et GG en -1082 que les taux plasmatiques d'IL-10 sont plus élevés.[284] L'analyse par rapport au statut EBV, montre que les résultats obtenus sur des SNPs de l'IL-10 sont significatifs dans la cohorte de patients EBV-. Ces résultats doivent cependant être analysés avec prudence. En effet, le statut EBV a été obtenu de façon rétrospective avec des techniques différentes (EBER, LMP1) et le nombre de patients de la cohorte EBV+ est faible. On peut très bien imaginer qu'avec un nombre de patients EBV+ plus important les différences statistiques soient également retrouvées. Par contre, la distribution des génotypes des différents SNPs de l'*IL10* est similaire pour les patients EBV+ et - et les taux d'IL-10 plasmatiques ne sont pas statistiquement différents entre ces deux populations. A noter que la survie globale et la survie sans progression des patients EBV+ et – ne sont pas globalement différentes (Figure N°20). On retrouve par contre une tendance à un pronostic plus défavorable dans la population EBV+ après 50 ans, comme cela a été démontré dans l'étude de Diepstra et al. mais il n'y a pas de différence d'expression de l'EBV avant et après 50 ans (Figure N°21). Cette partie de notre travail sera présentée en poster au congrès Américain d'Hématologie (ASH) 2010 **(Abstract en Annexe 2)**.

A.



B.

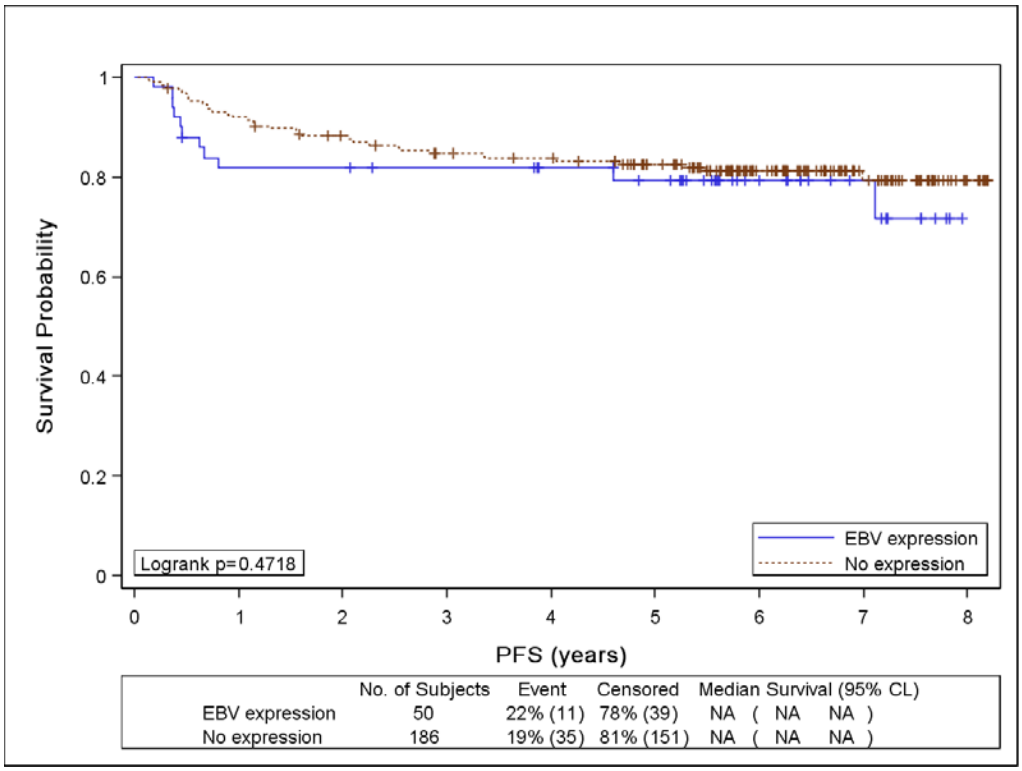


Figure 21: Différence de (A) survie globale et de (B) Survie sans progression des LH en fonction du statut EBV de la tumeur

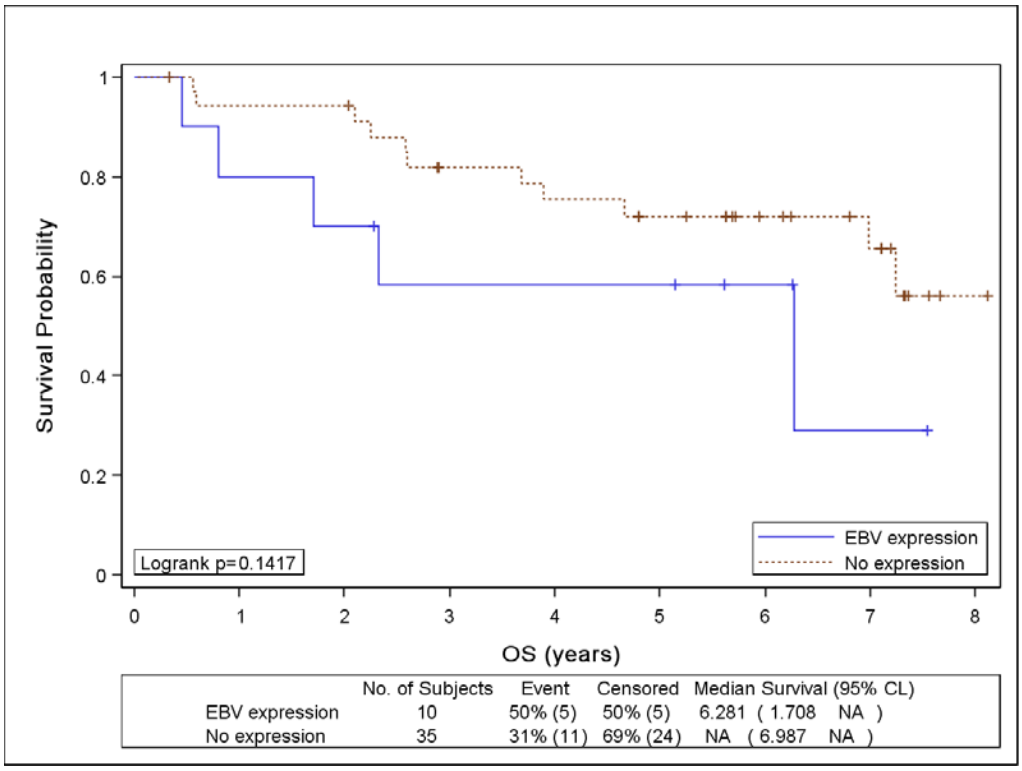


Figure 22: Différence de survie globale pour les patients de plus de 50 ans en fonction du statut EBV de la tumeur

A noter que pour les résultats des SNPs de l'*IL10* dans les sous-groupes des stades avancés et les tumeurs EBV-, ce sont les génotypes hétérozygotes (AC en -592 et CT en -819, ces SNPs étant en LD) qui sont les génotypes délétères. L'analyse globale des SNPs du promoteur de l'*IL10* (haplotype) montre qu'ils n'ont aucun impact pronostique sur la survie globale et la survie sans progression.

Dans ce travail, nous montrons également que le SNP au niveau du *TNFA*-308G>C est un élément pronostic pour les 189 patients porteurs de LH EBV-, alors que ce résultat n'est pas retrouvé sur la cohorte entière des 464 patients étudiés pour ce SNP. Les 37 patients porteurs du génotype hétérozygote AG ont la survie globale plus courte par rapport aux patients homozygotes GG (84% vs. 68% à 6 ans, $P = .03$) (Figure N°22). Ces résultats pourraient aller dans le sens d'un pronostic plus défavorable de l'allèle A du *TNF*-308 comme cela a été montré dans les LDGCB.[216]

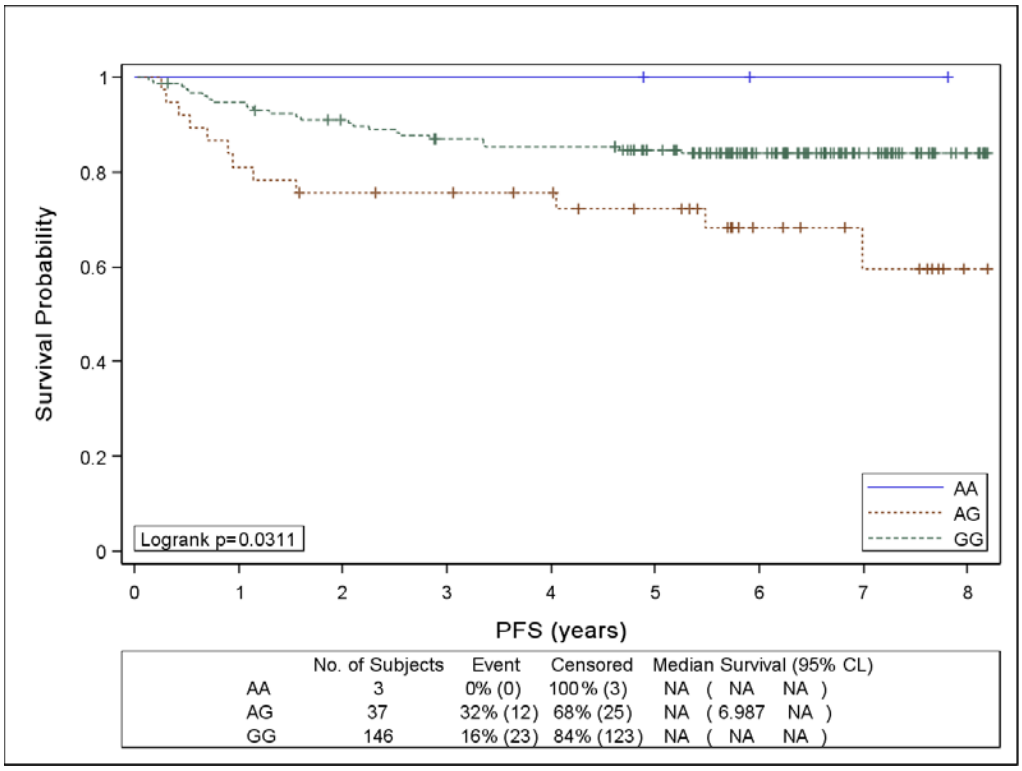
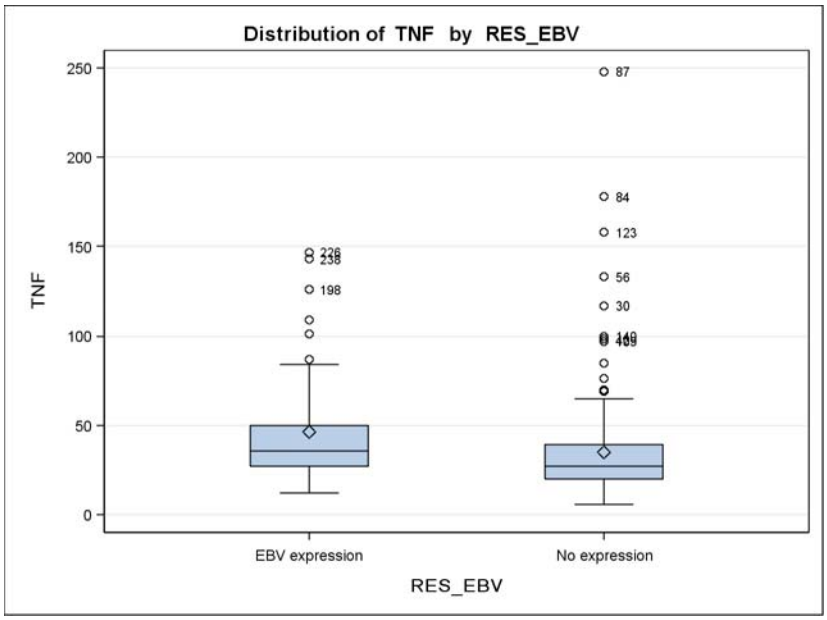


Figure 23: Survie sans progression des patients EBV- en fonction du génotype du TNF-308G>A

Comme pour l'*IL10*, la distribution des génotypes du *TNFA*-308G>C n'est pas différente entre la population EBV+ et EBV-. Par contre, les taux plasmatiques de TNFA et de TNF-R2 sont significativement plus élevés chez les patients ayant une tumeur EBV+ (Figure N°23).

