

## Conférences

- 
- Hybridation génomique comparative sur puces à ADN en pathologies constitutionnelle et acquise avec la participation de **B. BENZACKEN (Jean Verdier – Paris)**, **V. DEFFRENNES (Abbott – Paris)**, **M.A. BELAUD ROTUREAU (Bordeaux)** et **P. VAGO (Clermont Ferrand)**
- Les trois révolutions de l’Histologie **J. POIRIER, Paris**
- Deuxième semaine du développement : aspects morphologiques et moléculaires - **C. CARATERO, Toulouse** et **A. DEFOSSEZ, Lille**
- Le diagnostic pré-implantatoire – **S. VIVILLE, Strasbourg**
- Choix d’un destin cellulaire au cours du développement : le cas des cellules gliales du système nerveux central – **P. COCHARD, Toulouse**
- Le myofibroblaste dans tous ses états – **A. DESMOULIERE, Bordeaux**
- Myélinisation : développement normal et pathologique – **O. BOESPFLUG TANGUY, Clermont-Ferrand**

## Communications

(Résumés ci-après)

- Expression du récepteur de la rénine dans le tissu adipeux du sujet mince et de l’obèse – V Achard (1); R Desbriere (2); G Nguyen (3); M Grino (1); (1) Inserm Umr 626, Faculté de Médecine, Marseille; (2) Service de Gynécologie-Obstétrique, Chu Nord , Marseille; (3) Inserm U36, Collège de France, Paris;
- Genèse des neurones à hypocrépine dans le diencephale ventral de rat.- C. Amiot, F. Brischoux, C. Colard, A. La Roche, D. Fellmann, P.Y. Risold Université de Franche-Comté, EA 3922, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon cedex 3, France
- Etude rétrospective de facteurs pronostiques notamment le status chromosomique en 1p/19q dans une série de 86 oligodendrogliomes – Auger N (1,2) , Saïkali S (3) , Hamlat A (4) , Laviolle B (5) , Guegan Y (4) , Le Calvé M (1,2) (1) laboratoire d’histologie embryologie, Faculté de médecine Rennes, (2) Laboratoire de cytogénétique et biologie cellulaire, CHU Pontchaillou Rennes , (3) Laboratoire d’anatomopathologie, CHU Pontchaillou Rennes , (4) Service de neurochirurgie, CHU Pontchaillou Rennes , (5) Centre d’investigation clinique INSERM 20, Rennes.
- Implication de la tumstatine dans la progression tumorale des carcinomes broncho-pulmonaires – Caudroy S 12 , Cucherousset J 1 , Lorenzato M 1 , Zahm JM 2 , Martinella-Catusse C 2 , Polette M 2 and Birembaut P 12 . 1. Laboratoire Pol Bouin, CHU Maison Blanche , 45 rue Cognacq Jay 51092 Reims Cedex. 2. INSERM UMRS514, CHU Maison Blanche , 45 rue Cognacq Jay 51092 Reims Cedex
- Caractérisation d’une inversion duplication délétion du bras court du chromosome X - Dupont C. (1), Lebbar A. (1), Teinturier C. (2), Baverel F. (1), Viot G. (3), Le Tessier D. (1), Aubourg P. (2), Dupont JM. (1)Service d’Histologie Embryologie Cytogénétique, Hôpital Cochin, Paris (2)Service de

Neurologie et Endocrinologie Pédiatrique, Hôpital Saint- Vincent de Paul, Paris (3)Génétique Médicale, Maternité Port Royal, Hôpital Cochin, Paris

- Syndrome polymalformatif et isochromosome 20 q en mosaïque de découverte anténatale C Goumy 1 , AM Beaufrère 2 , C Francannet 3 , A Tchirkov 1 , H Laurichesse 4 ,F Geissler 5 , D Lemery 4 , P Dechelotte 2 , P Vago 1 1 Cytogénétique Médicale, 2 Anatomie et cytologie pathologiques, 3 Génétique Médicale, 4 Médecine Fœtale et 5 Imagerie Médicale – CHU / Faculté de Médecine Clermont-Ferrand, France
- Cellules dendritiques médullaires au cours des gammopathies monoclonales.Nicolas Josselin (1), Marie-Christine Rousselet (2), Michel Baslé (1), Daniel Chappard (1) (1) Laboratoire d'histologie (2) Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU Angers
- Régulation de l'expression de Fgf 8 dans la région caudale de l'embryon de poulet – Claire Morgand, Liliana Osorio da Silva, Annie Wolff, Martin Catala – Laboratoire d'histologie et embryologie Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière Paris, France
- Analyse morphologique et ultrastructurale des sarcomes des souris présentant une mutation activatrice de la Kinase Cycline Dépendante 4 (CDK4 R24C) – Pelluard-Nehmé F (1,2), Vital A(2), Herfaut G (2), Turmo M (1), Barbacid M (3), Merlio JP (1), Dubus P (1) - (1) EA 2406, Université Bordeaux 2, (2) Service de Pathologie, Hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux et (3) Centre national d'Investigations Oncologiques Carlos III, Madrid.
- Recherche de marqueurs cytogénétiques spécifiques à la transformation des Mycosis Fongoïdes – M Prochazkova, E Chevret and JP Merlio – Laboratoire d'Histologie et Pathologie des Tumeurs, EA2406, Université Bordeaux2
- Le caryotype systématique chez les donneurs et donneuses de gamètes : Utilité réelle ou simple sécurité ? Ravel C, Berthaut I, Siffroi JP et la Commission de Génétique de la Fédération Française des CECOS, CECOS Paris Tenon, Service d'Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique, Hôpital Tenon (AP-HP), 4 rue de la Chine , 75020 Paris
- La trogocytose est-elle nécessaire à la fusion des gamètes ? – A. Ziyat, N. Naud-Barriant and J.P. Wolf – Laboratoire de Biologie de la Reproduction , UPRES 3410, UFR SMBH, Université Paris 13, 74, rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France. Service d'Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Hôpital Jean Verdier (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), Bondy, France.

