



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**  
Année 2017

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Evaluation de la sensibilité et de la spécificité de  
l'immunomarquage CXCL13 dans le diagnostic de lymphome  
non hodgkinien de phénotype T de type angioimmunoblastique.**

Présentée et soutenue publiquement le 05 mai 2017 à 18 heures  
Au Pôle Recherche  
**Par Santiago GIMENEZ DE MESTRAL**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Xavier LEROY**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Franck MORSCHHAUSER**

**Monsieur le Docteur Guillaume LEFEVRE**

**Monsieur le Docteur Romain DUBOIS**

**Directrice de Thèse :**

**Madame le Professeur Marie-Christine COPIN**

---

## **AVERTISSEMENT**

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

## LISTE DES ABREVIATIONS

BCL6	B-cell lymphoma 6 protein
BOM	biopsie ostéo-médullaire
CFD	cellules folliculaires dendritiques
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
EATL	LNH de phénotype T lié aux entéropathies
EBV	Epstein Barr virus
ICOS	inducible costimulator molecule
LHNPL	lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire
LNH	lymphome non hodgkinien
LTAI	lymphome non hodgkinien de phénotype T de type angioimmunoblastique
MALT	tissu lymphoïde associé aux muqueuses
NK	natural killer
NOS	not otherwise specified
PD1	programmed cell death 1
SAP	signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein
SHE	syndrome hyperéosinophilie
TCR	T cell receptor
TFH	lymphocytes T helper folliculaires

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b> .....	1
<b>INTRODUCTION</b> .....	2
<b>I. Physiologie du follicule secondaire et du centre germinatif</b> .....	2
A. Les follicules lymphoïdes primaires et secondaires .....	2
B. Parcours des lymphocytes B : recrutement dans les follicules, migration au contact de la zone T, activation et migration dans le centre germinatif .....	5
C. Différenciation en plasmocytes à longue durée de vie et lymphocytes B mémoires à haut degré d'affinité. ....	6
<b>II. Lymphocytes TFH</b> .....	10
A. Différenciation et spécialisation dans la coopération avec les lymphocytes B dans les centres germinatifs .....	10
B. La chimioquine CXCL13 et son récepteur, CXCR5 .....	12
C. Marqueurs immunohistochimiques des lymphocytes TFH .....	14
<b>III. Lymphomes avec immunophénotype TFH</b> .....	16
A. LTAI : le prototype du lymphome dérivé des lymphocytes TFH .....	16
1. Epidémiologie, historique et clinique.....	16
2. Microscopie.....	19
3. Immunohistochimie.....	21
4. Biologie moléculaire .....	23
5. Traitement.....	24
6. Le LTAI, un lymphome immunologiquement fonctionnel .....	25
B. Autres lymphomes dérivés des lymphocytes TFH .....	26
<b>IV. Autres pathologies avec immunomarquage CXCL13+</b> .....	27
A. Lymphomes non dérivés des lymphocytes TFH .....	27
1. Immunomarquage CXCL13+ des cellules tumorales.....	27
2. Immunomarquage CXCL13+ du microenvironnement.....	28
B. Pathologies non hématologiques : sarcome à cellules folliculaires dendritiques.....	28
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	29
<b>I. Objectif principal : étude de la sensibilité et de la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI</b> .....	29
<b>II. Objectifs secondaires</b> .....	29
A. La détection d'un immunomarquage CXCL13+ varie-t-elle en fonction du type de prélèvement? Comparaison des biopsies ostéo-médullaires et des exérèses ganglionnaires .....	29

B. Le niveau de certitude diagnostique varie-t-il en fonction du type de prélèvement ? Comparaison des biopsies ganglionnaires à l'aiguille et des exérèses ganglionnaires .....	31
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>32</b>
<b>I. Sélection des cas.....</b>	<b>32</b>
A. Critères d'inclusion .....	32
B. Critères d'exclusion .....	33
<b>II. Données recueillies.....</b>	<b>33</b>
<b>III. Modalités d'évaluation de l'immunomarquage CXCL13 .....</b>	<b>34</b>
A. Classement en catégories.....	34
B. Sélection d'un prélèvement servant de référence par patient .....	36
C. Anonymisation des données et accord de la CNIL .....	37
D. Etude statistique .....	37
1. Objectif principal .....	37
2. Objectifs secondaires .....	38
a. La détection d'un immunomarquage CXCL13+ varie-t-elle en fonction du type de prélèvement ? Comparaison des BOM et des exérèses ganglionnaires.....	38
b. Le niveau de certitude diagnostique varie-t-il en fonction du type de prélèvement ? Comparaison des biopsies ganglionnaires à l'aiguille et des exérèses ganglionnaires .....	38
<b>RESULTATS .....</b>	<b>39</b>
<b>I. Nombre de dossiers analysés .....</b>	<b>39</b>
<b>II. Données épidémiologiques.....</b>	<b>40</b>
<b>III. Types de prélèvement tissulaire.....</b>	<b>40</b>
<b>IV. Comparaison de l'immunomarquage CXCL13 et des diagnostics AP.....</b>	<b>41</b>
A. Pour l'objectif principal : étude de 206 dossiers .....	41
1. Sensibilité et spécificité du marqueur CXCL13 pour le diagnostic de LTAI .....	45
2. CXCL13 n'est pas un marqueur spécifique du LTAI .....	49
B. Pour l'objectif secondaire : étude sur 273 cas.....	56
1. Présentation des 273 cas.....	56
2. La détection de CXCL13 varie selon le tissu.....	58
3. Le mode de prélèvement a une influence sur le niveau de certitude diagnostique .....	59
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>61</b>
<b>I. La sensibilité de l'immunomarquage CXCL13+ est excellente pour le diagnostic de LTAI .....</b>	<b>61</b>

<b>II. La spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI dépend du type cellulaire marqué</b> .....	61
A. Lorsque le marquage concerne des cellules tumorales, la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI est de 92,7 % .....	61
B. L'identification de la nature des cellules marquées diminue le risque de faux positifs et de faux négatifs.....	62
1. Les cellules tumorales CXCL13+ peuvent être peu nombreuses dans le LTAI : risque de faux négatifs .....	62
2. L'immunomarquage CXCL13+ du microenvironnement : risque de faux positifs .....	63
<b>III. Néoplasies avec cellules tumorales CXCL13+</b> .....	65
A. Lymphomes T périphériques.....	65
1. LNH T de phénotype TFH et LNH T folliculaire .....	65
2. LNH extra-ganglionnaire de phénotype T/NK.....	67
3. LNH T lié aux entéropathies (EATL) .....	68
B. Autres lymphomes dont les cellules tumorales expriment CXCL13 .....	69
1. LHHNPL .....	69
2. LNH primitif du système nerveux central .....	69
C. Sarcome à cellules folliculaires dendritiques.....	69
<b>IV. Infiltrat TFH CXCL13+ dans le microenvironnement de néoplasies autres que le LTAI</b> .....	71
A. Lymphomes B .....	71
1. LHNPL.....	71
2. LNH B riche en lymphocytes T.....	73
3. LH classique .....	74
4. Lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC).....	75
5. LNH B de la zone marginale (LZM) .....	75
6. LNH B de type folliculaire .....	76
B. Lymphomes T .....	77
1. LNH T périphérique NOS .....	77
2. LNH T anaplasique ALK+.....	78
3. LHN T anaplasique ALK-.....	79
4. Lymphomes T primitifs cutanés .....	80
<b>V. Infiltrat réactionnel TFH CXCL13+ dans des pathologies bénignes</b> .....	81
A. Lymphadénite histiocytaire nécrosante .....	81
B. Lymphadénite avec hyperplasie angioimmunoblastique .....	83
C. Syndrome hyperéosinophilique variant lymphoïde (SHE-L) .....	85
<b>VI. Le type de prélèvement a une influence sur le niveau de certitude diagnostique</b> .....	86
A. Le typage précis d'un lymphome n'est pas toujours possible sur biopsie à l'aiguille ganglionnaire .....	86

B. BOM .....	88
1. La détection immunohistochimique de la chimioquine CXCL13 est moins sensible dans la moelle osseuse .....	88
2. Risque de faux négatif .....	89
C. Biopsie cutanée .....	90
D. Le diagnostic de lymphome est rarement possible sur un examen extemporané .....	91
<b>VII. Particularités et points sensibles de l'étude.....</b>	<b>91</b>
A. L'immunomarquage CXCL13 : un outil diagnostique à utiliser avec précaution .....	91
B. L'immunomarquage CXCL13+ dans le LTAI : lymphocytes TFH tumoraux ou CFD ? .....	92
C. Perspectives d'études .....	95
D. Le diagnostic anatomopathologique de LTAI peut être retardé .....	95
<b>VIII. Le rôle du microenvironnement dans la croissance tumorale .....</b>	<b>97</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>99</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>101</b>

## RESUME

Le lymphome non hodgkinien de phénotype T de type angioimmunoblastique (LTAI) est le lymphome T périphérique non cutané le plus fréquent en France. Ses caractéristiques cliniques, morphologiques et immunohistochimiques permettent de le différencier des autres sous-types de lymphomes, mais le diagnostic reste parfois difficile. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette entité, et notamment de sa cellule d'origine, le lymphocyte T helper folliculaire (TFH), a permis au cours des dernières années de définir des critères diagnostiques de plus en plus précis.

La molécule CXCL13 est une chimioquine exprimée par les lymphocytes TFH et par les cellules folliculaires dendritiques (CFD) au sein des centres germinatifs des follicules secondaires. Initialement, un immunomarquage positif par l'anticorps anti-CXCL13 au sein d'une population lymphomateuse sur coupe tissulaire était décrit comme spécifique du LTAI, permettant de poser ce diagnostic par rapport aux autres lymphomes T périphériques (1–3). Par la suite, des études ont mis en évidence une expression de CXCL13 dans d'autres lymphomes (4–8), mais aussi dans des tumeurs non hématologiques (9). Enfin, l'expression de CXCL13 par des cellules réactionnelles non tumorales au sein du microenvironnement de pathologies variées a été rapportée (4,10).

Dans cette étude, nous rappelons le rôle biologique du lymphocyte TFH et de la chimioquine CXCL13 au sein du centre germinatif. Nous évaluons la sensibilité et la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI, à partir de 273 cas diagnostiqués dans l'institut de Pathologie du CHRU de Lille, de janvier 2014 à mai 2016. Nous détaillons dans quelles pathologies un immunomarquage CXCL13 peut être observé ; pour certaines d'entre elles, un tel immunomarquage n'avait jamais été décrit auparavant dans la littérature. Nous précisons enfin les conditions correctes d'évaluation et d'interprétation de ce marqueur.

# INTRODUCTION

## I. PHYSIOLOGIE DU FOLLICULE SECONDAIRE ET DU CENTRE GERMINATIF

### A. Les follicules lymphoïdes primaires et secondaires

La réponse humorale est médiée par la sécrétion d'immunoglobulines, dont les régions variables des chaînes légères et des chaînes lourdes forment un domaine qui reconnaît l'antigène avec un haut degré d'affinité. Pour exprimer les immunoglobulines spécifiques de l'antigène, les lymphocytes B subissent des étapes de sélection et de maturation, qui permettent la différenciation en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes. La coopération avec les lymphocytes T helper CD4+ est essentielle à cette différenciation. La mise en place et le maintien de la réponse humorale spécifique de l'antigène requièrent en particulier la coopération des lymphocytes T helper folliculaires pour être efficaces (11). Les antigènes qui nécessitent une coopération entre lymphocytes B et lymphocytes T pour induire une réponse immunitaire sont dits antigènes thymus-dépendants ou T-dépendants (12).

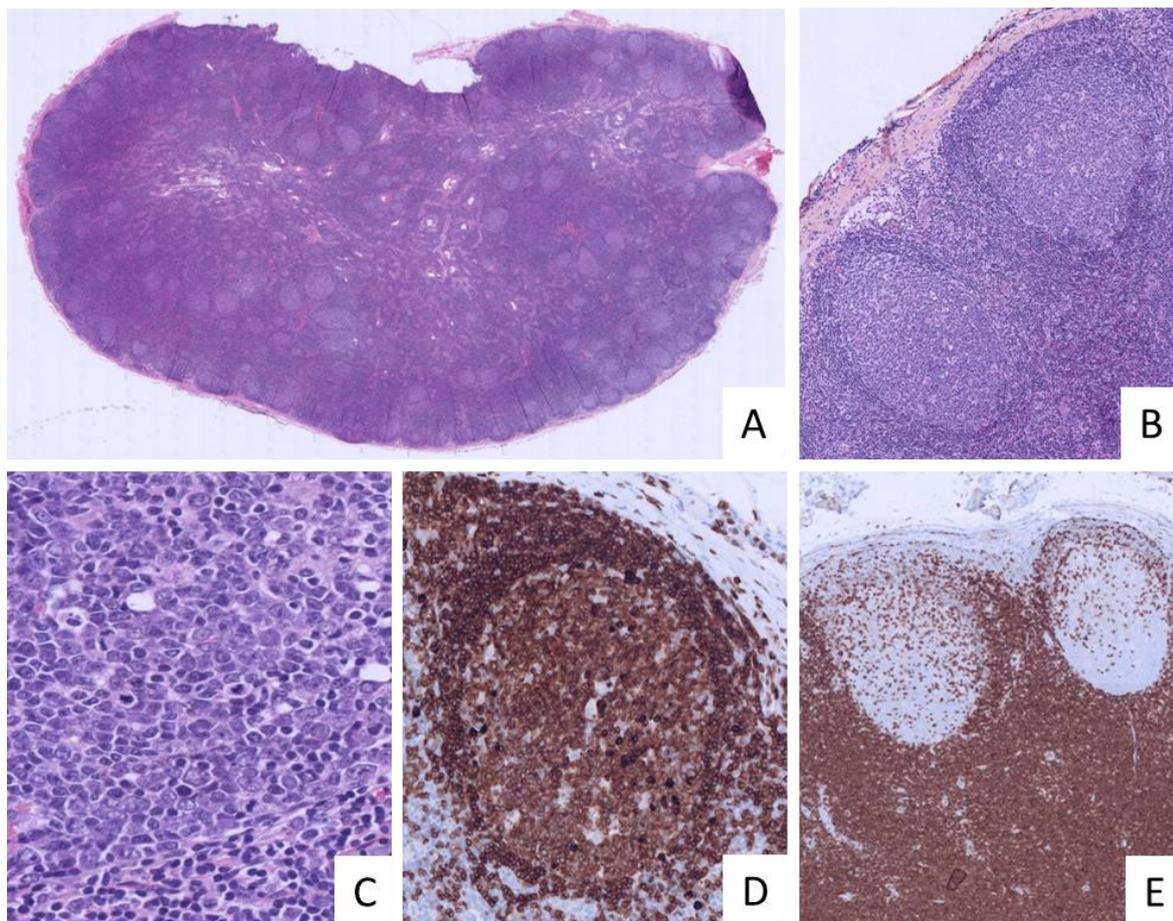
Les lymphocytes B sont produits à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes dans la moelle osseuse. Lorsqu'ils sont matures, ils quittent la moelle osseuse et circulent dans le sang, puis sont délivrés dans les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques, tels que les ganglions, la rate, les amygdales et le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT), où ils se regroupent et forment des follicules lymphoïdes B primaires. A ce stade, les

lymphocytes B sont dits naïfs, car ils n'ont pas encore été exposés à des antigènes externes.

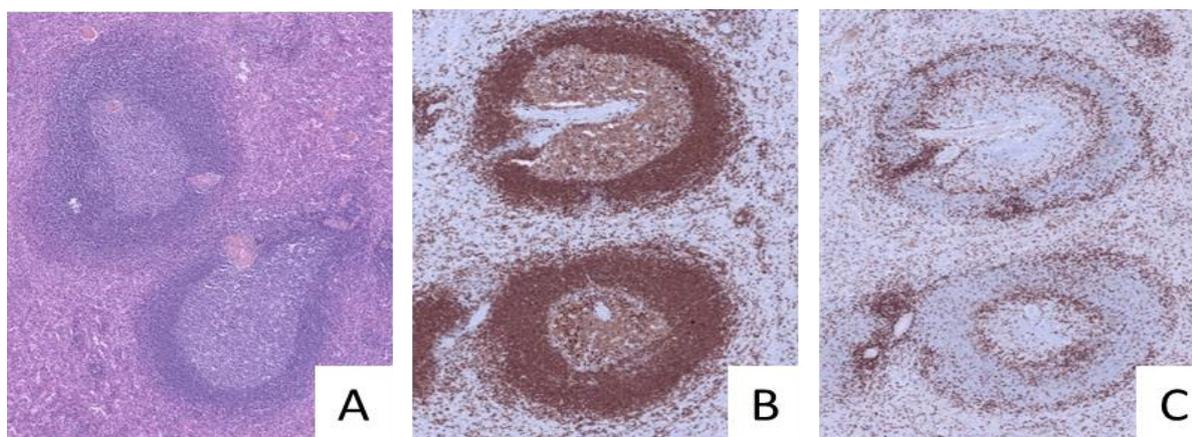
L'unité fonctionnelle des organes lymphoïdes secondaires, où a lieu la maturation de l'affinité des lymphocytes B pour l'antigène, était appelée par le passé "nodule composite". Sa structure microanatomique, initialement décrite par *Van den Oord et al.* (13), comprend un follicule B et une aire T para corticale adjacente. Le contact avec l'antigène engendre le développement d'un centre germinatif intra-folliculaire, cerné d'une couronne lymphocytaire, le follicule est alors dit secondaire (14).

Les centres germinatifs sont constitués d'un réseau de CFD, de lymphocytes B en cours de maturation, de macrophages résorbant des corps apoptotiques et de lymphocytes TFH, qui correspondent à un sous-groupe spécialisé de lymphocytes T helper CD4+. Dans les organes lymphoïdes secondaires où l'afflux d'antigènes est abondant (rate et MALT), une zone périphérique autour de la couronne lymphocytaire nommée zone marginale est présente. Cette zone est moins visible dans les follicules B secondaires des ganglions, à l'exception de ceux du mésentère. La couronne lymphocytaire et la zone marginale forment le manteau du follicule B secondaire. C'est au sein du centre germinatif qu'a lieu la maturation des lymphocytes B naïfs.

La zone T adjacente, est constituée de nombreux lymphocytes T, d'un nombre variable de cellules réticulaires inter digitées et de veinules post-capillaires (11). Les Figure 1 et Figure 2 illustrent l'architecture des follicules lymphoïdes secondaires dans le ganglion et la rate.



**Figure 1 : Architecture du ganglion lymphoïde.** A. Ganglion lymphoïde (HE x10). B. Deux follicules lymphoïdes localisés dans la corticale (HE x10). C. Centre germinatif (HE x400). D. Immunomarquage CD79a des lymphocytes B : marquage plus intense de la couronne lymphocytaire, par rapport au centre germinatif (x200). E. Immunomarquage CD3 des lymphocytes T, localisés principalement dans la zone paracorticale, et en faible proportion dans les centres germinatifs (x100).



**Figure 2 : Follicules lymphoïdes spléniques.** A. Deux follicules lymphoïdes spléniques (HE x100). B. Immunomarquage CD79a des lymphocytes B (x100). C. Immunomarquage CD3 des lymphocytes T : mise en évidence de la zone T (x100).

## **B. Parcours des lymphocytes B : recrutement dans les follicules, migration au contact de la zone T, activation et migration dans le centre germinatif**

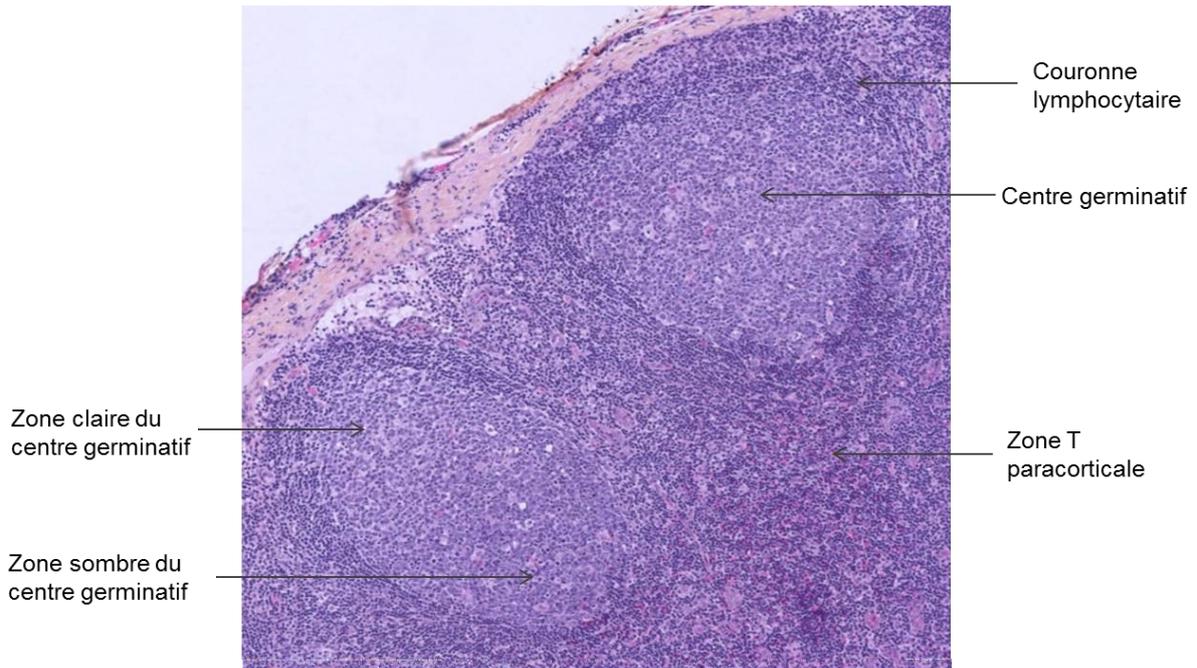
Les lymphocytes TFH et les CFD sécrètent la chimioquine CXCL13, dont le premier rôle est de recruter les lymphocytes B naïfs au sein des centres germinatifs, à travers les veinules post-capillaires situées dans les territoires para corticaux périfolliculaires (15). Le seul récepteur connu à la molécule CXCL13 est le CXCR5, exprimé entre autres par les lymphocytes B naïfs. Produite en grande quantité dans le centre germinatif, la chimioquine CXCL13 fait l'objet d'une transcytose vers la surface luminale des cellules endothéliales des veinules post-capillaires. Elle se lie à son récepteur CXCR5, exprimé par les lymphocytes B, et entraîne l'activation d'intégrines, en particulier l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ . Ces intégrines permettront aux lymphocytes B d'adhérer à l'endothélium, premier pas vers la migration trans-endothéliale (16).

Une fois dans le follicule B, les lymphocytes B naïfs surexpriment le récepteur CCR7, dont les ligands sont les chimioquines CCL19 et le CCL21, produites par les cellules stromales de la zone T para corticale qui borde les follicules B. Arrivés par chimiotactisme au contact de cette zone T, les lymphocytes B présentent aux lymphocytes T helper l'antigène associé aux molécules de classe II du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Ils reçoivent en retour un premier signal de prolifération et de différenciation, grâce à l'interaction entre la molécule CD40, exprimée par les lymphocytes B, et son ligand CD40L, exprimé par les lymphocytes T helper.

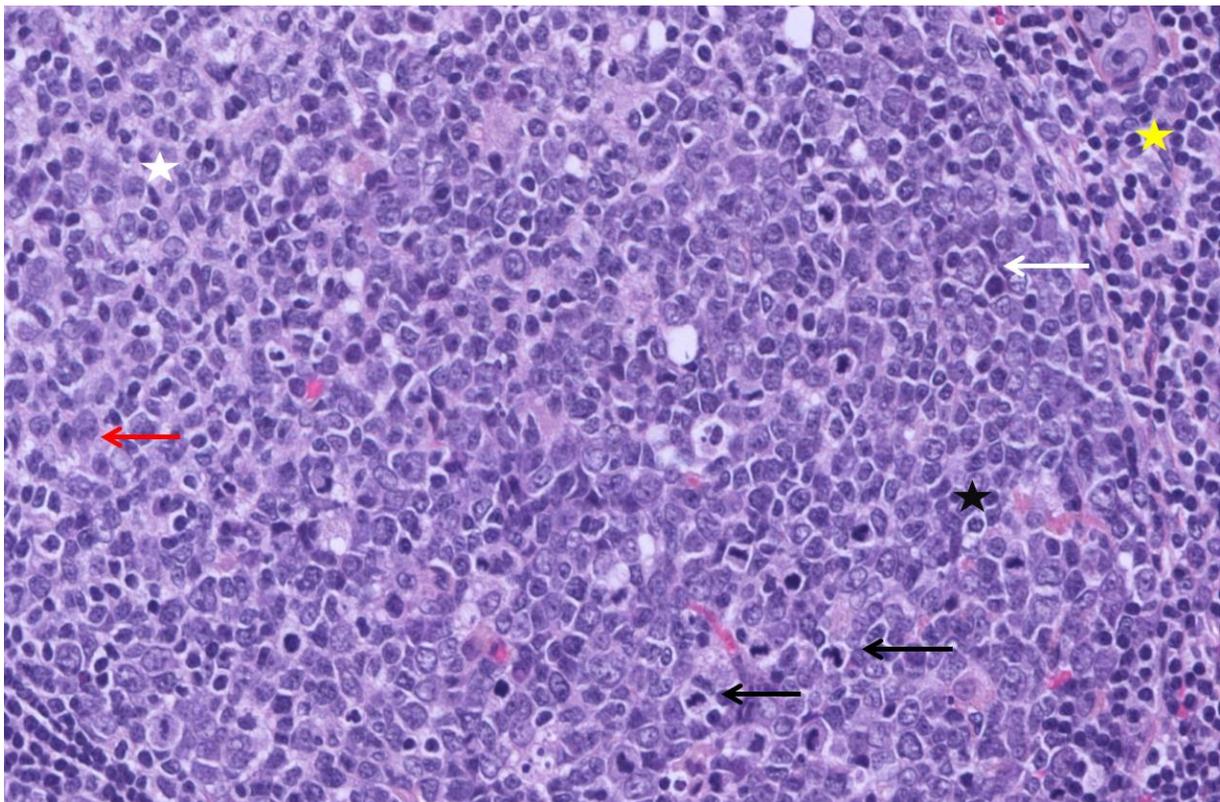
Les lymphocytes B activés ou blastes prolifèrent et peuvent suivre deux voies de différenciation. Une partie, majoritaire, se différencie en plasmocytes de courte durée de vie produisant des anticorps à faible degré d'affinité. Les lymphocytes B activés qui suivent cette voie ont une régulation négative de CXCR5, et échappent donc à l'attraction vers le centre germinatif exercée par la chimioquine CXCL13. Ces cellules se localisent dans les cordons médullaires des ganglions et la pulpe rouge splénique. Les anticorps produits manquent d'affinité pour l'antigène, mais sont disponibles rapidement et participent à la réponse humorale précoce, qui compense le délai de formation des centres germinatifs. L'autre partie des lymphocytes B activés surexprime le récepteur CXCR5 et migre par chimiotactisme dans le centre germinatif. Les lymphocytes B naïfs non activés forment la couronne lymphocytaire du manteau.

### **C. Différenciation en plasmocytes à longue durée de vie et lymphocytes B mémoires à haut degré d'affinité.**

Sept à dix jours après l'exposition à l'antigène T-dépendant, le centre germinatif du follicule secondaire est constitué. Il est polarisé en deux zones : une zone sombre constituée de centroblastes rapidement prolifératifs, et une zone claire constituée de centrocytes quiescents (Figure 3) (17,18). Les centroblastes sont des cellules de grande taille n'exprimant pas ou peu d'immunoglobulines de surface, avec un noyau rond vésiculeux, siège d'hypermutations somatiques. Ces mutations intéressent la région variable des gènes des immunoglobulines, et la prolifération se traduit morphologiquement par la présence de nombreuses mitoses (Figure 4).