A.



B.

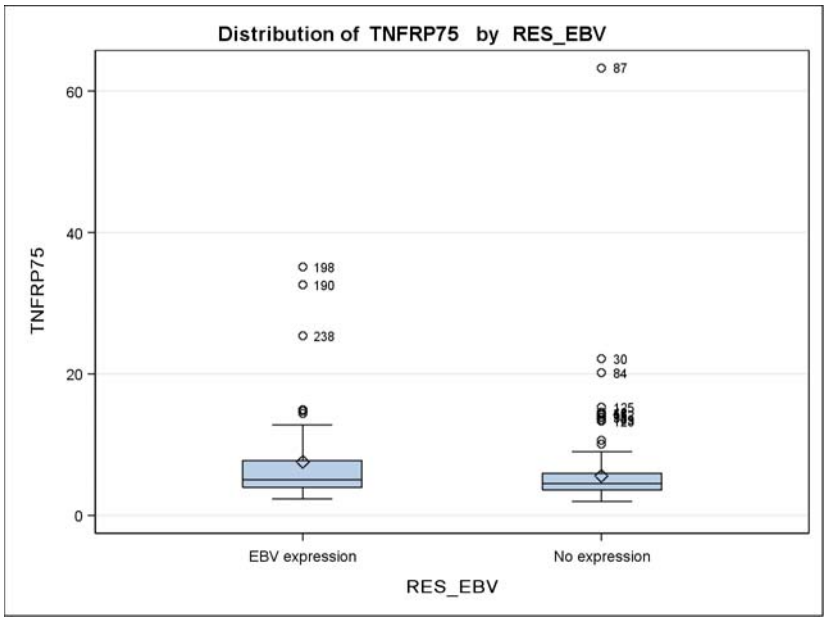


Figure 24 : Différence des dosages plasmatiques du TNFA (A) et de TNF-R2 (B) entre les patients porteurs de LH EBV+ et –

(*P* = .004 pour TNF et *P* = .01, Test de Kruskal-Wallis)

Ces résultats, s'ils étaient confirmés, en faveur d'un effet différentiel des SNPs de l'*IL10* et du *TNFA* entre les LH EBV+ et -, iraient dans le sens d'un impact différent du fond génétique ''immun'' vis-à-vis de l'infection à EBV. Helminen et al. montrent ainsi que les donneurs de sang séronégatifs pour EBV présentent plus fréquemment l'allèle G en position -1082 au niveau du promoteur de l'*IL10*.[285] Dans les tumeurs EBV+, on retrouve une expression plus importante d'IL-10 par rapport aux tumeurs EBV- (66% vs. 16%).[98] Le micro-environnement semble donc différent entre les tumeurs EBV + et – avec une expression plus importante de certaines chimiokines comme CCL3, CCL5, CCL20 et CXCL10.[176,177,286] La surexpression de CCL20 dans le micro-environnement serait induite par EBNA1 qui activerait le facteur transcriptionnel AP1.[178] Le promoteur de CCL20 présenterait des sites de fixation d'AP1. La chimiokine CCL20 aurait la capacité de faire migrer les LTreg via le récepteur CCR6. Les LTreg permettraient une inhibition de la réponse immune anti-EBV, avec notamment la sécrétion d'IL-10 et TGF-B. Dans l'étude de Alvaro et al. il n'est pas retrouvé de différence au niveau de l'infiltration de LTreg entre les tumeurs EBV+ et EBV-, mais les sous-types de LTreg pourraient être différents entre les LH EBV+ et EBV-.[52,287] Cela pourrait expliquer les études contradictoires concernant l'impact pronostique des LTreg dans les LH.[52,53,288,289] Le ratio par rapport aux autres cellules immunes semble important à prendre en compte.[52,290]. Chetaille et al. confirment par une étude du profil d'expression des gènes sur cellules de RS micro-disséquées que les LH EBV+ présentent un profil différent des tumeurs EBV-.[143] Est ainsi mis en évidence une signature ''anti-virale'' avec l'expression d'*INFG*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11* capable de favoriser une réponse Th1. Cette réponse immunitaire semble cependant inefficace à l'élimination des cellules tumorales et n'apporterait donc pas un pronostic meilleur aux patients. Des données plus récentes confirment une physiopathologie très différentes entre les LH EBV+ et – avec la mise en évidence de mutations sur le gène suppresseur de tumeur *TNFAIP3* codant pour A20 un inhibiteur de la voie NFkB, majoritaire dans les LH EBV-.[291] L'activation de la voie NFkB ne nécessite donc pas dans le cadre des LH EBV+ de mutations sur les inhibiteurs de cette voie, de même que l'expression aberrante de récepteur de type tyrosine kinase que l'on retrouve majoritairement dans les LH EBV-.[291,292]

Est-ce que nos résultats montrant une spécificité de l'impact des SNPs de l'*IL10* et du *TNFA* dans les LH EBV-, peuvent s'inscrivent dans ces différences physiopathologiques entre les LH EBV+ et - ? On peut faire l'hypothèse que les différences de micro-environnement créées par la présence d'EBV (mécanismes autocrines et paracrines différents vis-à-vis de l'IL-10 et du TNFA) rendent moins influent les polymorphismes génétiques des gènes de cytokines des

patients qui ne sont alors mis en évidence que dans le cadre des LH EBV-. Cette hypothèse nécessite de toute façon une confirmation des résultats obtenus sur une autre série de patients avec une relecture anatomo-pathologique de l'ensemble des marqueurs d'EBV, notre série ayant un taux de LH EBV+ (20%) inférieur aux séries antérieures (revue de la littérature par Souza et al.[293]).

L'étude du SNP de l'*IL12* dans une série de 259 patients confirme la différence de distribution des génotypes par rapport à une population générale, ceci par rapport à des témoins dans l'étude de Cozen et al. et après vérification de l'équilibre de HW dans notre étude.[166] Nos résultats ont été vérifiés par deux techniques Taqman et le séquençage de la partie 3'UTR comprenant le SNP+1188A>C permettant de valider nos résultats pour 18 des 20 patients de génotype CC. Par contre, ce SNP n'a aucune valeur pronostique par rapport au devenir des patients. L'hypothèse émise par Cozen et al. serait que des taux abaissés d'IL-12, cytokine qui favorise l'activation de l'immunité innée et adaptative, pourraient permettre le développement des LH. Par contre les génotypes n'ont pas pu être corrélés aux dosages plasmatiques d'IL-12, ce que nous prévoyons de faire à partir des sérums des patients (dosage de l'IL-12p40, p70, IL-23, IL-17A en cours en collaboration avec le service d'immunologie du CHU Dijon). Compte tenu de l'importance de l'IL-12 dans la stimulation d'activation de la réponse Th1 et sa possible implication dans la physiopathologie des LH, des études thérapeutiques avec injection IV ou SC d'IL-12 ont été réalisées mais sans réelle efficacité dans les LH en rechutes multitraitées ou réfractaires.[167] L'ensemble des données sur l'IL-12 dans les LH en faveur d'un déficit somatique via les polymorphismes ou acquis par une faible exposition antigénique dans l'enfance (théorie dit ''hygiénique'')[193] chez certains patients peuvent amener à ré-étudier la possibilité de traitement par IL-12 notamment avec de nouvelle formulation (liposome) pour éviter les effets secondaires des ''anciennes'' formulations (asthénie, fièvre, nausées, vomissements, céphalées, hyperglycémie, pancytopénie).[294] La présence d'un récepteur à l'IL-12 fonctionnel est majeure et comme nous l'avions vu dans la revue de la littérature, l'expression de la chaîne β du récepteur à l'IL-12 peut être diminuée par un mécanisme épigénétique de méthylation de l'ADN. L'utilisation d'agents déméthylants pourraient permettre l'expression d'un récepteur à l'IL-12 fonctionnel, et permettre ensuite l'utilisation d'IL-12.[162] Les agents déméthylants pourraient également permettre la réexpression d'autres gènes dans les cellules de RS dont l'expression est réduite par méthylation.[295,296]

L'absence de résultats significatifs pour les autres SNPs peut être en lien avec un nombre non suffisant de patients. D'autre part, nos résultats sont exprimés par rapport à la survie globale en sachant que certains patients sont décédés de tumeurs secondaires ou de complications tardives de traitement. Il est toujours difficile de sélectionner à priori les patients, en sachant que le lien entre les causes de décès autres que le lymphome et les SNPs n'est pas forcément fortuit. Nous avons tout de même réalisé une étude en ''survie spécifique'' qui retrouve les mêmes résultats. Notre hypothèse de départ a été de choisir des SNPs situés au niveau de site de régulation des gènes de cytokines pouvant donc influencer l'expression de la cytokine. Compte tenu de la complexité des interactions entre les différents types cellulaires au niveau du micro-environnement, il serait nécessaire d'avoir des données plus globales du profil des SNPs ''immuns'' pour voir si celui-ci influence réellement le pronostic des patients. Cela pourrait nécessiter pas exemple d'élargir les recherches sur les SNPs des chimiokines dont le rôle est majeur dans les interactions entre les cellules de RS et les cellules réactionnelles. Plus récemment, ont également été mis en évidence des SNPs sur le gène de l'IL-17 dont le rôle dans les LH pourrait être étudié.[297] D'autres SNPs que ceux des gènes des effecteurs immuns ont pu être étudiés dans les LH. Ainsi, l'analyse des polymorphismes des enzymes de détoxification et du métabolisme des produits de chimiothérapie a montré que le pronostic des patients pouvait être estimé en fonction des polymorphismes au niveau des gènes d'enzyme de détoxification.[298-300] Dans le cadre des lymphomes, des études épidémiologiques ou cliniques ont montré l'importance des SNPs des gènes de l'apoptose, du cycle cellulaire et enzymes de réparation de l'ADN, du métabolisme oxydatif et des facteurs de transcription comme IRF4.[202,301-306] Récemment, il a été montré qu'un SNP au niveau de gène codant pour des protéines impliquées dans les mécanismes épigénétiques comme EZH2 pourrait avoir une influence pronostique dans le cadre de LF (communication du Pr J. Fitzgibbon).

