



UNIVERSITE DE LILLE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**  
Année : 2020

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Caractérisation anatomopathologique des lymphomes folliculaires basée sur la  
nouvelle classification OMS 2016 : à propos de 287 cas diagnostiqués  
dans un centre expert LYMPHOPATH**

Présentée et soutenue publiquement le 7 mai 2020 à 16h  
au Pôle Recherche  
**Par Mélanie Bénozène**

---

**JURY**

**Président :**

**Madame le Professeur Marie-Christine COPIN**

**Assesseurs :**

**Madame le Professeur Catherine ROCHE-LESTIENNE**

**Monsieur le Professeur Franck MORSCHHAUSER**

**Directeur de Thèse :**

**Monsieur le Docteur Romain DUBOIS**

---

## **Avertissement**

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



## LISTE DES ABREVIATIONS

18-FDG	18-Fluorodesoxyglucose
ADN	acide désoxyribonucléique
AID	Activation Induced Desaminase
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCL6	B-cell lymphoma 6
BOM	Biopsie ostéo-médullaire
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CD79a	Cluster of Differentiation 79a
CHOP	Cyclophosphamide doxorubicine vincristine et prednisone
CHRU	Centre Hospitalier Régional de Lille
CREBBP	CREB-binding protein
DLBCL	Diffuse Large B Cell Lymphoma
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
FISH	Fluorescente <i>in situ</i> Hybridation
FISH	Hybridation In Situ en Fluorescence
FLIPI	Follicular Lymphoma International Prognostic Index
GELF	Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires
HES	Hémalun-Eosine-Safran
HPF	High Ppower Field
IMiD	Immunomodulatory Drugs
IRF4	Interferon legulatory lactor 4
LDH	Lactate Deshydrogénase

LNH	Lymphome non-hodgkinien
MALT	Mucosa-Associated Lymphoid Tissue
MLL2	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2
MUM 1	MUltiple Myeloma oncogenese 1
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORR	Objective Response Rate
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PRC2	Polycomb Repressive Complex 2
TDM	Tomodensitométrie
TEP	Tomographie par Emission de Positons
TFH	Follicular Helper T cells
TNFRSF14	Tumor Necrosis Factor Receptor Super Family Member 14

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>2</b>
<b>I. Définition</b> .....	<b>2</b>
A. Lymphome Folliculaire conventionnel et ses variants .....	2
B. Le lymphome folliculaire de type pédiatrique.....	3
C. Le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4.....	3
<b>II. Historique</b> .....	<b>4</b>
<b>III. Épidémiologie</b> .....	<b>4</b>
<b>IV. Facteurs de risque</b> .....	<b>6</b>
<b>V. Clinique</b> .....	<b>6</b>
<b>VI. Classifications</b> .....	<b>8</b>
<b>VII. Pronostic</b> .....	<b>10</b>
<b>VIII. Traitements de première ligne</b> .....	<b>12</b>
<b>IX. Les patients en rechute ou réfractaires</b> .....	<b>13</b>
<b>X. Nouvelles thérapeutiques</b> .....	<b>14</b>
A. Inhibiteurs de la PI3K.....	14
B. Nouvelle immunothérapie .....	14
C. Immunomodulation .....	15
D. Inhibiteurs d'EZH2 .....	15
<b>XI. De la différenciation du lymphocyte B à la lymphomagenèse du lymphome folliculaire</b> .....	<b>17</b>
A. Différenciation du lymphocyte B .....	17
B. Lymphomagenèse du lymphome folliculaire.....	18
<b>XII. Aspects histologique et immunohistochimique du ganglion lymphatique normal</b> .....	<b>20</b>
A. Histologie .....	20
B. Immunohistochimie.....	21
<b>XIII. Caractéristiques pathologiques et cytogénétiques du lymphome folliculaire</b> .	<b>23</b>
A. Macroscopie .....	23
B. Microscopie du lymphome folliculaire conventionnel.....	23
1. Morphologie .....	23
2. Cytologie .....	25
3. Microenvironnement.....	25
4. Grade cytologique .....	26
C. Immunohistochimie.....	27
D. Anomalies génétiques .....	29
1. Translocation primaire t(14;18)(q32;q21).....	29
2. Modes de détection.....	30