**Figure 3 : Architecture du follicule lymphoïde (HE x100).**



**Figure 4 : Constituants du centre germinatif (HE x400).** La zone sombre (étoile noire) contient des centroblastes de grande taille au noyau vésiculeux (flèche blanche), de nombreuses mitoses (flèches noires) et des corps apoptotiques. La zone claire (étoile blanche) comporte des centrocytes de taille moyenne au noyau clivé (flèche rouge) et des lymphocytes T de petite taille. La couronne lymphocytaire (étoile jaune) entoure le centre germinatif.

Les centroblastes se différencient en centrocytes non prolifératifs, qui migrent vers la zone claire du centre germinatif. Ces cellules sont de taille moyenne (entre un lymphocyte naïf et un centroblaste), au noyau irrégulier et clivé. Elles expriment à leur surface les anticorps néoformés, et interagissent avec les CFD, qui forment un réseau dans la zone claire du centre germinatif, et qui présentent l'antigène sous forme de complexes immuns. Une fois l'anticorps lié à l'antigène, les centrocytes présentent l'antigène aux lymphocytes TFH, localisés dans la zone claire des centres germinatifs, et requièrent leur coopération pour poursuivre leur différenciation.

Les centrocytes dont les hypermutations ont entraîné une augmentation de l'affinité pour l'antigène interagissent avec les lymphocytes TFH, par l'intermédiaire du récepteur ICOS (inducible T cell costimulator), exprimé en grande quantité par les lymphocytes TFH, et son ligand ICOSL, exprimé par les cellules présentatrices de l'antigène, y compris les lymphocytes B. Les lymphocytes TFH expriment alors le ligand de CD40, qui se lie à la molécule CD40 exprimée à la surface des centrocytes, et sécrètent les molécules IL4 et IL10, qui sont des facteurs de croissance et de différenciation des lymphocytes B (Figure 5). Associées à l'interaction CD40-CD40L, ces molécules induisent la survie des blastes sélectionnés, leur expansion clonale, leur différenciation en plasmocytes à longue durée de vie et cellules B mémoires, ainsi que la recombinaison du domaine constant des chaînes lourdes des immunoglobulines (commutation de classe ou « class-switch recombination »). D'autre part, les lymphocytes TFH peuvent également orienter les centrocytes vers une redifférenciation en centroblastes, afin de subir un nouveau cycle d'hypermutations. PD1 (programmed cell death-1) est une

protéine exprimée à la surface des lymphocytes TFH, qui aurait également un rôle dans la sélection et la survie des lymphocytes B du centre germinatif (4).

Les centrocytes dont le degré d'affinité pour l'antigène n'est pas suffisant, ou qui produisent des auto-anticorps, ne reçoivent pas de signal de survie et meurent par apoptose. Ils sont ensuite phagocytés et digérés par les macrophages. Les lymphocytes TFH qui sont eux-mêmes auto-réactifs reçoivent un signal inhibiteur leur empêchant de fournir de l'aide aux lymphocytes B. Ce signal est fourni par les lymphocytes T helper régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD69<sup>-</sup>, également localisés dans les centres germinatifs (19).

En absence de lymphocytes TFH spécifiques de l'antigène, les centrocytes sont éliminés et le centre germinatif disparaît précocement (20).

Les centres germinatifs nouvellement formés représentent une population oligoclonale B. En moyenne, chaque centre germinatif est dérivé de 1 à 3 clones, et comporte 10<sup>4</sup> lymphocytes B. Sans stimulation antigénique supplémentaire, le centre germinatif disparaît environ 21 jours après l'immunisation (17). La réponse à l'antigène T-dépendant continue, elle, pendant plusieurs mois, grâce à l'antigène de surface présenté par les CFD sous forme de complexes immuns, qui maintient l'activation des cellules B mémoires (21).

## II. Lymphocytes TFH

### A. Différenciation et spécialisation dans la coopération avec les lymphocytes B dans les centres germinatifs

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> centro folliculaires ont été initialement individualisés par *Velardi et al.* en 1986. Ils correspondent à un sous-type minoritaire de lymphocytes T helper caractérisés par un phénotype de surface  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> et l'expression de chimioquinas spécifiques (22). Des études d'expression génique ont montré que leur programme transcriptionnel et leurs fonctions sont différents des autres sous-types de lymphocytes T helper (Th1, Th2, Th17, Treg) (23,24). *Shaerli et al.* ont donné leur nom aux lymphocytes TFH en 2000, et ont décrit plus précisément leur rôle dans le recrutement initial des lymphocytes B naïfs à l'intérieur du centre germinatif, et leur contribution secondaire à l'activation et à la différenciation de ces derniers (25).

Une revue de la littérature datant de 2005 définit les lymphocytes TFH comme des lymphocytes T helper CD4<sup>+</sup> exprimant le récepteur CXCR5, ce qui explique leur localisation centro folliculaire, spécialisés dans la coopération avec les lymphocytes B dans les centres germinatifs au cours de la réponse aux antigènes T-dépendants (20).

Le mécanisme de différenciation en lymphocytes TFH a fait l'objet de plusieurs hypothèses. Initialement, des auteurs ont suggéré que les lymphocytes TFH proviennent de lymphocytes T helper Th1 ou Th2, ayant acquis des fonctions TFH par l'expression de marqueurs de surface et de chimioquinas spécifiques. D'après une revue de la littérature rédigée par *J.Scott Hale et Rafi Ahmed* en 2015,

les lymphocytes TFH se différencieraient précocement à partir de lymphocytes T CD4+ naïfs. La différenciation en lymphocytes TFH passe par l'expression d'ICOS, qui induit un signal entraînant l'expression de BCL6 (B-cell lymphoma 6 protein). BCL6 est un facteur répresseur de transcription, son rôle est d'initier et de réguler le programme de différenciation de la lignée TFH (24,26). L'expression de BCL6 en quantité élevée est nécessaire à l'expression de CXCR5, et donc à la présence des lymphocytes TFH dans les centres germinatifs (27,28). Si BCL6 est également exprimé dans d'autres sous-types de lymphocytes T, c'est son expression en quantité élevée qui joue un rôle dans la différenciation en lymphocyte TFH. D'autres molécules telles que SAP (signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein) et les cytokines IL-6 et IL-21, jouent également un rôle important dans la différenciation TFH. IL-21 a également un rôle dans la survie des lymphocytes TFH de manière autocrine, la survie des lymphocytes B et la production d'anticorps (4,29). Le maintien du phénotype TFH au cours de la réponse immune nécessite par ailleurs des interactions avec les lymphocytes B.

Certains lymphocytes TFH se différencient en lymphocytes TFH mémoires, dont les fonctions peuvent être réactivées en cas de nouveau contact avec l'antigène, à distance du premier contact (24).

Des études ont montré que le taux d'expression d'ICOS et d'IL-21 est associé à la production d'auto-anticorps (27), et qu'une surexpression d'ICOS par les lymphocytes TFH est associée au développement de pathologies auto-immunes telles que le lupus érythémateux disséminé, par échappement du contrôle des lymphocytes TFH sur les clones B auto-réactifs (30–32).

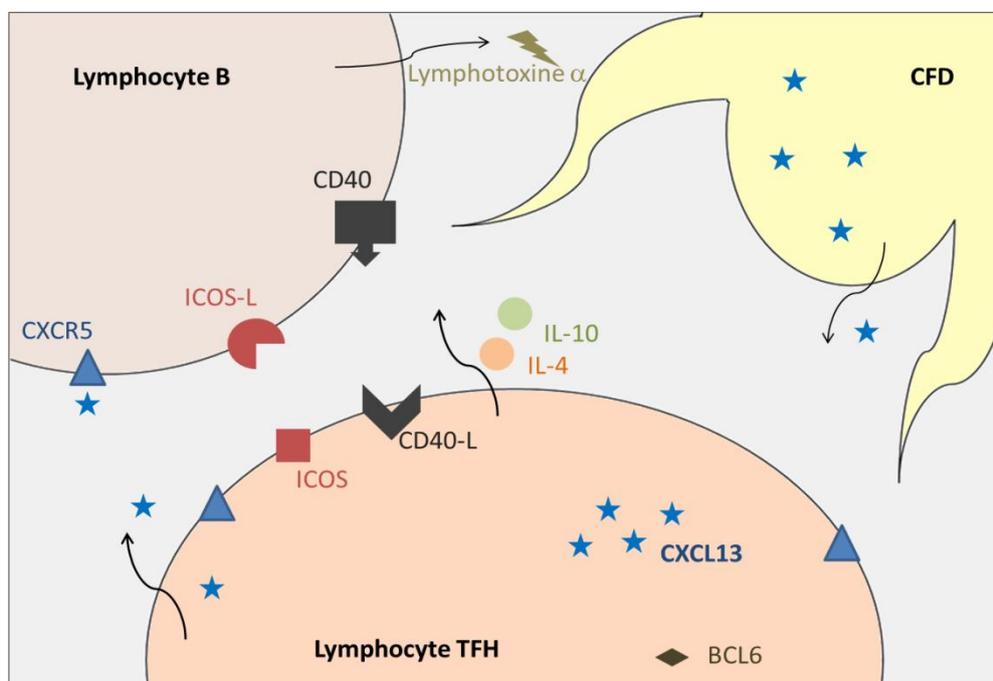
## **B. La chimioquine CXCL13 et son récepteur, CXCR5**

Le rôle principal de la molécule chimio-attractante CXCL13 est de recruter les lymphocytes B naïfs et les lymphocytes TFH dans le centre germinatif du follicule lymphoïde, et de relocaliser les lymphocytes T helper dans les zones para corticales à proximité du follicule lymphoïde, pour favoriser la coopération avec les lymphocytes B (1). Le récepteur CXCR5 est le seul récepteur connu de CXCL13. Il est exprimé par les lymphocytes B naïfs et les lymphocytes TFH (Figure 5), et n'est pas exprimé par les autres sous-types de lymphocytes T helper (23).

Initialement, cette chimioquine était appelée BCA1 (B-cell attracting chemokine 1), car les cellules attirées sont majoritairement des lymphocytes B. CXCL13 est produite par les cellules stromales des follicules secondaires, par les lymphocytes TFH, et par les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes. Des études fondamentales ont prouvé que la chimioquine CXCL13 et son ligand, le récepteur CXCR5, sont cruciaux dans le développement des organes lymphoïdes secondaires et la microarchitecture des tissus lymphoïdes. Un déficit en CXCL13 ou en CXCR5 entraîne des altérations de la microarchitecture des ganglions et de la rate, et une diminution du nombre de ganglions périphériques et des follicules des plaques de Peyer (33). A l'inverse, la chimioquine CXCL13 est capable d'induire des structures « tissu lymphoïde-like », lorsqu'elle est surexprimée dans des îlots pancréatiques par exemple. D'après une étude de profil d'expression génique (*Kim et al*, 2004 (34)), le gène codant pour la chimioquine CXCL13 est un des plus positivement régulés dans les lymphocytes TFH.

CXCL13 stimule également la production de la lymphotoxine  $\alpha$  par les lymphocytes B, qui à son tour induit la prolifération des CFD et stimule leur production de CXCL13, créant un feedback positif considéré comme nécessaire à l'organisation du follicule lymphoïde (1,35,36). En situation physiologique, la molécule CXCL13 est absente des sites extra folliculaires.

D'après *Yu et Vinuesa (27)*, il existe un contingent de lymphocytes T helper qui coopèrent avec les lymphocytes B en dehors du follicule lymphoïde. Ces lymphocytes expriment également ICOS et PD1, mais en quantité moins importante que les TFH des centres germinatifs, et ils expriment peu le CXCR5, ce qui explique qu'ils échappent à la chemo attraction vers le centre germinatif. Le profil d'expression de chimioquines serait différent entre les lymphocytes TFH des centres germinatifs et ceux localisés hors du centre germinatif ; les données sur l'expression de CXCL13 par ces lymphocytes T helper extra folliculaires manquent dans la littérature.



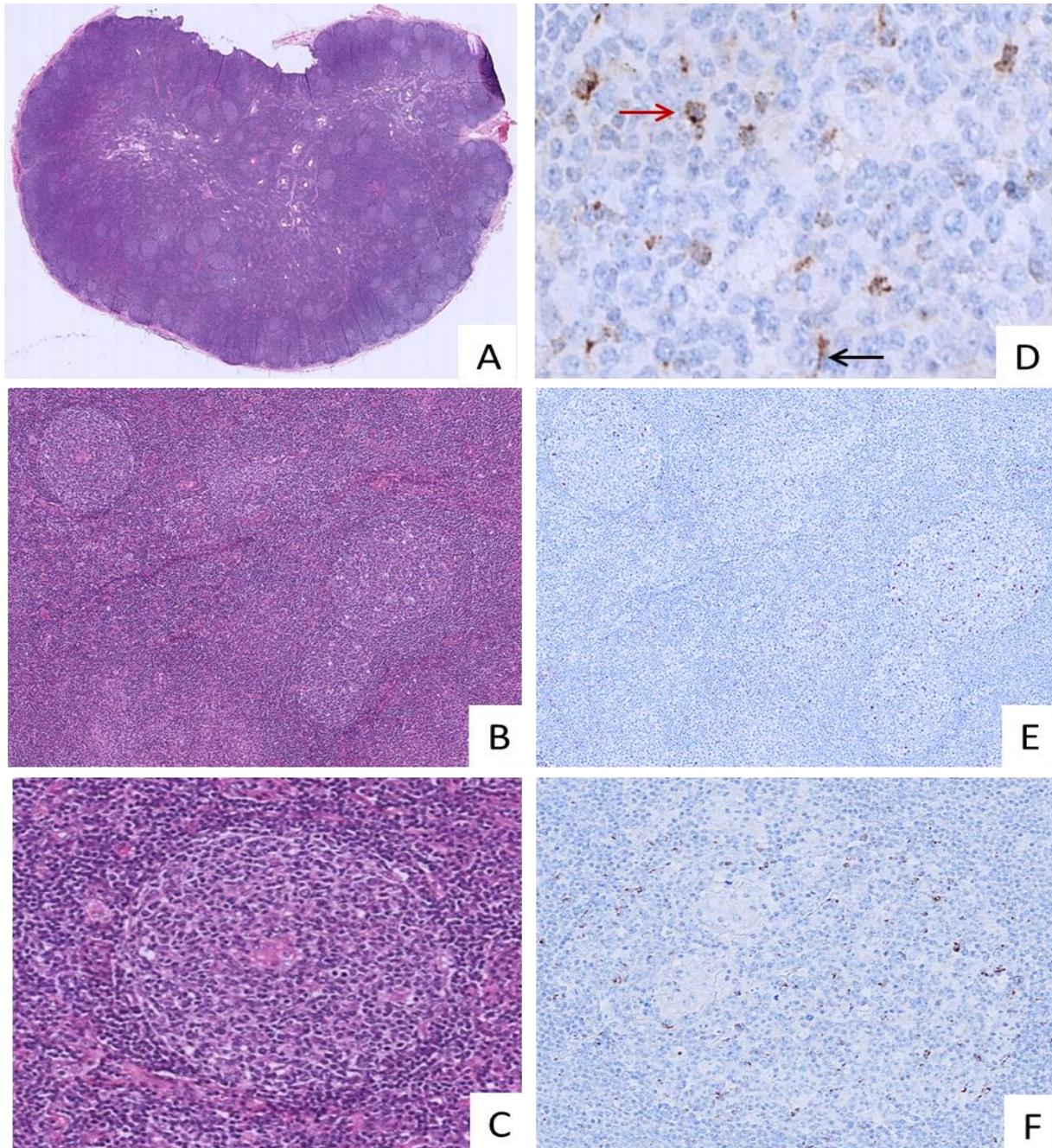
**Figure 5 : Interactions moléculaires entre les TFH, les lymphocytes B et les CFD au sein du centre germinatif.**

### **C. Marqueurs immunohistochimiques des lymphocytes TFH**

Les lymphocytes TFH ont un phénotype T helper CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>. Leur profil d'expression spécifique permet leur identification par cytométrie en flux (molécules de surface CXCR5, ICOS, PD1) ou par immunomarquage sur tissu fixé et inclus en paraffine (CXCL13, PD1, ICOS et BCL6). Les molécules CD57 et CD10 sont exprimées dans une minorité de lymphocytes TFH. Le récepteur de surface CXCR5 est facile à détecter par cytométrie en flux, mais difficile à mettre en évidence sur coupe tissulaire. Individuellement, ces marqueurs immunohistochimiques ne sont pas spécifiques des lymphocytes TFH, chacun peut être exprimé par d'autres sous-groupes de lymphocytes T. En particulier, ICOS et PD1 peuvent être exprimés par des lymphocytes T activés, hors lymphocytes TFH (37). En pratique de routine, sur coupe histologique, il est recommandé d'utiliser plusieurs marqueurs immunohistochimiques parmi CXCL13, PD1, ICOS et BCL6 (4). Une attention particulière doit être attribuée à la distribution et à l'intensité du marquage. La positivité d'au moins deux de ces marqueurs sur des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> permet d'identifier les lymphocytes TFH. L'immunomarquage par l'anticorps anti-CXCL13 semble être le plus spécifique, il est défini par un marquage cytoplasmique granuleux, avec renforcement para nucléaire en dot intéressant la zone de l'appareil de Golgi (38). L'anticorps anti-CXCL13 marque également les CFD, reconnaissables morphologiquement par leurs prolongements cytoplasmiques.

Ainsi, dans un ganglion lymphatique normal, l'immunomarquage de CXCL13 n'est positif qu'au sein des centres germinatifs, avec quelques lymphocytes TFH interfolliculaires isolés (Figure 6) (39). Par ailleurs, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> folliculaires

régulateurs sont eux aussi localisés dans le centre germinatif, mais n'ont pas un phénotype TFH, et ne sont pas spécialisés dans l'aide aux lymphocytes B, mais dans la régulation des lymphocytes T.



**Figure 6 : Immunomarcage CXCL13 dans un ganglion normal.** A. Ganglion lymphoïde (HE x10). B. et C. Follicules lymphoïdes normaux (HE x100 et x200). E. et F. Immunomarcage CXCL13 de cellules cantonnées aux centres germinatifs (x100 et x200). D. Immunomarcage CXCL13 cytoplasmique granuleux avec renforcement en dot para nucléaire de lymphocytes TFH (flèche rouge), et immunomarcage CXCL13 cytoplasmique granuleux des prolongements cytoplasmiques des cellules folliculaires dendritiques (flèche noire) (x400).

### III. Lymphomes avec immunophénotype TFH

#### A. LTAI : le prototype du lymphome dérivé des lymphocytes TFH

##### 1. Epidémiologie, historique et clinique

Le lymphome non hodgkinien de phénotype T de type angioimmunoblastique (LTAI) est le lymphome T périphérique non cutané le plus fréquent en France (40). En 2015, *de Leval et al* ont publié les résultats d'une étude réalisée à partir des données issues du réseau LYMPHOPATH, de 2010 à 2013. Le réseau LYMPHOPATH est constitué de centres experts de référence dans le diagnostic anatomopathologique des lymphomes. Depuis 2010, il couvre environ 70 % des diagnostics de lymphome en France. D'après cette étude, les lymphomes non hodgkiniens (LNH) T périphériques concernent 6,5 % des lymphomes non cutanés (2.046/31.401), dont 36,1 % sont des LTAI (739/2.046) (40).

Initialement, cette pathologie était décrite dans les années 1970 comme une condition dysimmunitaire réactionnelle non néoplasique. En 1974, *Frizzera et al* l'ont nommée « lymphadénite angioimmunoblastique avec dysprotéïnémie ». Ils ont constaté que les symptômes disparaissaient sous immunosuppresseurs dans un tiers des cas (41). D'autres auteurs l'ont nommée « lymphadénite immunoblastique » (*Luke & Tindle, 1975*) (42), et l'ont décrite comme une lymphoprolifération B d'ordre dysimmunitaire « hyperimmune », non néoplasique. Ils ont remarqué des caractéristiques communes avec le lymphome de Hodgkin, ainsi qu'une activation et une transformation excessive des lymphocytes B en immunoblastes et cellules plasmocytaires. D'autres auteurs l'ont enfin nommée « lymphogranulomatose X » (*Lennert, 1979*) (43).

Le mauvais pronostic de cette maladie, puis l'identification d'anomalies cytogénétiques et de réarrangements clonaux ou oligoclonaux des gènes du TCR dans la plupart des cas, ont finalement établi la nature néoplasique lymphomateuse T du LTAI (44).

Deux raisons principales expliquent la mise en évidence tardive du caractère tumoral malin du LTAI. La première est liée aux signes de dysrégulation immunitaire qui accompagnent fréquemment la maladie (voir p. 25), et qui peuvent masquer son caractère lymphomateux (45). La deuxième est que, comme pour le lymphome de Hodgkin, les cellules tumorales peuvent ne correspondre qu'à 5-30 % de la population, dominée par le fond inflammatoire polymorphe (voir p. 19). Le faible nombre de cellules tumorales serait lié à une suppression des signaux apoptotiques, plutôt qu'à l'acquisition de signaux prolifératifs, dans la transformation maligne (46). Par ailleurs, les critères de malignité cytologiques ne sont pas toujours facilement identifiables.

L'expression aberrante du CD10 par les cellules tumorales n'a été décrite que tardivement par *Attygalle et al* en 2002 (46), permettant de poser plus facilement le diagnostic, et de différencier les LTAI des lymphadénites réactionnelles (cellules CD10+ confinées aux centres germinatifs) et des autres lymphomes T périphériques (CD10-).

Plus tard, la mise en évidence de similitudes entre les cellules tumorales du LTAI et les lymphocytes TFH par analyse de profil d'expression génique, a établi de manière définitive que la cellule à l'origine du LTAI est le lymphocyte TFH (47). Cette origine était initialement suspectée sur la base de l'expression des marqueurs TFH

par les cellules tumorales, en particulier la chimiokine CXCL13 (48). L'identification des lymphocytes TFH comme étant les cellules d'origine du LTAI a représenté une étape majeure dans la compréhension des caractéristiques pathobiologiques de cette néoplasie (47).

Cliniquement, il s'agit d'un lymphome agressif touchant principalement le sujet âgé, au cours de la 6<sup>ème</sup> ou 7<sup>ème</sup> décennie, avec un âge médian entre 59 et 65 ans et une discrète prédominance masculine (3,47). Plus fréquent en Europe qu'en Asie ou Amérique (47), le LTAI se manifeste par des adénopathies généralisées, une altération de l'état général associant fièvre et perte de poids (signes B), et parfois des signes biologiques d'auto-immunité ou de dysrégulation immunitaire. L'hypergammaglobulinémie polyclonale (64 % des cas), l'anémie hémolytique avec positivité du test de Coombs (41 % des cas) et l'hyperéosinophilie sont les signes de dysrégulation immunitaire les plus fréquents (40,47). Une hépatosplénomégalie et une infiltration médullaire sont fréquemment associées (47). Des atteintes extranodales inconstantes sont également décrites, notamment des manifestations cutanées dans 50 % des cas, sous forme d'une éruption maculopapulaire mimant une pathologie inflammatoire (49), ou encore des atteintes articulaires (arthralgies, arthrites), ou des séreuses.

Dans la plupart des études, le pronostic est sombre et la durée moyenne de survie est inférieure à 3 ans (4,46). La survie à 5 ans est de 34 % (40). Tous les cas ne sont cependant pas létaux, le taux de survie à long terme est de 30 % (47), et de rares cas de rémission spontanée sont décrits (50).

## 2. Microscopie

Microscopiquement, l'architecture ganglionnaire est détruite par une prolifération diffuse. Le fond est polymorphe et comporte des polynucléaires éosinophiles, des lymphocytes, des plasmocytes et des histiocytes (Figure 7D). La prolifération tumorale est constituée de lymphocytes TFH clonaux atypiques, de taille petite à moyenne, au noyau rond modérément irrégulier, et au cytoplasme clair peu abondant, avec une limite membranaire nette. Des immunoblastes activés sont parsemés dans la prolifération. Ces lymphocytes B de grande taille peuvent présenter des caractéristiques morphologiques communes avec les cellules de Hodgkin ou les cellules de Reed-Sternberg (37). Ils expriment le plus souvent l'EBV (Epstein Barr Virus), cette expression étant détectée soit par immunohistochimie à l'aide de l'anticorps anti-LMP1, soit, de manière plus sensible, par hybridation in situ à l'aide de la sonde EBER (51).

D'autres critères histologiques sont particulièrement utiles pour établir le diagnostic, tels que le « saut du sinus », c'est-à-dire l'absence de comblement des sinus périphériques corticaux sous capsulaires par la prolifération lymphomateuse, contrastant avec l'infiltration du tissu péri-ganglionnaire (Figure 7A et 7B).

L'hyperplasie du réseau veineux post-capillaire est également un critère diagnostique important, défini par une prolifération marquée de veinules à endothélium turgescent. Enfin, un réseau dense, hyperplasique et irrégulier de cellules folliculaires dendritiques (CFD) avec encorbellement des vaisseaux, est un critère histopathologique majeur. Sur section colorée par l'Hémalun-Eosine, les CFD apparaissent comme des cellules pâles péri vasculaires, et l'hyperplasie est parfois subtile à détecter (Figure 7C) (47).

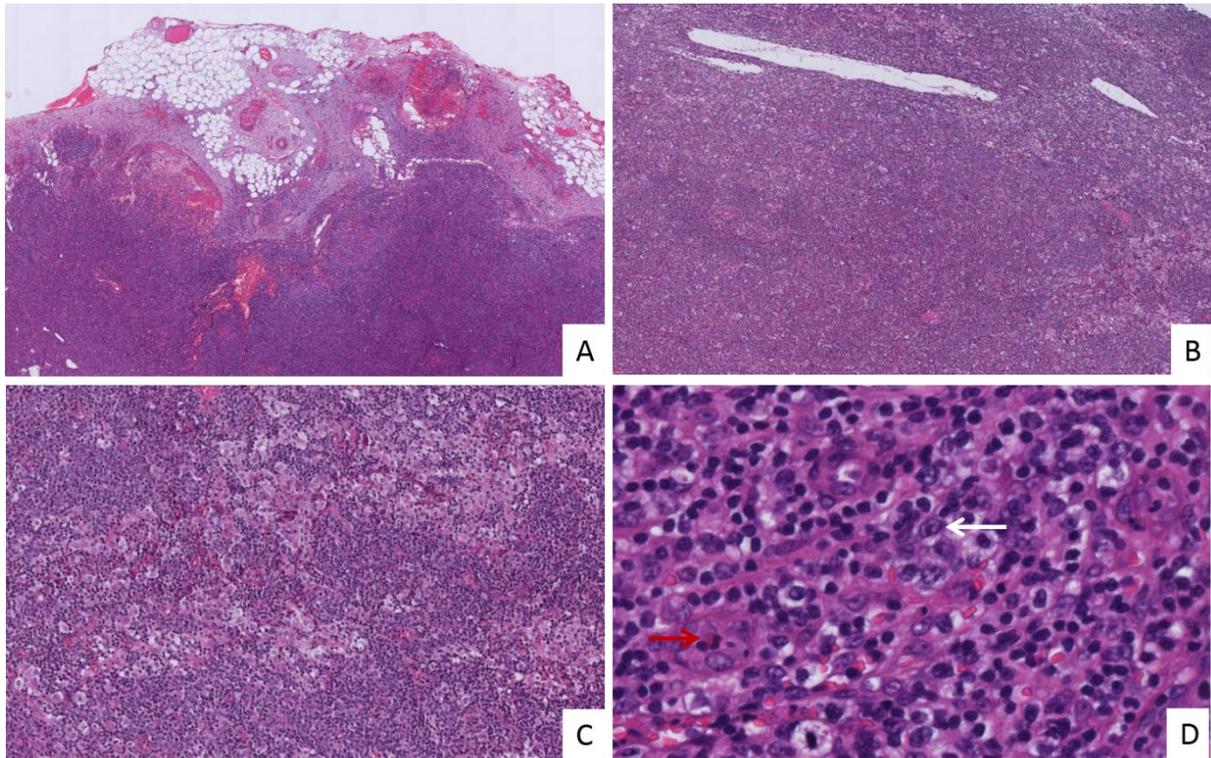
Trois grands modèles architecturaux ont été décrits par *Attygalle et al* en 2002 (46). Ils correspondent à un continuum morphologique du même processus néoplasique, sans corrélation clinique. Plusieurs modèles peuvent être observés de manière synchrone.