**Expression du récepteur de la rénine dans le tissu adipeux du sujet mince et de l'obèse V Achard (1); R Desbriere (2); G Nguyen (3); M Grino (1); (1) Inserm Umr 626, Faculté de Médecine, Marseille; (2) Service de Gynécologie-Obstétrique, Chu Nord , Marseille; (3) Inserm U36, Collège de France, Paris;**

Introduction : Le tissu adipeux exprime l'ensemble des constituants du système rénine angiotensine et synthétise l'angiotensine II qui pourrait réguler la différenciation préadipocytaire et la croissance adipocytaire. Le récepteur de la rénine (RR), qui augmente son activité catalytique, étape limitante dans la synthèse d'angiotensine, a été récemment isolé. Le RR est présent dans de nombreux tissus de l'organisme. Cependant, son expression dans le tissu adipeux n'a pas été explorée.

Patients et Méthodes : Nous avons étudié par immunohistochimie et hybridation in situ l'expression du RR dans des prélèvements de tissu adipeux obtenus chez 14 femmes minces et 17 femmes obèses (IMC respectifs:  $21 \pm 0,6$  et  $39 \pm 1,5$  kg/m<sup>2</sup> ).

Résultats : Dans les deux groupes étudiés, à la fois dans les compartiments adipeux sous-cutané et viscéral, une immunoréactivité RR (IR-RR) et une expression des ARNm RR sont retrouvées dans les parois des vaisseaux, les plages stromales ainsi que les cellules stromales interadipocytaires, tandis que les adipocytes ne sont pas marqués. Le niveau de l'IR-RR (exprimé en pourcentage de cellules stromales marquées) est comparable dans le compartiment adipeux sous-cutané des témoins et des sujets obèses (respectivement 16,5% et 16,2%; test de Kolmogorov-Smirnov:  $p = 0,7$ ) et augmenté dans le compartiment viscéral par rapport au compartiment sous-cutané; cependant cette différence n'est significative ( $p = 0,02$ ) que chez le sujet obèse (24,8% vs 20.2% chez les témoins).

Conclusion : Notre étude montre que le RR est synthétisé par le stroma du tissu adipeux humain et est plus abondant dans le tissu adipeux viscéral que dans le tissu adipeux sous cutané, en particulier chez l'obèse. En facilitant la génération d'angiotensine II à la surface cellulaire, le RR pourrait participer à la régulation de la croissance du tissu adipeux et aux complications associées à l'obésité viscérale.

**Genèse des neurones à hypocréline dans le diencéphale ventral de rat. – C. Amiot, F. Brischoux, C. Colard, A. La Roche, D. Fellmann, P.Y. Risold -Université de Franche-Comté, EA 3922, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon cedex 3, France.**

Les neurones à hypocréline (Hcr) sont localisés dans le diencéphale ventral, où ils sont co-distribués avec les neurones producteurs de l'hormone de mélanocortine (MCH). Ces deux populations neuronales projettent dans l'ensemble du système nerveux central et sont impliquées dans des réponses similaires (cycles veille-sommeil, prise alimentaire).

L'objet de cette étude a été de déterminer la date de naissance des neurones à Hcr par la méthode au bromodésoxyuridine (BrdU) et de comparer ces résultats à ceux concernant la genèse des neurones à MCH (*Brischoux et al., 2002, Eur J Neurosci. 16, 1672 – 1680*).

Ce travail a été effectué sur des coupes de cerveaux de rats nés de mères respectivement injectées par le BrdU entre le 10<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jours de vie fœtale. Après double marquage immunohistochimique pour le peptide Hcr et le BrdU, il apparaît que les neurones à Hcr sont générés du 11<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jours de vie embryonnaire, avec un pic au 12<sup>ème</sup> jour. Aucun gradient spatiotemporel n'a été observé concernant leur distribution.

Ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour l'ensemble de la population des neurones à MCH, qui sont générés en un pic large du 10<sup>ème</sup> au 16<sup>ème</sup> jours de gestation et suivant un gradient spatiotemporel latéral à médian. Cependant la population MCH n'est pas homogène, en effet les neurones à projections corticales naissent au 13<sup>ème</sup> jour de vie fœtale donc plus tardivement que ceux à projections hypothalamo-spinales, qui sont générés en un pic essentiellement au 11<sup>ème</sup> jour. Ainsi le pic de genèse des neurones à Hcr est encadré par les deux pics de genèse des deux sous-populations de neurones à MCH identifiées par leurs projections.

En conclusion, les neurones à Hcr sont générés en un pic étroit, ce qui explique leur distribution dans une aire incluse dans celle des neurones à MCH. Le fait que ce pic soit encadré par ceux des deux sous-populations MCH suggère que les neurones à Hcr pourraient envoyer des collatérales à la fois vers le cortex et la moelle épinière.

**Etude rétrospective de facteurs pronostiques notamment le status chromosomique en 1p/19q dans une série de 86 oligodendrogliomes Auger N (1,2) , Saïkali S (3) , Hamlat A (4) , Laviolle B (5) , Guegan Y (4) , Le Calvé M (1,2) .(1) laboratoire d'histologie embryologie, Faculté de médecine Rennes, (2) Laboratoire de cytogénétique et biologie cellulaire, CHU Pontchaillou Rennes , (3) Laboratoire d'anatomopathologie, CHU Pontchaillou Rennes , (4) Service de neurochirurgie, CHU Pontchaillou Rennes , (5) Centre d'investigation clinique INSERM 20, Rennes. Correspondant : [nathalie.auger@chu-rennes.fr](mailto:nathalie.auger@chu-rennes.fr)**

Les oligodendrogliomes représentent 5% des tumeurs cérébrales primitives et appartiennent aux gliomes malins. Il a été montré que les oligodendrogliomes présentant un remaniement de la région 1p36/19q13 étaient de meilleur pronostic avec une meilleure réponse au traitement. Nous avons réalisé une étude rétrospective avec analyse des données cliniques et détermination du status 1p/19q par une technique de *FISH* (Fluorescente In Situ Hybridization) afin de déterminer des facteurs pronostiques pour 86 patients suivis pour un oligodendrogliome pur.