a)	Technique d'hybridation in situ fluorescente (FISH) sur coupe de tissu.....	30
b)	Cytogénétique .....	31
E.	Variants.....	34
1.	Néoplasie folliculaire <i>in situ</i> (NFIS) .....	34
a)	Définition.....	34
b)	Épidémiologie .....	34
c)	Morphologie .....	34
d)	Immunohistochimie.....	35
e)	Cytogénétique .....	36
f)	Pronostic.....	36
g)	Diagnostics différentiels.....	37
2.	Variant diffus du lymphome folliculaire.....	38
a)	Définition.....	38
b)	Épidémiologie .....	38
c)	Morphologie .....	38
d)	Immunohistochimie.....	38
e)	Cytogénétique et biologie moléculaire.....	39
f)	Pronostic.....	39
g)	Diagnostics différentiels.....	40
3.	Lymphome folliculaire de type duodéal (LFTD) .....	40
a)	Définition.....	40
b)	Épidémiologie .....	40
c)	Morphologie .....	40
d)	Immunohistochimie.....	41
e)	Génétique et cytogénétique.....	42
f)	Pronostic.....	42
g)	Diagnostics différentiels.....	43
4.	Lymphome folliculaire de type testiculaire .....	44
a)	Définition.....	44
b)	Épidémiologie .....	44
c)	Morphologie .....	44
d)	Immunohistochimie.....	44
e)	Cytogénétique .....	45
f)	Pronostic.....	45
g)	Diagnostic différentiel .....	45
F.	Autres sous-types .....	45
1.	Sous-types morphologiques.....	45
a)	LF avec différenciation marginale.....	45
b)	LF avec différenciation plasmocytaire .....	46
c)	Lymphome folliculaire avec des caractéristiques Castleman-like .....	47
2.	Sous types immunophénotypiques .....	48
a)	Lymphome folliculaire CD5+.....	48
b)	Lymphome folliculaire CD10-/MUM1+.....	49
3.	Lymphome folliculaire composite .....	50
4.	Lymphome folliculaire « double hit » et « triple hit » .....	50
G.	Lymphome folliculaire de type pédiatrique .....	52
1.	Épidémiologie.....	52
2.	Morphologie .....	53

3. Immunohistochimie .....	53
4. Cytogénétique et biologie moléculaire .....	54
5. Pronostic .....	55
6. Diagnostics différentiels .....	55
H. Le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4 .....	57
1. Épidémiologie .....	57
2. Morphologie .....	57
3. Immunohistochimie .....	58
4. Cytogénétique .....	58
5. Pronostic .....	59
6. Diagnostics différentiels .....	59
<b>XIV. L'épigénétique dans le lymphome folliculaire : la cible EZH2 .....</b>	<b>60</b>
A. Généralités d'épigénétique .....	60
B. Le complexe PRC2 .....	62
C. Rôle d'EZH2 dans la lymphopoïèse des cellules B .....	64
D. Surexpression d'EZH2 .....	65
E. Mutations somatiques activatrices de l'EZH2 .....	65
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>67</b>
<b>I. Objectif principal .....</b>	<b>67</b>
<b>II. Objectifs secondaires .....</b>	<b>68</b>
A. Impact de la relecture des lymphomes folliculaires dans le cadre du réseau national LYMPHOPATH .....	68
B. Prédiction de la réponse au traitement anti EZH2 .....	68
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>70</b>
<b>I. Objectif principal .....</b>	<b>70</b>
A. Sélection des cas .....	70
B. Données recueillies .....	71
C. Relecture histologique .....	72
D. Analyses complémentaires dans la série de LF de grade 3A et 3B et des LF transformés .....	74
1. Étude immunohistochimique .....	74
2. Étude par FISH interphasique .....	76
a) Sélection des cas .....	76
b) Choix et mise au point de la sonde IRF4 .....	76
c) Technique FISH .....	76
d) Interprétation .....	79
<b>II. Objectifs secondaires .....</b>	<b>80</b>
A. Analyse de l'impact de la relecture par les experts du réseau LYMPHOPATH .....	80
B. Prédiction de la réponse au traitement anti-EZH2 .....	82
1. Sélection des cas .....	82
2. Étude immunohistochimique .....	82
a) Mise au point de la technique .....	82
b) Interprétation .....	86



<b>RESULTATS</b> .....	<b>88</b>
<b>I. Objectif principal</b> .....	<b>88</b>
A. Nombre de cas analysés .....	88
B. Données épidémiologiques .....	89
C. Types et localisations des prélèvements .....	90
1. Type de prélèvement .....	90
2. Localisation du prélèvement .....	91
D. Caractéristiques histopathologiques.....	92
1. Architecture .....	92
2. Grade cytologique .....	92
E. Caractéristiques immunohistochimiques .....	93
1. Anticorps anti-CD20 ou CD79a.....	94
2. Anticorps anti-CD5 .....	95
3. Marqueurs centro-germinatifs .....	95
4. Anticorps anti-BCL2 (clone 100/D5 et clone E17).....	95
5. Anticorps anti-MUM1.....	96
6. Anticorps anti-CD21 et anti-CD23 .....	96
7. Anticorps anti-MIB1 .....	96
F. Caractéristiques moléculaires.....	97
1. Analyse FISH BCL2 .....	97
2. Clonalité B en biologie moléculaire .....	98
G. Relecture histologique .....	98
1. Variants de LF ou LF présentant une morphologie ou un phénotype non conventionnel .....	98
a) Description histologique .....	98
b) Examens complémentaires .....	109
2. LF de grade 3A/3B et transformés .....	112
a) Analyse histologique.....	112
b) Examens complémentaires .....	114
c) Analyse du gène IRF4 par FISH interphasique .....	114
<b>II. Objectifs secondaires</b> .....	<b>116</b>
A. Impact de la relecture du réseau LYMPHOPATH dans la prise en charge des patients .....	116
B. Prédiction de la réponse au traitement anti-EZH2.....	120
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>124</b>
<b>I. Objectif principal</b> .....	<b>124</b>
A. Données épidémiologiques .....	124
B. Type et localisation des prélèvements.....	125
1. Type de prélèvement .....	125
2. Localisation des prélèvements.....	126
C. Données histopathologiques .....	127
D. Données immunohistochimiques.....	128
1. Expression de BCL2 .....	128
2. Expression des marqueurs centro-germinatifs (CD10/BCL6).....	130
3. Expression de CD23 et CD21 .....	130
4. Expression de MIB1 .....	131