Le pattern I, « LTAI avec follicules hyperplasiques », correspond à la phase précoce périfolliculaire. Il s'agit du modèle le moins fréquemment rencontré, et le plus difficile à diagnostiquer. L'architecture ganglionnaire est partiellement préservée, avec présence de follicules hyperplasiques comportant une zone du manteau atténuée. L'infiltrat néoplasique est para cortical. Les cellules tumorales se disposent au pourtour des centres germinatifs, associées à des veinules à endothélium turgescent. L'hyperplasie des CFD est absente ou focale.

Dans le pattern II, « LTAI appauvri en follicules », les follicules ont un aspect atrophique, proche de celui observé dans la maladie de Castleman, avec des CFD disposées de manière concentrique. Le réseau est parfois étendu au-delà du follicule.

Le pattern III, « LTAI sans follicules » est le plus fréquent. Il est caractérisé par un effacement complet de l'architecture ganglionnaire par une prolifération diffuse, avec un réseau hyperplasique, périvasculaire, proéminent et irrégulier de CFD, accompagné d'une hyperplasie du réseau veinulaire post-capillaire et d'un infiltrat polymorphe.

Il existe également des formes morphologiques de LTAI riches en cellules claires, riches en histiocytes ou riches en immunoblastes (47).



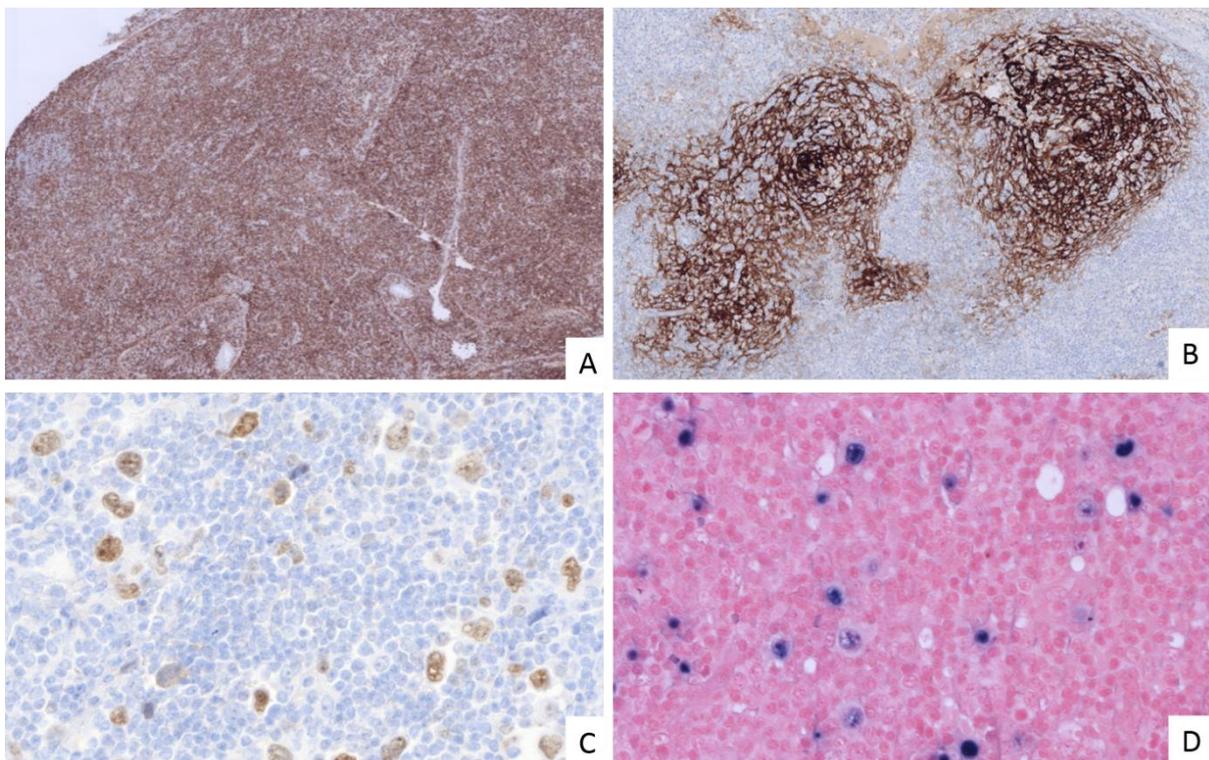
**Figure 7 : LTAI, exérèse ganglionnaire.** A. L'architecture ganglionnaire est détruite par une prolifération lymphoïde diffuse, infiltrant le tissu adipeux péri-ganglionnaire (HE x10). B. Les sinus périphériques sont préservés par la prolifération tumorale (HE x40). C. Hyperplasie du réseau de cellules folliculaires dendritiques, au cytoplasme clarifié (HE x100). D. La tumeur est constituée de lymphocytes T atypiques, associés à des blastes B de grande taille (flèche blanche), sur un fond polymorphe comportant des polynucléaires éosinophiles (flèche rouge), avec hyperplasie du réseau veineux post-capillaire (HE x400).

### 3. Immunohistochimie

Les lymphocytes TFH tumoraux ont un immunoprofil CD3+,  $\alpha\beta$ CD4+, CD8-, CXCL13+, PD1+, ICOS+, BCL6+ (8,46,47). Souvent, de manière aberrante et hétérogène, ils expriment la molécule de surface CD10, bien que ce marqueur ne soit pas exprimé par les lymphocytes TFH en situation physiologique. Le marquage est alors décrit comme plus faible que celui des lymphocytes B des centres germinatifs (46). En pratique diagnostique, aucun de ces marqueurs pris séparément n'est complètement spécifique, et il est recommandé d'utiliser plusieurs anticorps parmi CXCL13, PD1, ICOS et BCL6 afin d'identifier les lymphocytes TFH

tumoraux (47). Selon l'étude menée par *de Leval et al* en 2015, l'expression du CXCL13 par les cellules tumorales est retrouvée dans 76 % des LTAI (40).

Les immunoblastes B expriment les molécules CD20, CD79a, PAX5, et souvent CD30 (Figure 8C). L'anticorps anti-LMP1 permet de détecter les blastes B infectés par l'EBV, mais l'étude par hybridation avec la sonde EBER est plus sensible (Figure 8D) (52). La population plasmocytaire est polytypique ou monotypique (47). La prolifération périvasculaire de CFD est marquée par les anticorps anti-CD21 et anti-CD23 (Figure 8B). L'immunomarquage CXCL13 est également positif sur les CFD, avec un marquage des prolongements cytoplasmiques caractéristique (voir p.46) (9).



**Figure 8 : LTAI sur exérèse ganglionnaire.** A. Immunomarquage CD4+ des lymphocytes TFH tumoraux (x10). B. Immunomarquage CD21 : mise en évidence du réseau de CFD hyperplasique et désorganisé (x100). C. Immunomarquage PAX5+ nucléaire des grandes cellules B (x200). D. Hybridation in situ avec la sonde EBER : signal nucléaire des blastes B (x200).

#### 4. Biologie moléculaire

En biologie moléculaire, un réarrangement monoclonal ou oligoclonal des gènes du TCR est détecté par techniques PCR dans la grande majorité des cas (66 à 100 % des cas selon les études), et constitue un argument supplémentaire en faveur du LTAI (47). En plus des réarrangements des gènes du TCR, un réarrangement clonal ou oligoclonal des gènes des immunoglobulines est également retrouvé dans 5 à 34 % des cas selon les études. Cette population B monoclonale ou oligoclonale est attribuée à l'expansion des immunoblastes B.

D'une part, l'infection par l'EBV est un facteur de lymphoprolifération B, possiblement secondaire à l'immunodépression associée au lymphome T (46). La plupart des blastes B infectés par l'EBV sont porteurs de mutations des gènes des immunoglobulines, indiquant que dans le LTAI, l'EBV réside préférentiellement dans des cellules B mémoires et/ou des cellules B du centre germinatif. Ces cellules accumulent des mutations au cours des cycles de mitoses et de divisions cellulaires, et les immunoglobulines produites ne sont pas toujours reconnues par le récepteur de l'antigène. Pourtant, elles ne reçoivent pas de signal d'apoptose, suggérant que les lymphocytes TFH tumoraux stimulent la survie de ces cellules anormales (53). Un sous-groupe de patients développe ainsi une lymphoprolifération B associée à l'EBV, le plus souvent un lymphome B diffus à grandes cellules (54).

Par ailleurs, la détection d'une clonalité B est corrélée à la présence d'immunoblastes en grand nombre, mais pas toujours à l'infection par l'EBV. L'infection par l'EBV n'est donc pas le seul facteur de lymphoprolifération B, ce qui sous-entend une coopération entre lymphocytes TFH tumoraux et immunoblastes indépendamment de l'infection par l'EBV (55).

L'altération moléculaire qui entraîne la transformation maligne des lymphocytes TFH n'est pas connue. Dans 90 % des cas, des aberrations clonales sont détectées par analyse cytogénétique. Les trisomies des chromosomes 3, 5 et 21, le gain de X, et la perte de 6q sont les plus communes (4,56). Récemment, des mutations récurrentes du régulateur épigénétique IDH2 ont été identifiées chez 20 à 30 % des patients atteints de LTAI au niveau du hotspot pR172. Des inhibiteurs dirigés contre la protéine IDH2 sont actuellement en cours d'essais thérapeutiques (8). Des mutations des gènes RHOA (G17V) et TET2 sont retrouvées dans 58 % et 48 % des LTAI respectivement (7). Les découvertes récentes de mutations dans les gènes codant pour les enzymes qui contrôlent la méthylation de l'ADN (TET2, IDH2 et DNMT3) et dans le gène RHOA, qui code pour une petite GTPase, ouvrent la voie à des études qui évaluent le potentiel thérapeutique d'agents déméthylants et/ou d'inhibiteurs spécifiques dans le LTAI. Les thérapies ciblées justifient d'autant plus le classement des lymphomes T périphériques dans des catégories adaptées (40).

## **5. Traitement**

Le traitement par corticoïdes est celui qui donne le plus de résultats au long cours. Comme pour les autres lymphomes T périphériques, il améliore notamment les signes généraux. Les chimiothérapies agressives de type CHOP sont peu efficaces. Certains auteurs recommandent une consolidation avec transplantation de cellules souches autologues, qui aurait un impact favorable, bien que limité, sur le pronostic (57). De nouveaux traitements sont apparus au cours des dernières années, tels que les inhibiteurs d'IDH, ainsi que les agents déméthylants pour les

patients mutés TMT3 et TEP2. La mutation RHOA n'a pas d'implication thérapeutique pour le LTAI à l'heure actuelle. Dans les cas de transformation de la prolifération immunoblastique en lymphome B diffus à grandes cellules, l'utilisation du Rituximab a un intérêt thérapeutique (47). A ce jour, les avancées dans la découverte de mutations intervenant dans la tumorigenèse du LTAI n'ont pas amélioré le pronostic, ni défini un consensus concernant les traitements de première ou de deuxième ligne. Aucun traitement n'a fait la preuve de son efficacité par rapport à la survie à long terme (58).

## **6. Le LTAI, un lymphome immunologiquement fonctionnel**

Le nom de ce lymphome vient de la vascularisation typique et du contingent immunoblastique de la tumeur. Les manifestations cliniques du LTAI sont liées davantage à la dysrégulation du système immunitaire (éosinophilie, hypergammaglobulinémie, anémie hémolytique auto-immune) qu'à la masse tumorale (38). Ces signes d'auto-immunité, qui caractérisent le LTAI et le différencient des autres lymphomes, peuvent être expliqués par une conservation des fonctions immunologiques des cellules tumorales.

Différents facteurs sécrétés par les lymphocytes TFH tumoraux sont impliqués dans le recrutement des lymphocytes B (CXCL13), l'expansion et la différenciation des immunoblastes entraînant l'hypergammaglobulinémie et les manifestations auto-immunes (ICOS, CD40L, IL10), et l'induction de la prolifération vasculaire (facteurs de croissance angiogéniques tels que le VEGF et l'angiopoïétine). Ils joueraient aussi un rôle autocrine (IL21). Le TGF $\beta$  est également un médiateur de la différenciation

des CFD, qui sont à leur tour une source de CXCL13 et VEGF (47). De plus, les lymphocytes TFH peuvent supprimer la réponse cellulaire T en inhibant la prolifération et la fonction des lymphocytes T CD4+ conventionnels, via la production de TGF- $\beta$  et IL-10. Ils pourraient ainsi contribuer à l'inhibition de la réponse T dans le LTAI, considérée comme responsable notamment de la primo-infection ou de la réactivation de l'infection par l'EBV (4,32).

Le rôle de la chimioquine CXCL13 dans le follicule lymphoïde pourrait expliquer la présence initiale de la prolifération néoplasique en périphérie du follicule lymphoïde, via l'expression du récepteur CXCR5. D'autre part, l'expression de CXCL13 par les cellules tumorales recrute d'autres lymphocytes TFH non tumoraux au sein de la prolifération du LTAI : tous les lymphocytes TFH immunomarqués par le CXCL13 ne seraient donc pas tumoraux (1).

Une meilleure compréhension des interactions entre lymphocytes TFH tumoraux et le microenvironnement tumoral pourrait permettre d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques (59).

## **B. Autres lymphomes dérivés des lymphocytes TFH**

La révision de la classification OMS des néoplasies hématologiques effectuée en 2016 reconnaît, en plus du LTAI, deux entités lymphomateuses provisoires dérivées des lymphocytes TFH : le lymphome T périphérique folliculaire, et le lymphome T périphérique ganglionnaire de phénotype TFH (6,7). L'immunoprofil TFH des cellules tumorales peut être établi dès lors qu'elles expriment deux marqueurs parmi CXCL13, ICOS, BCL6, CD10 et PD1.

## **IV. Autres pathologies avec immunomarquage CXCL13+**

Initialement, un immunomarquage CXCL13+ au sein d'une population lymphomateuse était considéré comme un marqueur diagnostique fiable du LTAI, plus sensible et plus uniformément et intensément positif que le CD10. Il était décrit comme spécifique du diagnostic de LTAI par rapport aux autres LNH T périphériques, notamment le LNH T NOS (not otherwise specified) (1–3). Progressivement, plusieurs études ont montré qu'un immunomarquage CXCL13+ était en fait retrouvé dans d'autres pathologies, hématologiques ou non, tumorales ou non.

### **A. Lymphomes non dérivés des lymphocytes TFH**

#### **1. Immunomarquage CXCL13+ des cellules tumorales**

Un immunomarquage CXCL13+ a été décrit dans des LNH T primitifs cutanés à petites et moyennes cellules CD4+, et dans une partie des LNH T périphériques NOS (4,5). Une étude récente comportant 30 cas de LNH T/NK a décrit une expression de marqueurs CXCL13 par les cellules tumorales dans 26 % des cas (8). Une expression de CXCL13 était également retrouvée dans 2 cas de lymphomes T anaplasiques ALK- sur 8, avec un microenvironnement contenant des cellules réactionnelles CXCL13+ dans 3 cas sur 8 (8).

## **2. Immunomarquage CXCL13+ du microenvironnement**

Dans certains lymphomes, ce ne sont pas les cellules tumorales qui expriment le CXCL13, mais les lymphocytes TFH non tumoraux réactionnels. Au cours des dernières années, un intérêt particulier a été accordé à la présence de lymphocytes TFH dans le microenvironnement de lymphomes B notamment. Certains auteurs avancent que les interactions entre les lymphocytes TFH et les cellules tumorales B contribuent à la croissance et au maintien de la population tumorale. C'est le cas du lymphome non hodgkinien nodulaire à prédominance lymphocytaire (LHNPL), où un immunomarquage CXCL13+ est décrit dans les zones diffuses (10). Les follicules tumoraux du lymphome B folliculaire comportent aussi des lymphocytes TFH non tumoraux (4).

### **B. Pathologies non hématologiques : sarcome à cellules folliculaires dendritiques**

Les tumeurs des cellules histiocytaires et dendritiques sont très rares, elles intéressent les ganglions lymphatiques et les tissus mous (60). Le sarcome à cellules folliculaires dendritiques est dérivé des cellules stromales mésenchymateuses des follicules lymphoïdes, les CFD. Les cellules tumorales ont un immunophénotype CD21+ CD23+ CD68+. Une étude publiée en 2008 (9) a mis en évidence une expression intense et diffuse de la chimioquine CXCL13 dans les sarcomes à cellules folliculaires dendritiques, alors que l'immunomarquage était négatif pour les autres tumeurs mésenchymateuses constituant les diagnostics différentiels de l'étude.

# OBJECTIFS DE L'ETUDE

## I. Objectif principal : étude de la sensibilité et de la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI

L'objectif principal de l'étude était d'évaluer la sensibilité et la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI, à partir de 273 cas, et de déterminer les diverses pathologies dans lesquelles un immunomarquage CXCL13 positif peut être observé, dans les cellules tumorales et/ou au sein du microenvironnement. Pour certaines d'entre elles, ce marquage n'était ni attendu, ni décrit dans la littérature.

Nous avons également détaillé les critères anatomopathologiques et immunohistochimiques qui permettent d'interpréter l'immunomarquage CXCL13, et déterminé de manière précise l'utilité de ce marqueur dans l'établissement du diagnostic de LTAI, ainsi que ses bonnes conditions d'évaluation.

## II. Objectifs secondaires

### A. La détection d'un immunomarquage CXCL13+ varie-t-elle en fonction du type de prélèvement ? Comparaison des biopsies ostéo-médullaires et des exérèses ganglionnaires

Certaines localisations extra-ganglionnaires comme la moelle osseuse et la peau entraînent des difficultés diagnostiques en raison de la faible quantité de cellules tumorales, en particulier en l'absence de diagnostic de LTAI établi

antérieurement (4,61). Les études immunohistochimiques (marqueurs TFH) et moléculaires sont alors particulièrement utiles pour le diagnostic. L'infiltration de la moelle osseuse est présente dans environ 70 % des LTAI. Elle est corrélée, entre autres, à la présence de fièvre, d'une hépatosplénomégalie, et d'une anémie (62). La BOM (biopsie ostéo-médullaire) est souvent effectuée de manière précoce dans la prise en charge de patients atteints de LTAI. Dans un certain nombre de cas, elle correspond même au premier prélèvement envoyé pour examen anatomopathologique (2). Dans la moelle osseuse, l'infiltration par le LTAI peut être difficile à mettre en évidence (47). Une étude publiée en 2009 recensant 27 cas d'infiltration osseuse par un LTAI (63), rapporte un mode d'infiltration nodulaire multifocal dans 78 % des cas. En immunohistochimie, BCL6, PD1 et CD10 étaient exprimés par les cellules tumorales dans 100 %, 85 % et 18,5 % des cas respectivement, alors que l'immunomarquage CXCL13 n'était positif que pour un cas, sur des cellules dendritiques. D'après cette étude, l'absence d'expression de CXCL13 par les cellules tumorales (faux négatif), et l'expression de CD10 dans une minorité de cas, ainsi que la rareté des CFD, rendaient le diagnostic de LTAI difficile dans la moelle osseuse. Par ailleurs, l'anticorps anti-CD10 marque également le stroma, et peut être d'interprétation difficile. Les auteurs ont conclu que l'immunoprofil TFH est plus facilement détectable à l'aide des marqueurs PD1 et BCL6. *Grogg et al.* ont eux aussi évalué l'immunophénotype de l'infiltration du LTAI dans les BOM, ils décrivent une expression focale du CXCL13 par des cellules atypiques dans une partie des cas (2). La quantité de cellules exprimant la chimioquine CXCL13 peut être très faible, ce qui pourrait limiter la puissance diagnostique de la BOM, par rapport à l'exérèse ganglionnaire. D'après les données

de la littérature, la confirmation du diagnostic de LTAI par exérèse ganglionnaire est indispensable (49). Dans un certain nombre de cas, ces difficultés diagnostiques empêchent le pathologiste de conclure et d'établir un diagnostic formel.

Le premier objectif secondaire de l'étude est d'évaluer si la détection d'un immunomarquage CXCL13 varie en fonction du type de prélèvement, en comparant les LTAI diagnostiqués sur BOM, aux LTAI diagnostiqués sur d'autres types de prélèvement.

**B. Le niveau de certitude diagnostique varie-t-il en fonction du type de prélèvement ? Comparaison des biopsies ganglionnaires à l'aiguille et des exérèses ganglionnaires**

L'établissement du diagnostic anatomopathologique de LTAI requiert une exérèse ganglionnaire pour l'évaluation de l'architecture, des caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques de la prolifération, ainsi que pour l'étude moléculaire. Les critères architecturaux ne sont pas évaluables sur certains types de prélèvement, notamment les biopsies ganglionnaires à l'aiguille.

Le deuxième objectif secondaire de l'étude est d'évaluer si le niveau de certitude diagnostique varie en fonction du type de prélèvement, en comparant les diagnostics portés sur biopsie ganglionnaire à l'aiguille, aux diagnostics portés sur exérèse ganglionnaire.

# MATERIELS ET METHODES

## I. Sélection des cas

L'étude est rétrospective, mono centrique, avec recueil de données à partir du système de gestion de laboratoire Diamic® de l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille, sous la responsabilité du Professeur Claude-Alain Maurage.

### A. Critères d'inclusion

Les dossiers anatomopathologiques ont été sélectionnés sur la base de la réalisation d'un immunomarquage par l'anticorps anti-CXCL13 (immunomarquage CXCL13), entre le 1<sup>er</sup> janvier 2014 et le 1<sup>er</sup> mai 2016, dans l'Institut de Pathologie du Centre de Biologie-Pathologie du CHRU de Lille. La sélection a été faite à l'aide du code technique IPCXCL13 dans Diamic®. Pour chaque patient sélectionné, tous les prélèvements le concernant ont été analysés, quelle que soit la date du prélèvement, de manière à disposer de l'ensemble de chaque dossier anatomopathologique.

Les dossiers anatomopathologiques sélectionnés correspondaient :

- Soit à des patients pris en charge initialement au CHRU de Lille. Le prélèvement était alors directement adressé à l'Institut de Pathologie du CHRU ;
- Soit à des patients pris en charge en dehors du CHRU de Lille. Le prélèvement était alors adressé à l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille pour relecture dans le cadre du réseau national LYMPHOPATH, sous forme

de blocs d'inclusion et de lames colorées. Dans ce cas, l'immunomarquage CXCL13 était réalisé au CHRU à partir du bloc transmis.

## **B. Critères d'exclusion**

Nous avons exclu les dossiers de l'étude lorsque :

- Le bloc était transmis exclusivement pour immunomarquage CXCL13 sans demande de relecture (prestation technique simple sans interprétation) ;
- Le bloc était épuisé et ne comportait plus de tissu pathologique, ne permettant pas l'interprétation de l'immunomarquage CXCL13.

## **II. Données recueillies**

Pour chaque dossier, nous avons recueilli :

- L'âge du patient au moment du prélèvement ;
- Le sexe du patient ;
- Le type de prélèvement :
  - Exérèse ganglionnaire chirurgicale,
  - Biopsie ganglionnaire à l'aiguille,
  - Biopsie cutanée,
  - Biopsie ostéo-médullaire (BOM),
  - Pièce opératoire en dehors des exérèses ganglionnaires,
  - Autre type de prélèvement, ou non précisé.

- La date de réalisation de l'immunomarquage CXCL13 initial (J0) et des immunomarquages CXCL13 suivants (JN) ;
- Le diagnostic anatomopathologique (AP), établi par la synthèse des caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires de la lésion. Par rapport au diagnostic de LTAI, nous avons classé les diagnostics AP en trois catégories, selon le niveau de certitude diagnostique :
  - Diagnostic certain de LTAI : **LTAI +**
  - Diagnostic incertain de LTAI : **LTAI i**
  - Autre diagnostic : **LTAI -**

Nous avons considéré le diagnostic AP comme la référence pour évaluer la fiabilité diagnostique de l'immunomarquage CXCL13.

- Le résultat de l'immunomarquage CXCL13, dont les modalités d'évaluation sont détaillées dans le paragraphe suivant.

### **III. Modalités d'évaluation de l'immunomarquage CXCL13**

#### **A. Classement en catégories**

L'analyse des comptes-rendus AP a conduit à relire tous les cas où un immunomarquage CXCL13 positif était décrit sur des cellules tumorales ou des cellules du microenvironnement. Seuls les cas d'immunomarquage CXCL13 négatif (absence de marquage) ou physiologique (marquage des lymphocytes TFH dans les centres germinatifs) n'étaient pas relus.

Après analyse des comptes-rendus AP et relecture des lames, les cas étaient classés en quatre catégories :

#### Résultat négatif : CXCL13-

Dans cette catégorie, nous avons regroupé les cas sans marquage cellulaire détecté sur la coupe, et les cas où le marquage est celui attendu dans les structures ganglionnaires normales, en l'occurrence la présence de cellules positives dans les centres germinatifs des follicules lymphoïdes B secondaires. Quelques cellules inter folliculaires immunomarquées, isolées et minoritaires, étaient observées dans cette catégorie. Lorsque le compte rendu AP décrivait un immunomarquage rentrant dans cette catégorie, les lames n'étaient pas relues.

#### Résultat positif sur les cellules du microenvironnement : CXCL13+ M

Dans cette catégorie, nous avons regroupé les cas où l'immunomarquage intéressait des lymphocytes réactionnels non tumoraux faisant partie du microenvironnement, dans un processus néoplasique autre que le LTAI, ou dans des pathologies non tumorales, inflammatoires ou auto-immunes.

#### Résultat positif sur les cellules tumorales : CXCL13+ T

Dans cette catégorie, nous avons regroupé les cas où l'immunomarquage positif concernait des cellules tumorales, quel que soit le diagnostic AP. La reconnaissance du caractère néoplasique des cellules marquées était basée sur des critères cytologiques, tels que l'anisocaryose, l'aspect irrégulier des contours nucléaires, la présence d'un nucléole proéminent, la densité nucléaire, ainsi que sur des critères architecturaux, tels que la destruction de l'architecture ganglionnaire, et l'infiltration du tissu adipeux adjacent par les cellules tumorales.

### Résultat non interprétable : NI

Cette catégorie concernait les cas où l'immunomarquage était non interprétable par épuisement du matériel à analyser.

Pour évaluer la validité de l'immunomarquage, le témoin interne correspondait aux lymphocytes TFH des centres germinatifs. Aucun témoin externe n'était utilisé.

### **B. Sélection d'un prélèvement servant de référence par patient**

Afin d'éviter un biais de sélection lié à la présence de plusieurs prélèvements par patient, et donc de plusieurs immunomarquages CXCL13 par patient, nous avons sélectionné un prélèvement servant de référence pour chaque dossier. Le prélèvement de référence était défini par deux critères, le type de prélèvement et le niveau de certitude du diagnostic AP. A diagnostic AP égal, le prélèvement de référence était l'exérèse ganglionnaire en première intention, ou la pièce opératoire hors exérèse ganglionnaire en deuxième intention. Lorsque plusieurs diagnostics étaient suggérés sans pouvoir conclure formellement sur un premier prélèvement, et qu'un deuxième prélèvement permettait de porter un diagnostic AP formel, le deuxième prélèvement était sélectionné comme référence. De même, lorsqu'un deuxième prélèvement permettait de rectifier un diagnostic, à la lumière de données évolutives ou grâce à une meilleure qualité du prélèvement, il était sélectionné comme référence.

## **C. Anonymisation des données et accord de la CNIL**

La Commission Nationale Informatique et Libertés a donné son accord pour la réalisation de l'étude (numéro de référence DEC 16-87). Toutes les données collectées ont été entièrement anonymisées, si bien qu'il est impossible de remonter directement au patient. S'agissant d'une thèse de recueil de données, l'autorisation d'un Comité Protecteur des Personnes n'a pas été nécessaire.