**Matériel et Méthode** : 86 patients traités pour un oligodendrogliome primitif dans le service de neurochirurgie de CHU de Rennes entre 1990 et 2001, ayant des données cliniques et du matériel interprétable en *FISH* . Les tumeurs ont été classées selon les critères de l'OMS et de Ste Anne. La *FISH* a été réalisée sur des coupes de tumeurs incluses en paraffine avec des sondes de type BAC localisées en 1p36 et 19q13.

**Résultats** : S'il n'y a pas de corrélation entre les classifications histologiques et la survie, la présence de nécrose est un facteur de mauvais pronostic (Odds Ratio à 13.7). Le status chromosomique nous a permis d'identifier trois groupes tumoraux : les tumeurs délétées, les tumeurs disomiques (« normales ») et les tumeurs polysomiques. S'il n'y a pas de corrélation entre le status chromosomique et le grade histologique, une survie plus longue est corrélée à la présence d'une délétion et inversement corrélée à la présence d'une polysomie (Odds Ratio à 0.026). Le dernier facteur indépendant mis en évidence par l'analyse statistique multivariée est l'âge du patient (Odds Ratio à 0.026).

**Conclusion** : Trois facteurs pronostiques indépendants ont donc été mis en évidence : la présence d'une nécrose tumorale, l'âge du patient au diagnostic et le status 1p/19q. En outre, il s'agit, à notre connaissance, de la première étude qui met en évidence le caractère très péjoratif de la polysomie dans les oligodendrogliomes quelque soit le traitement proposé à ces patients.

**IMPLICATION DE LA TUMSTATINE DANS LA PROGRESSION TUMORALE DES CARCINOMES BRONCHO-PULMONAIRES – Caudroy S 12 , Cucherousset J 1 , Lorenzato M 1 , Zahm JM 2 , Martinella-Catusse C 2 , Polette M 2 and Birembaut P 12 .**  
**1. Laboratoire Pol Bouin, CHU Maison Blanche , 45 rue Cognacq Jay 51092 Reims Cedex. 2. INSERM UMRS514, CHU Maison Blanche , 45 rue Cognacq Jay 51092 Reims Cedex**

La matrice extracellulaire est source de nombreux facteurs capables de réguler le développement tumoral. Parmi eux, la tumstatine (domaine Non Collagénique de la chaîne  $\alpha 3$  du collagène de type IV) présente des propriétés anti-tumorales *in vitro* . En effet, il a été mis en évidence que ce domaine inhibe la prolifération de cellules tumorales de mélanome. De plus, nous avons montré que la tumstatine réduit la capacité infiltrante de cellules tumorales invasives *via* l'inhibition de l'expression d'activateur de métalloprotéinases matricielles. Dernièrement il a été établi que la tumstatine possède une propriété anti-angiogénique en induisant l'apoptose de cellules endothéliales *via* sa liaison à l'intégrine  $\alpha v \beta 3$ .

Jusqu'à présent, la fonction anti-angiogénique de la tumstatine n'a pas été mise en évidence chez l'Homme. Nous avons précédemment montré que la tumstatine est néosynthétisée autour des massifs tumoraux bien différenciés dans les lésions broncho-pulmonaires. En effet, absente de la membrane basale de l'épithélium pulmonaire normal, cette chaîne apparaît autour des massifs tumoraux bien différenciés. Nous avons donc, pour cette étude, comparé la vascularisation tumorale et la présence de tumstatine dans l'environnement tumoral. Pour cela, nous avons réalisé une étude immunohistochimique sur 34 lésions broncho-pulmonaires en utilisant des anticorps dirigés contre la tumstatine, l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  et le facteur VIII (marqueur de cellules endothéliales).

Nous avons mis en évidence une corrélation significative entre la présence de tumstatine et la vascularisation tumorale. En effet, la tumstatine est localisée de manière intense et continue autour des massifs tumoraux peu vascularisés. Au contraire, les tumeurs les plus vascularisées ne présentent pas de tumstatine dans l'environnement tumoral. De plus, l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  et la tumstatine ont pu être colocalisées au niveau de cellules endothéliales en périphérie des massifs tumoraux.

Nos résultats suggèrent donc un potentiel effet anti-angiogénique de la tumstatine *in vivo* . Ce facteur, exprimé dans les tumeurs pulmonaires bien différenciées, pourrait inhiber la vascularisation tumorale et ainsi limiter la progression tumorale.

**CARACTERISATION D'UNE INVERSION DUPLICATION DELETION DU BRAS COURT DU CHROMOSOME X – Dupont C. (1), Lebbar A. (1), Teinturier C. (2), Baverel F. (1), Viot G. (3), Le Tessier D. (1), Aubourg P. (2), Dupont JM. – (1) Service d'Histologie Embryologie Cytogénétique, Hôpital Cochin, Paris (2) Service de Neurologie et Endocrinologie Pédiatrique, Hôpital Saint- Vincent de Paul, Paris (3) Génétique Médicale, Maternité Port Royal, Hôpital Cochin, Paris**

Nous rapportons ici le cas d'un enfant de 6 ans [GL] adressé en Cytogénétique pour un caryotype et une recherche de microdélétion du gène *SHOX* en raison d'une suspicion de syndrome de Léri-Weill. Le tableau clinique de GL associe une petite taille, une déformation de Madelung, une hypomélie, une dysmorphie, un retard modéré des acquisitions ainsi que des troubles de l'attention et de la mémorisation. Les examens en cytogénétique classique (bandes R, G et haute résolution) n'ont montré aucune anomalie.