9. Perspectives

Sur cette collection d'ADN avec des données cliniques actualisées, il est prévu de réaliser une étude pan-génome en collaboration avec le Centre National de Génétique (programme GWASH). Actuellement, 365 échantillons ayant une quantité nécessaire d'ADN pour cette analyse globale et des validations éventuelles, sont disponibles. Il est possible d'élargir cette collection avec des ADN de patients des centres d'Hématologie de Lyon et de Dijon. Cette collection pourra également permettre des collaborations avec des projets de recherches épidémiologiques sur les gènes de susceptibilité aux LH, pour la constitution de cohorte importante de patients. Il sera concevable de valider les résultats de la première étude de susceptibilité ''pangénome'' des LH, publiée récemment.[188] Il pourrait également être intéressant de se focaliser sur les cas familiaux de LH, pour mettre en évidence de variants rares ayant une pénétrance plus importante qui sont difficile à identifier par des études pangénomes. Dans le cadre des LDGCB traités dans le cadre de programme thérapeutique du GELA, un programme est en cours (étude GOAL), pour d'une part permettre la réalisation d'une étude pangénome et d'autre part permettre des études plus ciblées dans le cadre des SNPs immuns (cytokines et FcGR), des SNPs des facteurs de transcription et des SNPs des enzymes de détoxification. A noter que parallèlement à cette collection d'ADN somatique sur les patients inclus dans les programmes thérapeutiques 2003 du GELA, les anomalies tumorales acquises seront également analysées dans le cadre d'un autre programme biologique transversale (Programme GHEDI). Dans le cadre d'études génomiques sur la tumeur, la connaissance des variations génomiques de l'hôte prend tout son intérêt pour distinguer les anomalies acquises des variations génétiques héréditaires, pour ainsi éviter des biais d'analyse et d'interprétation sur les pertes et/ou aux gains de matériel génétique mis en évidence.[307] Une collection d'ADN a également été constituée dans le cadre d'un programme thérapeutique des LF (Protocole PRIMA) avec comme premier travail en cours, l'analyse de l'impact pronostique des polymorphismes des gènes de récepteur au fragment Fc. Ces programmes d'approches différentes permettront dans un cadre protocolaire, de mieux apprécier le rôle du fond génétique des patients par rapport aux données pronostiques classiques mais surtout par rapport à l'ensemble des données biologiques sur la tumeur. Dans ce sens, l'hypothèse de notre étude d'un effet différentiel en fonction du statut EBV des SNPs de l'*IL10* et du *TNFA* dans les LH devra être rigoureusement validée.

10. Conclusions

En 1998, quand l'étude biologique Hodgkin du GELA a débuté, l'objectif était de corréler les données du TNFA plasmatique au SNP en -308 au niveau du promoteur du gène et de voir son impact pronostique. Les résultats apportés par notre étude peuvent apparaître décevants dans le sens où l'on n'identifie pas un marqueur pronostique *stricto sensu* indépendant par exemple des données pronostiques classiques. A ce titre, les données biologiques issues de la physiopathologie des LH sont extrêmement difficiles à utiliser en situation clinique et la dernière étude publiée sur l'impact pronostique du nombre de macrophages au niveau du micro-environnement devra être validée par d'autres études.[8] Les données issues des études pangénomes sont finalement extrêmement récentes et pourront certainement permettre d'apporter des informations nouvelles sur des voies biologiques non encore explorées et des voies biologiques communes entre des pathologies d'expressions cliniques très différentes comme la PR et la SEP.[229] Par rapport à ce dernier concept, il pourrait être extrêmement intéressant d'analyser les polymorphismes génétiques ''immuns'' des patients aux antécédents de maladies auto-immunes présentant un diagnostic de lymphome pour mettre en évidence des spécificités génétiques par comparaison aux patients porteurs de lymphome sans terrain dysimmunitaire sous-jacent. Les études pangénomes dans les LDGCB (programme GOAL) ou dans les LH (programme GWASH) sur le plan épidémiologique (étude de susceptibilité) ou clinique pourront sûrement apporter des informations nouvelles sur la physiopathologie de ces tumeurs. Sur la série de patients porteurs de LDGCB traités dans le cadre de protocole thérapeutique du GELA (incluant des traitements par anticorps anti-CD20 et chimiothérapie) il sera extrêmement intéressant de vérifier la pertinence du score pronostique d'Habermann basé sur les SNPs de l'*ILA*, *IL8RB*, *IL4R*, *TNFA*, *IL10*.[221] Si ce score peut être validé, des analyses fonctionnelles en rapport à ces SNPs et des études de corrélation par rapport aux données biologiques obtenues sur la tumeur seront importantes à réaliser, en séparant par exemple dans un premier temps les LDGCB GC ou non GC. Même si les études pangénomes peuvent permettre la mise en évidence de ''points chauds'' au niveau du génome des patients, l'évaluation d'un nombre limité de SNPs ayant des conséquences fonctionnelles au niveau de gènes impliqués dans des voies oncogéniques importantes dans les LNH, reste une approche valide. Une étude récente publiée dans Blood montre ainsi que la présence d'un SNP (rs10190751) au niveau du gène de la protéine c-FLIP impliquée dans la régulation de l'apoptose, est à l'origine, en fonction des variants, de la synthèse d'isoformes de tailles différentes, d'un taux de transcription différent. La susceptibilité aux LF semble différente en fonction de ce SNP.[308] Parallèlement, cela nécessitera le développement d'outils

bioinformatiques nécessaires à l'analyse de données de plus en plus complexes. Dans le cadre de ce travail sur l'étude des SNPs ''immuns'', nous avons vu combien il est difficile d'interpréter les résultats d'un SNP par rapport à un autre compte tenu probablement de leur interdépendance, d'effets différents en fonction du tissu étudié et de la redondance de fonction des cytokines. La plupart des modèles statistiques utilisés vont analyser étape par étape la ''significativité'' d'une seule cible. Pour mieux apprécier l'effet d'un ensemble de SNPs et des gènes ou ils sont situés, il est possible de développer de nouveau modèle statistique comme celui proposé par Ma et al.,[309] (CTGDR, pour Clustering Threshold Gradient Directed Regularization) où les effets conjoints des SNPs et des gènes sont pris en compte. Ce modèle a pu être appliqué aux lymphomes, permettant de définir des scores pronostiques cliniques. Enfin, ce type d'étude nécessitera de poursuivre la constitution de collection d'ADN dans un cadre réglementaire, ancillaire à des programmes thérapeutiques.

11. Annexes

Annexe N°1

Interleukin-12 germline polymorphism and outcome of patients with Hodgkin lymphoma: A prospective study of the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte

Herve Ghesquieres, Olivier Casasnovas, Marion Fournier, **David Cox, Pauline Brice**, **Franck Morschhauser**, **Aurélie Verney**, **Catherine Sebban, Vincent Ribrag**, **Isabelle Gaillard**, **Pierre Feugier, Herve Tilly, Christophe Ferme, Gilles Salles.**

Background. Although Hodgkin lymphoma (HL) is a highly curable malignancy, about 15% and 30% of patients with respectively localized or disseminated disease do not respond or relapse after initial treatment. Several scoring systems using conventional biological and clinical parameters have been developed for limited and advanced stages in order to adapt the therapeutic strategy. However, the identification of patients with adverse outcome needs to be improved. Cytokines have an important role in the pathogenesis of HL. Among them, interleukin-12 had an important role in stimulating cytotoxic lymphocyte and natural killer cells. A recent study (Cozen et al. Blood 2008) showed that IL-12 level of HL patients and their twins was lower than matched controls and a IL-12 polymorphim (rs3212227) that modulate IL-12 expression was associated with an increase risk of HL.

Aims. In this context, we evaluated the influence of this IL-12 germline polymorphism on response to treatment and outcome in patients with HL.

Methods. Between 1998 and 2002, we prospectively investigated the prognostic role of plasma cytokines and soluble receptors in Hodgkin lymphoma patients (Casasnovas et al. JCO 2007). A sample was collected at diagnosis specifically to investigate single nucleotide polymorphisms (SNPs) in cytokine genes. DNA was extracted from venous blood samples. Genotyping experiments of *IL12* rs3212227 (3'UTR +1188A>C) were performed in duplicate using Taqman™ technology (ABI Prism 7000, Applied Biosystems) in 259 patients. We estimated the prognostic value of this SNP for response to treatment, relapse and overall survival (OS).

Results. Among the 259 studied patients, 25% were older than 45 years and 56% were male. At diagnosis, 187 patients (72%) were in Ann Arbor stage I-II and 116 (45%) presented with B symptoms. Histology was nodular sclerosis in 208 patients (80%). Treatment consisted of 4 to 6 courses of anthracycline-based chemotherapy (CT) followed by involved-field radiotherapy for stages I-II and 8 courses of anthracycline-based CT for stages III-IV.

Complete response (CR) and uncertain CR (uCR) were observed in 228 patients (88%), partial response in 11 (4%) and stable and progressive disease in 20 (8%). Relapse occurred in 46 patients (18%) and 25 patients (10%) died, 18 of whom of HL. After a median follow-up of 4.2 years months, the 4-year progression free survival (PFS) and OS were 81.7% and 92.2%, respectively. Genotypes of *IL12* +1188A>C were AA, AC and CC in 166 (64%), 73 (28%) and 20 (8%) patients, respectively. These distributions appear significantly different from what observed in the general population ($P<0.005$). No correlation was observed between initial characteristics of HL patients and IL-12 genotyping. Regarding treatment response, no specific IL-12 genotype was associated with a better CR or influenced OS and PFS.

Conclusions. Whether HL patients presented a specific *IL12* genotype distribution as suggested by our study and Cozen series need to be confirmed. However, we didn't observe in this large series of HL patients with a particularly favorable outcome that this SNP predict response to initial treatment or outcome of patients. The role of host immunogenetics as prognostic factors in HL deserved others studies.

Annexe N°2

Comparison of clinical characteristics, plasma cytokine signature, cytokine gene polymorphisms and outcome between EBV positive and negative Hodgkin Lymphoma: a study of the Groupe des Lymphomes de l'Adulte (GELA)

Hervé Ghesquières, Olivier Casasnovas, Marion Fournier, Pauline Brice, Richard Delarue, Franck Morschhauser, Catherine Sebban, Vincent Ribrag, Isabelle Gaillard, Pierre Feugier, Aspasia Stamatoullas, Christophe Ferme and Gilles Salles

Background: Hodgkin Lymphoma (HL) has a remarkable pathogenesis with rare neoplastic cells surrounded by numerous reactive cells that interact with cytokines, chemokines and soluble receptors. EBV is found in about 40% of HL. Recent clinical series showed that prognostic between EBV-positive and negative could be different especially in patients older than 50 years old, with a worse prognosis for patients with EBV-positive tumors (Diepstra et al. JCO 2009). Gene expression profile analysis of HL tumors are also in favor of different pathogenesis between EBV-positive and negative tumors. In this context, we assessed whether plasma cytokine pattern and cytokine gene polymorphisms could be different regarding EBV status and compared the clinical characteristics and outcome of patients according to EBV status in a series of 242 HL patients.