## **D. Etude statistique**

### **1. Objectif principal**

Le résultat de l'immunomarquage CXCL13 était comparé, en tant que test diagnostique, à la référence que constitue le diagnostic AP, classé en trois catégories : LTAI+, LTAI i, LTAI-. La spécificité et la sensibilité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI ont été évaluées par la biostatisticienne Mme Nassima Ramdane, affectée à l'Unité de Méthodologie - Biostatistique et Data Management, à la Maison Régionale de la Recherche Clinique du Pôle de Santé Publique du CHRU de Lille.

## **2. Objectifs secondaires**

**a. La détection d'un immunomarquage CXCL13+ varie-t-elle en fonction du type de prélèvement ? Comparaison des BOM et des exérèses ganglionnaires**

Pour évaluer si le résultat de l'immunomarquage CXCL13 varie selon le type de prélèvement, l'analyse a porté sur tous les diagnostics certains de LTAI (LTAI+). Une comparaison de l'immunomarquage CXCL13 en fonction du type de prélèvement a été réalisée par un test du Chi-deux. L'analyse statistique a été réalisée par la biostatisticienne Mme Nassima Ramdane.

**b. Le niveau de certitude diagnostique varie-t-il en fonction du type de prélèvement ? Comparaison des biopsies ganglionnaires à l'aiguille et des exérèses ganglionnaires**

Pour évaluer l'impact du type de prélèvement sur le niveau de certitude diagnostique, l'analyse a porté sur tous les prélèvements. Une comparaison du niveau de certitude diagnostique (LTAI+, LTAI i, LTAI-) en fonction du type de prélèvement a été réalisée par un test du Chi-deux. L'analyse statistique a été réalisée par la biostatisticienne Mme Nassima Ramdane.

# RESULTATS

## I. Nombre de dossiers analysés

Du 1<sup>er</sup> janvier 2014 au 1<sup>er</sup> mai 2016, 212 patients ont bénéficié d'une demande d'immunomarquage CXCL13. Au total, 283 prélèvements ont été analysés, après ajout des prélèvements antérieurs et postérieurs à la période étudiée, de manière à disposer de l'ensemble du dossier anatomopathologique pour chaque patient. Le délai maximal entre deux prélèvements pour un même patient était de 1659 jours, soit 4 ans et 7 mois.

Lors du diagnostic, les prélèvements ont été interprétés par un pathologiste du CHRU de Lille spécialisé en hématopathologie. Dans le cadre de notre étude, les lames ont été relues par le Professeur Marie-Christine Copin, responsable du réseau LYMPHOPATH pour la région Nord Pas-de-Calais, et par moi-même.

Dix dossiers ont été exclus de l'étude, ils correspondaient à 8 patients :

- Neuf dossiers concernaient des demandes d'immunomarquage CXCL13 sans relecture associée (prestation technique sans interprétation) ;
- Un dossier concernait une demande d'immunomarquage CXCL13, non réalisée en raison d'un matériel tissulaire résiduel insuffisant.

Après application des critères d'exclusion, l'étude comprenait 273 prélèvements concernant 206 patients, dont 65 demandes de relecture dans le cadre du réseau national LYMPHOPATH.

## II. Données épidémiologiques

La population étudiée comportait 44 % de femmes (91/206) et 56 % d'hommes (115/206). L'âge des patients variait entre 19 ans et 96 ans La moyenne d'âge était de 61 ans et 7 mois, la médiane était de 64 ans. Le premier quartile était 52 ans et le troisième quartile 72 ans.

## III. Types de prélèvement tissulaire

**Tableau 1 : Répartition des types de prélèvement**

Type de prélèvement	Effectifs	Pourcentage
Exérèse ganglionnaire	104	38 %
Biopsie cutanée	66	24 %
Biopsie ostéo-médullaire	48	18 %
Biopsie à l'aiguille	25	9 %
Pièce opératoire	14	5 %
Autre	16	6 %
Total	273	100 %

Les exérèses ganglionnaires constituaient le mode de prélèvement le plus fréquent (38 % soit 104/273), suivies par les biopsies cutanées (24 % soit 66/273), les biopsies ostéo-médullaires (18 % soit 48/273), les biopsies à l'aiguille (9 % soit 25/273), et les pièces opératoires (5 % soit 14/273). La catégorie BOM comportait également une biopsie de lésion osseuse iliaque, ayant subi le même procédé de décalcification que les BOM. La catégorie « Pièce opératoire » comportait 4 pièces de splénectomie, 4 pièces d'iléo-colectomie et résection partielle de grêle, une pièce

d'exérèse de tumeur pariétale, une tumorectomie intramusculaire, et 4 pièces d'amygdalectomie. La catégorie « Autre » comprenait principalement des prélèvements de petite taille :

- 2 ponction-biopsies hépatiques,
- 1 ponction-biopsie rénale,
- 3 biopsies ORL (épiglottique, amygdalienne et nasale),
- 3 biopsies digestives (gastrique, iléale et colique),
- 1 biopsie bronchique,
- 1 biopsie de lésion osseuse entièrement tumorale, sans tissu osseux résiduel,
- 1 liquide broncho-alvéolaire, où l'immunomarquage a été réalisé sur l'inclusion en paraffine du culot,
- 4 cas de relecture où le type de prélèvement n'était pas précisé, et où les lames n'étaient pas désarchivées en raison d'un immunomarquage CXCL13 décrit comme négatif dans le compte-rendu.

#### **IV. Comparaison de l'immunomarquage CXCL13 avec les diagnostics AP**

##### **A. Pour l'objectif principal : étude de 206 dossiers**

###### **1. Présentation des résultats**

Pour évaluer la sensibilité et la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI, l'analyse a été réalisée sur 206 dossiers (un prélèvement de référence par patient).

**Tableau 2 : Répartition des diagnostics anatomopathologiques**

<b>Diagnostics AP</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
Bénin	56	27 %
LTAI	44	21 %
Incertain	20	10 %
LNH T NOS	13	6 %
LNH T primitif cutané	10	5 %
LNH T à grandes cellules / LNH T CD56- EBV-	9	4 %
LNH T de phénotype TFH	6	3 %
Lymphome de Hodgkin classique	6	3 %
Lymphadénite histiocytaire nécrosante	6	3 %
LNH B de la zone marginale	4	2 %
LNH B diffus à grandes cellules / lymphoblastique	5	2 %
LNH T NK	3	1 %
EATL	3	1 %
Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire	3	1 %
LNH à grandes cellules B EBV+ / plasmoblastique EBV+	3	1 %
LNH B sans précision	3	1 %
Syndrome hyperéosinophilique variant lymphoïde	2	1 %
Leucémie à grands lymphocytes T granuleux	2	1 %
LNH B diffus à grandes cellules riche en lymphocytes	2	1 %
Lymphoprolifération B associée à l'EBV / Syndrome prolifératif de type Hodgkin associé à l'EBV	2	1 %
LNH B lymphoplasmocytaire	1	< 1 %
Hématodermie CD4+ / CD56+	1	< 1 %
Sarcome myéloïde	1	< 1 %
Sarcome à cellules dendritiques	1	< 1 %
<b>Total</b>	<b>206</b>	<b>100 %</b>

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique ; LNH : lymphome non hodgkinien ; NOS : not otherwise specified ; EBV : Epstein Barr virus ; EATL : LNH T associé à une entéropathie.*

La catégorie « Incertain » (10 % soit 20/206) concernait les dossiers où la synthèse des données morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires de l'ensemble des prélèvements ne permettait pas d'établir un diagnostic formel.

La catégorie « Bénin » (27 % soit 56/206) comportait des hyperplasies réactionnelles, des lymphadénites, des lésions d'eczéma, des vascularites, et d'autres processus inflammatoires, réactionnels ou auto-immuns sans caractère néoplasique. Les lésions ganglionnaires du syndrome hyperéosinophilie variant lymphoïde (SHE-L), qui peuvent mimer un lymphome T angioimmunoblastique (64), étaient classées dans une catégorie à part (2 cas). Les lymphadénites histiocytaires nécrosantes ou maladie de Kikuchi-Fujimoto sont des pathologies bénignes qui ont également fait l'objet d'une catégorie individualisée (3 % soit 6/206).

Les lymphomes non hodgkiniens T sont nombreux dans l'étude, subdivisés en plusieurs catégories : LTAI (21 % soit 44/206) ; LNH T/NK extra-ganglionnaire de type nasal (3 cas) ; LNH T périphérique NOS (6 % soit 13/206) ; LNH T primitif cutané (5 % soit 10/206) incluant le mycosis fongoïde transformé ou non et le syndrome de Sézary ; LNH T anaplasique à grandes cellules et LNH T CD56- / EBV- (4 % soit 9/206) ; LNH T de phénotype TFH (3 % soit 6/206) ; EATL (3 cas) ; et leucémie à grands lymphocytes T granuleux (2 cas).

Les lymphomes de phénotype B étaient également largement représentés. Parmi les lymphomes de Hodgkin (LH), on comptait des LH classique (3 % soit 6/206), et trois cas de LH nodulaire à prédominance lymphocytaire. Les autres catégories comprenaient des LNH B diffus à grandes cellules ou LNH B lymphoblastiques (5 cas), des LNH B de la zone marginale (4 cas), des LNH à

grandes cellules B EBV+ et LNH plasmoblastiques associés à l'EBV (3 cas), des LNH B diffus à grandes cellules riches en lymphocytes T (3 cas), des LNH B sans précision (3 cas), une lymphoprolifération B associée à l'EBV, un syndrome prolifératif de type Hodgkin associé à l'EBV, et un LNH B de type lymphoplasmocytaire.

Parmi les entités rares, on retrouvait 2 localisations cutanées d'hématodermie CD4+ / CD56+ ou leucémie à cellules plasmocytoïdes dendritiques blastiques, un sarcome myéloïde et un sarcome à cellules dendritiques.

Le nombre important de diagnostics de LTAI est attendu, car la demande d'immunomarquage CXCL13 est motivée, dans la grande majorité des cas, par une suspicion de LTAI.

**Tableau 3 : Répartition des diagnostics de LTAI**

<b>LTAI</b>	<b>Fréquence</b>	<b>Pourcentage</b>
LTAI-	142	69 %
LTAI+	44	21 %
LTAI i	20	10 %
Total	206	100 %

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique. LTAI- : autre diagnostic ; LTAI+ : diagnostic certain ; LTAI i : diagnostic incertain.*

Le diagnostic de LTAI était certain dans 21 % des cas (44/206), il s'agissait d'un autre diagnostic dans 69 % des cas (142/206), et le diagnostic était incertain dans 10 % des cas (20/206).

**Tableau 4 : Répartition de l'immunomarquage CXCL13**

<b>Immunomarquage CXCL13</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
CXCL13-	105	51 %
CXCL13+ T	57	28 %
CXCL13+ M	37	18 %
NI	7	3 %
<b>Total</b>	<b>206</b>	<b>100 %</b>

*CXCL13+ T : expression de CXCL13 par les cellules tumorales ; CXCL13+ M : expression de CXCL13 par les cellules du microenvironnement ; NI : non interprétable.*

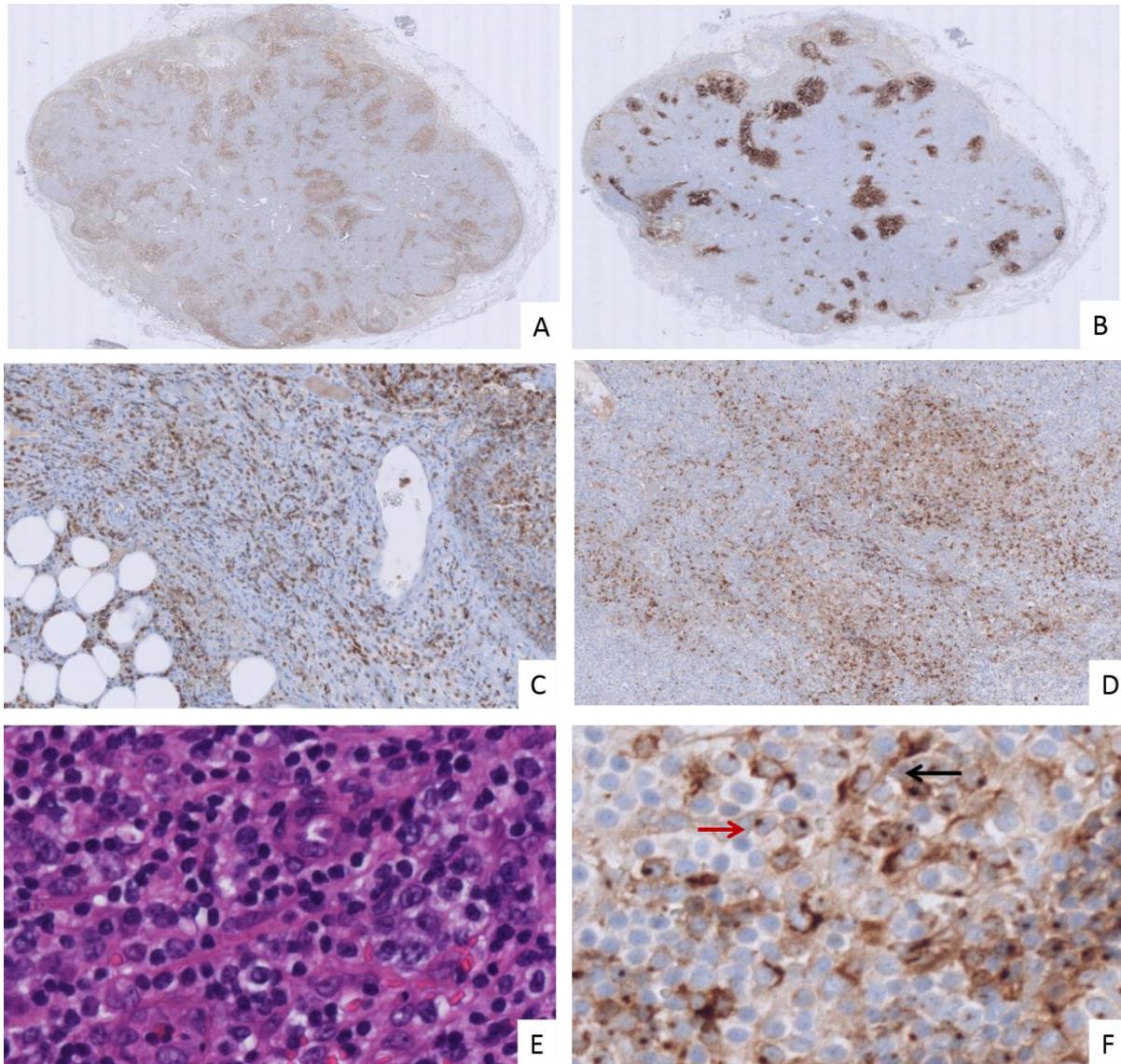
L'immunomarquage était négatif dans 51 % des cas (105/206), positif sur des cellules tumorales dans 28 % des cas (57/206), positif sur des cellules du microenvironnement dans 18 % des cas (37/206), et non interprétable dans 3 % des cas (7/206). L'immunomarquage des cellules tumorales dans le LTAI est illustré dans la Figure 9 (page 46).

## **2. Sensibilité et spécificité du marqueur CXCL13 pour le diagnostic de LTAI**

**Tableau 5 : Répartition de l'immunomarquage CXCL13 en fonction du diagnostic**

<b>CXCL13</b>	<b>LTAI</b>			<b>Total</b>
	<b>LTAI -</b>	<b>LTAI +</b>	<b>LTAI i</b>	
CXCL13-	97	0	8	105
CXCL13+ T	10	42	5	57
CXCL13+ M	30	2	5	37
NI	5	0	2	7
<b>Total</b>	<b>142</b>	<b>44</b>	<b>20</b>	<b>206</b>

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique ; CXCL13+ T : expression de CXCL13 par les cellules tumorales ; CXCL13+ M : expression de CXCL13 par les cellules du microenvironnement ; NI : non interprétable.*



**Figure 9 : Immunomarquage CXCL13 des cellules tumorales dans un LTAI, sur une exérèse ganglionnaire.** A. La répartition des cellules CXCL13+ est similaire à celle des cellules CD21+, suggérant une localisation proche des cellules tumorales par rapport au réseau de cellules folliculaires dendritiques (x10). B. Immunomarquage CD21 : mise en évidence du réseau de cellules folliculaires dendritiques, hyperplasique et désorganisé (x10). C. Infiltration du tissu adipeux péri-ganglionnaire par les cellules tumorales CXCL13+, avec respect d'un sinus périphérique (x100). D. Les cellules tumorales CXCL13+ sont réparties de manière diffuse au sein du parenchyme ganglionnaire. E. Cellules tumorales et cellules folliculaires dendritiques (HE x400). F. Immunomarquage CXCL13+ cytoplasmique granuleux avec renforcement para nucléaire en dot des cellules tumorales (flèche rouge), et cytoplasmique granuleux des prolongements cytoplasmiques des cellules folliculaires dendritiques (flèche noire).

Pour comparer l'immunomarquage CXCL13 en tant que test diagnostique au diagnostic AP de LTAI, nous avons dans un premier temps supprimé les diagnostics incertains et les résultats non interprétables de l'étude immunohistochimique. Il restait alors 181 cas avec un diagnostic de certitude établi (LTAI+ ou LTAI-), pour lesquels l'immunomarquage CXCL13 était interprétable.

Le calcul de sensibilité et spécificité a été effectué selon deux méthodes :

La première méthode était de considérer que le test diagnostique CXCL13 était positif dès lors que le marquage n'est pas celui rencontré en situation physiologique, que les cellules marquées soient tumorales ou du microenvironnement. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6. Dans ce cas, la sensibilité était de 100 % et la spécificité était de 70,80 %.

**Tableau 6 : Répartition de l'immunomarquage CXCL13 en fonction du diagnostic de LTAI, après suppression des immunomarquages non interprétables et des diagnostics incertains**

CXCL13	LTAI		Total
	LTAI -	LTAI +	
CXCL13-	97	0	97 (54 %)
	53,59	0	
	100	0	
	<b>70,80</b>	0	
CXCL13+ M et CXCL13+ T	40	44	84 (46 %)
	22,10	24,31	
	47,62	52,38	
	29,20	<b>100</b>	
Total	137 (75 %)	44 (24 %)	181 (100 %)

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique ; CXCL13+ T : expression de CXCL13 par les cellules tumorales ; CXCL13+ M : expression de CXCL13 par les cellules du microenvironnement.*

La deuxième méthode était de considérer que l'immunomarquage n'était positif que lorsque la chimioquine CXCL13 était exprimée par des cellules tumorales. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant. La sensibilité était alors de 95,45 % et la spécificité 92,7 %.

**Tableau 7 : Répartition de l'immunomarquage CXCL13 en fonction du diagnostic de LTAI, après suppression des immunomarquages non interprétables et des diagnostics incertains**

CXCL13	LTAI		Total
	LTAI -	LTAI +	
CXCL13- et CXCL13+ M	127	2	129
	70,17	1,1	71,27
	98,45	1,55	
	92,7	4,54	
CXCL13+ T	10	42	52
	5,52	23,20	28,73
	19,23	80,77	
	7,30	95,45	
Total	137	44	181
	75,69 %	24,31 %	100,00 %

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique ; CXCL13+ T : expression de CXCL13 par les cellules tumorales ; CXCL13+ M : expression de CXCL13 par les cellules du microenvironnement.*

La diminution de la **sensibilité**, qui restait néanmoins très bonne, était liée à deux cas d'interprétation délicate :

- Le premier dossier concernait un patient aux antécédents de lymphadénite avec hyperplasie immunoblastique en 2012. L'immunomarquage CXCL13 était principalement intra folliculaire, avec quelques cellules inter folliculaires isolées et minoritaires marquées. L'étude par hybridation in situ avec la sonde EBER était négative, et les études de biologie moléculaire retrouvaient à la fois un clone B et un clone T. La lésion a régressé spontanément, il n'y avait

pas de signe cutané ni d'altération de l'état général. En 2013, la lésion récidivait avec cette fois-ci une altération de l'état général et un profil oligoclonal T. Malgré un immunomarquage similaire à celui observé au niveau de l'adénopathie précédente, la synthèse du dossier permettait de poser le diagnostic de LTAI.

- Le deuxième dossier concernait un patient suivi pour SHE-L. Pour ce patient, sur les adénopathies antérieures, l'aspect mimait un LTAI mais l'immunomarquage CXCL13 était négatif. Sur l'exérèse ganglionnaire réalisée en 2015, l'anticorps anti-CXCL13 marquait quelques cellules dispersées, mais la perte partielle du CD4 concomitante permettait de poser le diagnostic de LTAI. Dans ce contexte particulier, l'expression du CXCL13 était très utile pour le diagnostic.

L'amélioration de la **spécificité** était notable. La prise en compte des caractéristiques cytologiques et architecturales de la population marquée par le CXCL13 permettait d'établir leur caractère tumoral ou réactionnel. Si l'on considérait que l'immunomarquage n'était positif que lorsqu'il intéressait des cellules tumorales, la spécificité était de 92,7 %, ce qui est élevé.

### **3. CXCL13 n'est pas un marqueur spécifique du LTAI**

Cependant, dans 7,3 % de cas (10/137, hors diagnostics incertains) l'immunomarquage CXCL13 était positif sur des cellules tumorales dans un diagnostic autre que le LTAI. Ces cas sont répertoriés dans le Tableau 8.

**Tableau 8 : Répartition de l'immunomarquage CXCL13 en fonction des diagnostics anatomopathologiques**

DIAGNOSTIC	CXCL13				Total
	-	+ T	+ M	NI	
Bénin	52	0	1	3	56
LTAI	0	42	2	0	44
Incertain	9	5	5	1	20
LNH T NOS	10	0	3	0	13
LNH T primitif cutané	5	0	5	0	10
LNH T à grandes cellules / LNH T CD56- / EBV-	6	0	2	1	9
Lymphadénite histiocytaire nécrosante	1	0	5	0	6
LNH T de phénotype TFH / folliculaire	2	4	0	0	6
LH classique	3	0	3	0	6
LNH B diffus à grandes cellules / lymphoblastique	3	0	1	1	5
LNH B de la zone marginale	1	0	2	1	4
LNH T NK	1	2	0	0	3
EATL	1	2	0	0	3
LHNPL	0	1	2	0	3
LNH à grandes cellules B EBV+ / plasmoblastique EBV+	1	0	2	0	3
LNH B sans précision	3	0	0	0	3
SHE-L	2	0	0	0	2
Leucémie à grands lymphocytes T granuleux	2	0	0	0	2
LNH B diffus à grandes cellules riche en lymphocytes	0	0	2	0	2
Lymphoprolifération B associée à l'EBV / Syndrome prolifératif de type Hodgkin associé à l'EBV	1	0	1	0	2
LNH B lymphoplasmocytaire	0	0	1	0	1
Hématodermie CD4+ / CD56+	1	0	0	0	1
Sarcome myéloïde	1	0	0	0	1
Sarcome à cellules dendritiques	0	1	0	0	1
<b>Total</b>	<b>105</b>	<b>57</b>	<b>37</b>	<b>7</b>	<b>206</b>

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique ; LNH : lymphome non hodgkinien ; LH : lymphome de Hodgkin ; NOS : not otherwise specified ; EBV : Epstein Barr virus ; EATL : LNH T associé à une entéropathie ; LHNPL : lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire ; SHE-L : syndrome hyperéosinophilique variant lymphoïde.*

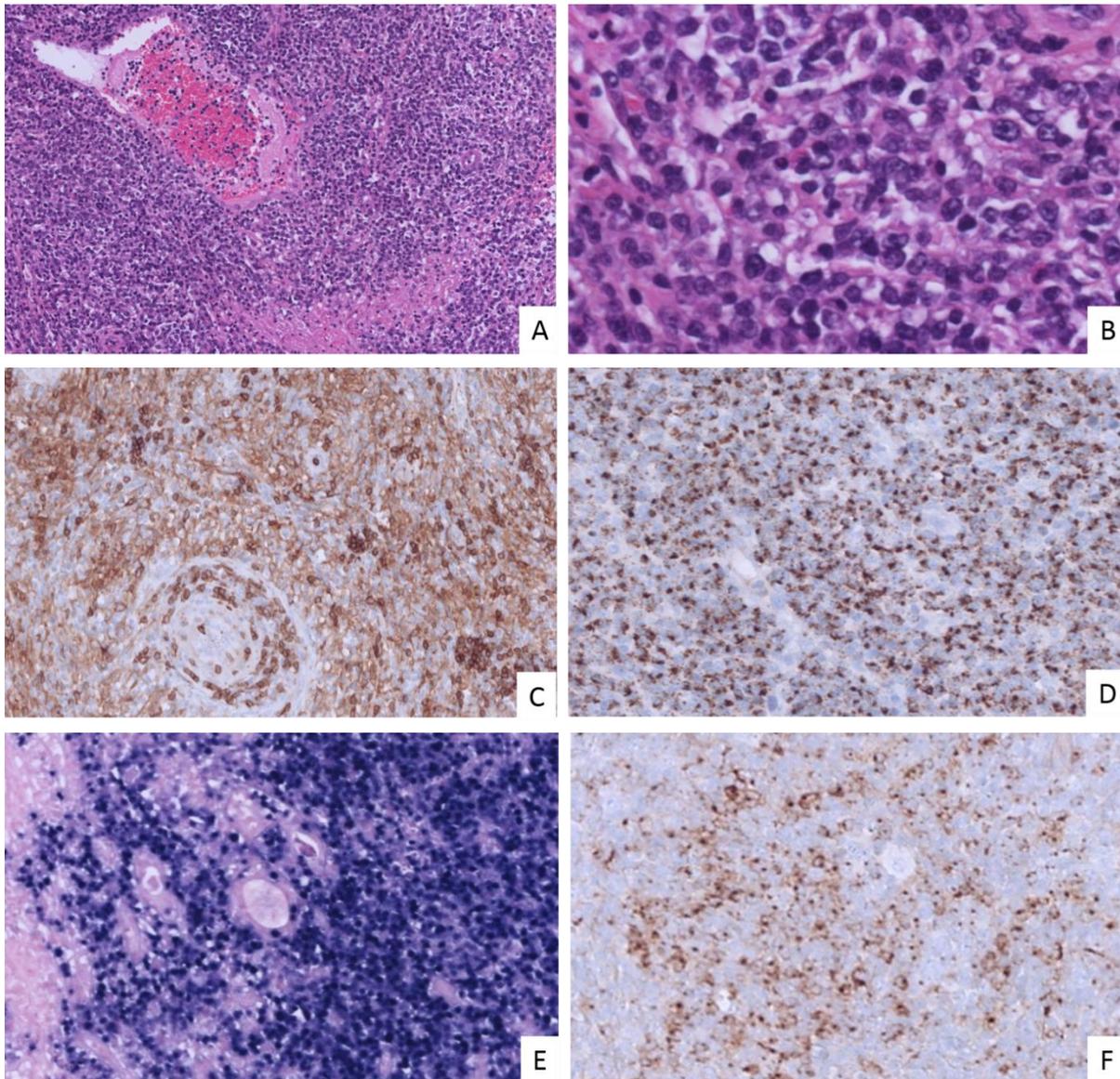
L'immunomarquage CXCL13 des cellules tumorales n'était pas spécifique du LTAI, car on l'observait également dans d'autres tumeurs malignes :

- LNH T : LNH T de phénotype TFH (4 cas) ; LNH T/NK (Natural Killer, 2 cas, Figure 10 p. 52) ; LNH T associé à une entéropathie (EATL, 2 cas, Figure 11, p. 53)
- Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire (1 cas, Figure 12, p. 53)
- Sarcome à cellules dendritiques (1 cas, Figure 13, p. 54).