L'Hybridation *In Situ* en Fluorescence (FISH) réalisée avec la sonde cosmique M34F5 (Xp22.33) qui couvre le gène *SHOX*, a mis en évidence une délétion de celui-ci. Le phénotype de cet enfant incluant des signes cliniques non associés au syndrome de Léri-Weill, nous avons hybridé la sonde subtélomérique du bras court du chromosome X (CTC-839D20, Xp22.33) et diagnostiqué ainsi une délétion terminale du bras court du chromosome X emportant cette région. La caractérisation de la limite proximale de cette délétion grâce à l'hybridation de sondes commerciales situées dans la région Xp22.3 ( *STS* et *KALI* ) nous a permis de diagnostiquer une duplication associée à la délétion. La cartographie à l'aide de BACs, de ce remaniement, montre qu'il s'agit d'une duplication inversée d'environ 13,7 Mb (située entre le BAC RP11-131H1 en Xp22.32 et le BAC RP5-1129A6 en Xp22.13), englobant les gènes *STS*, *VCX-A* et *KALI* et que le segment délété est d'environ 3,6 Mb.

Ce type de remaniement très bien décrit sur le chromosome 8 (8p), peut également concerner d'autres chromosomes (2q, 3p, 4p, 9p, 11p...). Cependant, un seul cas d'inversion duplication délétion du bras court du chromosome X a été rapporté (Milunsky et al., 1999). Des éléments génomiques répétitifs (LCR, duplions...) situés en Xp22.3 et Xp22.12 pourraient favoriser la survenue d'un tel remaniement (recombinaison homologue non allélique entre deux chromosomes d'une même paire ou entre chromatides sœurs).

La grande richesse en gènes de cette région chromosomique nous permet de discuter le phénotype de cet enfant qui présente à la fois une délétion subtélomérique Xp (troubles de l'attention), une délétion de *SHOX* (syndrome de Leri-Weill), une délétion d' *ARSE* (Chondrodysplasie Punctata) et une disomie fonctionnelle partielle du chromosome X englobant plusieurs gènes impliqués en pathologie humaine ( *STS*, *VCX-A* et *KALI* ).

**Syndrome polymalformatif et isochromosome 20 q en mosaïque de découverte anténatale – C GOUMY 1 , AM BEAUFRERE 2 , C FRANCANET 3 , A TCHIRKOV 1 , H LAURICHESSE 4 ,F GEISSLER 5 , D LEMERY 4 , P DECHELOTTE 2 , P VAGO 1 – 1 Cytogénétique Médicale, 2 Anatomie et cytologie pathologiques, 3 Génétique Médicale, 4 Médecine Fœtale et 5 Imagerie Médicale – CHU / Faculté de Médecine Clermont-Ferrand, France**

La présence en mosaïque d'un isochromosome 20q [i(20q)] est classiquement considérée comme sans conséquence phénotypique. Seulement trois cas d'i(20q) en mosaïque associé à un phénotype anormal ont été publiés (Chernos et al, 1992 ; Pfeiffer et al, 1997 ; Chen, 2003) et les auteurs concluaient que les malformations observées n'étaient vraisemblablement pas en relation avec l'anomalie chromosomique.

Nous décrivons un cas d'i(20q) en mosaïque de découverte anténatale associé à un syndrome polymalformatif comprenant une hydrocéphalie, des pieds bots et des malformations vertébrales. Une interruption thérapeutique de grossesse a été proposée. L'examen fœtopathologique retrouvait, en plus des malformations vues à l'échographie, une dysmorphie faciale, une hypoplasie cérébelleuse majeure et des anomalies oculaires. Les radiographies du fœtus montraient une anomalie de segmentation des vertèbres thoraciques.

Le caryotype standard en bandes G et en bandes R, réalisé à partir d'une culture d'amniocytes, a mis en évidence la présence d'un i(20q) dans 14 clones sur 15, alors que, par hybridation in situ en fluorescence (FISH) avec sonde locus spécifique (LSI 20q12), l'anomalie n'était retrouvée dans aucun des noyaux interphasiques du prélèvement d'origine : la culture a donc favorisé la prolifération des cellules anormales. Le caryotype des fibroblastes n'a pas pu être réalisé en raison d'une absence de prolifération des cellules en culture.

Une hybridation génomique comparative (CGH) sur métaphase et une CGH sur puces à ADN génomique (CGH array) ont été réalisées en vu d'éliminer un autre déséquilibre génomique pouvant être à l'origine des signes cliniques. Ces deux investigations n'ont pas mis en évidence d'anomalie.

Par ailleurs, certaines malformations retrouvées chez ce fœtus, en particulier les anomalies oculaires, les pieds bots et les anomalies de segmentation vertébrale, sont comparables à celles décrites par Pfeiffer (1997). Des malformations vertébrales sont également retrouvées dans les délétions du bras court du chromosome 20.

Tous ces éléments, CGH et CGH array sans anomalies et malformations comparables à celles précédemment décrites, sont en faveur d'une relation directe entre les malformations retrouvées chez le fœtus et la présence de l'isochromosome 20q, à l'origine d'une trisomie 20q et d'une monosomie 20p.