Patients and Methods: the GELA conducted between 1998 and 2002, a prospective study to assess the prognostic role at diagnosis of plasma levels of TNFA, its soluble receptors TNF-R1, TNF-R2, and IL-10, IL-6, IL-1B, IL-1Ra, sCD30 (Casasnovas et al. JCO 2007). This study was also designed to investigate the role of polymorphisms (SNP) in cytokine genes of *IL10* (Four SNPs), *TNFA, IL6, IL1B*, *IL1RN*, *INFG*, *CCL17 and IL12.* EBV status of classical HL samples could be obtained retrospectively for 242 patients.

Results: EBV status was obtained according to the immunohistochemistry detection of latent membrane protein-1 (LMP-1) in 186 patients (77%), to EBER in situ hybridation results in 48 patients (20%) or others techniques in the 8 remaining patients (3%). EBV status was considered as positive and negative for 53 (21%) and 189 (79%) patients, respectively. Comparison of clinical characteristics between EBV-negative and positive HL showed some differences in term of sex-ratio and histological subtypes with a higher proportion of male in EBV-positive cohort (81% vs. 54, $P < .01$) and less nodular sclerosis subtypes (74% vs. 85% $P = .05$). Erythrocyte sedimentation rate and white-cell count were more frequently increased in EBV-negative population but the distribution of prognostic categories according to the

Hasenclever score was not different between the two cohorts. The TNFA and TNF-R2 plasma levels were significantly higher for EBV-positive compared to EBV-negative HL (P = .03) but no difference was observed for others cytokines (TNF-R1, IL-10, IL-6, IL-1Ra, sCD30). For the eleven studied SNPs, no difference in term of genotype distribution was observed between EBV-positive and negative tumors. The 6-year overall survival (OS) (91% vs. 88% P = .3) and progression free survival (PFS) (81% vs. 79% P = .3) were not statistically different between the EBV-negative and positive cohorts. Analysis of outcome by age groups, showed a non-significant trend for a worse 6-year OS (72.1% vs. 58.3% P = .14) and 6-year PFS (57.2% vs. 48% P = .42) for EBV-positive HL after 50 years old with a similar proportion of EBV-positive and negative HL tumors before and after 50 years old.

Conclusions: In this study, we confirm difference of histological subtype distribution between EBV-positive and negative HL. A difference of plasma levels of TNFA and TNF-R2 was observed suggesting a different inflammatory profile between EBV-positive and negative EBV HL but genotype distribution of germline cytokine gene polymorphisms was not different. In this cohort of HL with a global favorable outcome, a trend for a worse prognosis became apparent for older patients with EBV-positive HL.

12. Références

(1) Hess G, Herbrecht R, Romaguera J et al. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. J Clin Oncol. 2009;27:3822-3829.

(2) Coiffier B, Lepage E, Briere J et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. N Engl J Med. 2002;346:235-242.

(3) Barrans S, Crouch S, Smith A et al. Rearrangement of MYC is associated with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated in the era of rituximab. J Clin Oncol. 2010;28:3360-3365.

(4) Copie-Bergman C, Gaulard P, Leroy K et al. Immuno-fluorescence in situ hybridization index predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP: a GELA study. J Clin Oncol. 2009;27:5573-5579.

(5) Dave SS, Wright G, Tan B et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. N Engl J Med. 2004;351:2159-2169.

(6) Glas AM, Knoops L, Delahaye L et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. J Clin Oncol. 2007;25:390-398.

(7) Lenz G, Wright G, Dave SS et al. Stromal gene signatures in large-B-cell lymphomas. N Engl J Med. 2008;359:2313-2323.

(8) Steidl C, Lee T, Shah SP et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med. 2010;362:875-885.

(9) Altieri A, Bermejo JL, Hemminki K. Familial risk for non-Hodgkin lymphoma and other lymphoproliferative malignancies by histopathologic subtype: the Swedish Family-Cancer Database. Blood. 2005;106:668-672.

(10) Smedby KE, Baecklund E, Askling J. Malignant lymphomas in autoimmunity and inflammation: a review of risks, risk factors, and lymphoma characteristics. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15:2069-2077.

(11) Casasnovas RO, Mounier N, Brice P et al. Plasma cytokine and soluble receptor signature predicts outcome of patients with classical Hodgkin's lymphoma: a study from the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol. 2007;25:1732-1740.

(12) Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. Nat Rev Genet. 2009;10:241-251.

(13) Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. Science. 2005;307:1434-1440.

(14) Volik S, Raphael BJ, Huang G et al. Decoding the fine-scale structure of a breast cancer genome and transcriptome. Genome Res. 2006;16:394-404.

(15) Cheung VG, Spielman RS. The genetics of variation in gene expression. Nat Genet. 2002;32 Suppl:522-525.

(16) Cheung VG, Spielman RS. Genetics of human gene expression: mapping DNA variants that influence gene expression. Nat Rev Genet. 2009;10:595-604.

(17) Conrad DF, Hurles ME. The population genetics of structural variation. Nat Genet. 2007;39:S30-S36.

(18) Duerr RH, Taylor KD, Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. Science. 2006;314:1461-1463.

(19) Nair RP, Duffin KC, Helms C et al. Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways. Nat Genet. 2009;41:199-204.

(20) Stadler ZK, Thom P, Robson ME et al. Genome-wide association studies of cancer. J Clin Oncol. 2010;28:4255-4267.

(21) Orr N, Chanock S. Common genetic variation and human disease. Adv Genet. 2008;62:1-32.

(22) Price AL, Zaitlen NA, Reich D, Patterson N. New approaches to population stratification in genome-wide association studies. Nat Rev Genet. 2010;11:459-463.

(23) Gorlov I, Gorlova O, Frazier M, Spitz M, Amos C. Evolutionary evidence of the effect of rare variants on disease etiology. Clin Genet. 2010.

(24) Bansal V, Libiger O, Torkamani A, Schork NJ. Statistical analysis strategies for association studies involving rare variants. Nat Rev Genet. 2010;11:773-785.

(25) Hollegaard MV, Bidwell JL. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, Supplement 3. Genes Immun. 2006;7:269-276.

(26) Kuppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009;491-496.

(27) Kuppers R, Rajewsky K, Zhao M et al. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91:10962-10966.

(28) Atkin NB. Cytogenetics of Hodgkin's disease. Cytogenet Cell Genet. 1998;80:23-27.

(29) Deerberg-Wittram J, Weber-Matthiesen K, Schlegelberger B. Cytogenetics and molecular cytogenetics in Hodgkin's disease. Ann Oncol. 1996;7 Suppl 4:49-53.

(30) Metkar SS, Naresh KN, Redkar AA et al. Expression of Fas and Fas ligand in Hodgkin's disease. Leuk Lymphoma. 1999;33:521-530.

(31) van Houdt IS, Muris JJ, Hesselink AT et al. Expression of c-FLIP is primarily detected in diffuse large B-cell lymphoma and Hodgkin's lymphoma and correlates with lack of caspase 8 activation. Histopathology. 2007;51:778-784.

(32) Mathas S, Lietz A, Anagnostopoulos I et al. c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. J Exp Med. 2004;199:1041-1052.

(33) Canioni D, Deau-Fischer B, Taupin P et al. Prognostic significance of new immunohistochemical markers in refractory classical Hodgkin lymphoma: a study of 59 cases. PLoS One. 2009;4:e6341.

(34) Sup SJ, Alemany CA, Pohlman B et al. Expression of bcl-2 in classical Hodgkin's lymphoma: an independent predictor of poor outcome. J Clin Oncol. 2005;23:3773-3779.

(35) Feuerborn A, Moritz C, Von Bonin F et al. Dysfunctional p53 deletion mutants in cell lines derived from Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma. 2006;47:1932-1940.

(36) Maggio EM, Stekelenburg E, Van den BA, Poppema S. TP53 gene mutations in Hodgkin lymphoma are infrequent and not associated with absence of Epstein-Barr virus. Int J Cancer. 2001;94:60-66.

(37) Montesinos-Rongen M, Roers A, Kuppers R, Rajewsky K, Hansmann ML. Mutation of the p53 gene is not a typical feature of Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. Blood. 1999;94:1755-1760.

(38) Cabannes E, Khan G, Aillet F, Jarrett RF, Hay RT. Mutations in the IkBa gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for IkappaBalpha. Oncogene. 1999;18:3063-3070.

(39) Emmerich F, Meiser M, Hummel M et al. Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. Blood. 1999;94:3129-3134.

(40) Emmerich F, Theurich S, Hummel M et al. Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. J Pathol. 2003;201:413-420.

(41) Jungnickel B, Staratschek-Jox A, Brauninger A et al. Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. J Exp Med. 2000;191:395-402.

(42) Mathas S, Johrens K, Joos S et al. Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. Blood. 2005;106:4287-4293.

(43) Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. J Exp Med. 2009;206:981-989.

(44) Joos S, Kupper M, Ohl S et al. Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. Cancer Res. 2000;60:549-552.

(45) Weniger MA, Melzner I, Menz CK et al. Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation. Oncogene. 2006;25:2679-2684.

(46) Kapp U, Yeh WC, Patterson B et al. Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. J Exp Med. 1999;189:1939-1946.

(47) Renne C, Willenbrock K, Martin-Subero JI et al. High expression of several tyrosine kinases and activation of the PI3K/AKT pathway in mediastinal large B cell lymphoma reveals further similarities to Hodgkin lymphoma. Leukemia. 2007;21:780-787.

(48) Renne C, Willenbrock K, Kuppers R, Hansmann ML, Brauninger A. Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. Blood. 2005;105:4051-4059.

(49) Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I et al. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. EMBO J. 2002;21:4104-4113.

(50) Zheng B, Fiumara P, Li YV et al. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. Blood. 2003;102:1019-1027.

(51) 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;221:248-263.

(52) Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT et al. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. Clin Cancer Res. 2005;11:1467-1473.

(53) Kelley TW, Pohlman B, Elson P, Hsi ED. The ratio of FOXP3+ regulatory T cells to granzyme B+ cytotoxic T/NK cells predicts prognosis in classical Hodgkin lymphoma and is independent of bcl-2 and MAL expression. Am J Clin Pathol. 2007;128:958-965.

(54) Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. Cytokine Growth Factor Rev. 2009;20:43-59.

(55) Xerri L, Birg F, Guigou V et al. In situ expression of the IL-1-alpha and TNF-alpha genes by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease. Int J Cancer. 1992;50:689-693.