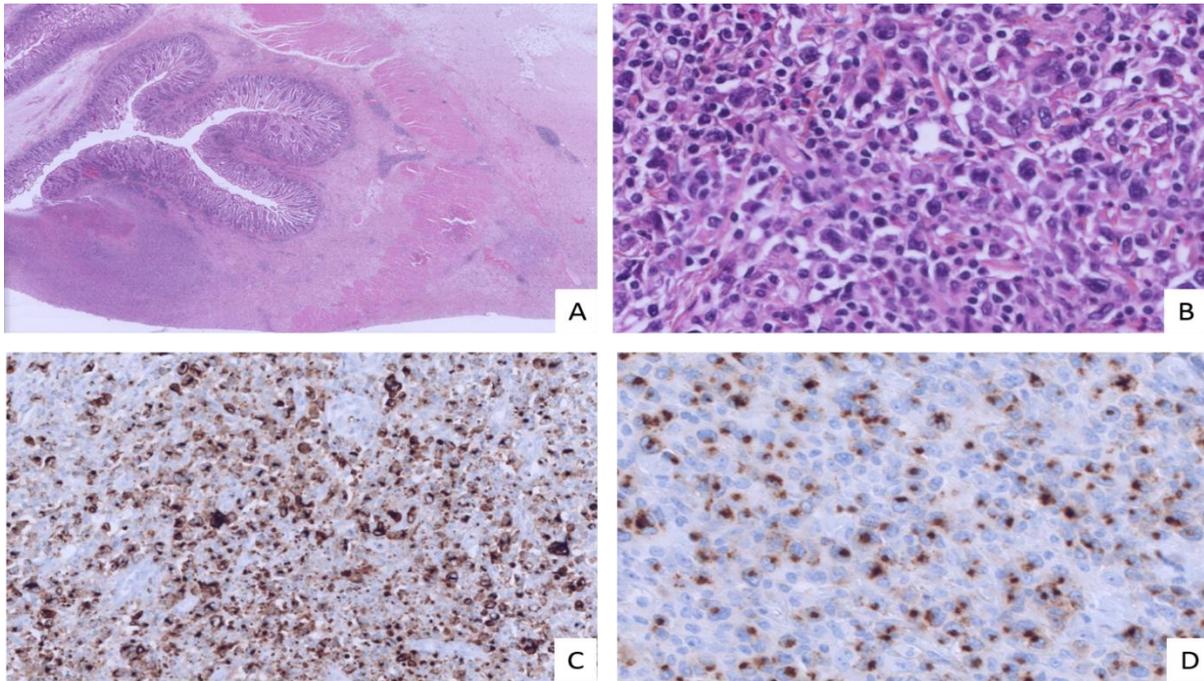
L'immunomarquage CXCL13 de cellules non tumorales pouvait être observé :

- Dans des pathologies bénignes :
  - Lymphadénite avec hyperplasie angioimmunoblastique (1 cas)
  - Lymphadénite histiocytaire nécrosante ou maladie de Kikuchi-Fujimoto (5/6 soit 83 % des cas, Figure 14, p. 55).
- Dans le microenvironnement de pathologies malignes :
  - LTAI (2 cas où le diagnostic était établi malgré un immunomarquage négatif sur les cellules tumorales)
  - LNH T périphérique NOS (3/13 soit 23%)
  - LNH T anaplasique à grandes cellules (2 cas)
  - LNH T primitif cutané (5/10 soit 50 %)
  - Lymphome de Hodgkin classique (3/6 soit 50 %)
  - Lymphomes de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire (2/3)
  - LNH B de la zone marginale (2/4)
  - LNH B diffus à grandes cellules (1 cas)

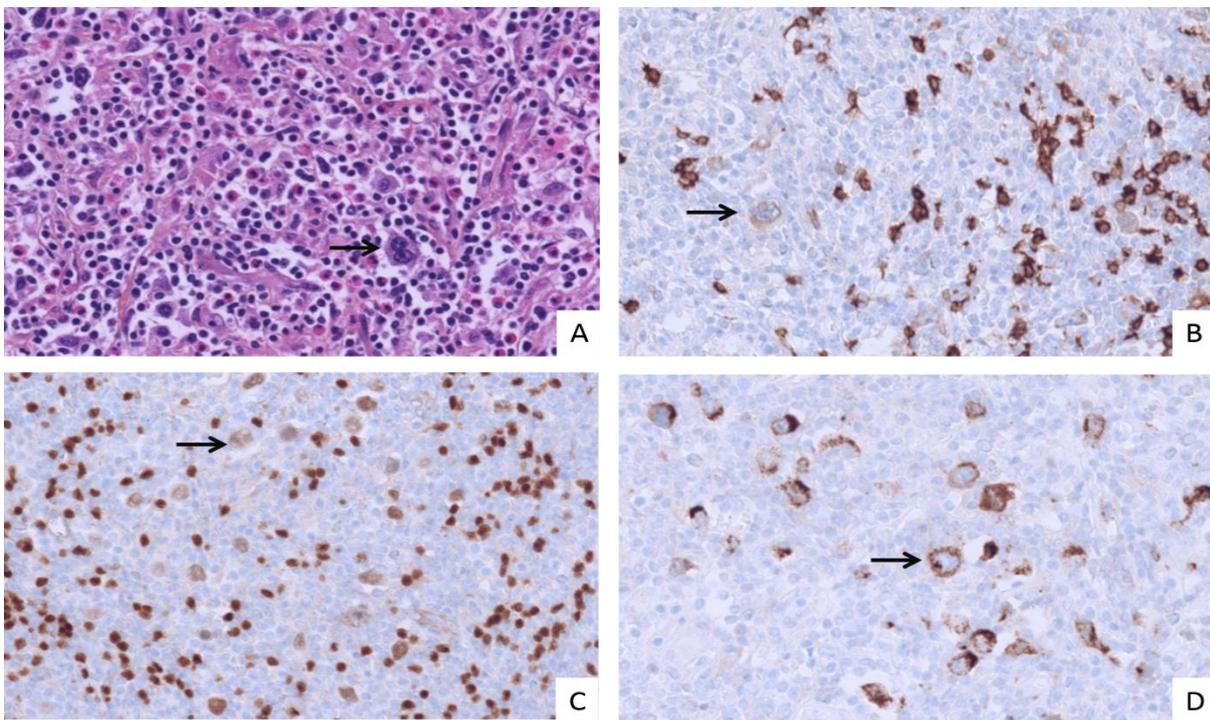
- LNH à grandes cellules B associé à l'EBV (2 cas), LNH à grandes cellules B diffus riche en lymphocytes T (2 cas), Lymphoprolifération B associée à l'EBV (1 cas) et LNH B lymphoplasmocytaire (1 cas).



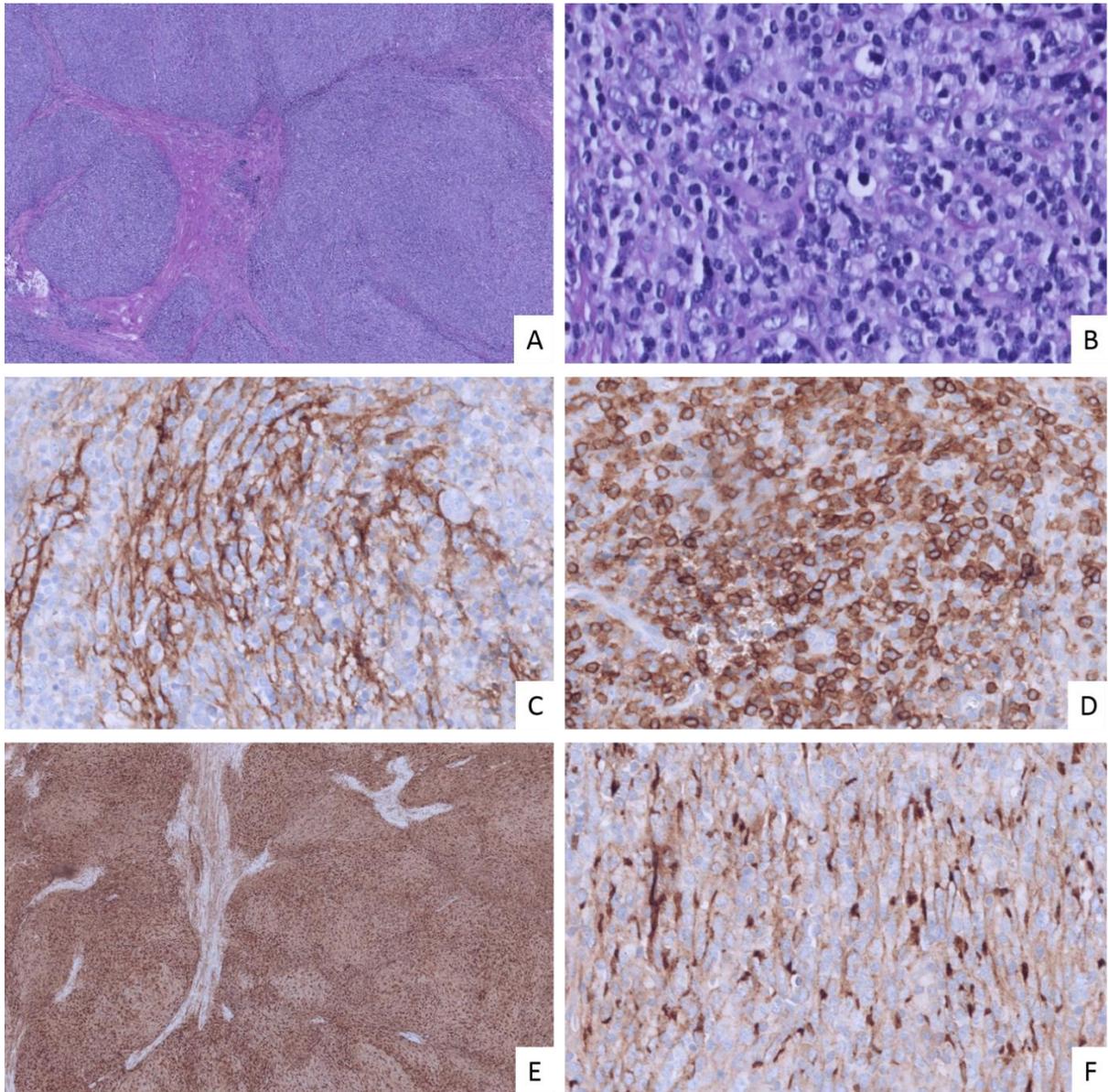
**Figure 10 : LNH T/NK.** A. Infiltrat tumoral lymphoïde diffus avec plages de nécrose et angioinvasion (HE x100). B. Cellules tumorales T atypiques (HE x400). C. Immunomarquage CD4+ des cellules tumorales (x200). D. Immunomarquages TIA1+ des cellules tumorales (x200). E. Hybridation in situ avec la sonde EBER : signal nucléaire des cellules tumorales T (x 200). F. Immunomarquage CXCL13+ cytoplasmique granuleux et en dot paranucléaire de nombreuses cellules tumorales (x200).



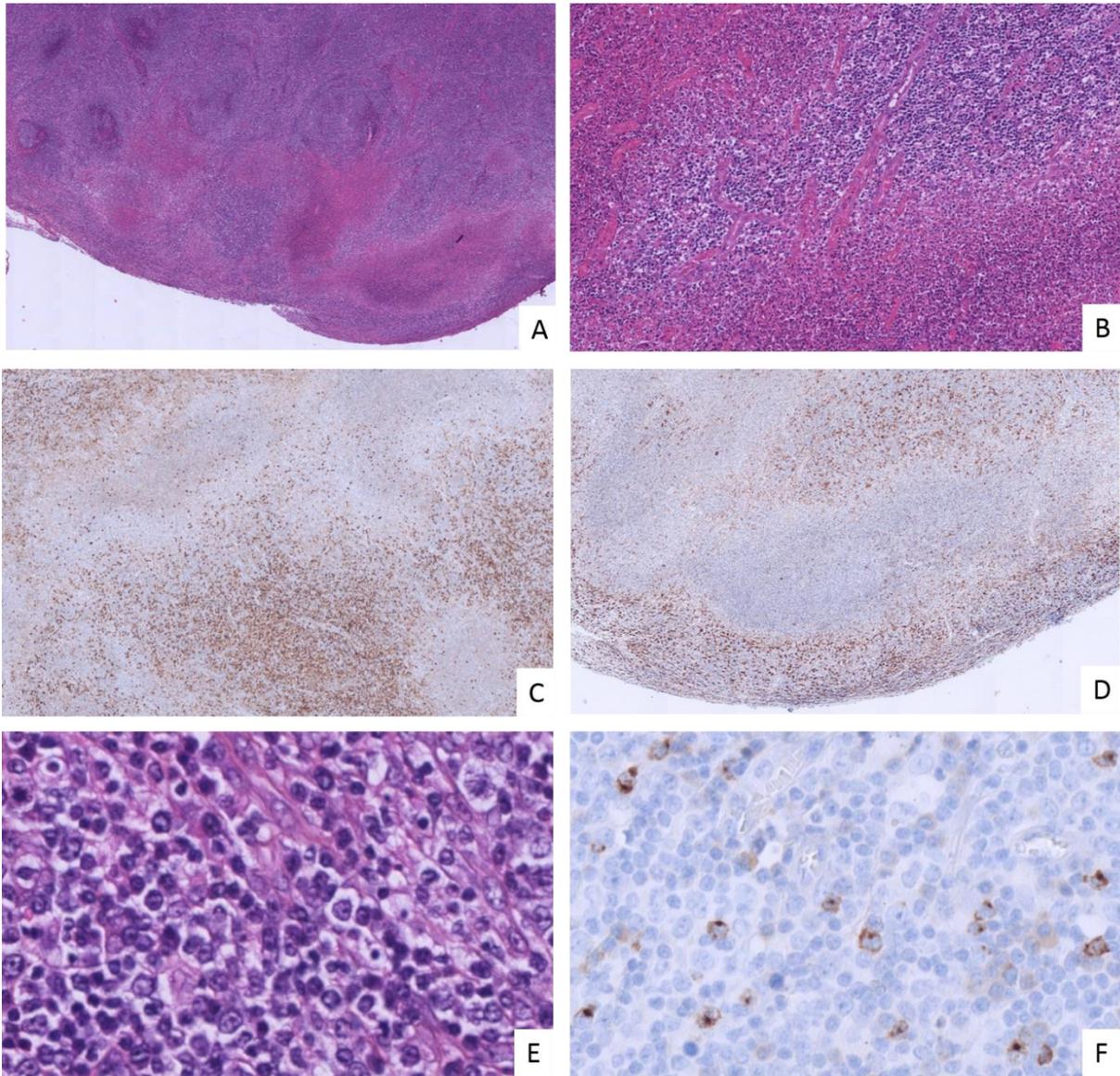
**Figure 11 : EATL.** A. Ulcération de la muqueuse et infiltration de la paroi iléale par une prolifération lymphoïde densément cellulaire. Atrophie villositaire modérée de la muqueuse adjacente (HE x10). B. La prolifération est constituée de lymphocytes T atypiques (HE x400). C. Immunomarquage TIA1+ des cellules tumorales (x400). D. Immunomarquage CXCL13+ des cellules tumorales : marquage cytoplasmique para nucléaire en dot (x400).



**Figure 12 : LHNPL.** A. Cellules B sternbergoïdes (flèche) dispersées sur un fond lymphocytaire (x200). B. Immunomarquage CD79a+ cytoplasmique faible des cellules tumorales B (flèche, x200). C. Immunomarquage PAX5+ nucléaire des cellules tumorales B (flèche, x200). D. Immunomarquage CXCL13+ cytoplasmique granuleux avec renforcement para nucléaire en dot des cellules tumorales B (flèche, x400).



**Figure 13 : Sarcome à cellules folliculaires dendritiques, exérèse ganglionnaire.**  
 A. Destruction du parenchyme ganglionnaire par une tumeur d'architecture nodulaire (HE x40). B. Cellules tumorales au cytoplasme clarifié, associées à un infiltrat lymphocytaire (HE x400). C. Immunomarquage CD21+ des cellules tumorales, mise en évidence des prolongements cytoplasmiques (x400). D. Immunomarquage CD4+ des cellules tumorales (x400). E. Immunomarquage CD68+ des cellules tumorales (x50). F. Immunomarquage CXCL13+ des cellules tumorales : marquage des prolongements cytoplasmiques (x400).



**Figure 14 : Lymphadénite histiocytaire nécrosante (maladie de Kikuchi-Fujimoto).**  
 A. Plages de nécrose au sein du parenchyme ganglionnaire (HE x10). B. Couronne de cellules histiocytaires et lymphocytaires en périphérie des zones de nécrose (HE x100).  
 C. Immunomarquage CD4+ des lymphocytes T en périphérie des plages de nécrose (x100).  
 D. Immunomarquage CD163+ des histiocytes en périphérie des plages de nécrose (X100).  
 E. Lymphocytes T activés en périphérie des plages de nécrose (HE x400).  
 F. Immunomarquage CXCL13+ de nombreux lymphocytes dispersés autour des plages de nécrose (x400).

## B. Pour l'objectif secondaire : étude sur 273 cas

### 1. Présentation des 273 cas

**Tableau 9 : Résultats de l'immunomarquage CXCL13**

<b>CXCL13</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
CXCL13-	137	51 %
CXCL13+ T	79	29 %
CXCL13+ M	47	18 %
NI	10	4 %
Total	273	100 %

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique ; CXCL13+ T : expression de CXCL13 par les cellules tumorales ; CXCL13+ M : expression de CXCL13 par les cellules du microenvironnement ; NI : non interprétable.*

L'immunomarquage était négatif dans 51 % des cas (137/273), positif sur des cellules tumorales dans 29 % des cas (79/273), positif sur des cellules non tumorales du microenvironnement dans 18 % des cas (47/273), et non interprétable dans 4 % des cas (10/273).

**Tableau 10 : Répartition des diagnostics de LTAI**

<b>LTAI</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
LTAI -	179	66 %
LTAI +	57	21 %
LTAI i	37	14 %
Total	273	100 %

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique. LTAI - : autre diagnostic ; LTAI + : diagnostic certain ; LTAI i : diagnostic incertain.*

Le diagnostic de LTAI était certain dans 21 % des cas (57/273), il s'agissait d'un autre diagnostic dans 66 % des cas (179/273), et le diagnostic était incertain dans 14 % des cas (37/273).

**Tableau 11 : Répartition des diagnostics anatomopathologiques**

<b>Diagnostics anatomopathologiques</b>	<b>Effectifs</b>	<b>Pourcentage</b>
Bénin	74	28 %
LTAI	57	21 %
Incertain	38	14 %
LNH T NOS	15	5 %
LNH T de phénotype TFH / folliculaire	10	4 %
LNH T primitif cutané	10	4 %
LNH T à grandes cellules / LNH T CD56- / EBV-	9	3%
Lymphome de Hodgkin classique	8	3 %
SHE-L	6	2%
Lymphadénite histiocytaire nécrosante	6	2%
LNH B de la zone marginale	5	2 %
LNH B diffus à grandes cellules / lymphoblastique	5	2 %
LNH B sans précision	4	1%
LNH T NK	3	1 %
EATL	3	1 %
Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire	3	1 %
LNH à grandes cellules B EBV+ / plasmoblastique EBV+	3	1%
LNH B diffus à grandes cellules riche en lymphocytes	3	1%
Lymphoprolifération B associée à l'EBV, Syndrome prolifératif de type Hodgkin associé à l'EBV	3	1 %
Hématodermie CD4+ / CD56+	3	1 %
Leucémie à grands lymphocytes T granuleux	2	1 %
LNH B lymphoplasmocytaire	1	< 1 %
Sarcome myéloïde	1	< 1 %
Sarcome à cellules dendritiques	1	< 1 %
<b>Total</b>	<b>273</b>	<b>100 %</b>

*LTAI : lymphome T angioimmunoblastique ; LNH : lymphome non hodgkinien ; NOS : not otherwise specified ; EBV : Epstein Barr virus ; SHE-L : syndrome hyperéosinophilique variant lymphoïde. EATL : LN H T associé à une entéropathie.*

## 2. La détection de CXCL13 varie selon le tissu

**Tableau 12 : Répartition de l'immunomarquage CXCL13 en fonction du tissu, étude des diagnostics certains de LTAI**

<b>CXCL13</b>	<b>BOM</b>	<b>Autres</b>	<b>Total</b>
-	2	0	2
+ M et + T	7	45	55
Total	9	45	57

*CXCL13+ M : expression de CXCL13 par les cellules du microenvironnement ;  
CXCL13+ T : expression de CXCL13 par les cellules tumorales.*

Le tableau ci-dessus représente la répartition de l'immunomarquages CXCL13 en fonction du tissu, dans les diagnostics positifs de LTAI. Il y avait au total 57 cas de LTAI sur les 273 cas : 38 cas étaient diagnostiqués sur exérèse ganglionnaire, 3 cas sur biopsie ganglionnaire à l'aiguille, 3 cas sur biopsie cutanée, 9 cas sur biopsie ostéo-médullaire, 1 cas sur pièce opératoire et 3 cas sur un autre type de prélèvement.

Sur l'ensemble des prélèvements hormis les biopsies ostéo-médullaires, l'immunomarquage CXCL13 était positif. En revanche, sur les 9 cas de LTAI diagnostiqués sur BOM, l'immunomarquage CXCL13 n'était pas détecté dans 2 cas. Le diagnostic a néanmoins pu être établi avec certitude, sur la base de plusieurs arguments, tels qu'un antécédent de LTAI connu chez le patient, un diagnostic de LTAI confirmé sur un autre site, ou une morphologie fortement évocatrice de LTAI malgré l'absence d'immunomarquage CXCL13+ dans les cellules tumorales (amas para trabéculaires et interstitiels de lymphocytes T CD4+ atypiques et irréguliers,

prolifération vasculaire marquée, présence de polynucléaires éosinophiles, immunomarquage PD1+ CD10+ BCL6+, clonalité T) (63).

Les seuls cas de LTAI où l'immunomarquage CXCL13 était négatif concernaient donc des BOM (tissu osseux). La différence observée entre les BOM et les autres types de prélèvement n'était pas statistiquement significative, en raison du faible nombre d'immunomarquage CXCL13 négatif. Ce manque de sensibilité de détection de l'expression de CXCL13 sur BOM correspondait à une tendance statistique.

### 3. Le mode de prélèvement a une influence sur le niveau de certitude diagnostique

**Tableau 13 : Niveau de certitude diagnostique en fonction du type de prélèvement**

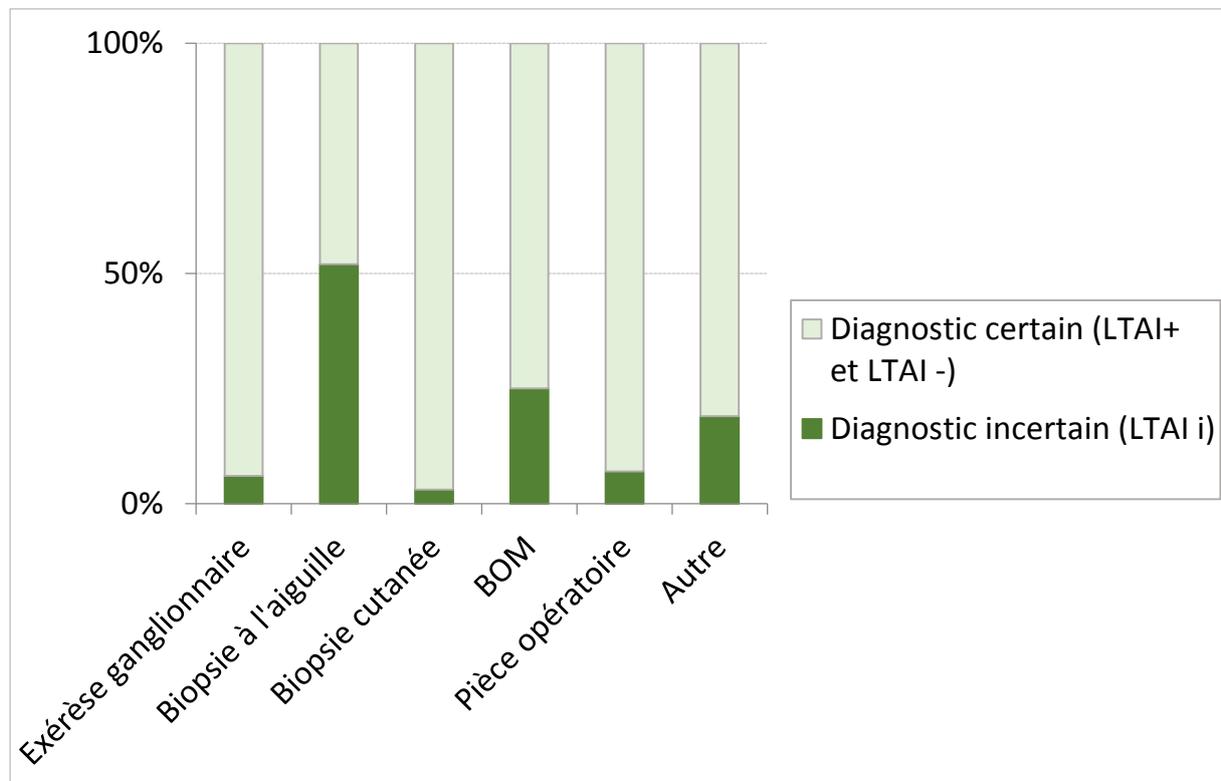
<b>LTAI</b>	<b>Oui + Non</b>	<b>Incertain</b>	<b>Total</b>
Exérèse ganglionnaire	98 (94%)	6 (6%)	104
Biopsie ganglionnaire à l'aiguille	12 (48%)	13 (52%)	25
Biopsie cutanée	64 (97%)	2 (3%)	66
BOM	36 (75%)	12 (25%)	48
Pièce opératoire	13 (93%)	1 (7%)	14
Autres	13 (81%)	3 (19%)	16
<b>Total</b>	<b>236</b>	<b>37</b>	<b>273</b>

*BOM : biopsie ostéo-médullaire*

Le diagnostic était établi de manière certaine à partir de la grande majorité des exérèses ganglionnaires (diagnostics incertains 6/104 soit 5,77 %), les biopsies cutanées (diagnostics incertains 2/66 soit 3,03 %) et les pièces opératoires (diagnostics incertains 1/14 soit 7,14 %).

En revanche, un diagnostic n'était établi de manière certaine sur biopsie à l'aiguille que dans la moitié des cas (13 diagnostics incertains sur 25 soit 52 %), et sur biopsie ostéo-médullaire dans trois quarts des cas (diagnostics incertains 12/48 soit 25 %). L'analyse statistique par test de Fisher permettait d'affirmer que ces résultats sont statistiquement différents de manière significative ( $p < 0,0001$ ). Les résultats sont représentés sur l'histogramme suivant (Figure 15).

**Figure 15 : Proportion de diagnostics incertains en fonction du type de prélèvement**



*BOM : biopsie ostéo-médullaire ; LTAI : lymphome T angioimmunoblastique ; LTAI+ : diagnostic certain de LTAI ; LTAI- : autre diagnostic.*

Dans notre série, le diagnostic anatomopathologique était établi avec certitude dans 94 % des exérèses ganglionnaires, et seulement dans 48 % des biopsies ganglionnaires à l'aiguille. Le niveau de certitude diagnostique était donc significativement influencé par le type de prélèvement.

## DISCUSSION

### I. La sensibilité de l'immunomarquage CXCL13+ est excellente pour le diagnostic de LTAI

Après sélection d'un cas représentatif par patient, notre étude comptait 44 diagnostics de LTAI sur 206 dossiers. Nous avons observé un immunomarquage CXCL13+ sur les cellules tumorales dans 95,45 % des cas (42/44), la sensibilité de ce marqueur est donc très bonne pour le diagnostic de LTAI. Devant une suspicion clinique et morphologique de LTAI sur exérèse ganglionnaire, l'absence d'immunomarquage CXCL13 doit remettre en question le diagnostic.

Ce résultat est en accord avec ceux d'études précédentes : la sensibilité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI est, selon les séries, de 95,3 % sur 64 LTAI (*Gu et al*, 2014 (65)), 93,3 % sur 18 LTAI (*Yuan et al*, 2009 (66)), 82,8 % sur 29 LTAI (*Zheng et al*, 2009 (67)), 100 % sur 22 LTAI (*Yu et al*, 2009 (39)), et 89 % sur 35 LTAI (*Grogg et al*, 2006 (2)).