La découverte en prénatal d'un isochromosome 20q en mosaïque, même en faible pourcentage, doit donc inciter à la prudence lors du conseil génétique et faire rechercher des malformations associées à l'échographie. Chen CP, 2003. *Prenat Diag* **23** : 85-87 ; Chernos JE et al, 1992. *Am J Hum Genet* **51** : A288 ; Pfeiffer RA et al, 1997. *Prenat Diag* **17** : 1171-1175

**Cellules dendritiques médullaires au cours des gammopathies monoclonales Nicolas Josselin (1), Marie-Christine Rousselet (2), Michel Baslé (1), Daniel Chappard (1) – (1) Laboratoire d'histologie, (2) Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU Angers**

**INTRODUCTION :** Les cellules dendritiques sont des cellules spécialisées jouant un rôle clef dans différents stades de développement du lymphocyte B. En effet, elles participent à l'induction de la prolifération des cellules de phénotype B lors de la présentation antigénique; elles peuvent activer la translocation des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines et favoriser la survie des plasmoblastes ayant bénéficié de cette translocation. De rares études se sont intéressées aux rapports existants entre les cellules dendritiques et gammopathies monoclonales. Rettig (1), en 1997, a proposé une étiologie virale pour le myélome multiple en mettant en évidence le génome du virus herpès associé au sarcome de Kaposi au sein des cellules dendritiques de la moelle osseuse (technique PCR et HIS). Cette hypothèse a depuis été réfutée. Une étude (2) réalisée sur les cellules dendritiques sanguines (myélome comparés à des sujets sains) a mis en évidence des anomalies d'expression phénotypique du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 et des molécules de costimulation (CD 83, CD 86). Cette anomalie phénotypique s'associait à un défaut de présentation de l'antigène aux lymphocytes T et des anomalies d'internalisation des molécules dextran. Une autre étude (3) ne mettait pas en évidence d'anomalie fonctionnelle, mais une diminution du nombre de cellules circulantes dans les myélomes en comparaison à des patients présentant une gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS).

**BUT DE L'ETUDE :** Le but de cette étude est de mettre en évidence et de quantifier les cellules dendritiques médullaires au cours des gammopathies monoclonales.

**MATERIEL ET METHODES :** Nous avons collecté de façon rétrospective une centaine de patients ayant bénéficié à la fois d'une biopsie osseuse (étude histomorphométrique) et d'une biopsie ostéoméduleuse (étude immunohistochimique). Les patients étaient classés en MGUS (54 cas), myélomes (39 cas) et contrôles (10 cas). Nous avons mis en évidence et quantifié les cellules dendritiques médullaires à l'aide de l'anticorps dirigé contre la protéine S-100. Les résultats étaient corrélés aux données cliniques, biologiques et à l'imagerie.

**RESULTATS :** Le nombre moyen de cellules dendritiques médullaires était significativement plus élevé dans les MGUS (11.7 / 20 champs), comparé à la fois aux myélomes (5,2 / 20 champs) et aux sujets contrôles (1,2/20 champs). Le nombre de cellules dendritiques médullaires semblait par ailleurs inversement associé, de façon statistiquement significative, à l'âge ( $p= 0.0236$ ). Aucune autre association pertinente n'était statistiquement significative.

**DISCUSSION :** Les cellules dendritiques médullaires jouent un rôle clef dans le développement du lymphocyte B. L'augmentation du nombre de cellules dendritiques au cours des gammopathies monoclonales de signification indéterminée pourrait favoriser la transition de MGUS en myélome (activation de prolifération, survie cellulaire prolongée). Le nombre moins important de cellules dendritiques dans les myélomes pourrait s'expliquer par une inhibition de la prolifération des cellules dendritiques au cours par des sécrétions de cytokines synthétisées par les cellules tumorales et le microenvironnement (IL-6; IL-1 $\beta$ ). Par ailleurs, les cellules dendritiques dérivent de la même cellule souche que l'ostéoclaste et dans certaines conditions de culture, les cellules dendritiques immatures (4) peuvent se différencier en ostéoclastes (M-CSF, IL-6). Ce mécanisme permettrait hypothétiquement au myélome

d'échapper au système immunitaire de l'hôte tout en favorisant l'ostéoclastogénèse et donc la prolifération tumorale.

**REFERENCES:** (1) *Kaposi's sarcoma-associated herpes virus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients.* Rettig MB, Ma HJ, Vescio RA, Pold M, Schiller G, Belson D, Savage A, Nishikubo C, Wu C, Fraser J, Said JW, Berenson JR. *Science.* 1997 Jun 20;276(5320):1851-4. ; (2) *Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6.* Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM. *Blood.* 2002 Jul 1;100(1):230-7. ; (3) *Efficient presentation of tumor idiotype to autologous T cells by CD83(+) dendritic cells derived from highly purified circulating CD14(+) monocytes in multiple myeloma patients.* Ratta M, Curti A, Fogli M, Pantucci M, Viscomi G, Tazzari P, Fagnoni F, Vescovini R, Sansoni P, Tura S, Lemoli RM. ; (4) *Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors.* Miyamoto T, Ohneda O, Arai F, Iwamoto K, Okada S, Takagi K, Anderson DM, Suda T. *Blood.* 2001 Oct 15;98(8):2544-54.

**REGULATION DE L'EXPRESSION DE *Fgf 8* DANS LA REGION CAUDALE DE L'EMBRYON DE POULET – Claire Morgand, Liliana Osorio da Silva, Annie Wolff, Martin Catala – Laboratoire d'histologie et embryologie Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière Paris, France**

La croissance axiale embryonnaire se réalise selon un gradient classique céphalo-caudal. Ainsi, la région céphalique se forme avant les régions caudales. Le développement axial se produit aux dépens de cellules moins différenciées dont les caractères font penser à ceux qui sont communément admis pour les cellules-souches. La connaissance de la régulation de ce processus pourrait donner des clés pour la compréhension des mécanismes moléculaires qui permettent le maintien du caractère souche.

L'élongation axiale durant l'embryogenèse des amniotes est un processus conservé et précisément régulé au cours de l'évolution. *Fgf8* qui code la protéine FGF8 maintient les cellules dans un état mitotiquement actif. Le patron d'expression du gène *Fgf8* a été étudié à différents stades par hybridation *in situ in toto* chez le poulet. Outre les expressions isthmique, branchiales, olfactives et au niveau des membres, nous avons observé une forte expression du gène dans la partie caudale de l'embryon (ligne primitive puis bourgeon caudal). De plus, à l'instar du bourrelet ectodermique apical, l'expression du gène cesse lorsque la croissance est achevée. Ces résultats suggèrent que l'expression génique est finement régulée de façon concomitante à la durée de la croissance axiale.