(56) Ruco LP, Pomponi D, Pigott R et al. Cytokine production (IL-1 alpha, IL-1 beta, and TNF alpha) and endothelial cell activation (ELAM-1 and HLA-DR) in reactive lymphadenitis, Hodgkin's disease, and in non-Hodgkin's lymphomas. An immunocytochemical study. Am J Pathol. 1990;137:1163-1171.

(57) Benharroch D, Prinsloo I, Apte RN et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Correlation with clinical and morphological "inflammatory" features. Eur Cytokine Netw. 1996;7:51-57.

(58) Hsu SM, Zhao X. Expression of interleukin-1 in Reed-Sternberg cells and neoplastic cells from true histiocytic malignancies. Am J Pathol. 1986;125:221-225.

(59) Ree HJ, Crowley JP, Dinarello CA. Anti-interleukin-1 reactive cells in Hodgkin's disease. Cancer. 1987;59:1717-1720.

(60) Lind H, Haugen A, Zienolddiny S. Differential binding of proteins to the IL1B -31 T/C polymorphism in lung epithelial cells. Cytokine. 2007;38:43-48.

(61) Chen H, Wilkins LM, Aziz N et al. Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context. Hum Mol Genet. 2006;15:519-529.

(62) Rogus J, Beck JD, Offenbacher S et al. IL1B gene promoter haplotype pairs predict clinical levels of interleukin-1beta and C-reactive protein. Hum Genet. 2008;123:387-398.

(63) Steinkasserer A, Koelble K, Sim RB. Length variation within intron 2 of the human IL-1 receptor antagonist protein gene (IL1RN). Nucleic Acids Res. 1991;19:5095.

(64) Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. Eur J Immunol. 1998;28:2598-2602.

(65) Rafiq S, Stevens K, Hurst AJ et al. Common genetic variation in the gene encoding interleukin-1-receptor antagonist (IL-1RA) is associated with altered circulating IL-1RA levels. Genes Immun. 2007;8:344-351.

(66) Reiner AP, Wurfel MM, Lange LA et al. Polymorphisms of the IL1-receptor antagonist gene (IL1RN) are associated with multiple markers of systemic inflammation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28:1407-1412.

(67) Kornman KS. Interleukin 1 genetics, inflammatory mechanisms, and nutrigenetic opportunities to modulate diseases of aging. Am J Clin Nutr. 2006;83:475S-483S.

(68) Berger P, McConnell JP, Nunn M et al. C-reactive protein levels are influenced by common IL-1 gene variations. Cytokine. 2002;17:171-174.

(69) Reveille JD, Sims AM, Danoy P et al. Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. Nat Genet. 2010;42:123-127.

(70) Sims AM, Timms AE, Bruges-Armas J et al. Prospective meta-analysis of interleukin 1 gene complex polymorphisms confirms associations with ankylosing spondylitis. Ann Rheum Dis. 2008;67:1305-1309.

(71) Harrison P, Pointon JJ, Chapman K, Roddam A, Wordsworth BP. Interleukin-1 promoter region polymorphism role in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of IL-1B-511A/G variant reveals association with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2008;47:1768-1770.

(72) Rezaii AA, Hoseinipanah SM, Hajilooi M et al. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and susceptibility to ischemic stroke. Immunol Invest. 2009;38:220-230.

(73) Crusius JB, Canzian F, Capella G et al. Cytokine gene polymorphisms and the risk of adenocarcinoma of the stomach in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST). Ann Oncol. 2008;19:1894-1902.

(74) Peleteiro B, Lunet N, Carrilho C et al. Association between cytokine gene polymorphisms and gastric precancerous lesions: systematic review and meta-analysis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010;19:762-776.

(75) Seruga B, Zhang H, Bernstein LJ, Tannock IF. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. Nat Rev Cancer. 2008;8:887-899.

(76) Fayad L, Cabanillas F, Talpaz M, McLaughlin P, Kurzrock R. High serum interleukin-6 levels correlate with a shorter failure-free survival in indolent lymphoma. Leuk Lymphoma. 1998;30:563-571.

(77) Preti HA, Cabanillas F, Talpaz M et al. Prognostic value of serum interleukin-6 in diffuse large-cell lymphoma. Ann Intern Med. 1997;127:186-194.

(78) Seymour JF, Talpaz M, Cabanillas F, Wetzler M, Kurzrock R. Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma. J Clin Oncol. 1995;13:575-582.

(79) Beck A, Pazolt D, Grabenbauer GG et al. Expression of cytokine and chemokine genes in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma: comparison with Hodgkin's disease. J Pathol. 2001;194:145-151.

(80) Foss HD, Herbst H, Oelmann E et al. Lymphotoxin, tumour necrosis factor and interleukin-6 gene transcripts are present in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of most Hodgkin's disease cases. Br J Haematol. 1993;84:627-635.

(81) Herbst H, Samol J, Foss HD, Raff T, Niedobitek G. Modulation of interleukin-6 expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells by Epstein-Barr virus. J Pathol. 1997;182:299-306.

(82) Hsu SM, Xie SS, Hsu PL, Waldron JA, Jr. Interleukin-6, but not interleukin-4, is expressed by Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease with or without histologic features of Castleman's disease. Am J Pathol. 1992;141:129-138.

(83) Jucker M, Abts H, Li W et al. Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. Blood. 1991;77:2413-2418.

(84) Fishman D, Faulds G, Jeffery R et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest. 1998;102:1369-1376.

(85) Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. J Biol Chem. 2000;275:18138-18144.

(86) Huth C, Illig T, Herder C et al. Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index. Ann Med. 2009;41:128-138.

(87) Kilpinen S, Hulkkonen J, Wang XY, Hurme M. The promoter polymorphism of the interleukin-6 gene regulates interleukin-6 production in neonates but not in adults. Eur Cytokine Netw. 2001;12:62-68.

(88) Ljungman P, Bellander T, Nyberg F et al. DNA variants, plasma levels and variability of interleukin-6 in myocardial infarction survivors: results from the AIRGENE study. Thromb Res. 2009;124:57-64.

(89) Samuel JM, Kelberman D, Smith AJ, Humphries SE, Woo P. Identification of a novel regulatory region in the interleukin-6 gene promoter. Cytokine. 2008;42:256-264.

(90) Smith AJ, D'Aiuto F, Palmen J et al. Association of serum interleukin-6 concentration with a functional IL6 -6331T>C polymorphism. Clin Chem. 2008;54:841-850.

(91) Schotte H, Schluter B, Rust S et al. Interleukin-6 promoter polymorphism (--174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. Rheumatology (Oxford). 2001;40:393-400.

(92) Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J, Pasternack A, Hurme M. Elevated interleukin-6 plasma levels are regulated by the promoter region polymorphism of the IL6 gene in primary Sjogren's syndrome and correlate with the clinical manifestations of the disease. Rheumatology (Oxford). 2001;40:656-661.

(93) Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. Nat Rev Immunol. 2010;10:170-181.

(94) Lech-Maranda E, Baseggio L, Bienvenu J et al. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2004;103:3529-3534.

(95) Blay JY, Burdin N, Rousset F et al. Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. Blood. 1993;82:2169-2174.

(96) Cortes JE, Talpaz M, Cabanillas F, Seymour JF, Kurzrock R. Serum levels of interleukin-10 in patients with diffuse large cell lymphoma: lack of correlation with prognosis. Blood. 1995;85:2516-2520.

(97) Stasi R, Zinzani L, Galieni P et al. Detection of soluble interleukin-2 receptor and interleukin-10 in the serum of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Identification of a subset at high risk of treatment failure. Cancer. 1994;74:1792-1800.

(98) Herbst H, Foss HD, Samol J et al. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. Blood. 1996;87:2918-2929.

(99) Turner DM, Williams DM, Sankaran D et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet. 1997;24:1-8.

(100) Crawley E, Kay R, Sillibourne J et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999;42:1101-1108.

(101) Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. Genes Immun. 2000;1:185-190.

(102) Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM et al. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. Hepatology. 1999;30:526-530.

(103) Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:9465-9470.

(104) Gibson AW, Edberg JC, Wu J et al. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2001;166:3915-3922.

(105) Hulkkonen J, Pertovaara M, Antonen J et al. Genetic association between interleukin-10 promoter region polymorphisms and primary Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum. 2001;44:176-179.

(106) Rieth H, Mormann M, Luty AJ et al. A three base pair gene variation within the distal 5'-flanking region of the interleukin-10 (IL-10) gene is related to the in vitro IL-10 production capacity of lipopolysaccharide-stimulated peripheral blood mononuclear cells. Eur Cytokine Netw. 2004;15:153-158.

(107) Yilmaz V, Yentur SP, Saruhan-Direskeneli G. IL-12 and IL-10 polymorphisms and their effects on cytokine production. Cytokine. 2005;30:188-194.

(108) Miteva L, Stanilova S. The combined effect of interleukin (IL)-10 and IL-12 polymorphisms on induced cytokine production. Hum Immunol. 2008;69:562-566.

(109) Suarez A, Castro P, Alonso R, Mozo L, Gutierrez C. Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. Transplantation. 2003;75:711-717.

(110) Mormann M, Rieth H, Hua TD et al. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. Genes Immun. 2004;5:246-255.

(111) Kube D, Rieth H, Eskdale J, Kremsner PG, Gallagher G. Structural characterisation of the distal 5' flanking region of the human interleukin-10 gene. Genes Immun. 2001;2:181-190.

(112) Platzer C, Fritsch E, Elsner T et al. Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. Eur J Immunol. 1999;29:3098-3104.

(113) Brenner S, Prosch S, Schenke-Layland K et al. cAMP-induced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. J Biol Chem. 2003;278:5597-5604.

(114) Larsson L, Rymo L, Berglundh T. Sp1 binds to the G allele of the-1087 polymorphism in the IL-10 promoter and promotes IL-10 mRNA transcription and protein production. Genes Immun. 2010;11:181-187.

(115) Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. Nat Rev Cancer. 2009;9:361-371.

(116) Hsu PL, Hsu SM. Production of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin by cells of Hodgkin's neoplastic cell lines HDLM-1 and KM-H2. Am J Pathol. 1989;135:735-745.

(117) Kretschmer C, Jones DB, Morrison K et al. Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin production in Hodgkin's disease. Am J Pathol. 1990;137:341-351.

(118) Valente FP, Tan C, Phipps M et al. TNF block haplotypes associated with conserved MHC haplotypes in European, Asian and Australian Aboriginal donors. Tissue Antigens. 2009;74:57-61.

(119) Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. N Engl J Med. 2007;357:1199-1209.

(120) Turner DM, Grant SC, Lamb WR et al. A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. Transplantation. 1995;60:1113-1117.

(121) Huizinga TW, Westendorp RG, Bollen EL et al. TNF-alpha promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. J Neuroimmunol. 1997;72:149-153.

(122) Knuchel MC, Spira TJ, Neumann AU et al. Analysis of a biallelic polymorphism in the tumor necrosis factor alpha promoter and HIV type 1 disease progression. AIDS Res Hum Retroviruses. 1998;14:305-309.

(123) Somoskovi A, Zissel G, Seitzer U et al. Polymorphisms at position -308 in the promoter region of the TNF-alpha and in the first intron of the TNF-beta genes and spontaneous and lipopolysaccharide-induced TNF-alpha release in sarcoidosis. Cytokine. 1999;11:882-887.