### II. La spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI dépend du type cellulaire marqué

#### A. Lorsque le marquage concerne des cellules tumorales, la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI est de 92,7 %,

Dans notre série, la spécificité de l'immunomarquage CXCL13+ T pour le diagnostic de LTAI est de 92,7 %. Lorsqu'il concerne des cellules tumorales,

l'immunomarquage CXCL13 est donc relativement spécifique du LTAI, malgré un biais de sélection discuté dans le paragraphe « Particularités et points sensibles de l'étude » (voir p.91).

Dans 6 % des cas, soit 10/181 hors diagnostics incertains, l'immunomarquage CXCL13 est positif sur des cellules tumorales en dehors du diagnostic de LTAI :

- Lymphomes T périphériques : 2 cas de LNH T/NK, 3 cas de LNH T de phénotype TFH, 1 cas LNH T folliculaire, 2 cas de EATL ;
- Lymphome B : 1 cas de LHNPL ;
- Un cas de sarcome à cellules dendritiques.

## **B. L'identification de la nature des cellules marquées diminue le risque de faux positifs et de faux négatifs**

### **1. Les cellules tumorales CXCL13+ peuvent être peu nombreuses dans le LTAI : risque de faux négatifs**

Dans un nombre de cas non négligeable, seule une partie des cellules tumorales exprime la chimioquine CXCL13 à un taux suffisamment élevé pour être détectable en immunohistochimie. De plus, la population TFH clonale ne correspond souvent qu'à 10 % de la tumeur. Un marquage même partiel, intéressant une minorité de cellules tumorales, peut donc être considéré comme suffisant pour constituer un critère diagnostique de LTAI (Figure 9F).

L'identification du caractère tumoral des cellules CXCL13+ est une étape essentielle pour le diagnostic morphologique de LTAI. Les lymphocytes TFH tumoraux sont caractérisés par une taille cellulaire moyenne, un cytoplasme clarifié

et des contours nucléaires irréguliers. Les atypies cyto-nucléaires sont parfois discrètes, et peuvent être interprétées à tort comme un signe d'activation des lymphocytes TFH. L'infiltration du tissu adipeux péri-ganglionnaire, la destruction de l'architecture ganglionnaire avec respect des sinus, et la mise en évidence d'un clone T en biologie moléculaire, sont des critères de malignité souvent contributifs au diagnostic (37).

## **2. L'immunomarquage CXCL13+ des cellules du microenvironnement : risque de faux positifs**

Nous avons observé un immunomarquage CXCL13+ de cellules inter folliculaires réactionnelles dans 18 % des cas, soit 37 cas sur 206. Si l'on considère comme positifs les cas où l'immunomarquage CXCL13 est diffus, indépendamment du type cellulaire, la spécificité pour le diagnostic de LTAI diminue à 71 %. Les pathologies rencontrées comportant un infiltrat TFH diffus sont diverses :

- Des pathologies bénignes :
  - Lymphadénite avec hyperplasie angioimmunoblastique (1 cas),
  - Lymphadénites histiocytaires nécrosantes ou maladie de Kikuchi-Fujimoto (5/6 soit 83 % des cas).
- Le microenvironnement de pathologies malignes :
  - Lymphomes T : LNH T périphériques NOS (3/13 soit 23 %), LNH T anaplasiques à grandes cellules (2 cas, l'un ALK+ et l'autre ALK-), LNH T primitifs cutanés (5/10 soit 50 %),

- Lymphomes de Hodgkin : lymphomes de Hodgkin classiques (3/6 soit 50 %), LHNPL (2/3),
- LNH B : LNH B de la zone marginale (2/4), LNH B diffus à grandes cellules (1 cas), LNH à grandes cellules B associé à l'EBV (2 cas), LNH à grandes cellules B diffus riche en lymphocytes T (2 cas), lymphoprolifération B associée à l'EBV (1 cas), LNH B lymphoplasmocytaire (1 cas).

Pour plusieurs de ces dossiers, une interprétation abusive de l'immunomarquage CXCL13+ inter folliculaire avait fait porter initialement le diagnostic de LTAI. À la lumière d'une confrontation anatomoclinique et de données évolutives et moléculaires complémentaires, le diagnostic a pu être rétabli après relecture, soit dans le cadre du réseau LYMPHOPATH, soit dans le cadre de notre étude.

Un immunomarquage CXCL13+ inter folliculaire diffus ne constitue donc pas, à lui seul, un critère diagnostique fiable de LTAI. Une fois encore, les critères d'identification du caractère tumoral ou non des cellules marquées sont importants, associés à la confrontation anatomoclinique. Un tableau clinique discordant, l'absence de critères histopathologiques tels que l'hyperplasie du réseau veineux post-capillaire ou l'hyperplasie du réseau de CFD, l'absence d'autres marqueurs immunohistochimiques TFH positifs, ou encore l'absence de clone T en biologie moléculaire, doivent remettre en cause le diagnostic de LTAI. L'immunomarquage CXCL13 doit être interprété avec précaution, en tant que critère individuel faisant partie d'un faisceau d'arguments cliniques, évolutifs, morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires.

### III. Néoplasies avec cellules tumorales CXCL13+

#### A. Lymphomes T périphériques

##### 1. LNH T de phénotype TFH et LNH T folliculaire

Le LNH T périphérique de phénotype TFH a récemment fait son entrée dans la classification OMS des tumeurs lymphoïdes, en tant qu'entité provisoire (6). Par définition, les cellules tumorales expriment au moins deux marqueurs antigéniques TFH parmi PD1, CD10, BCL6, CXCL13, ICOS, SAP et CCR5. Notre étude compte 5 cas de LNH T périphériques de phénotype TFH. Dans 3 cas, les cellules tumorales expriment le CXCL13, le marquage est attendu. Dans 2 cas, l'immunomarquage CXCL13 est négatif, les cellules tumorales expriment alors, par définition, au moins deux autres marqueurs TFH.

Le lymphome T folliculaire est une nouvelle entité provisoire de la classification OMS 2016. Le terme folliculaire est lié au mode de croissance de ce lymphome rare, mimant un LNH de phénotype B de type folliculaire. Morphologiquement, il est caractérisé par des amas de lymphocytes T tumoraux dans des zones du manteau élargies, donnant un aspect de transformation progressive des centres germinatifs. Les cellules tumorales sont CD4+ et expriment les marqueurs TFH (CXCL13, PD1, BCL6, ICOS +/- CD10) (4,6). Un réseau de CFD est présent au sein des follicules, sans expansion extra folliculaire. Une étude récente comportant 5 cas de LNH T folliculaire retrouve 100 % d'expression du CXCL13 par les cellules tumorales (*Dobay et al, 2017 (7)*). Notre série comporte un cas de LNH T folliculaire, avec immunomarquage CXCL13+ des cellules tumorales.

Une étude récente publiée en janvier 2017 (*Gaulard, de Leval et al (7)*), a mis en évidence, en plus de caractéristiques immunophénotypiques communes, des similitudes cliniques, génétiques et moléculaires entre les trois lymphomes dérivés des lymphocytes TFH, à savoir le LTAI, le LNH T ganglionnaire de phénotype TFH et le LNH T folliculaire. Morphologiquement, on observe souvent des immunoblastes B de morphologie Hodgkin-like ou Reed-Sternberg-like, CD30+ et parfois CD15+, EBV+ dans 50 % des cas, posant le problème du diagnostic différentiel avec le lymphome de Hodgkin classique riche en lymphocytes. Le réseau de CFD est également décrit dans les trois lymphomes dérivés des cellules TFH (7,68), et les anémies avec test de Coombs positif sont plus fréquentes dans ces lymphomes que dans les LNH T NOS. En biologie moléculaire, un séquençage ciblé a mis en évidence des fréquences de mutation similaires dans les gènes TET2, DNMT3A et RHOA, alors que les mutations d'IDH2 ne sont observées que pour les LTAI. Les chevauchements cliniques, morphologiques et moléculaires entre ces différents sous-groupes suggèrent que ces lymphomes appartiennent au même spectre lésionnel (69).

Comme pour le LTAI, la prolifération B dans le LNH de phénotype TFH et le LNH T folliculaire est attribuée à plusieurs facteurs. D'une part, les lymphocytes TFH tumoraux ont un rôle inhibiteur des fonctions lymphocytaires T, ce qui induit une immunodépression à l'origine d'une réactivation ou d'une primo-infection par l'EBV. D'autre part, les lymphocytes TFH tumoraux maintiennent leurs fonctions de recrutement et d'activation des lymphocytes B. Certains auteurs emploient le terme de lymphomes immunologiquement fonctionnels (32) pour décrire la conservation des fonctions TFH au sein de la tumeur.

## 2. LNH extra-ganglionnaire de phénotype T/NK

Ce lymphome lié à l'EBV atteint l'adulte, avec une prédominance masculine, et une prévalence plus élevée dans les populations Asiatiques et d'Amérique centrale et du sud. Il se développe classiquement dans la cavité nasale et les voies aéro-digestives supérieures, mais peut également atteindre d'autres sites tels que le tube digestif ou la peau. La majorité des LNH T/NK sont dérivés des cellules NK (54). Morphologiquement, les cellules sont de taille variable. Elles s'agencent en plages densément cellulaires, avec un angiocentrisme et une angi invasion caractéristiques. La présence de plages de nécrose de coagulation est fréquente, et peut gêner l'interprétation sur biopsie à l'aiguille. Les cellules tumorales sont CD3+ CD2+ CD5- CD4- CD8-, et généralement CD56+. Elles expriment les marqueurs cytotoxiques, et sont systématiquement EBV+ (70).

Dans la littérature, un immunomarquage CXCL13+ sur les cellules tumorales a été décrit dans 26 % des cas sur 30 LNH T/NK (*Bruno et al, 2016 (8)*), dans 14 % des cas sur 7 LNH T/NK (*Yu et al, 2009 (39)*), avec une expression focale et de faible intensité, et dans 59 % des cas sur 67 LNH T/NK d'origine NK (*Pongpruttipan et al, 2012 (71)*), alors qu'il n'y avait pas d'expression de CXCL13 dans les LNH T/NK d'origine T pour la même étude (cette différence n'était pas significative,  $p = 0,098$ ). D'après *Pongpruttipan et al*, l'expression de CD30 par les cellules tumorales des LNH T/NK serait associée à l'expression de CXCL13 et de IRF4/MUM1. Les auteurs suggèrent que l'expression de ces marqueurs, habituellement non retrouvée dans les cellules NK normales, correspond à un signe d'activation. Elle n'a pas d'implication pronostique ni thérapeutique à l'heure actuelle.

Dans notre étude, les cellules tumorales sont CXCL13+ dans 2 cas de LNH T/NK sur 3 (Figure 10).

### 3. LNH T lié aux entéropathies (EATL)

Ce lymphome, de localisation intestinale, fait partie des complications de la maladie cœliaque. Sa prévalence est plus élevée en Europe du Nord. Les cellules tumorales sont dérivées des lymphocytes intra-épithéliaux T $\alpha\beta$ . Morphologiquement, elles sont de grande taille, d'aspect pléomorphe (54). L'environnement réactionnel comporte des polynucléaires éosinophiles et des histiocytes. Des plages de nécrose sont présentes, ainsi qu'un épithéliotropisme. La muqueuse à distance est caractérisée par une atrophie villositaire variable, une lymphocytose intra-épithéliale et une hyperplasie cryptique. Les cellules tumorales ont le même immunophénotype que les lymphocytes intra-épithéliaux de la muqueuse adjacente. Elles sont CD3+ CD5- CD4- CD56-, elles expriment les marqueurs cytotoxiques et sont EBV- (70). Un des diagnostics différentiels principaux est le lymphome T anaplasique CD30+ ALK -, de présentation souvent extra-ganglionnaire.

Une étude récente a étudié l'expression immunohistochimique des marqueurs TFH dans 254 cas de lymphomes T périphériques, dont 9 EATL (*Bruneau et al*, 2016 (8)). Sur 9 EATL, 8 étaient négatifs pour l'ensemble des marqueurs TFH, et il n'a pas été observé de microenvironnement TFH pour ces cas. Les auteurs ne précisent pas si le cas est positif pour la chimioquine CXCL13 ou pour un autre marqueur.

Dans notre étude, 2 cas d'EATL sur 3 ont un immunomarquage CXCL13 positif sur les cellules tumorales.

## **B. Autres lymphomes dont les cellules tumorales expriment CXCL13**

### **1. LHNPL**

La description de ce lymphome est faite au paragraphe suivant (p. 71). Une étude de *Nam-Cha et al* datant de 2008 (72) comptait 58 LHNPL, dont 7 présentaient une expression aberrante de CXCL13 par les cellules tumorales. Les auteurs ne proposent pas d'explication pour cet immunomarquage, qui n'est pas décrit ailleurs dans la littérature, à notre connaissance. Notre étude compte un cas de LHNPL avec expression de CXCL13 par les cellules tumorales (Figure 12).

### **2. LNH primitif du système nerveux central**

Certains auteurs ont mis en évidence, par analyse de l'ARN sur microarray, une expression de CXCL13 par les cellules B malignes du lymphome primitif du système nerveux central (73,74). Notre série n'en comporte pas.

## **C. Sarcome à cellules folliculaires dendritiques**

Le sarcome à cellules folliculaires dendritiques est une tumeur très rare développée le plus souvent dans les ganglions périphériques. L'oncogenèse de cette tumeur est peu connue. Certains auteurs ont décrit des cas développés à partir de centres germinatifs résiduels dans le cadre d'une maladie de Castleman, ou d'un lymphome folliculaire. Il s'agit d'une tumeur à malignité intermédiaire, avec un pronostic assez bon (75). Des manifestations auto-immunes associées au sarcome folliculaire dendritique ont été décrites, le pemphigus paranéoplasique est la plus

fréquente d'entre elles (75). Morphologiquement, le sarcome à cellules folliculaires dendritiques est caractérisé par une prolifération à cellules fusiformes, anisocaryotiques, agencées en faisceaux (Figure 13). Les noyaux sont ovoïdes ou allongés, les limites cytoplasmiques sont floues, et des mitoses sont présentes (60). En immunohistochimie, les cellules folliculaires dendritiques tumorales expriment le CXCL13 de manière diffuse et intense, ce qui les différencie des autres sous-types de sarcomes à cellules dendritiques. Un infiltrat lymphocytaire intra tumoral dense est souvent décrit, il s'agit principalement de lymphocytes B de la zone du manteau (9). L'exérèse chirurgicale est habituellement la norme, mais le traitement de cette entité rare n'est pas standardisé.

Une observation rapportée récente (*Benharroch et al, 2017 (76)*) suggère qu'il est parfois difficile, morphologiquement, de différencier une hyperplasie du réseau de CFD CD21+ CD23+ dans le cadre d'un LTAI, d'un sarcome à cellules folliculaire dendritique. Le recours à la biologie moléculaire est alors utile.

Notre étude comporte un cas de sarcome à cellules folliculaires dendritiques, développé sur une maladie de Castleman dans une variante plasmocytaire.

## IV. Infiltrat TFH CXCL13+ dans le microenvironnement de néoplasies autres que le LTAI

### A. Lymphomes B

#### 1. LHNPL

Le LHNPL, anciennement nommé paragranoïde nodulaire de Poppema et Lennert, est un sous-type de lymphome de Hodgkin d'évolution habituellement indolente. Souvent asymptomatique, sa découverte fortuite s'inscrit dans un contexte d'adénopathie unique ou multiple, dans une aire ganglionnaire superficielle, le plus souvent chez le sujet jeune de sexe masculin. Morphologiquement, l'architecture est nodulaire dans la forme classique, mais il existe des formes diffuses, pouvant poser le problème du diagnostic différentiel avec un lymphome B riche en T ou avec un LTAI. Six différents sous-groupes architecturaux ont été décrits par *Fan et al.* à partir de 118 cas de LHNPL (77). Dans les zones diffuses, le fond est constitué majoritairement de petits lymphocytes TFH PD1+ CXCL13+, alors qu'au sein des nodules, la proportion de lymphocytes B est plus grande. Ce fond de petits lymphocytes est ponctué par les cellules tumorales B d'origine centrogerminative. Également appelées cellules LP ou « popcorn », elles sont de grande taille, au noyau vésiculeux polylobé, CD20+, CD79a+ et PAX5+. Il est important de décrire la présence de zones diffuses, car elles sont associées à un risque de récurrence et de transformation plus important en LNH B diffus à grandes cellules, même si le pronostic reste globalement bon.

D'après *Nathwani et al.* (2013, (10)), la présence de nombreux lymphocytes TFH dans le microenvironnement des LHNPL est caractéristique. Histologiquement,

ces lymphocytes activés ont une taille petite à moyenne, un cytoplasme pâle, une chromatine dispersée, et un petit nucléole. Ils se disposent volontiers en rosettes PD1+ CD57+ autour des cellules LP. Dans leur étude, des rosettes CXCL13+ au moins partielles ont été observées dans 2 cas sur 32.

Sur une autre série de 58 LHNPL (*Nam-Cha et al, 2008, (72)*), 7 cas présentent des cellules TFH CXCL13+ dans le microenvironnement. D'après les auteurs, la présence de rosettes de lymphocytes TFH est décrite comme un argument diagnostique de LHNPL versus celui de LNH B riche en lymphocytes T, où les rosettes sont habituellement absentes. Cependant, même si elles sont typiques du LHNPL, elles n'en sont pas spécifiques, car elles peuvent être rencontrées dans les LH riches en lymphocytes. Le même auteur a publié une série de 68 cas de LHNPL en 2009 (78), pour lesquels il décrit des rosettes PD1+ autour des cellules LP dans 88 % des cas, et des rosettes CXCL13+ dans 12 % des cas.

La présence de lymphocytes TFH autour des cellules LP, ainsi que le maintien du programme B dans les cellules tumorales, suggèrent que le microenvironnement des centres germinatifs est maintenu dans le LHNPL, mimant les interactions biologiques qui prennent place dans les follicules lymphoïdes. Dans d'autres tumeurs, comme par exemple les LH classiques, ce microenvironnement est perdu. Cependant, la présence de lymphocytes TFH activés n'augmenterait pas le nombre de cellules malignes (10).

Le diagnostic différentiel histologique entre un LTAI et un LHNPL peut être délicat, en particulier dans les formes diffuses de LHNPL. Il faut s'efforcer de rechercher des zones nodulaires, soulignées de manière plus évidente par

l'immunomarquage CD20 ou CD21. D'après la définition de l'OMS, la présence d'un nodule unique suffit à établir le diagnostic de LHNPL (77). Par ailleurs, les immunoblastes activés présents dans le LTAI sont CD30+, alors que les cellules LP du LHNPL sont EMA+ dans 50 % des cas. D'autre part, dans le LTAI, les lymphocytes TFH tumoraux sont caractérisés par des atypies cytonucléaires, qui sont théoriquement absentes dans les lymphocytes TFH réactionnels du LHNPL. Cependant, les atypies sur les lymphocytes T constituent un critère subjectif parfois difficile à établir, et peu reproductible.

Dans notre étude, deux cas de LHNPL comportent un microenvironnement au sein duquel sont présents de nombreux lymphocytes TFH CXCL13+. Pour l'un d'entre eux, un diagnostic initial de LTAI avait été posé. En raison d'une discordance clinique, le cas a été secondairement relu, et, à la lumière de données cliniques et évolutives, le diagnostic de LHNPL a pu être rétabli.

## **2. LNH B riche en lymphocytes T**

Notre étude comporte deux cas de LNH B diffus riche en lymphocytes T avec des lymphocytes T CXCL13+ dans le microenvironnement tumoral. Le diagnostic différentiel est difficile avec les formes de LTAI riches en immunoblastes. Dans le LNH B riche en lymphocytes T, le fond ne comporte pas d'éosinophiles ni de plasmocytes, il n'y a pas d'expansion des CFD et les cellules B tumorales sont EBV-. De plus, l'expression du marqueur EMA par les cellules B tumorales est un bon argument en faveur du LNH B riche en lymphocytes T. Dans le LTAI, les immunoblastes n'expriment pas l'EMA.

La mise en évidence d'un clone B par analyse moléculaire peut être utile. Cependant, les LTAI riches en immunoblastes sont plus souvent corrélés au développement d'une lymphoprolifération B associée à l'EBV. Or, les immunoblastes B infectés par l'EBV ont davantage tendance à développer une prolifération clonale ou oligoclonale B que les immunoblastes non infectés par l'EBV (53). La clonalité B doit donc être interprétée en fonction du contexte, et ne constitue pas à elle seule un critère diagnostique absolu.

### **3. LH classique**

Notre étude comprend trois cas sur six de LH classique pour lesquels le microenvironnement comporte des lymphocytes TFH CXCL13+. Le diagnostic est une fois de plus difficile avec le LTAI.

Pour un cas, un diagnostic de LH classique riche en lymphocytes avait été établi en 2010 sur exérèse ganglionnaire. Les grandes cellules B étaient CD30+ CD15+ et EBV-. Le patient a bénéficié d'une chimiothérapie de type ABVD puis de type RCHOP, avec réponse complète. En 2014, une exérèse ganglionnaire est adressée pour suspicion de poussée évolutive. Les caractéristiques morphologiques spécifiques, l'immunoprofil CXCL13+ et la présence d'un clone T, ainsi que l'envahissement médullaire, ont finalement permis de poser le diagnostic de LTAI. Une relecture des lames de 2010 a été effectuée, retrouvant le même clone T, et reclassant la lésion en LTAI dans une forme précoce avec hyperplasie folliculaire.

Un autre cas de LTAI dans une variante avec préservation des follicules lymphoïdes a également posé le problème du diagnostic différentiel avec un LH

classique, car les lymphocytes T tumoraux étaient peu atypiques. La présence du même clone T sur plusieurs prélèvements consécutifs a finalement permis d'établir le diagnostic de LTAI.

Enfin, un autre cas a posé des difficultés de diagnostic différentiel entre un LTAI et un LH classique sur exérèse ganglionnaire. Le fond était polymorphe, avec préservation de quelques follicules B. Les arguments en faveur du LTAI étaient la présence d'une population T atypique CXCL13+ PD1+, l'infiltration de la graisse péri-ganglionnaire par les cellules tumorales, et la présence d'un clone T.

#### **4. Lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC)**

Notre étude comporte un cas de LBDGC associé à l'EBV du sujet âgé dans une forme polymorphe, initialement diagnostiqué comme un LTAI, en raison de nombreuses cellules CXCL13+ dans le microenvironnement.

#### **5. LNH B de la zone marginale (LZM)**

Le LZM splénique est un lymphome indolent du sujet âgé caractérisé par une splénomégalie, et une infiltration de la moelle osseuse fréquemment présente au moment du diagnostic (79). D'après *Lopes-Carvalho et al*, les lymphocytes B de la zone marginale contribuent à la formation des centres germinatifs : ils transportent les complexes immuns vers les CFD, et ont un rôle dans l'organisation des CFD. Ils auraient également un rôle dans l'activation des lymphocytes T CD4+ naïfs (80). Les LZM ganglionnaires sont rares. Ils touchent le sujet âgé. Des associations avec l'infection par le VHC et avec des dysrégulations immunes ont été décrites (81).

Dans notre série, 2 cas de LZM ganglionnaires sur 4 comportent un microenvironnement CXCL13+. Dans les deux cas, le diagnostic de LTAI avait été discuté. Le premier cas concernait un LZM splénique. A l'examen microscopique, de nombreux lymphocytes T CXCL13+ dispersés étaient présents à la fois dans le parenchyme ganglionnaire et dans la moelle osseuse. Un clone B était retrouvé. Le deuxième cas concernait un LZM ganglionnaire, associé à une hyperplasie immunoblastique EBV+. De nombreuses cellules CXCL13+ étaient présentes en territoire inter folliculaire.

Nous n'avons pas retrouvé de description de la présence de lymphocytes CXCL13+ dans le microenvironnement des LZM dans la littérature.

## **6. LNH B de type folliculaire**

D'après *Gaulard, de Leval et al (4)*, des lymphocytes TFH PD1+ sont retrouvés dans les follicules tumoraux des LNH B folliculaires. La proportion de lymphocytes PD1+ serait moins importante dans les grades III que dans les grades I-II, et la présence de lymphocytes TFH dans les follicules tumoraux aurait un impact favorable sur le pronostic. Comme pour le LHNPL, il est possible que la présence de lymphocytes TFH dans le microenvironnement a un rôle dans la croissance des cellules B tumorales dérivées du centre germinatif (4). Notre série ne comporte pas de LNH folliculaire avec cellules du microenvironnement CXCL13+, probablement parce que ce lymphome a un aspect morphologique nodulaire caractéristique. Or les cas de notre étude sont sélectionnés sur la base d'un immunomarquage CXCL13,

qui est motivé par une suspicion de LTAI, dont l'architecture est classiquement diffuse.

## **B. Lymphomes T**

### **1. LNH T périphérique NOS**

Les LNH T périphériques NOS correspondent à un diagnostic d'élimination. Ils sont définis par l'absence de caractéristique morphologique permettant de les classer dans une catégorie plus spécifique, et présentent donc une grande hétérogénéité cytologique et phénotypique (6). Le diagnostic de lymphome T NOS requiert un examen morphologique minutieux et une analyse immunohistochimique extensive. En effet, une expression de plusieurs marqueurs TFH permet de les reclasser en lymphomes T périphériques de phénotype TFH, et une expansion du réseau de CFD permet éventuellement un reclassement en LTAI sous une forme riche en cellules tumorales, surtout en cas de positivité pour l'EBV. Une atteinte à la fois ganglionnaire et cutanée doit également faire éliminer un lymphome T cutané (mycosis fongoïde ou syndrome de Sézary) (52).

Il est important de différencier ces catégories, définies par un consensus parmi les hématopathologistes, cliniciens et généticiens, car elles sont associées à une lymphomagenèse et un retentissement clinique différent, et sont donc potentiellement soumises à une prise en charge spécifique. A ce jour, la distinction entre LNH T d'origine TFH et LNH T NOS n'a pas d'implication thérapeutique (47), mais cette situation pourrait évoluer dans un futur proche avec l'introduction de

nouvelles approches thérapeutiques et le développement de thérapies ciblées, comme les agents déméthylants pour les patients mutés TET2 et DNMT3A (82).

Le diagnostic différentiel avec des pathologies bénignes peut également être difficile. Si la population T est cytotoxique CD8+, il convient d'éliminer une lymphadénite histiocytaire nécrosante, ou une mononucléose infectieuse, qui s'accompagne d'un nombre variable de cellules B EBV+.

Dans notre étude, 3 cas sur 13 comportent des lymphocytes T CXCL13+ dans le microenvironnement, sans expression d'un autre marqueur TFH.

## **2. LNH T anaplasique ALK+**

En France, le lymphome T anaplasique ALK+ représente environ 9 % des lymphomes T périphériques non cutanés. Il atteint préférentiellement l'adulte jeune et l'enfant, et les symptômes régressent sous chimiothérapie, avec un meilleur pronostic que le LNH T anaplasique ALK-. La présentation de ce lymphome est le plus souvent ganglionnaire, mais les atteintes cutanées, osseuses ou des tissus mous ne sont pas rares. Ce lymphome est défini par une altération génétique : le réarrangement du gène ALK, entraînant une protéine de fusion chimérique qui induit l'activation de la tyrosine kinase ALK (54).

Histologiquement, les cellules tumorales infiltrent les sinus et les zones paracorticales, avec un aspect cohésif pseudo-métastatique. Ces cellules dites « hallmark » sont de grande taille, au noyau réniforme ou en fer à cheval, avec un cytoplasme abondant. En immunohistochimie, les lymphocytes T tumoraux sont

CD30+ EMA+ ALK+. La perte d'antigènes T est fréquente. Les cellules lymphomateuses expriment les marqueurs cytotoxiques et sont EBV-.

Différentes variantes morphologiques sont décrites. Dans les variantes « à petites cellules » ou « lymphohistiocytaires » (10-15 %), les grandes cellules « hallmark » CD30+ sont minoritaires, et le diagnostic différentiel avec un lymphome T périphérique peut être morphologiquement délicat. Il convient de rechercher l'expression de la protéine ALK (83).