Les mécanismes régulant l'expression de ce gène restent cependant mal définis. La pratique de transplantations hétérotopiques dans le modèle aviaire nous a permis de constater que l'expression de ce gène n'est pas intrinséquement régulée dans ces cellules. Ceci indique donc qu'il existe un centre inducteur responsable de la transcription active de ce gène. Nous avons donc cherché à déterminer la structure tissulaire à l'origine de cette induction. Pour ce faire, des ablations du nœud de Hensen ont été réalisées au stade de 6 somites ; puis le système de chimères caille/poulet a permis de mettre en évidence que le nœud n'est pas capable d'induire ni de maintenir l'expression de *Fgf8* lorsqu'il est placé dans le mésoderme présomitique. Il convient donc de rechercher un autre tissu responsable du maintien de l'expression de *Fgf8* pendant les cinq premiers jours de développement embryonnaire. Plusieurs études tendent à mettre en évidence le rôle du bourrelet ectodermique ventral du bourgeon caudal dans la croissance axiale. L'ablation de cette région nous permettrait donc de déterminer si elle agit sur l'expression de *Fgf8* dans la région caudale de l'embryon de poulet.

En conclusion, la dynamique de l'embryogénèse est un processus très complexe qui fait intervenir des régulations entre différents tissus. La lecture de ces interactions ne peut se faire qu'à partir d'une approche expérimentale animale.

**Analyse morphologique et ultrastructurale des sarcomes des souris présentant une mutation activatrice de la Kinase Cycline Dépendante 4 (CDK4 R24C) – Pelluard-Nehmé F (1,2), Vital A(2), Herfaut G (2), Turmo M (1), Barbacid M (3), Merlio JP (1), Dubus P (1) – (1) EA 2406, Université Bordeaux 2, (2) Service de Pathologie, Hôpital Pellegrin, 33076 Bordeaux et (3) Centre national d'Investigations Oncologiques Carlos III, Madrid.**

**Introduction :** Les stimuli mitotiques parvenant à la cellule sont intégrés lors de la phase G1 du cycle cellulaire par des complexes associant une sous-unité régulatrice (Cyclines D1, D2, ou D3) et une sous unité catalytique (CDK pour Kinase Cycline Dépendante 4 ou 6). Les protéines appartenant à la famille Ink4 (p16Ink4a, p15Ink4b, p18Ink4c et p19Ink4d) ont un rôle d'inhibiteur spécifique des CDK 4 et 6. La mutation de CDK4 R24C affecte le domaine de liaison entre CDK4 et Ink4 et ainsi bloque l'action inhibitrice des différents Ink4.

**Modèles animaux :** Une lignée de souris présentant une mutation activatrice (CDK4 R24C) a été générée par recombinaison homologue. Cette mutation activatrice empêche l'association aux inhibiteurs Ink4 et prédispose à la survenue de tumeurs multiples (sarcomes et tumeurs endocrines)

**Buts de l'étude :** Caractériser les sarcomes développés par ces souris à l'aide de techniques histologiques, immuno-histologiques et ultrastructurales. L'étude ultrastructurale a été ciblée sur les tumeurs d'aspect macroscopique vasculaire.

**Matériel / Méthodes :** Nous avons suivi une cohorte de 60 souris CDK4 R24C homozygote pendant 24 mois. Les animaux ont été sacrifiés lorsqu'une altération de leur état général était constaté. 25% des animaux, décédés spontanément, n'ont pu être analysés (autolyse). 21 sarcomes ont été prélevés, fixés par le formol et inclus en paraffine pour les études morphologiques et immuno-histochimiques. 17 tumeurs présentant un aspect macroscopique de tumeur vasculaire ont été fixées par le glutaraldéhyde puis ont été analysées sur coupes semi-fines et par microscopie électronique (Philips Technai 12).

**Conclusion :** La lignée CDK4 R24C développe avec une forte incidence de vrais angiosarcomes et constitue ainsi un modèle privilégié pour l'étude de ces tumeurs rares chez l'homme. Les mécanismes moléculaires conduisant à la transformation tumorale et les fonctions physiologiques des inhibiteurs Ink4 dans les cellules endothéliales feront l'objet d'études complémentaires à partir de ces modèles.

**Recherche de marqueurs cytogénétiques spécifiques à la transformation des Mycosis Fongoïdes – M Prochazkova, E Chevret and JP Merlio 9 – Laboratoire d’Histologie et Pathologie des Tumeurs, EA2406, Université Bordeaux2**

Le Mycosis Fongoïde (MF) représente plus de la moitié des lymphomes T cutanés primitifs (1). Il est caractérisé par un infiltrat épidermotrope de cellules tumorales T helper CD4+, et dans la plupart des cas un réarrangement clonal du gène du récepteur T est observé (1). L’évolution clinique du MF est indolente pendant de nombreuses années cependant, une transformation en lymphome à grandes cellules (MFT) peut survenir chez 8 à 23% des patients (2). Cet événement tardif est de mauvais pronostic avec une médiane de survie de 1 à 2 ans (3). Les paramètres histopathologiques associés au MFT sont bien définis (4) mais les critères cytogénétiques ou moléculaires responsables de la transformation en lymphomes T à grandes cellules sont inconnus. C’est pourquoi, chez un patient nous avons analysé des prélèvements de sang périphérique et de lésions cutanées avant et après transformation du MF, à l’aide d’outils de cytogénétique classique et moléculaire, de façon à rechercher des altérations chromosomiques associées à la transformation du MF en lymphome T cutané à grandes cellules.