(124) Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin CE et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. Transplantation. 2001;72:1444-1450.

(125) Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M et al. Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. J Neuroimmunol. 1998;84:198-206.

(126) Pociot F, Wilson AG, Nerup J, Duff GW. No independent association between a tumor necrosis factor-alpha promotor region polymorphism and insulin-dependent diabetes mellitus. Eur J Immunol. 1993;23:3050-3053.

(127) Danis VA, Millington M, Hyland V et al. Increased frequency of the uncommon allele of a tumour necrosis factor alpha gene polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Dis Markers. 1995;12:127-133.

(128) Louis E, Franchimont D, Piron A et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. Clin Exp Immunol. 1998;113:401-406.

(129) Hutchings A, Guay-Woodford L, Thomas JM et al. Association of cytokine single nucleotide polymorphisms with B7 costimulatory molecules in kidney allograft recipients. Pediatr Transplant. 2002;6:69-77.

(130) Bouma G, Crusius JB, Oudkerk PM et al. Secretion of tumour necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha in relation to polymorphisms in the TNF genes and HLA-DR alleles. Relevance for inflammatory bowel disease. Scand J Immunol. 1996;43:456-463.

(131) Udalova IA, Richardson A, Denys A et al. Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. Mol Cell Biol. 2000;20:9113-9119.

(132) Baseggio L, Bartholin L, Chantome A et al. Allele-specific binding to the -308 single nucleotide polymorphism site in the tumour necrosis factor-alpha promoter. Eur J Immunogenet. 2004;31:15-19.

(133) Knight JC, Keating BJ, Rockett KA, Kwiatkowski DP. In vivo characterization of regulatory polymorphisms by allele-specific quantification of RNA polymerase loading. Nat Genet. 2003;33:469-475.

(134) Messer G, Spengler U, Jung MC et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. J Exp Med. 1991;173:209-219.

(135) Whichelow CE, Hitman GA, Raafat I, Bottazzo GF, Sachs JA. The effect of TNF*B gene polymorphism on TNF-alpha and -beta secretion levels in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and healthy controls. Eur J Immunogenet. 1996;23:425-435.

(136) Bayley JP, Ottenhoff TH, Verweij CL. Is there a future for TNF promoter polymorphisms? Genes Immun. 2004;5:315-329.

(137) Lee YH, Ji JD, Bae SC, Song GG. Associations between tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -308 and -238 G/A polymorphisms and shared epitope status and responsiveness to TNF-alpha blockers in rheumatoid arthritis: a metaanalysis update. J Rheumatol. 2010;37:740-746.

(138) O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A, Rahman P. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. Pharmacogenomics J. 2009;9:161-167.

(139) Pavy S, Toonen EJ, Miceli-Richard C et al. Tumour necrosis factor alpha -308G->A polymorphism is not associated with response to TNFalpha blockers in Caucasian patients with rheumatoid arthritis: systematic review and meta-analysis. Ann Rheum Dis. 2010;69:1022-1028.

(140) Cunninghame Graham DS, Graham RR, Manku H et al. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. Nat Genet. 2008;40:83-89.

(141) Plenge RM, Cotsapas C, Davies L et al. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. Nat Genet. 2007;39:1477-1482.

(142) Gerdes J, Kretschmer C, Zahn G et al. Immunoenzymatic assessment of interferon-gamma in Hodgkin and Sternberg-Reed cells. Cytokine. 1990;2:307-310.

(143) 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.

(144) 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;27:3815-3821.

(145) Pravica V, Asderakis A, Perrey C et al. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. Eur J Immunogenet. 1999;26:1-3.

(146) Pravica V, Perrey C, Stevens A, Lee JH, Hutchinson IV. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. Hum Immunol. 2000;61:863-866.

(147) Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ et al. Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? Liver Transpl. 2003;9:170-181.

(148) Nieters A, Brems S, Becker N. Cross-sectional study on cytokine polymorphisms, cytokine production after T-cell stimulation and clinical parameters in a random sample of a German population. Hum Genet. 2001;108:241-248.

(149) Cartwright N, Demaine A, Jahromi M, Sanders H, Kaminski ER. A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN-G gene polymorphisms in normal individuals. Transplantation. 1999;68:1546-1552.

(150) Cartwright NH, Keen LJ, Demaine AG et al. A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation. Transpl Immunol. 2001;8:237-244.

(151) Asderakis A, Sankaran D, Dyer P et al. Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation. Transplantation. 2001;71:674-677.

(152) Huang Y, Yang H, Borg BB et al. A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:985-990.

(153) Gonsky R, Deem RL, Bream JH, Young HA, Targan SR. An IFNG SNP with an estrogen-like response element selectively enhances promoter expression in peripheral but not lamina propria T cells. Genes Immun. 2006;7:342-351.

(154) Bozzi A, Reis BS, Pereira PP, Pedroso EP, Goes AM. Interferon-gamma and interleukin-4 single nucleotide gene polymorphisms in Paracoccidioidomycosis. Cytokine. 2009;48:212-217.

(155) Forte GI, Scola L, Misiano G et al. Relevance of gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-10 gene polymorphisms to susceptibility to Mediterranean spotted fever. Clin Vaccine Immunol. 2009;16:811-815.

(156) Ivansson EL, Juko-Pecirep I, Gyllensten UB. Interaction of immunological genes on chromosome 2q33 and IFNG in susceptibility to cervical cancer. Gynecol Oncol. 2010;116:544-548.

(157) Wang SS, Gonzalez P, Yu K et al. Common genetic variants and risk for HPV persistence and progression to cervical cancer. PLoS One. 2010;5:e8667.

(158) Kim K, Cho SK, Sestak A et al. Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2010;69:1247-1250.

(159) Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S et al. Interleukin-12: biological properties and clinical application. Clin Cancer Res. 2007;13:4677-4685.

(160) Goriely S, Neurath MF, Goldman M. How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members. Nat Rev Immunol. 2008;8:81-86.

(161) Wigginton JM, Kuhns DB, Back TC et al. Interleukin 12 primes macrophages for nitric oxide production in vivo and restores depressed nitric oxide production by macrophages from tumor-bearing mice: implications for the antitumor activity of interleukin 12 and/or interleukin 2. Cancer Res. 1996;56:1131-1136.

(162) Pistoia V, Cocco C, Airoldi I. Interleukin-12 receptor beta2: from cytokine receptor to gatekeeper gene in human B-cell malignancies. J Clin Oncol. 2009;27:4809-4816.

(163) Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. Nat Rev Immunol. 2005;5:521-531.

(164) Schwaller J, Tobler A, Niklaus G et al. Interleukin-12 expression in human lymphomas and nonneoplastic lymphoid disorders. Blood. 1995;85:2182-2188.

(165) Bien E, Balcerska A, Adamkiewicz-Drozynska E et al. Pre-treatment serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and their ratio predict response to therapy and probability of event-free and overall survival in childhood soft tissue sarcomas, Hodgkin's lymphomas and acute lymphoblastic leukemias. Clin Biochem. 2009;42:1144-1157.

(166) Cozen W, Gill PS, Salam MT et al. Interleukin-2, interleukin-12, and interferon-gamma levels and risk of young adult Hodgkin lymphoma. Blood. 2008;111:3377-3382.

(167) Younes A, Pro B, Robertson MJ et al. Phase II clinical trial of interleukin-12 in patients with relapsed and refractory non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease. Clin Cancer Res. 2004;10:5432-5438.

(168) Huang D, Cancilla MR, Morahan G. Complete primary structure, chromosomal localisation, and definition of polymorphisms of the gene encoding the human interleukin-12 p40 subunit. Genes Immun. 2000;1:515-520.

(169) Morahan G, Huang D, Ymer SI et al. Linkage disequilibrium of a type 1 diabetes susceptibility locus with a regulatory IL12B allele. Nat Genet. 2001;27:218-221.

(170) Morahan G, McKinnon E, Berry J et al. Evaluation of IL12B as a candidate type I diabetes susceptibility gene using data from the Type I Diabetes Genetics Consortium. Genes Immun. 2009;10 Suppl 1:S64-S68.

(171) Seegers D, Zwiers A, Strober W, Pena AS, Bouma G. A TaqI polymorphism in the 3'UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. Genes Immun. 2002;3:419-423.

(172) Stanilova S, Miteva L. Taq-I polymorphism in 3'UTR of the IL-12B and association with IL-12p40 production from human PBMC. Genes Immun. 2005;6:364-366.

(173) Chen X, Han S, Wang S et al. Interactions of IL-12A and IL-12B polymorphisms on the risk of cervical cancer in Chinese women. Clin Cancer Res. 2009;15:400-405.

(174) Kordi Tamandani DM, Shekari M, Suri V. Interleukin-12 Gene Polymorphism and Cervical Cancer Risk. Am J Clin Oncol. 2009; May 29. [Epub ahead of print]

(175) Skinnider BF, Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2002;99:4283-4297.

(176) Maggio EM, Van den BA, Visser L et al. Common and differential chemokine expression patterns in rs cells of NLP, EBV positive and negative classical Hodgkin lymphomas. Int J Cancer. 2002;99:665-672.

(177) Teruya-Feldstein J, Tosato G, Jaffe ES. The role of chemokines in Hodgkin's disease. Leuk Lymphoma. 2000;38:363-371.

(178) Baumforth KR, Birgersdotter A, Reynolds GM et al. Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. Am J Pathol. 2008;173:195-204.

(179) Niens M, Visser L, Nolte IM et al. Serum chemokine levels in Hodgkin lymphoma patients: highly increased levels of CCL17 and CCL22. Br J Haematol. 2008;140:527-536.

(180) Weihrauch MR, Manzke O, Beyer M et al. Elevated serum levels of CC thymus and activation-related chemokine (TARC) in primary Hodgkin's disease: potential for a prognostic factor. Cancer Res. 2005;65:5516-5519.

(181) Dean M, Jacobson LP, McFarlane G et al. Reduced risk of AIDS lymphoma in individuals heterozygous for the CCR5-delta32 mutation. Cancer Res. 1999;59:3561-3564.

(182) Rabkin CS, Yang Q, Goedert JJ et al. Chemokine and chemokine receptor gene variants and risk of non-Hodgkin's lymphoma in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. Blood. 1999;93:1838-1842.

(183) Bracci PM, Skibola CF, Conde L et al. Chemokine polymorphisms and lymphoma: a pooled analysis. Leuk Lymphoma. 2010;51:497-506.

(184) Nickel RG, Casolaro V, Wahn U et al. Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES. J Immunol. 2000;164:1612-1616.

(185) Tanaka K, Roberts MH, Yamamoto N et al. Upregulating promoter polymorphisms of RANTES relate to atopic dermatitis. Int J Immunogenet. 2006;33:423-428.

(186) Giltay EJ, Fonk JC, von Blomberg BM et al. In vivo effects of sex steroids on lymphocyte responsiveness and immunoglobulin levels in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85:1648-1657.