Notre série comporte un cas de lymphome T anaplasique ALK+, avec un immunomarquage CXCL13+ granuleux cytoplasmique de très nombreux lymphocytes T helper activés dans l'infiltrat réactionnel.

### **3. LHN T anaplasique ALK-**

Le lymphome T anaplasique ALK- touche le sujet âgé. Les localisations extra-ganglionnaires sont moins fréquentes, et le pronostic est moins favorable que celui des formes ALK+. La morphologie et l'immunophénotype sont similaires à ceux de la forme ALK+, à l'exception de l'absence d'expression de la protéine ALK, et de marqueurs T un peu mieux préservés.

L'étude de *Bruneau et al*, 2016 (8), a révélé une expression de CXCL13 par les cellules tumorales dans 2 lymphomes T anaplasiques ALK- sur 8, avec un microenvironnement CXCL13+ dans 3 cas sur 8. *Yu et al*, 2009 (39), avaient eux aussi retrouvé un immunomarquage CXCL13+ focal et de faible intensité dans un cas sur 12 LNH T anaplasique à grandes cellules.

Notre série comporte un cas de lymphome T anaplasique ALK-, où l'immunomarquage CXCL13+ dans le microenvironnement avait initialement orienté le diagnostic vers celui de LTAI.

#### **4. Lymphomes T primitifs cutanés**

Sur biopsie cutanée, un immunophénotype TFH est décrit dans les lymphoproliférations T primitives cutanées à petites/moyennes cellules CD4+. Cette entité atteint l'adulte âgé. Les lésions sont exclusivement cutanées, sans atteinte ganglionnaire ni symptôme systémique (84). Dans la révision de la classification OMS 2016, ces tumeurs ont été classées dans les lymphoproliférations plutôt que dans les lymphomes, en raison de leur évolution indolente et de l'absence de critères de malignité (6). Histologiquement, le derme est le siège d'un infiltrat T CD4+ dense et atypique, exprimant les marqueurs TFH, associé à des blastes B réactionnels pouvant être EBV+. Là encore, une stimulation des lymphocytes B par les lymphocytes TFH tumoraux a été suggérée par certains auteurs (5).

Une étude comportant 16 cas retrouvait une expression de CXCL13 par les cellules tumorales dans 100 % des cas (*Ponciano et al, 2012 (85)*).

Le diagnostic différentiel est la localisation cutanée d'un LTAI (50 % des LTAI). Parmi les manifestations cutanées observées dans le LTAI, la plus fréquente est l'éruption maculopapulaire, mais elles peuvent être très variées (érythème, papule, bulle, purpura ou autre), et peuvent mimer des dermatoses inflammatoires. Dans le LTAI, les signes cutanés s'accompagnent de symptômes B, d'autres localisations, notamment ganglionnaires, et d'une altération de l'état général (86).

De rares cas de mycosis fongoïdes avec expression aberrante de marqueurs TFH (PD1) ont été décrits (4).

## **V. Infiltrat réactionnel TFH CXCL13+ dans des pathologies bénignes**

### **A. Lymphadénite histiocytaire nécrosante**

La lymphadénite histiocytaire nécrosante, ou maladie de Kikuchi-Fujimoto, est une maladie bénigne d'étiologie inconnue. Son incidence est plus élevée chez les femmes de 20 à 35 ans, dans les populations asiatiques. Elle se manifeste le plus souvent comme une lymphadénopathie cervicale unique, mesurant généralement moins de 3 cm, parfois accompagnée de signes généraux (fièvre, céphalée ou asthénie). Dans 30 % des cas, des signes cutanés non spécifiques peuvent être présents. Le bilan biologique peut retrouver des cytopénies, une élévation de la CRP, et éventuellement la présence de lymphocytes atypiques dans le sang (87). L'exérèse chirurgicale est la méthode de choix pour le diagnostic anatomopathologique.

Microscopiquement, la lymphadénite histiocytaire nécrosante est caractérisée par des lésions nodulaires, centrées par une nécrose fibrinoïde contenant des débris nucléaires, entourée d'histiocytes, de lymphocytes T à prédominance CD8+ et de cellules dendritiques immatures. La lésion ne contient pas de polynucléaire neutrophile ou éosinophile, ni de plasmocyte. Les lymphomes T périphériques, le

lupus érythémateux disséminé (LED), la tuberculose et la mononucléose infectieuse font partie des diagnostics différentiels.

Les cellules dendritiques immatures sont des précurseurs des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène. Leur aspect histologique est proche de celui de lymphocytes de grande taille (88), et elles sont marquées par les anticorps anti-CD1C, anti-CD303 et anti-CD123 (89). D'après *Feller et al.*, ces cellules auraient un immunoprofil TFH (90), mais à notre connaissance, il n'a jamais été décrit d'immunomarquage CXCL13+ sur ces cellules dans la littérature.

Notre série comporte 6 lymphadénites histiocytaires nécrosantes. Pour 5 d'entre elles, on observait un immunomarquage CXCL13+ sur des cellules réactionnelles activées autour des plages de nécrose. Les lymphocytes T activés CD4+ pouvaient être de grande taille, et pouvaient présenter des atypies cytonucléaires importantes, posant le problème du diagnostic différentiel avec un lymphome T périphérique.

Pour un des cas, le tableau clinique était initialement bruyant et inquiétant, avec une altération de l'état général, une polyadénopathie et des lésions cutanées. Sur exérèse ganglionnaire, les cellules lymphoïdes en périphérie des plages de nécrose étaient nombreuses, de taille moyenne, au noyau irrégulier et nucléolé. Leur profil immunophénotypique était CD3+ CD4+, et certaines d'entre elles étaient PD1+ CXCL13+. En biologie moléculaire, un pic majoritaire T associé à une population polyclonale étaient retrouvés. Le diagnostic de LTAI avait été évoqué. Par la suite, le profil cytotoxique TIA1+ granzyme+ perforine+ des cellules lymphoïdes, ainsi que la présence de nombreux histiocytes CD68+, et l'absence d'EBV, ont finalement permis

de poser le diagnostic de lymphadénite histiocytaire nécrosante dans une phase proliférante, avec un phénotype TFH aberrant.

La présence de foyers de nécrose n'est pas un critère décrit dans le LTAI, et peut aider à orienter le diagnostic. Cependant, il existe des formes de maladie de Kikuchi prolifératives, pré-nécrosantes, dans lesquelles on peut observer un grand nombre de cellules CXCL13+ dans les zones interfolliculaires. C'est le cas d'un des patients de l'étude, chez qui une polyadénopathie cervicale associée à un fébricule chronique, des cytopénies et une élévation des LDH ont initialement fait suspecter un lymphome. *Deaver et al, 2014 (91)*, décrivent eux aussi cet aspect clinique initialement trompeur des lymphadénites histiocytaires nécrosantes, sous forme d'adénopathies généralisées, avec symptômes systémiques B et éventuellement présence de signes cutanés, qui peuvent orienter vers le diagnostic de LTAI. Des signes de dysrégulation auto-immune ont par ailleurs été décrits, avec notamment une association au LED, ainsi que des cas EBV+. La confrontation anatomoclinique et l'évolution du patient sont particulièrement importantes dans l'interprétation de ces cas difficiles.

## **B. Lymphadénite avec hyperplasie angioimmunoblastique**

Les lymphadénites angioimmunoblastiques peuvent mimer un LTAI, mais l'architecture ganglionnaire est préservée, les lymphocytes T sont CD8+ et il n'y a pas d'expression des marqueurs TFH.

Un ganglion inguinal a été prélevé chez un patient de notre série, qui souffrait d'adénopathies diffuses et d'une hépato-splénomégalie. Morphologiquement, on observait un aspect de lymphadénite avec lymphoprolifération plasmocytaire et présence de nombreuses veinules post capillaires à paroi légèrement épaissie. Un clone T était présent. Cliniquement, les adénopathies ont disparu spontanément, le diagnostic retenu était celui de lymphadénite angioimmunoblastique. Trois mois plus tard, le même patient présentait une altération de l'état général et une anémie profonde. Une nouvelle exérèse ganglionnaire permettait de diagnostiquer un LTAI.

La mise en évidence d'un clone T en biologie moléculaire doit toujours être interprétée en fonction du contexte morphologique et clinique. Une population clonale T et une morphologie angioimmunoblastique peuvent être observées dans les pathologies réactionnelles virales, auto-immunes ou médicamenteuses. En particulier, des cas de lymphadénites liées au méthotrexate ont été décrites, avec une évolution favorable après arrêt thérapeutique (92). La confrontation anatomopathologique est essentielle dans ce contexte.

Dans un autre cas de lymphadénite, la régression spontanée des adénopathies, l'absence d'expression des marqueurs TFH, la préservation de l'architecture ganglionnaire et l'absence de blastes B EBV+ étaient des signes en faveur du diagnostic de lymphadénite angioimmunoblastique.

### **C. Syndrome hyperéosinophilique variant lymphoïde (SHE-L)**

Le SHE-L est caractérisé par une hyperéosinophilie sanguine et/ou tissulaire, secondaire à la production de cytokines pro-éosinophiles (IL-5) par une population lymphocytaire T clonale persistante. Le retentissement clinique peut être variable, les manifestations cutanées et les adénopathies sont les signes les plus fréquents (93). Les lymphocytes clonaux ont un phénotype Th2 aberrant CD3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>. La persistance du même clone lymphocytaire T dans le sang et les tissus lésés pendant plusieurs années fait classer le SHE-L dans les syndromes lymphoprolifératifs clonaux T indolents périphériques. Le risque de ce syndrome est la transformation en lymphome T périphérique, et en particulier en LTAI.

*Lefevre et al, 2015 (64)*, ont étudié une cohorte de 21 patients atteints d'un SHE-L. Morphologiquement, sur exérèse ganglionnaire, ils décrivent des caractéristiques histopathologiques similaires au LTAI : un infiltrat lymphocytaire T clonal atypique CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>, de distribution interfolliculaire ou diffuse, avec respect des sinus périphériques corticaux, associé à une hyperplasie du réseau de CFD et des veinules endothéliales, et un infiltrat à polynucléaires éosinophiles et à plasmocytes. Deux caractéristiques diffèrent par rapport au LTAI : l'absence de blastes B EBV<sup>+</sup>, et l'absence d'expression des marqueurs TFH par les lymphocytes T clonaux.

Dans leur cohorte, les auteurs ont observé deux cas de transformation en LTAI. Dans les deux cas, l'aspect morphologique de l'exérèse ganglionnaire est superposable à celui du SHE-L avant la transformation, mais les lymphocytes T atypiques ont acquis un immunophénotype TFH CXCL13<sup>+</sup> CD10<sup>+</sup> (64,94). De plus,

dans le LTAI, les cellules tumorales ont un noyau clarifié et plus volumineux, et un cytoplasme plus abondant, que les cellules clonales du SHE-L.

Dans notre étude, trois patients sont porteurs d'un SHE-L. Deux d'entre eux développent un LTAI, avec acquisition des marqueurs TFH et perte d'expression du CD4. Il s'agit des mêmes patients que dans l'étude de *Lefèvre et al.* Ils sont tous deux décédés rapidement après la transformation maligne, qui a eu lieu plus de vingt ans après le diagnostic de SHE-L. Dans ce contexte, l'immunomarquage CXCL13 a un rôle diagnostique majeur.

## **VI. Le type de prélèvement a une influence sur le niveau de certitude diagnostique**

### **A. Le typage précis d'un lymphome n'est pas toujours possible sur biopsie à l'aiguille ganglionnaire**

Dans notre étude, sur 104 exérèses ganglionnaires, le diagnostic anatomopathologique a pu être établi de manière certaine dans 98 cas, soit 94 %. En revanche, sur 25 biopsies ganglionnaires à l'aiguille, le diagnostic restait incertain dans plus de la moitié des cas (52 %). Ces résultats sont significatifs. Ils montrent que dans la problématique diagnostique qui est celle de notre travail (lymphome T angioimmunoblastique et ses diagnostics différentiels), la biopsie à l'aiguille ne permet pas l'établissement d'un diagnostic précis, dans un grand nombre de cas.

En effet, sur une carotte biopsique fine, des difficultés d'interprétation sont souvent rencontrées, liées au problème de la représentativité du prélèvement. Il est

parfois impossible d'apprécier l'architecture nodulaire ou diffuse d'une prolifération lymphoïde. La présence de zones de nécrose, même s'il s'agit d'un élément éventuellement informatif, peut diminuer la surface analysable de manière considérable. Il est également plus délicat d'identifier des zones d'hyperplasie veinulaire post-capillaire, ou d'apprécier le réseau folliculaire dendritique. Le diagnostic en hématopathologie, et plus particulièrement celui de LTAI, exige une appréciation de l'architecture globale de la lésion au faible grossissement. La mise en évidence du respect des sinus périphériques, la conservation ou la destruction des follicules lymphoïdes, la présence de blastes B EBV+ qui peuvent être peu nombreux, sont autant d'éléments essentiels au diagnostic, parfois non évaluables sur une biopsie de petite taille.

De plus, la quantité de matériel analysable est parfois insuffisante pour la réalisation d'études immunohistochimiques, indispensables à l'établissement d'un diagnostic formel. De même, les analyses moléculaires requièrent une quantité suffisante d'ADN pour être interprétables. Dans notre étude, ces difficultés s'observaient également pour d'autres prélèvements de petite taille, tels que des biopsies à l'aiguille de lésions ORL, et des biopsies digestives et bronchiques.

D'autres diagnostics requièrent une exérèse ganglionnaire pour une analyse anatomopathologique adaptée. Par exemple, le diagnostic différentiel entre un LNH B diffus riche en lymphocytes T et un LHNPL, en particulier quand ce dernier comporte des zones diffuses, peut s'avérer impossible sur biopsie à l'aiguille. Le retentissement pour le patient peut être important, puisqu'un diagnostic AP incertain retarde la prise en charge thérapeutique, qui peut être radicalement différente.

Il convient donc de privilégier, à chaque fois que possible, l'exérèse ganglionnaire par rapport à la biopsie à l'aiguille. Dans notre série, la réalisation d'une exérèse ganglionnaire était parfois impossible, par exemple en raison d'une thrombopénie trop importante. Dans ce cas, il faut être extrêmement vigilant lors de l'interprétation de la biopsie ganglionnaire à l'aiguille, et proposer la réalisation de prélèvements ultérieurs en fonction des données évolutives.

## **B. BOM**

### **1. La détection immunohistochimique de la chimiokine CXCL13 est moins sensible dans la moelle osseuse**

En situation physiologique, les marqueurs TFH sont négatifs dans la moelle osseuse. D'après une étude comportant 27 cas d'infiltration médullaire par un LTAI (*Khokhar et al*, 2010 (63)), les cellules tumorales expriment PD1 dans 85 % des cas, et BCL6 dans 100 % des cas. Les cellules marquées concernent souvent moins de 10 % de l'infiltrat. Pour évaluer l'immunomarquage BCL6 des cellules tumorales, les auteurs ont utilisé un double marquage CD3 et BCL6, car les cellules myéloïdes et les monocytes sont également BCL6+.

Les résultats de notre étude, bien que statistiquement non significatifs par manque d'effectifs, mettent en évidence une détection moins sensible de l'immunomarquage CXCL13 sur moelle osseuse. Ce défaut de détection a déjà été décrit par *Khokhar et al*, qui montrent également une sensibilité moins bonne du marqueur CD10 pour le diagnostic de LTAI dans la moelle osseuse.

Contrairement aux autres tissus, les prélèvements osseux sont soumis à une ou plusieurs étapes de décalcification, après fixation par le formol. Le produit décalcifiant utilisé à l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille est le DC1 (acide formique). Les BOM sont décalcifiées sous agitateur pendant une durée allant de cinq à huit heures, avant inclusion en paraffine. Une deuxième étape de décalcification par le DC1 pendant 30 minutes peut éventuellement être réalisée, avant la coupe au microtome. Il est possible que ces étapes de décalcification aient un effet destructeur sur les sites antigéniques, induisant une moins bonne affinité de l'anticorps anti-CXCL13 pour la chimioquine.

Néanmoins, le diagnostic de certitude de LTAI sur BOM reste possible, même sans immunomarquage CXCL13+ des cellules tumorales. Si l'aspect histologique est caractéristique, et le diagnostic de LTAI a été établi sur un autre prélèvement, certains pathologistes n'effectuent pas d'immunomarquage CXCL13. Une expression du marqueur CD3 par des lymphocytes atypiques regroupés en amas paratrabéculaires peut suffire à établir le diagnostic d'infiltration médullaire, c'est le cas pour deux patients dans notre étude. Pour un des cas, l'infiltration médullaire par le LTAI était évaluée à 40 %, et l'immunomarquage CXCL13+ concernait moins de 10 % des cellules tumorales. Le diagnostic de LTAI sur une exérèse ganglionnaire préalable a permis de poser le diagnostic d'infiltration médullaire sur la BOM.

## **2. Risque de faux négatif**

En dehors de tout contexte d'infiltration tumorale, des modifications de la moelle osseuse hématopoïétique sont fréquentes au cours des pathologies

lymphomateuses. On peut observer, entre autres, une hyperplasie des trois lignées hématopoïétiques, une plasmocytose, une hyperéosinophilie, une myélofibrose ou une hémotophagocytose (2,47). Si la BOM précède l'exérèse ganglionnaire dans la démarche diagnostique, ces modifications secondaires peuvent être interprétées à tort comme une maladie myéloproliférative chronique ou une plasmocytose médullaire. Elles peuvent par surcroît masquer une infiltration médullaire par le LTAI, en particulier en cas d'immunomarquage CXCL13-, retardant le diagnostic anatomopathologique (2). Cela souligne, une fois encore, l'importance de l'exérèse ganglionnaire dans la démarche diagnostique.

L'établissement du diagnostic de LTAI sur BOM est donc difficile, car plusieurs outils immunohistochimiques sont moins performants que sur l'exérèse ganglionnaire, en particulier CXCL13 et CD10 (63). L'étude de l'expression de PD1 et le double marquage CD3 et BCL6 seraient plus utiles.

### **C. Biopsie cutanée**

Dans 50 % des cas, des manifestations cutanées sont observées chez les patients souffrant de LTAI. Le diagnostic d'infiltration cutanée par le LTAI peut s'avérer difficile sur biopsie cutanée, en particulier si le contexte de LTAI n'est pas connu. Microscopiquement, l'infiltrat lymphoïde dermique est dense et atypique, à prédominance CD4+. L'expression immunohistochimique des marqueurs TFH par les lymphocytes T CD4+ peut être un argument utile pour orienter le diagnostic. Dans les localisations cutanées, l'immunomarquage CXCL13+ des lymphocytes T tumoraux est considéré par certains auteurs comme utile pour établir le diagnostic de LTAI

(Ortonne et al, 2007) (61). En revanche, la présence d'une clonalité T ne semble pas avoir de valeur discriminante par rapport aux infiltrats inflammatoires non néoplasiques. Les réarrangements du TCR sont possibles dans les réactions inflammatoires, en particulier chez les patients âgés, et dans les contextes de toxidermie. Dans tous les cas, la confirmation du diagnostic de LTAI par exérèse ganglionnaire est indispensable (49).

#### **D. Le diagnostic de lymphome est rarement possible sur un examen extemporané**

Pour deux cas de notre étude, une demande d'examen extemporané a été effectuée sur exérèse ganglionnaire. Dans les deux cas, un carcinome a été éliminé, mais l'analyse en extemporané n'a pas permis de préciser s'il existait une infiltration par un lymphome.

### **VII. Particularités et points sensibles de l'étude**

#### **A. L'immunomarquage CXCL13 : un outil diagnostique à utiliser avec précaution**

La première difficulté rencontrée lors de cette étude était de définir des catégories pour classer les résultats de l'immunomarquage CXCL13. Il ne s'agit pas d'un test diagnostique au résultat binaire, positif ou négatif, mais d'un immunomarquage sur coupe histologique, soumis à une interprétation. Cette interprétation requiert d'une part l'identification du type cellulaire marqué

(lymphocytes, cellule dendritique, macrophage, etc), et d'autre part l'identification de la nature réactionnelle ou tumorale de ces cellules. L'évaluation de la localisation des cellules marquées au sein du tissu est également à prendre en compte : un immunomarquage centrolliculaire est classé dans les résultats négatifs, car il s'agit du marquage physiologique attendu.

L'identification du caractère tumoral des cellules s'appuie sur des critères cytologiques, tels que la densité nucléaire, l'irrégularité des contours nucléaires, la présence d'un nucléole proéminent, et l'anisocaryose, et sur des critères architecturaux, tels que la présence de cellules infiltrant le tissu péri-ganglionnaire. La détection d'une clonalité T peut aider à établir le diagnostic, en particulier si le même clone est retrouvé sur plusieurs prélèvements.

#### **B. L'immunomarquage CXCL13+ dans le LTAI : lymphocytes TFH tumoraux ou CFD ?**

*Haruo Ohtani et al.* (95), ont récemment étudié de manière précise la nature des cellules CXCL13+ dans 33 LTAI ganglionnaires. Dans les tissus lymphoïdes normaux, l'analyse par double immunofluorescence a montré, d'après eux, que l'immunomarquage CXCL13+ intéressait principalement les CFD (double marquage CXCL13+ CD21+), et, d'une manière moins importante, les lymphocytes TFH (double marquage CXCL13+ CD4+ ou CXCL13+ CD3+). Ils suggèrent que tous les lymphocytes T helper du centre germinatif n'expriment pas la chimioquine CXCL13. De même, d'après les auteurs, dans 23 cas de LTAI, l'étude par double fluorescence a montré que l'immunomarquage CXCL13+ concernait surtout les CFD, avec un

marquage en réseau ou en mailles, et, à un degré moindre, les cellules TFH tumorales, avec un marquage en dot paranucléaire. Comme pour notre étude, la présence de prolongements cytoplasmiques permettait d'identifier les CFD.

*Agostinelli et al.*, 2001 (96), avaient déjà décrit une expression de CXCL13 par les CFD dans le LTAI. Cet immunomarquage est attendu, puisque les CFD sécrètent la chimioquine CXCL13 pour attirer les lymphocytes B et les lymphocytes TFH CXCR5+ au sein du centre germinatif. Pour *Haruo Ohtani et al*, l'expression de CXCL13 par les CFD dans le LTAI est sous-estimée dans la littérature. Une de leurs hypothèses est que les prolongements cytoplasmiques des CFD n'expriment pas toujours de CXCL13 en quantité suffisante pour être détectée. Elles sont alors considérées à tort comme des cellules tumorales de grande taille. Le double immunomarquage permet de mieux identifier la nature des cellules CXCL13+.

Dans toutes les études, les lymphocytes tumoraux CXCL13+ du LTAI sont disposés à proximité immédiate du réseau de CFD. La chimioquine CXCL13 est densément concentrée autour du réseau de CFD, à la fois dans les LTAI et dans les centres germinatifs normaux. Cette constatation est en accord avec l'hypothèse que les lymphocytes TFH tumoraux contribuent à la formation du réseau de CFD, et que le LTAI peut être considéré comme une « tumeur fonctionnelle » (95).

Des différences entre LTAI et centres germinatifs normaux ont toutefois été identifiées. Dans le LTAI, le réseau de CFD comporte d'abondantes cellules tumorales T, alors que dans les CG normaux, les cellules dominantes sont de phénotype B. De plus, dans le LTAI, le réseau de CFD est désorganisé, ce qui

constitue d'ailleurs un argument permettant de distinguer les LTAI des autres LNH T périphériques.

*Hongbo Yu et al, 2009 (39)*, ont réalisé une étude similaire par double marquage, mais ont retrouvé des résultats différents. Ils suggèrent que dans les tissus lymphoïdes normaux, l'immunomarquage CXCL13 intéresse principalement les lymphocytes TFH du centre germinatif. Le marquage est également décrit comme cytoplasmique en dot paranucléaire. Par contre, pour une série de 22 LTAI, ils décrivent un immunomarquage CXCL13+ des cellules tumorales uniquement, avec un double marquage CXCL13+ CD4+. L'analyse par double marquage CXCL13 et CD21 montrait une distribution similaire de ces deux marqueurs, mais des populations cellulaires marquées différentes. La répartition des cellules CXCL13+ est donc là encore autour du réseau de CFD. D'autre part, les auteurs suggèrent que les immunomarquages PD1 et CXCL13 des lymphocytes TFH ont des intensités différentes, ils recommandent donc l'utilisation de plusieurs marqueurs pour augmenter la sensibilité de détection des lymphocytes TFH tumoraux dans le LTAI.

Dans notre série, nous n'avons pas effectué de double immunomarquage CXCL13 et CD3 ni CXCL13 et CD4. L'identification de la nature des cellules marquées était basée sur des critères morphologiques, notamment sur la taille des cellules, et la présence de prolongements cytoplasmiques. À de nombreuses reprises, nous avons observé une localisation préférentielle des lymphocytes TFH tumoraux CXCL13+ au contact des cellules dendritiques au niveau des zones d'hyperplasie du réseau. Par ailleurs, le marquage CXCL13 était la plupart du temps décrit comme cytoplasmique granuleux, avec parfois un renforcement golgien en dot paranucléaire.

### **C. Perspectives d'études**

Pour évaluer la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI, nous avons étudié 273 cas, sélectionnés de manière rétrospective sur la base d'une demande d'immunomarquage CXCL13. Or, cette demande est motivée par une suspicion de LTAI, l'étude est donc restreinte à une problématique diagnostique hématopathologique précise. Il serait intéressant d'effectuer un immunomarquage CXCL13 sur tous les cas diagnostiqués au cours d'une période donnée, hématologiques ou non, bénins ou malins. Une nouvelle étude avec réalisation d'un immunomarquage CXCL13 sur tous les diagnostics, permettrait peut-être la découverte d'un immunomarquage inattendu dans d'autres pathologies.

### **D. Le diagnostic anatomopathologique de LTAI peut être retardé**

L'établissement du diagnostic anatomopathologique de LTAI repose sur un faisceau d'arguments, chacun évalué à sa juste valeur par le pathologiste. Le diagnostic est la synthèse des données cliniques, histologiques, immunohistochimiques et moléculaires. Il est parfois impossible d'établir le diagnostic de manière certaine, soit par manque de matériel analysable, soit par manque de données cliniques, soit, quelquefois, en raison du caractère inhabituel de la tumeur (tumeurs « grey zone »). Dans notre série, sur 273 prélèvements, 38 diagnostics anatomopathologiques sont incertains, soit 14 %. Parmi ces 38 diagnostics incertains, les types de prélèvement les plus fréquents sont la biopsie ganglionnaire à l'aiguille (13 cas soit 34 %) et la BOM (12 cas soit 32 %).

Pour un certain nombre de patients, le LTAI présente un mode d'évolution par poussées spontanément résolutive. Cette caractéristique est peu décrite dans la littérature. Les manifestations du LTAI peuvent être très différentes, elles peuvent mimer des tableaux infectieux, allergiques ou auto-immuns, retardant le diagnostic (97). Dans certains cas où le diagnostic de LTAI reste incertain après confrontation anatomo-clinique, c'est l'évolution du patient, et la réalisation de nouveaux prélèvements, en particulier une exérèse ganglionnaire, qui permettront de poser le diagnostic de manière certaine. Plusieurs auteurs, comme *Yuan et al*, 2009 (66), soulignent eux aussi l'utilité des biopsies ganglionnaires répétées pour confirmer le diagnostic. La mise en évidence du même clone T sur plusieurs prélèvements, par exemple, est très informative.