Nous avons mis en évidence que les caryotypes des cellules sanguines périphériques avant et après la transformation sont identiques, hypodiploïdes à 45 chromosomes. Les cellules cutanées après la transformation présentent un caryotype hypotétraploïde très complexe avec de nombreux réarrangements. Avant la transformation, aucune anomalie cytogénétique n’a été identifiée dans les cellules de la lésion cutanée. La comparaison des caryotypes sanguins et cutanés révèle que ces caryotypes présentent sept anomalies communes, dont un isochromosome 17q, la perte du chromosome 10 et la délétion de la région 9p21. Ces anomalies sont connues chez les patients présentant un MF ou un syndrome de Sézary aussi bien dans les stades précoces que les stades avancés de la maladie (5, 6, 7). Elles ne peuvent donc être considérées comme des marqueurs de la transformation des MF. Cependant, la récurrence de ces anomalies chromosomiques associée à la présence du même réarrangement du gène du TCR gamma confirme que les cellules tumorales cutanées et celles provenant du sang périphérique dérivent de la même population tumorale. A partir de cet ancêtre commun les cellules cutanées ont probablement acquis des altérations chromosomiques secondaires. En effet le caryotype cutané hypotétraploïde peut être expliqué par un phénomène de duplication chromosomique suivi de pertes de chromosomes et de réarrangements inter-chromosomiques. La survenue de tels événements est bien connue dans les tumeurs solides (8). Chez notre patient la polyploïdisation survient uniquement au niveau de la peau, ce qui suggère qu’elle est liée à la transformation en grandes cellules du MF.

L’étude cytogénétique d’une cohorte de prélèvements sanguins et cutanés provenant de patients présentant un MFT devrait nous permettre de déterminer si la tétraploïdisation est un phénomène récurrent et spécifique de la transformation cutanée des MF. Ce travail devrait aussi conduire à la caractérisation de déséquilibres cytogénétiques spécifiquement associés au MFT.1 – Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Perez JL, Geerts ML, Goos M, Knobler R, Ralfkiaer E, Santucci M, Smith N, Wechsler J, van Vloten WA, Meijer CJ. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 1997;90 (1):354-71.

2 – Siegel RS, Pandolfino T, Guitart J, Rosen S, Kuzel TM. Primary cutaneous T-cell lymphoma: review and current concepts. *J Clin Oncol* 2000;18 (15):2908-25.

3 – Diamandidou E, Colome-Grimmer M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Transformation of mycosis fungoides/Sezary syndrome: clinical characteristics and prognosis. *Blood* 1998;92 (4):1150-9.

4 – Vergier B, de Muret A, Beylot-Barry M, Vaillant L, Ekouevi D, Chene G, Carlotti A, Franck N, Dechelotte P, Souteyrand P, Courville P, Joly P, Delaunay M, Bagot M, Grange F, Fraitag S, Bosq J, Petrella T, Durlach A, De Mascarel A, Merlio JP, Wechsler J. Transformation of mycosis fungoides: clinicopathological and prognostic features of 45 cases. French Study Group of Cutaneous Lymphomas. *Blood* 2000;95 (7):2212-8

5 – Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Loss of heterozygosity on 10q and microsatellite instability in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma and possible association with homozygous deletion of PTEN. *Blood* 2000;95 (9):2937-42.

6 – Mao X, Lillington D, Scarisbrick JJ, Mitchell T, Czepulkowski B, Russell-Jones R, Young B, Whittaker SJ. Molecular cytogenetic analysis of cutaneous T-cell lymphomas: identification of common genetic alterations in Sezary syndrome and mycosis fungoides. *Br J Dermatol* 2002;147 (3):464-75.

7 – Scarisbrick JJ, Woolford AJ, Russell-Jones R, Whittaker SJ. Allelotyping in mycosis fungoides and Sezary syndrome: common regions of allelic loss identified on 9p, 10q, and 17p. *J Invest Dermatol* 2001;117 (3):663-70.

8 – Shackney SE, Smith CA, Miller BW, Burholt DR, Murtha K, Giles HR, Ketterer DM, Pollice AA. Model for the genetic evolution of human solid tumors. *Cancer Res* 1989;49 (12):3344-54.

9 – Prochazkova M, Chevret E, Beylot-Barry M, Vergier B, Sobotka J and Merlio JP. Transformation of mycosis fungoides: identification of tetraploidisation within skin tumour large cells arising from malignant skin and blood clones. *Cancer Genet and Cytogenet in press*

Le caryotype systématique chez les donneurs et donneuses **de gamètes : Utilité réelle ou simple sécurité ?** – RAVEL C, BERTHAUT I, SIFFROI JP et la Commission de Génétique de la Fédération Française des CECOS, CECOS Paris Tenon, Service d'Histologie, Biologie de la Reproduction et Cytogénétique, Hôpital Tenon (AP-HP), 4 rue de la Chine , 75020 Paris

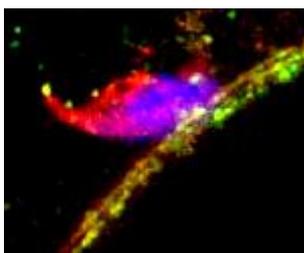
La Commission de Génétique de la Fédération Française des CECOS a envoyé un questionnaire à tous les CECOS portant sur l'année de début de fonctionnement de chaque centre, le nombre de caryotypes réalisés chaque année, les anomalies dépistées et les conséquences pour le don. En ce qui concerne les donneurs de sperme, le nombre de caryotypes est de 9410 pour une durée moyenne d'activité de 21,3 ans : 57 anomalies (0,6%) ont motivé l'exclusion du donneur. Vingt anomalies soit 0,2% [8 t(13;14), 3 translocations réciproques, 2 anomalies de structure non étiquetées et 7 inversions] sont potentiellement dangereuses pour la descendance et ont entraîné l'exclusion des donneurs. Vingt trois anomalies (3 marqueurs surnuméraires, 5 double Y, 5 sites fragiles et 10 mosaïques) présentant un risque beaucoup plus discutable et 9 autres (3 inversions de l'Y, 6 inversions péricentriques du 9) considérées comme des variants chromosomiques sans conséquence pathologique ont quand même fait l'objet d'une exclusion des donneurs. Cinq anomalies non classables ont été également considérées comme des motifs d'exclusion. Des données généalogiques et les chiffres du spermogrammes sont connus pour 28 de ces anomalies. En ce qui concerne les donneuses d'ovocytes, l'activité plus récente ne s'étend que sur 7,8 années et porte sur 681 caryotypes. Cinq anomalies chromosomiques ont entraîné l'exclusion de la donneuse : 1 trisomie X, 1 mosaïque 45,X/47,XXX/46,XX, 1 cas de remaniements non spécifiques dans 50% des métaphases et 2 translocations réciproques [ t(8;20) (q13;p13) et t(3;17) (q26;p13)]. Les conséquences sur la surveillance génétique des donneurs sont discutées.