(187) Nieters A, Beckmann L, Deeg E, Becker N. Gene polymorphisms in Toll-like receptors, interleukin-10, and interleukin-10 receptor alpha and lymphoma risk. Genes Immun. 2006;7:615-624.

(188) Enciso-Mora V, Broderick P, Ma Y et al. A genome-wide association study of Hodgkin's lymphoma identifies new susceptibility loci at 2p16.1 (REL), 8q24.21 and 10p14 (GATA3). Nat Genet. 2010;Oct 31. [Epub ahead of print]

(189) Cordano P, Lake A, Shield L et al. Effect of IL-6 promoter polymorphism on incidence and outcome in Hodgkin's lymphoma. Br J Haematol. 2005;128:493-495.

(190) Cozen W, Gill PS, Ingles SA et al. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. Blood. 2004;103:3216-3221.

(191) Mollaki V, Georgiadis T, Tassidou A et al. Polymorphisms and haplotypes in TLR9 and MYD88 are associated with the development of Hodgkin's lymphoma: a candidate-gene association study. J Hum Genet. 2009;54:655-659.

(192) Munro LR, Johnston PW, Marshall NA et al. Polymorphisms in the interleukin-10 and interferon gamma genes in Hodgkin lymphoma. Leuk Lymphoma. 2003;44:2083-2088.

(193) Cozen W, Hamilton AS, Zhao P et al. A protective role for early oral exposures in the etiology of young adult Hodgkin lymphoma. Blood. 2009;114:4014-4020.

(194) Domingo-Domenech E, Benavente Y, Gonzalez-Barca E et al. Impact of interleukin-10 polymorphisms (-1082 and -3575) on the survival of patients with lymphoid neoplasms. Haematologica. 2007;92:1475-1481.

(195) Rothman N, Skibola CF, Wang SS et al. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. Lancet Oncol. 2006;7:27-38.

(196) Skibola CF, Bracci PM, Nieters A et al. Tumor Necrosis Factor (TNF) and Lymphotoxin-{alpha} (LTA) Polymorphisms and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma in the InterLymph Consortium. Am J Epidemiol. 2010;171:267-76.

(197) Cerhan JR, Liu-Mares W, Fredericksen ZS et al. Genetic variation in tumor necrosis factor and the nuclear factor-kappaB canonical pathway and risk of non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008;17:3161-3169.

(198) Lan Q, Zheng T, Rothman N et al. Cytokine polymorphisms in the Th1/Th2 pathway and susceptibility to non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2006;107:4101-4108.

(199) Purdue MP, Lan Q, Kricker A et al. Polymorphisms in immune function genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: findings from the New South Wales non-Hodgkin Lymphoma Study. Carcinogenesis. 2007;28:704-712.

(200) Wang SS, Cerhan JR, Hartge P et al. Common genetic variants in proinflammatory and other immunoregulatory genes and risk for non-Hodgkin lymphoma. Cancer Res. 2006;66:9771-9780.

(201) Cerhan JR, Ansell SM, Fredericksen ZS et al. Genetic variation in 1253 immune and inflammation genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2007;110:4455-4463.

(202) Wang SS, Purdue MP, Cerhan JR et al. Common gene variants in the tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor superfamilies and NF-kB transcription factors and non-Hodgkin lymphoma risk. PLoS One. 2009;4:e5360.

(203) Novak AJ, Slager SL, Fredericksen ZS et al. Genetic variation in B-cell-activating factor is associated with an increased risk of developing B-cell non-Hodgkin lymphoma. Cancer Res. 2009;69:4217-4224.

(204) Skibola CF, Nieters A, Bracci PM et al. A functional TNFRSF5 gene variant is associated with risk of lymphoma. Blood. 2008;111:4348-4354.

(205) Skibola CF, Bracci PM, Halperin E et al. Genetic variants at 6p21.33 are associated with susceptibility to follicular lymphoma. Nat Genet. 2009;41:873-875.

(206) Conde L, Halperin E, Akers NK et al. Genome-wide association study of follicular lymphoma identifies a risk locus at 6p21.32. Nat Genet. 2010;42:661-664.

(207) Abdou AM, Gao X, Cozen W et al. Human leukocyte antigen (HLA) A1-B8-DR3 (8.1) haplotype, tumor necrosis factor (TNF) G-308A, and risk of non-Hodgkin lymphoma. Leukemia. 2010;24:1055-1058.

(208) Candore G, Lio D, Colonna RG, Caruso C. Pathogenesis of autoimmune diseases associated with 8.1 ancestral haplotype: effect of multiple gene interactions. Autoimmun Rev. 2002;1:29-35.

(209) Wang SS, Abdou AM, Morton LM et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles in non-Hodgkin lymphoma etiology. Blood. 2010;115:4820-4823.

(210) Piras G, Monne M, Uras A et al. Genetic analysis of the 2q33 region containing CD28-CTLA4-ICOS genes: association with non-Hodgkin's lymphoma. Br J Haematol. 2005;129:784-790.

(211) Cheng TY, Lin JT, Chen LT et al. Association of T-cell regulatory gene polymorphisms with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. J Clin Oncol. 2006;24:3483-3489.

(212) Purdue MP, Lan Q, Wang SS et al. A pooled investigation of Toll-like receptor gene variants and risk of non-Hodgkin lymphoma. Carcinogenesis. 2009;30:275-281.

(213) Forrest MS, Skibola CF, Lightfoot TJ et al. Polymorphisms in innate immunity genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. Br J Haematol. 2006;134:180-183.

(214) Hellmig S, Fischbach W, Goebeler-Kolve ME et al. Association study of a functional Toll-like receptor 4 polymorphism with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Leuk Lymphoma. 2005;46:869-872.

(215) Warzocha K, Ribeiro P, Bienvenu J et al. Genetic polymorphisms in the tumor necrosis factor locus influence non-Hodgkin's lymphoma outcome. Blood. 1998;91:3574-3581.

(216) Juszczynski P, Kalinka E, Bienvenu J et al. Human leukocyte antigens class II and tumor necrosis factor genetic polymorphisms are independent predictors of non-Hodgkin lymphoma outcome. Blood. 2002;100:3037-3040.

(217) Berglund M, Thunberg U, Roos G, Rosenquist R, Enblad G. The interleukin-10 gene promoter polymorphism (-1082) does not correlate with clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2005;105:4894-4895.

(218) Kube D, Hua TD, Kloss M et al. The interleukin-10 gene promoter polymorphism -1087AG does not correlate with clinical outcome in non-Hodgkin's lymphoma. Genes Immun. 2007;8:164-167.

(219) Lee JJ, Kim DH, Lee NY et al. Interleukin-10 gene polymorphism influences the prognosis of T-cell non-Hodgkin lymphomas. Br J Haematol. 2007;137:329-336.

(220) Kube D, Hua TD, von Bonin F et al. Effect of interleukin-10 gene polymorphisms on clinical outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma: an exploratory study. Clin Cancer Res. 2008;14:3777-3784.

(221) Habermann TM, Wang SS, Maurer MJ et al. Host immune gene polymorphisms in combination with clinical and demographic factors predict late survival in diffuse large B-cell lymphoma patients in the pre-rituximab era. Blood. 2008;112:2694-2702.

(222) Park YH, Sohn SK, Kim JG et al. Interaction between BCL2 and interleukin-10 gene polymorphisms alter outcomes of diffuse large B-cell lymphoma following rituximab plus CHOP chemotherapy. Clin Cancer Res. 2009;15:2107-2115.

(223) Schoof N, Von Bonin F, Zeynalova S et al. Favorable impact of the interleukin-4 receptor allelic variant I75 on the survival of diffuse large B-cell lymphoma patients demonstrated in a large prospective clinical trial. Ann Oncol. 2009;20:1548-1554.

(224) Bogunia-Kubik K, Mazur G, Wrobel T, Kuliczkowski K, Lange A. Interleukin-10 gene polymorphisms influence the clinical course of non-Hodgkin's lymphoma. Tissue Antigens. 2008;71:146-150.

(225) Cerhan JR, Maurer MJ, Novak AJ, Ansell SM, Macon WR, Slager SL et al. Germline variation in complement genes and event-free survival in follicular lymphoma. Blood Nov; 114, Abstract 440. 2009.

(226) Cerhan JR, Wang S, Maurer MJ et al. Prognostic significance of host immune gene polymorphisms in follicular lymphoma survival. Blood. 2007;109:5439-5446.

(227) Fitzgibbon J, Grenzelias D, Matthews J, Lister TA, Gupta RK. Tumour necrosis factor polymorphisms and susceptibility to follicular lymphoma. Br J Haematol. 1999;107:388-391.

(228) Ueda T, Shimada E, Urakawa T. Serum levels of cytokines in patients with colorectal cancer: possible involvement of interleukin-6 and interleukin-8 in hematogenous metastasis. J Gastroenterol. 1994;29:423-429.

(229) Xavier RJ, Rioux JD. Genome-wide association studies: a new window into immune-mediated diseases. Nat Rev Immunol. 2008;8:631-643.

(230) Satsangi J, Parkes M, Louis E et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. Nat Genet. 1996;14:199-202.

(231) Bruhns P, Iannascoli B, England P et al. Specificity and affinity of human Fcgamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. Blood. 2009;113:3716-3725.

(232) Koene HR, Kleijer M, Algra J et al. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. Blood. 1997;90:1109-1114.

(233) Cartron G, Dacheux L, Salles G et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. Blood. 2002;99:754-758.

(234) Ghielmini M, Rufibach K, Salles G et al. Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). Ann Oncol. 2005;16:1675-1682.

(235) Treon SP, Hansen M, Branagan AR et al. Polymorphisms in FcgammaRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. J Clin Oncol. 2005;23:474-481.

(236) Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. J Clin Oncol. 2003;21:3940-3947.

(237) Weng WK, Weng WK, Levy R. Immunoglobulin G Fc receptor polymorphisms do not correlate with response to chemotherapy or clinical course in patients with follicular lymphoma. Leuk Lymphoma. 2009;50:1494-1500.

(238) Kim DH, Jung HD, Kim JG et al. FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. Blood. 2006;108:2720-2725.

(239) Carlotti E, Palumbo GA, Oldani E et al. FcgammaRIIIA and FcgammaRIIA polymorphisms do not predict clinical outcome of follicular non-Hodgkin's lymphoma patients treated with sequential CHOP and rituximab. Haematologica. 2007;92:1127-1130.

(240) Mitrovic Z, Aurer I, Radman I et al. FCgammaRIIIA and FCgammaRIIA polymorphisms are not associated with response to rituximab and CHOP in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Haematologica. 2007;92:998-999.

(241) Lejeune J, Thibault G, Ternant D et al. Evidence for linkage disequilibrium between Fcgamma RIIIa-V158F and Fcgamma RIIa-H131R polymorphisms in white patients, and for an Fcgamma RIIIa-restricted influence on the response to therapeutic antibodies. J Clin Oncol. 2008;26:5489-5491.

(242) Stern M, Opelz G, Dohler B, Hess C. Natural killer-cell receptor polymorphisms and posttransplantation non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2010;115:3960-3965.