Un des patients de notre série présentait, en 2012, une tuméfaction laryngée avec des symptômes B et une polyadénopathie. Une biopsie à l'aiguille a été effectuée, le diagnostic anatomopathologique proposé était un LTAI, mais sans certitude, en raison de la petite taille du prélèvement, de l'absence de clone T retrouvé, et de la présentation clinique inhabituelle. Les adénopathies ont disparu spontanément. Par la suite, le patient a présenté des poussées évolutives, avec une élévation fluctuante des gammaglobulines, sans que la taille des ganglions ne soit significative. Aucun traitement n'a été administré. En 2015, le patient a présenté une altération de l'état général, avec une hyperthermie, une polyadénopathie, un syndrome d'activation macrophagique et une pancytopénie. La thrombopénie était trop sévère et ne répondait pas à la transfusion plaquettaire pour permettre la réalisation d'une exérèse ganglionnaire. La BOM était normale. Ce tableau inquiétant a fait suspecter un lymphome, et le patient a été traité par chimiothérapie de type

CHOP. Le scanner de réévaluation retrouvait des adénopathies stables, dont aucune n'était *a priori* biopsiable. Un retour à domicile était autorisé, sans deuxième cure de chimiothérapie. En 2016, le patient a présenté une dysphagie d'aggravation progressive attribuée à une lésion amygdalienne droite infiltrant le pharynx, associée à une altération de l'état général avec perte de poids et une apparition d'adénopathies médiastinales. La biopsie de la lésion amygdalienne a confirmé le diagnostic de LTAI, au stade IV, et le patient a bénéficié d'une chimiothérapie de type RCHOP. Quatre ans d'évolution fluctuante ont été nécessaires à l'établissement du diagnostic de LTAI.

## **VIII. Le rôle du microenvironnement dans la croissance tumorale**

Dans le LTAI, le microenvironnement a un rôle important dans la symptomatologie clinique et biologique. La proportion de cellules tumorales est faible dans l'infiltrat, et les signes généraux prévalent par rapport au syndrome tumoral. L'origine cellulaire des lymphocytes TFH explique les caractéristiques pathologiques et biologiques particulières du LTAI, en particulier l'expansion des cellules B, la réponse T insuffisante, la prolifération des CFD, l'hypergammaglobulinémie et les manifestations auto-immunes. La chimiokine CXCL13 est un médiateur clé, elle permet le recrutement des cellules du microenvironnement, nécessaire aux interactions cellulaires qui miment celles qui ont lieu dans les centres germinatifs normaux.

Certains auteurs suggèrent un élément déclencheur viral ou médicamenteux dans l'évolution du LTAI. Sur une série de 77 LTAI (*Lachenal et al, 2007 (97)*), 35

patients ont présenté des manifestations cutanées, dont 11 cas de rash cutané sont survenus après administration de médicaments (pénicilline dans 4 cas). D'autres cas de manifestations cutanées de LTAI après une prise médicamenteuse ou un contexte d'infection virale ont été décrits (*de Leval et al, 2010 (47)*). Certains auteurs émettent l'hypothèse d'un rôle déclencheur médicamenteux ou viral dans la dysrégulation immunitaire, conduisant par la suite au LTAI. Les cellules folliculaires dendritiques pourraient être impliquées dans ce processus, en tant que cellules présentatrices de l'antigène activatrices des lymphocytes TFH. D'autres études devront être menées pour explorer la physiopathologie de ce lymphome, dont certains aspects restent à ce jour inexpliqués.

## CONCLUSION

Nous avons montré que l'immunomarquage CXCL13 est sensible pour le diagnostic de LTAI, mais assez peu spécifique. Un immunomarquage CXCL13+ interfolliculaire diffus ne constitue pas, à lui seul, un critère diagnostique fiable de LTAI. Le résultat de l'immunomarquage CXCL13 s'inscrit dans un faisceau d'arguments cliniques, évolutifs, morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires. Notre étude sur 273 cas montre un immunomarquage CXCL13+ sur les cellules tumorales dans différents lymphomes T, tels que le lymphome T/NK, le LNH T associé aux entéropathies et les LNH T originaires des lymphocytes TFH, et dans des tumeurs non hématologiques comme le sarcome à cellules folliculaires dendritiques.

Un immunomarquage diffus est également observé dans le microenvironnement réactionnel de nombreux lymphomes, comme le lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire ou le lymphome de Hodgkin classique. Dans ces lymphomes dérivés du centre germinatif, il est probable que la présence de lymphocytes TFH dans le microenvironnement a un rôle dans la croissance des cellules B. Enfin, l'infiltrat réactionnel accompagnant des pathologies diverses, telles que la lymphadénite histiocytaire nécrosante, peut contenir de nombreux lymphocytes activés CXCL13+.

Lors de l'interprétation de l'immunomarquage CXCL13, il est essentiel d'identifier le caractère tumoral ou réactionnel des cellules marquées. La confrontation anatomoclinique est particulièrement précieuse dans ce contexte. Un tableau clinique discordant, l'absence de critères histologiques tels que l'hyperplasie

du réseau veineux post-capillaire ou l'hyperplasie du réseau de CFD, l'absence d'autres marqueurs immunohistochimiques TFH positifs, ou encore l'absence de clone T en biologie moléculaire, sont susceptibles de remettre en cause le diagnostic de LTAI.

L'établissement d'un diagnostic anatomopathologique précis est important, car la prise en charge clinique et thérapeutique peut être radicalement différente. Notre étude montre que la biopsie ganglionnaire à l'aiguille est un mode de prélèvement peu adapté au diagnostic de LTAI et à ses diagnostics différentiels. L'exérèse ganglionnaire est nécessaire pour l'établissement du diagnostic de certitude dans ce contexte.

Le microenvironnement tumoral joue un rôle dans le maintien et le développement du LTAI. La conservation des fonctions TFH par les cellules tumorales, et leurs interactions avec les blastes B et les CFD, expliquent les caractéristiques cliniques, biologiques et anatomopathologiques particulières du LTAI. Les lymphocytes TFH constituent donc une cible thérapeutique potentielle intéressante, à la fois pour les lymphomes dérivés des lymphocytes TFH tels que le LTAI, et pour les lymphomes B pour lesquels le microenvironnement est riche en lymphocytes TFH.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Grogg KL, Attygale AD, Macon WR, Remstein ED, Kurtin PJ, Dogan A. Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Mod Pathol*. 2006 ; 19(8):1101-7.
2. Grogg KL, Morice WG, Macon WR. Spectrum of bone marrow findings in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol*. 2007 ; 137(5):416-22.
3. Vose J, Armitage J, Weisenburger D. International Peripheral T-Cell and Natural Killer/T-Cell Lymphoma Study: Pathology Findings and Clinical Outcomes. *J Clin Oncol*. 2008 ; 26(25):4124-30.
4. Gaulard P, De Leval L. Follicular helper T cells: implications in neoplastic hematopathology. *Semin Diagn Pathol*. 2011 ; 28(3):202-13.
5. Rodríguez Pinilla SM, Roncador G, Rodríguez-Peralto JL, Mollejo M, García JF, Montes-Moreno S. Primary cutaneous CD4+ small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma expresses follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol*. 2009 ; 33(1):81-90.
6. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016 ; 127(20):2375-90.
7. Dobay MP, Lemonnier F, Missiaglia E, Bastard C, Vallois D, Jais J-P. Integrative clinicopathological and molecular analyses of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and other nodal lymphomas of follicular helper T-cell origin. *Haematologica*. 2017 ; haematol.2016.158428.
8. Bruneau J. Lymphomes T périphériques et expression des marqueurs T folliculaires (TFH): étude de 254 cas. Communications orales SFP, Hématopathologie. 2016 ; Carrefour pathologie, Paris.
9. Vermi W, Lonardi S, Bosisio D, Ugucconi M, Danelon G, Pileri S. Identification of CXCL13 as a new marker for follicular dendritic cell sarcoma. *J Pathol*. 2008 ; 216(3):356-64.
10. Nathwani BN, Vornanen M, Winkelmann R, Kansal R, Doering C, Hartmann S. Intranodular clusters of activated cells with T follicular helper phenotype in nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: a pilot study of 32 cases from Finland. *Hum Pathol*. 2013 ; 44(9):1737-46.
11. Sagaert X, Sprangers B, De Wolf-Peeters C. The dynamics of the B follicle: understanding the normal counterpart of B-cell-derived malignancies. *Leukemia*. 2007 ; 21(7):1378-86.
12. Craft JE. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 ; 8(6):337-47.

13. Van den Oord JJ, de Wolf-Peeters C, Desmet VJ. The composite nodule. A structural and functional unit of the reactive human lymph node. *Am J Pathol.* 1986 ; 122(1):83-91.
14. Brink R. Germinal-Center B Cells in the Zone. *Immunity.* 2007 ; 26(5):552-4.
15. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL, Luther SA, Ngo VN. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev.* 2000 ; 176(1):181-93.
16. Müller G, Höpken UE, Lipp M. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol Rev.* 2003 ; 195(1):117-35.
17. McHeyzer-Williams LJ, Driver DJ, McHeyzer-Williams MG. Germinal center reaction. *Curr Opin Hematol.* 2001 ; 8(1):52-9.
18. Hardie DL, Johnson GD, Khan M, MacLennan ICM. Quantitative analysis of molecules which distinguish functional compartments within germinal centers. *Eur J Immunol.* 1993 ; 23(5):997-1004.
19. Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. *J Clin Invest.* 2004 ; 114(11):1640-9.
20. Vinuesa CG, Tangye SG, Moser B, Mackay CR. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2005 ; 5(11):853-65.
21. MacLennan ICM, Liu Y-J, Johnson GD. Maturation and Dispersal of B-Cell Clones during T Cell-Dependent Antibody Responses. *Immunol Rev.* 1992 ; 126(1):143-61.
22. Velardi A, Mingari MC, Moretta L, Grossi CE. Functional analysis of cloned germinal center CD4+ cells with natural killer cell-related features. Divergence from typical T helper cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1986 ; 137(9):2808-13.
23. Chtanova T, Tangye SG, Newton R, Frank N, Hodge MR, Rolph MS, et al. T Follicular Helper Cells Express a Distinctive Transcriptional Profile, Reflecting Their Role as Non-Th1/Th2 Effector Cells That Provide Help for B Cells. *J Immunol.* 2004 ; 173(1):68-78.
24. Hale JS, Ahmed R. Memory T Follicular Helper CD4 T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2015 [cited 2017 Feb 27];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313784/>
25. Schaerli P, Willimann K, Lang AB, Lipp M, Loetscher P, Moser B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J Exp Med.* 2000 ; 192(11):1553-62.
26. Nurieva RI, Chung Y, Martinez GJ, Yang XO, Tanaka S, Matskevitch TD, et al. Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science.* 2009 ; 325(5943):1001-5.
27. Yu D, Vinuesa CG. The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol.* 2010 ; 31(10):377-83.

28. Liu X, Yan X, Zhong B, Nurieva RI, Wang A, Wang X. Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *J Exp Med*. 2012 ; 209(10):1841-52, S1-24.
29. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, Light A, D'Costa K, Kallies A. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med*. 2010 Feb 15;207(2):365–78.
30. Hutloff A, Büchner K, Reiter K, Baelde HJ, Odendahl M, Jacobi A. Involvement of inducible costimulator in the exaggerated memory B cell and plasma cell generation in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004 ; 50(10):3211-20.
31. Eivazi S, Bagheri S, Hashemzadeh MS, Ghalavand M, Qamsari ES, Dorostkar R. Development of T follicular helper cells and their role in disease and immune system. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2016 ; 84:1668-78.
32. King C, Tangye SG, Mackay CR. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2008 ; 26:741-66.
33. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell*. 1996 ; 87(6):1037-47.
34. Unique gene expression program of human germinal center T helper cells | *Blood Journal* [Internet]. [cited 2017 Mar 26]. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/104/7/1952.long?sso-checked=true>
35. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. 2000 ; 406(6793):309-14.
36. Pereira JP, Kelly LM, Cyster JG. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int Immunol*. 2010 ; 22(6):413-9.
37. Moroch J, Copie-Bergman C, de Leval L, Plonquet A, Martin-Garcia N, Delfau-Larue M-H. Follicular peripheral T-cell lymphoma expands the spectrum of classical Hodgkin lymphoma mimics. *Am J Surg Pathol*. 2012 ; 36(11):1636-46.
38. Mourad N, Mounier N, Brière J, Raffoux E, Delmer A, Feller A, et al. Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood*. 2008 ; 111(9):4463-70.
39. Yu H, Shahsafaei A, Dorfman DM. Germinal-center T-helper-cell markers PD-1 and CXCL13 are both expressed by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2009 ; 131(1):33-41.
40. de Leval L, Parrens M, Le Bras F, Jais J-P, Fataccioli V, Martin A. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma is the most common T-cell lymphoma in two distinct French information data sets. *Haematologica*. 2015 ; 100(9):e361-4.
41. Frizzera G, Moran EM, Rappaport H. Angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia. *The Lancet*. 1974 ; 303(7866):1070-3.

42. Lukes RJ, Tindle BH. Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1975 ; 292(1):1-8.
43. Lennert K. Nature, prognosis and nomenclature of angioimmunoblastic lymphadenopathy (lymphogranulomatosis X or T-zone lymphoma). *Dtsch Med Wochenschr* 1946. 1979 ; 104(35):1246-7.
44. Weiss LM, Strickler JG, Dorfman RF, Horning SJ, Warnke RA, Sklar J. Clonal T-cell populations in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Am J Pathol.* 1986 ; 122(3):392-7.
45. Lunning MA, Vose JM. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: the many-faced lymphoma. *Blood.* 2017 ; 129(9):1095-102.
46. Attygalle A, Al-Jehani R, Diss TC, Munson P, Liu H, Du M-Q, et al. Neoplastic T cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma express CD10. *Blood.* 2002 ; 99(2):627-33.
47. de Leval L, Gisselbrecht C, Gaulard P. Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2010 ; 148(5):673-89.
48. Dupuis J, Boye K, Martin N, Copie-Bergman C, Plonquet A, Fabiani B. Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am J Surg Pathol.* 2006 ; 30(4):490-4.
49. Botros N, Cerroni L, Shawwa A, Green PJ, Greer W, Pasternak S, et al. Cutaneous manifestations of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: clinical and pathological characteristics. *Am J Dermatopathol.* 2015 ; 37(4):274-83.
50. Humeniuk MS, Liang JJ, Howard M, Inwards DJ. Spontaneous complete remission of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Proc Bayl Univ Med Cent.* 2014 ; 27(3):242-5.
51. Wang F, Zhang G-H, Ding K-Y, Liu L, Weng H-Y. Expression and Clinical Pathological Significance of EBER, PTEN and VEGF in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2015 ; 23(3):663-8.
52. Gaulard P. Que reste-t-il du lymphome T périphérique sans spécificité en 2016? Symposium Lymphomes T périphériques (non cutanés) : problèmes pratiques et diagnostics différentiels. 2016 ; Carrefour pathologie, Paris.
53. Bräuninger A, Spieker T, Willenbrock K, Gaulard P, Wacker HH, Rajewsky K, et al. Survival and clonal expansion of mutating "forbidden" (immunoglobulin receptor-deficient) epstein-barr virus-infected b cells in angioimmunoblastic t cell lymphoma. *J Exp Med.* 2001 ; 194(7):927-40.
54. Gaulard P, de Leval L. Pathology of peripheral T-cell lymphomas: where do we stand? *Semin Hematol.* 2014 ; 51(1):5-16.
55. Tan BT, Warnke RA, Arber DA. The Frequency of B- and T-Cell Gene Rearrangements and Epstein-Barr Virus in T-Cell Lymphomas. *J Mol Diagn JMD.* 2006 ; 8(4):466-75.

56. Dogan A, Attygalle AD, Kyriakou C. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2003 Jun;121(5):681–91.
57. Wilhelm M, Smetak M, Reimer P, Geissinger E, Ruediger T, Metzner B, et al. First-line therapy of peripheral T-cell lymphoma: extension and long-term follow-up of a study investigating the role of autologous stem cell transplantation. *Blood Cancer J.* 2016 ; 6(7):e452.
58. Willemsen M, Schouten HC. Inappropriate costimulation and aberrant DNA methylation as therapeutic targets in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Biomark Res* [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 19];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5299773/>
59. Gaulard P, de Leval L. The microenvironment in T-cell lymphomas: emerging themes. *Semin Cancer Biol.* 2014 ; 24:49-60.
60. Dalia S, Jaglal M, Chervenick P, Cualing H, Sokol L. Clinicopathologic Characteristics and Outcomes of Histiocytic and Dendritic Cell Neoplasms: The Moffitt Cancer Center Experience Over the Last Twenty Five Years. *Cancers.* 2014 ; 6(4):2275-95.
61. Ortonne N, Dupuis J, Plonquet A, Martin N, Copie-Bergman C, Bagot M, et al. Characterization of CXCL13+ neoplastic t cells in cutaneous lesions of angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). *Am J Surg Pathol.* 2007 ; 31(7):1068-76.
62. Cho Y-U, Chi H-S, Park C-J, Jang S, Seo E-J, Huh J. Distinct features of angioimmunoblastic T-cell lymphoma with bone marrow involvement. *Am J Clin Pathol.* 2009 ; 131(5):640-6.
63. Khokhar FA, Payne WD, Talwalkar SS, Jorgensen JL, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ, et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma in bone marrow: a morphologic and immunophenotypic study. *Hum Pathol.* 2010 ; 41(1):79-87.
64. Lefèvre G, Copin M-C, Roumier C, Aubert H, Avenel-Audran M, Grardel N, et al. CD3-CD4+ lymphoid variant of hypereosinophilic syndrome: nodal and extranodal histopathological and immunophenotypic features of a peripheral indolent clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Haematologica.* 2015 ; 100(8):1086-95.
65. Gu C, Li N, Li M, Xue X, Gao Z. Clinicopathological analysis of 64 case of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi Zhonghua Xueyexue Zazhi.* 2014 ; 35(1):24-8.
66. Yuan X, Chen F, Bi D, Zhao X, He Q, Li Q. [Clinicopathologic features and diagnosis of 18 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2009 ; 34(6):523-6.
67. Zheng Y, Chen G, Zhou X, Zhang S, Zhang Y. [Morphologic and immunophenotypic analysis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2009 ;38(3): 173-7.
68. Zhan H, Zhu X, Li X, Zhou X. [Follicular variant of peripheral T-cell lymphoma: a clinicopathologic and genetic study of 2 cases]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2011 ; 40(1):32-6.

69. Miyoshi H, Sato K, Niino D, Arakawa F, Kimura Y, Kiyasu J, et al. Clinicopathologic analysis of peripheral T-cell lymphoma, follicular variant, and comparison with angioimmunoblastic T-cell lymphoma: Bcl-6 expression might affect progression between these disorders. *Am J Clin Pathol.* 2012 ; 137(6):879-89.
70. Parrens M. Le spectre des lymphoproliférations cytotoxiques T et NK extra-ganglionnaires de l'adulte. Symposium Lymphomes T périphériques (non cutanés): problèmes pratiques et diagnostics différentiels. 2016 ; Carrefour pathologie, Paris.
71. Pongpruttipan T, Sukpanichnant S, Assanasen T, Wannakrairot P, Boonsakan P, Kanoksil W, et al. Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type, includes cases of natural killer cell and  $\alpha\beta$ ,  $\gamma\delta$ , and  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T-cell origin: a comprehensive clinicopathologic and phenotypic study. *Am J Surg Pathol.* 2012 ; 36(4):481-99.
72. Nam-Cha SH, Roncador G, Sanchez-Verde L, Montes-Moreno S, Acevedo A, Domínguez-Franjo P, et al. PD-1, a follicular T-cell marker useful for recognizing nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2008 ; 32(8):1252-7.
73. Huber AK, Irani DN. Targeting CXCL13 During Neuroinflammation. *Adv Neuroimmune Biol.* 2015 ; 6(1):1-8.
74. Tun HW, Personett D, Baskerville KA, Menke DM, Jaeckle KA, Kreinest P, et al. Pathway analysis of primary central nervous system lymphoma. *Blood.* 2008 ; 111(6):3200-10.
75. Saygin C, Uzunaslán D, Ozguroglu M, Senocak M, Tuzuner N. Dendritic cell sarcoma: A pooled analysis including 462 cases with presentation of our case series. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013 ; 88(2):253-71.
76. Benharroch D, Zekzer M, Nalbandyan K. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma: A Questionable Association with Follicular Dendritic Cell Sarcoma. *Case Rep Hematol* [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5286497/>
77. Fan Z, Natkunam Y, Bair E, Tibshirani R, Warnke RA. Characterization of variant patterns of nodular lymphocyte predominant hodgkin lymphoma with immunohistologic and clinical correlation. *Am J Surg Pathol.* 2003 ; 27(10):1346-56.
78. Nam-Cha SH, Montes-Moreno S, Salcedo MT, Sanjuan J, Garcia JF, Piris MA. Lymphocyte-rich classical Hodgkin's lymphoma: distinctive tumor and microenvironment markers. *Mod Pathol.* 2009 ; 22(8):1006-15.
79. Piris MA, Onaindía A, Mollejo M. Splenic marginal zone lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2017 ; 30(1-2):56-64.
80. Lopes-Carvalho T, Foote J, Kearney JF. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr Opin Immunol.* 2005 ; 17(3):244-50.
81. Pileri S, Ponzoni M. Pathology of nodal marginal zone lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2017 ; 30(1-2):50-5.

82. Cheminant M, Bruneau J, Kosmider O, Lefrere F, Delarue R, Gaulard P. Efficacy of 5-Azacytidine in a TET2 mutated angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2015 ; 168(6):913-6.
83. Bossard C. Les lymphomes T CD30+ en 2016 : quelles entités ? Symposium Lymphomes T périphériques (non cutanés) : problèmes pratiques et diagnostics différentiels. 2016 ; Carrefour pathologie, Paris.
84. Battistella M, Beylot-Barry M, Bachelez H, Rivet J, Vergier B, Bagot M. Primary cutaneous follicular helper T-cell lymphoma: a new subtype of cutaneous T-cell lymphoma reported in a series of 5 cases. *Arch Dermatol.* 2012 ; 148(7):832-9.
85. Ponciano A, de Muret A, Machet L, Gyan E, Monegier du Sorbier C, Molinier-Frenkel V. Epidermotropic secondary cutaneous involvement by relapsed angioimmunoblastic T-cell lymphoma mimicking mycosis fungoides: a case report. *J Cutan Pathol.* 2012 ;39(12 ):1119-24.
86. Ohmatsu H, Sugaya M, Fujita H, Kadono T, Sato S. Primary cutaneous follicular helper T-cell lymphoma treated with allogeneic bone marrow transplantation: immunohistochemical comparison with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol.* 2014 ; 94(1):54-7.
87. Deaver D, Naghashpour M, Sokol L. Kikuchi-Fujimoto Disease in the United States: Three Case Reports and Review of the Literature. *Mediterr J Hematol Infect Dis [Internet].* 2014 [cited 2017 Feb 4];6(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3894840/>
88. Kishimoto K, Tate G, Kitamura T, Kojima M, Mitsuya T. Cytologic features and frequency of plasmacytoid dendritic cells in the lymph nodes of patients with histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi-Fujimoto disease). *Diagn Cytopathol.* 2010 ; 38(7):521-6.
89. Pilichowska ME, Pinkus JL, Pinkus GS. Histiocytic Necrotizing Lymphadenitis (Kikuchi-Fujimoto Disease) Lesional Cells Exhibit an Immature Dendritic Cell Phenotype. *Am J Clin Pathol.* 2009 ; 131(2):174-82.
90. Feller AC, Lennert K, Stein H, Bruhn HD, Wuthe HH. Immunohistology and aetiology of histiocytic necrotizing lymphadenitis. Report of three instructive cases. *Histopathology.* 1983 ; 7(6):825-39.
91. Deaver D, Horna P, Cualing H, Sokol L. Pathogenesis, diagnosis, and management of Kikuchi-Fujimoto disease. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent.* 2014 ; 21(4):313-21.
92. Ichikawa A, Arakawa F, Kiyasu J, Sato K, Miyoshi H, Niino D. Methotrexate/iatrogenic lymphoproliferative disorders in rheumatoid arthritis: histology, Epstein-Barr virus, and clonality are important predictors of disease progression and regression. *Eur J Haematol.* 2013 ; 91(1):20-8.
93. Lefèvre G, Copin M-C, Staumont-Sallé D, Avenel-Audran M, Aubert H, Taieb A, et al. The lymphoid variant of hypereosinophilic syndrome: study of 21 patients with CD3-CD4+ aberrant T-cell phenotype. *Medicine (Baltimore).* 2014 ; 93(17):255-66.

94. Caractérisation immunophénotypique, histopathologique et moléculaire des Syndromes HyperEosinophiliques lymphoïdes avec lymphocytes T CD3-CD4+ circulants [Internet]. [cited 2017 Apr 3]. Available from: <http://pepite.univ-lille2.fr/notice/view/2015LIL2S001>
95. Ohtani H, Komeno T, Agatsuma Y, Kobayashi M, Noguchi M, Nakamura N. Follicular Dendritic Cell Meshwork in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma Is Characterized by Accumulation of CXCL13(+) Cells. *J Clin Exp Hematop JCEH*. 2015 ; 55(2):61-9.
96. Agostinelli C, Hartmann S, Klapper W, Korkolopoulou P, Righi S, Marafioti T, et al. Peripheral T cell lymphomas with follicular T helper phenotype: a new basket or a distinct entity? Revising Karl Lennert's personal archive. *Histopathology*. 2011 ; 59(4):679-91.
97. Lachenal F, Berger F, Ghesquières H, Biron P, Hot A, Callet-Bauchu E. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: clinical and laboratory features at diagnosis in 77 patients. *Medicine (Baltimore)*. 2007 ; 86(5):282-92.

**AUTEUR : Nom : GIMENEZ DE MESTRAL**

**Prénom : Santiago**

**Date de Soutenance : 5 mai 2017**

**Titre de la Thèse : Evaluation de la sensibilité et de la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 dans le diagnostic de lymphome non hodgkinien de phénotype T de type angioimmunoblastique.**

**Thèse - Médecine - Lille 2017**

**Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologiques**

**Mots-clés : lymphome T angioimmunoblastique, CXCL13, lymphocytes TFH, microenvironnement**

**Résumé :**

Le lymphome non hodgkinien de phénotype T de type angioimmunoblastique (LTAI) est le lymphome T périphérique non cutané le plus fréquent en France. Ses caractéristiques cliniques, morphologiques et immunohistochimiques permettent de le différencier des autres sous-types de lymphomes, mais le diagnostic reste parfois difficile. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de cette entité, et notamment de sa cellule d'origine, le lymphocyte T helper folliculaire (TFH), a permis au cours des dernières années de définir des critères diagnostiques de plus en plus précis.

La molécule CXCL13 est une chimioquine exprimée par les lymphocytes TFH et par les cellules folliculaires dendritiques (CFD) au sein des centres germinatifs des follicules secondaires. Initialement, un immunomarquage positif par l'anticorps anti-CXCL13 au sein d'une population lymphomateuse sur coupe tissulaire était décrit comme spécifique du LTAI, permettant de poser ce diagnostic par rapport aux autres lymphomes T périphériques. Par la suite, des études ont mis en évidence une expression de CXCL13 dans d'autres lymphomes, mais aussi dans des tumeurs non hématologiques. Enfin, l'expression de CXCL13 par des cellules réactionnelles non tumorales au sein du microenvironnement de pathologies variées a été rapportée.

Dans cette étude, nous rappelons le rôle biologique du lymphocyte TFH et de la chimioquine CXCL13 au sein du centre germinatif. Nous évaluons la sensibilité et la spécificité de l'immunomarquage CXCL13 pour le diagnostic de LTAI, à partir de 273 cas diagnostiqués dans l'institut de Pathologie du CHRU de Lille de janvier 2014 à mai 2016. Nous détaillons dans quelles pathologies un immunomarquage CXCL13 peut être observé ; pour certaines d'entre elles, un tel immunomarquage n'a pas été décrit auparavant dans la littérature. Nous précisons enfin les conditions correctes d'évaluation et d'interprétation de ce marqueur.

**Composition du Jury :**

**Président : Monsieur le Professeur Xavier LEROY**

**Assesseurs : Monsieur le Professeur Franck MORSCHHAUSER,**

**Monsieur le Docteur Guillaume LEFEVRE,**

**Monsieur le Docteur Romain DUBOIS**

**Directeur : Madame le Professeur Marie-Christine COPIN**