**La trogocytose est-elle nécessaire à la fusion des gamètes ? – A. Ziyat, N. Naud-Barriant and J.P. Wolf – Laboratoire de Biologie de la Reproduction , UPRES 3410, UFR SMBH, Université Paris 13, 74, rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France. Service d’Histologie-Embryologie-Cytogénétique, Hôpital Jean Verdier (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris), Bondy, France. (jean-philippe.wolf@jvr.ap-hop-paris.fr).**

**La fusion gamétique** repose sur une série d’interactions moléculaires dans lesquelles interviennent la fertiline spermatique ainsi que les tétraspanines et les intégrines ovocytaires ( 1, 2 ) .

**Les tétraspanines** constituent une superfamille de protéines de membrane, formant un réseau ou «tetraspan web ». Elles participent à des complexes multimoléculaires associant notamment des intégrines ( 3 ) . Au moins trois tétraspanines différentes : **CD9** , CD81 et CD151, sont exprimées dans les ovocytes de mammifères ainsi que les intégrines  $\alpha 6\beta 1$  et  $\alpha v\beta 3$  . Nous avons montré leur présence sur l’ovocyte humain (soumis). La tétraspanine CD9 est essentielle dans la fusion gamétique. En effet, les souris femelles invalidées pour le gène CD9 sont infertiles du fait d’un défaut électif des capacités fusio-gènes des membranes ovocytaires ( 2, 4 ) . La grande boucle extracellulaire de la tétraspanine, présente dans le milieu d’insémination, inhibe la fusion mais pas l’adhésion des gamètes de souris ( 5 ) . Fait essentiel, **aucune tétraspanine n’a été identifiée sur les spermatozoïdes** . De nombreuses expérimentations ont par ailleurs montré que l’intégrine  $\alpha 6\beta 1$  est le récepteur de la fertiline b et l’intégrine  $\alpha v\beta 3$  celui d’un ligand présentant le tripeptide RGD sur son site de liaison disintégrine ( 6 ) . Toutefois ces fonctionnalités ont été contestées par des expériences d’invalidation de gènes codant pour ces sous unités intégrines dans des modèles utilisant des ovocytes dépellucidés et des spermatozoïdes non mutés ( 7 ) .

Nous venons de mettre en évidence par immunofluorescence, microscopie confocale, et immunoprécipitation la présence des sous unités intégrines  **$\alpha 6$  ,  $\beta 1$  et  $\alpha v$**  sur les **spermatozoïdes de souris** . Pour étudier leur interaction nous avons utilisé un modèle d’ovocytes intacts car les différentes techniques de dépellucidation donnent des artefacts ( 8 ) dont la relocalisation des intégrines  $\alpha 6\beta 1$  ,  $\alpha v\beta 3$  et des tétraspanines CD151 que nous avons décrite. Nous venons aussi de mettre en évidence la présence de tétraspanine **CD9 à la surface des spermatozoïdes présents dans l’espace périvitellin** . La présence de cette molécule sur des spermatozoïdes pré-fusionnels alors qu’ils en sont dépourvus à l’extérieur de la zone pellucide pourrait s’expliquer par un phénomène de **trogocytose** . Il s’agit de transfert de fragments membranaires, phénomène récemment décrit sur certaines cellules du système immunitaire. Les cellules NK (natural killer) ou les lymphocytes T sont ainsi capables de capturer des fragments membranaires de leurs cellules cibles ( 9, 10 ) . Le CD9 acquis par les spermatozoïdes pourrait jouer un rôle de facilitateur et d’organisateur des intégrines dans un complexe moléculaire impliqué dans la fusion membranaire des gamètes au moment de la fécondation



Microscopie confocale. Détection de la protéine CD9 sur un spermatozoïde de souris présent dans l’espace périvitellin.

## Références

1. J. P. Evans, *Front Biosci* 4 , D114 (Jan 15, 1999). ; 2. F. Le Naour, E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant, C. Boucheix, *Science* 287 , 319 (Jan 14, 2000). ; 3. C. Boucheix, E. Rubinstein, *Cell Mol Life Sci* 58 , 1189 (Aug, 2001). ; 4. K. Miyado *et al.* , *Science* 287 , 321 (Jan 14, 2000). ; 5. G. Z. Zhu *et al.* , *Development* 129 , 1995 (Apr, 2002). ; 6. E. A. Almeida *et al.* , *Cell* 81 , 1095 (Jun 30, 1995). ; 7. Z. Y. He *et al.* , *Dev Biol* 254 , 226 (Feb 15, 2003). ; 8. J. Boldt, A. M. Howe, J. Preble, *Biol Reprod* 39 , 19 (Aug, 1988). ; 9. J. Tabiasco *et al.* , *Eur J Immunol* 32 , 1502 (May, 2002). ; 10. D. Hudrisier, J. Riond, H. Mazarguil, J. E. Gairin, E. Joly, *J Immunol* 166 , 3645 (Mar 15, 2001).