(243) Cartron G, Ohresser M, Salles G et al. Neutrophil role in in vivo anti-lymphoma activity of rituximab: FCGR3B-NA1/NA2 polymorphism does not influence response and survival after rituximab treatment. Ann Oncol. 2008;19:1485-1487.

(244) Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. Cancer Res. 2004;64:4664-4669.

(245) Ternant D, Henin E, Cartron G et al. Development of a drug-disease simulation model for rituximab in follicular non-Hodgkin's lymphoma. Br J Clin Pharmacol. 2009;68:561-573.

(246) Breunis WB, van Mirre E, Geissler J et al. Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. Hum Mutat. 2009;30:E640-E650.

(247) Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E et al. FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. Nat Genet. 2007;39:721-723.

(248) Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. N Engl J Med. 2007;357:1199-1209.

(249) Cerhan JR, Novak AJ, Fredericksen ZS et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma in association with germline variation in complement genes. Br J Haematol. 2009;145:614-623.

(250) Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. PLoS Med. 2007;4:e278.

(251) Kurreeman FA, Rocha D, Houwing-Duistermaat J et al. Replication of the tumor necrosis factor receptor-associated factor 1/complement component 5 region as a susceptibility locus for rheumatoid arthritis in a European family-based study. Arthritis Rheum. 2008;58:2670-2674.

(252) Eghbali H, Raemaekers J, Carde P. The EORTC strategy in the treatment of Hodgkin's lymphoma. Eur J Haematol Suppl. 2005;135-140.

(253) Gisselbrecht C, Mounier N, Andre M et al. How to define intermediate stage in Hodgkin's lymphoma? Eur J Haematol Suppl. 2005;111-114.

(254) Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International Prognostic Factors Project on Advanced Hodgkin's Disease. N Engl J Med. 1998;339:1506-1514.

(255) Re D, Kuppers R, Diehl V. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2005;23:6379-6386.

(256) Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. J Clin Pathol. 2007;60:1342-1349.

(257) Axdorph U, Sjoberg J, Grimfors G et al. Biological markers may add to prediction of outcome achieved by the International Prognostic Score in Hodgkin's disease. Ann Oncol. 2000;11:1405-1411.

(258) Gruss HJ, Dolken G, Brach MA, Mertelsmann R, Herrmann F. High concentrations of the interleukin-1 receptor antagonist in serum of patients with Hodgkin's disease. Lancet. 1992;340:968.

(259) Nadali G, Tavecchia L, Zanolin E et al. Serum level of the soluble form of the CD30 molecule identifies patients with Hodgkin's disease at high risk of unfavorable outcome. Blood. 1998;91:3011-3016.

(260) Seymour JF, Talpaz M, Hagemeister FB, Cabanillas F, Kurzrock R. Clinical correlates of elevated serum levels of interleukin 6 in patients with untreated Hodgkin's disease. Am J Med. 1997;102:21-28.

(261) Vener C, Guffanti A, Pomati M et al. Soluble cytokine levels correlate with the activity and clinical stage of Hodgkin's disease at diagnosis. Leuk Lymphoma. 2000;37:333-339.

(262) Visco C, Vassilakopoulos TP, Kliche KO et al. Elevated serum levels of IL-10 are associated with inferior progression-free survival in patients with Hodgkin's disease treated with radiotherapy. Leuk Lymphoma. 2004;45:2085-2092.

(263) Warzocha K, Bienvenu J, Ribeiro P et al. Plasma levels of tumour necrosis factor and its soluble receptors correlate with clinical features and outcome of Hodgkin's disease patients. Br J Cancer. 1998;77:2357-2362.

(264) Baseggio L, Bartholin L, Chantome A et al. Allele-specific binding to the -308 single nucleotide polymorphism site in the tumour necrosis factor-alpha promoter. Eur J Immunogenet. 2004;31:15-19.

(265) Hohaus S, Giachelia M, Di Febo A et al. Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol. 2007;18:1376-1381.

(266) Ferme C, Eghbali H, Meerwaldt JH et al. Chemotherapy plus involved-field radiation in early-stage Hodgkin's disease. N Engl J Med. 2007;357:1916-1927.

(267) Somers R, Carde P, Henry-Amar M et al. A randomized study in stage IIIB and IV Hodgkin's disease comparing eight courses of MOPP versus an alteration of MOPP with ABVD: a European Organization for Research and Treatment of Cancer Lymphoma Cooperative Group and Groupe Pierre-et-Marie-Curie controlled clinical trial. J Clin Oncol. 1994;12:279-287.

(268) Noordijk EM, Thomas J, Ferme C. First results of the EORTC-GELA H9 randomized trials: The H9-F trial (comparing 3 radiation dose levels) and H9-U trial (comparing 3 chemotherapy schemes) in patients with favorable or unfavorable early stage Hodgkin's lymphoma (HL). J Clin Oncol. 2008;23.

(269) Ferme C, Divine M, Vranovsky A. Four ABVD and involved-field radiotherapy in unfavorable supradiaphragmatic clinical stages (CS) I-II Hodgkin's lymphoma (HL): Preliminary results of the EORTC-GELA H9-U trial. Blood. 2005;106, abstr 813.

(270) Helminen M, Lahdenpohja N, Hurme M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. J Infect Dis. 1999;180:496-499.

(271) Helminen ME, Kilpinen S, Virta M, Hurme M. Susceptibility to primary Epstein-Barr virus infection is associated with interleukin-10 gene promoter polymorphism. J Infect Dis. 2001;184:777-780.

(272) da Silva GN, Bacchi MM, Rainho CA, de Oliveira DE. Epstein-Barr virus infection and single nucleotide polymorphisms in the promoter region of interleukin 10 gene in patients with Hodgkin lymphoma. Arch Pathol Lab Med. 2007;131:1691-1696.

(273) Hjalgrim H, Askling J, Rostgaard K et al. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. N Engl J Med. 2003;349:1324-1332.

(274) Diepstra A, Niens M, Vellenga E et al. Association with HLA class I in Epstein-Barr-virus-positive and with HLA class III in Epstein-Barr-virus-negative Hodgkin's lymphoma. Lancet. 2005;365:2216-2224.

(275) Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:9465-9470.

(276) Turner DM, Williams DM, Sankaran D et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. Eur J Immunogenet. 1997;24:1-8.

(277) Crawley E, Kay R, Sillibourne J et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1999;42:1101-1108.

(278) Gibson AW, Edberg JC, Wu J et al. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. J Immunol. 2001;166:3915-3922.

(279) Lim S, Crawley E, Woo P, Barnes PJ. Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma. Lancet. 1998;352:113.

(280) Mormann M, Rieth H, Hua TD et al. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. Genes Immun. 2004;5:246-255.

(281) Sacks D. BAC talk about cell type-specific regulation of human IL-10. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:16895-16896.

(282) Baseggio L, Bienvenu J, Charlot C et al. Higher LPS-stimulated TNF-alpha mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells from non-Hodgkin's lymphoma patients. Exp Hematol. 2001;29:330-338.

(283) Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4:11-22.

(284) Hohaus S, Giachelia M, Massini G et al. Clinical significance of interleukin-10 gene polymorphisms and plasma levels in Hodgkin lymphoma. Leuk Res. 2009;33:1352-1356.

(285) Helminen M, Lahdenpohja N, Hurme M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. J Infect Dis. 1999;180:496-499.

(286) Maggio E, Van den BA, Diepstra A et al. Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. Ann Oncol. 2002;13 Suppl 1:52-56.

(287) Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J et al. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T-cell function in Hodgkin lymphoma patients. Blood. 2006;108:2280-2289.

(288) Koreishi AF, Saenz AJ, Persky DO et al. The role of cytotoxic and regulatory T cells in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2010;18:206-211.

(289) Tzankov A, Meier C, Hirschmann P et al. Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica. 2008;93:193-200.

(290) 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;27:31-39.

(291) Schmitz R, Hansmann ML, Bohle V et al. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. J Exp Med. 2009;206:981-989.

(292) Renne C, Hinsch N, Willenbrock K et al. The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. Int J Cancer. 2007;120:2504-2509.

(293) Souza EM, Baiocchi OC, Zanichelli MA et al. Impact of Epstein-Barr virus in the clinical evolution of patients with classical Hodgkin's lymphoma in Brazil. Hematol Oncol. 2010;28:137-141.

(294) Salem ML, Gillanders WE, Kadima AN et al. Review: novel nonviral delivery approaches for interleukin-12 protein and gene systems: curbing toxicity and enhancing adjuvant activity. J Interferon Cytokine Res. 2006;26:593-608.

(295) Doerr JR, Malone CS, Fike FM et al. Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. J Mol Biol. 2005;350:631-640.

(296) Ushmorov A, Leithauser F, Sakk O et al. Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. Blood. 2006;107:2493-2500.

(297) Chen J, Deng Y, Zhao J et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. J Clin Immunol. 2010;30:539-545.

(298) Ribrag V, Koscielny S, Casasnovas O et al. Pharmacogenetic study in Hodgkin's lymphomas reveals the impact of UGT1A1 polymorphisms on patient's prognosis. Blood. 2009;113:3307-3313.

(299) Hohaus S, Massini G, D'Alo' F et al. Association between glutathione S-transferase genotypes and Hodgkin's lymphoma risk and prognosis. Clin Cancer Res. 2003;9:3435-3440.

(300) Hohaus S, Di Ruscio A, Di Febo A et al. Glutathione S-transferase P1 genotype and prognosis in Hodgkin's lymphoma. Clin Cancer Res. 2005;11:2175-2179.

(301) Lan Q, Morton LM, Armstrong B et al. Genetic variation in caspase genes and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis of 3 population-based case-control studies. Blood. 2009;114:264-267.

(302) Morton LM, Purdue MP, Zheng T et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with germline variation in genes that regulate the cell cycle, apoptosis, and lymphocyte development. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18:1259-1270.

(303) Hill DA, Wang SS, Cerhan JR et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes. Blood. 2006;108:3161-3167.

(304) Wang SS, Maurer MJ, Morton LM et al. Polymorphisms in DNA repair and one-carbon metabolism genes and overall survival in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma. Leukemia. 2009;23:596-602.

(305) Skibola CF, Forrest MS, Coppede F et al. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2004;104:2155-2162.

(306) Hoffmann M, Schirmer MA, Tzvetkov MV et al. A functional polymorphism in the NAD(P)H oxidase subunit CYBA is related to gene expression, enzyme activity, and outcome in non-Hodgkin lymphoma. Cancer Res. 2010;70:2328-2338.

(307) Heinrichs S, Li C, Look AT. SNP array analysis in hematologic malignancies: avoiding false discoveries. Blood. 2010;115:4157-4161.

(308) Ueffing N, Singh KK, Christians A et al. A single nucleotide polymorphism determines protein isoform production of the human c-FLIP protein. Blood. 2009;114:572-579.

(309) Ma S, Zhang Y, Huang J et al. Identification of non-Hodgkin's lymphoma prognosis signatures using the CTGDR method. Bioinformatics. 2010;26:15-21.