5. Expression de MUM1 .....	133
E. Données de cytogénétique .....	135
F. Ce qu'il faut retenir des variants du lymphome folliculaire.....	135
1. Néoplasie folliculaire <i>in situ</i> .....	135
2. Lymphome folliculaire de type duodéal.....	136
3. Variant diffus du Lymphome folliculaire .....	137
G. Ce qu'il faut retenir des sous-types de lymphome folliculaire.....	139
1. Sous-types morphologiques.....	139
2. Sous types immunophénotypiques .....	141
3. Le lymphome composite .....	142
H. Ce qu'il faut retenir des deux nouvelles entités de la classification OMS 2016.....	143
1. Le lymphome folliculaire de type pédiatrique .....	143
2. Le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement <i>IRF4</i> .....	146
I. Arbre décisionnel diagnostique du lymphome folliculaire .....	149
<b>II. Objectifs secondaires .....</b>	<b>151</b>
A. Impact de la relecture du réseau LYMPHOPATH dans la prise en charge du patient .....	151
1. Un faible taux de concordance.....	151
2. Une majorité de modifications majeures .....	153
a) De grandes difficultés à établir le grade cytologique .....	153
b) Autres modifications majeures .....	154
3. Des modifications mineures en faible nombre .....	154
4. Un réseau LYMPHOPATH indispensable.....	155
B. Prédiction de la réponse au traitement anti-EZH2.....	156
<b>Références Bibliographiques .....</b>	<b>159</b>

## RESUME

**Contexte :** Le lymphome folliculaire (LF) est le lymphome B à petites cellules indolent le plus fréquent. Il se caractérise par une grande variété de présentations morphologiques et phénotypiques, justifiant fréquemment une expertise LYMPHOPATH. La classification OMS 2016 a identifié 2 nouvelles entités se rapprochant des caractéristiques anatomopathologiques des LF de grade 3 (le LF de type pédiatrique et le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4), qui complexifient l'étude des diagnostics différentiels dans cette catégorie. L'établissement d'une stratégie diagnostique permettant de repérer ces nouvelles entités est donc primordial.

**Méthode :** Nous avons recueilli les données épidémiologiques et anatomopathologiques des LF diagnostiqués au sein de l'Institut de pathologie du CHRU de Lille (centre expert LYMPHOPATH), entre le 1<sup>er</sup> janvier 2017 et le 31 décembre 2018, en les comparant aux données du réseau LYMPHOPATH. Nous avons, par la suite, effectué une relecture de l'ensemble des LF « non conventionnels » et/ou de grade 3. Les cas présentant des caractéristiques communes avec les diagnostics différentiels du LF ont fait l'objet de techniques complémentaires : IHC MUM1 et FISH IRF4.

**Résultats :** Notre analyse comportait 287 LF dont 105 LF ont été relus (41 LF non conventionnels et 64 LF de grade 3A ou 3B). Parmi les LF non conventionnels, nous avons décrit les principaux variants morphologiques et phénotypiques recensés dans la classification OMS 2016 et reclassé un LF en lymphome à cellules du manteau de variant blastique. Parmi les LF de grade 3, nous avons recensé 1 LF de type pédiatrique et un lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4.

Notre cohorte comportait 60% de cas adressés pour une relecture d'expert dans le cadre du réseau LYMPHOPATH. Le taux de discordance entre le diagnostic initial et le diagnostic final de l'expert était de 66,9%, dont 88,7% étaient des modifications majeures, ayant un impact potentiel dans la prise en charge du patient.

**Conclusion :** Notre étude confirme la très grande hétérogénéité du LF et l'intérêt d'une relecture lorsque le diagnostic n'est pas aisé. Nous mettons en avant l'intérêt d'une étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-MUM1 à tous les LF d'aspect bastoïde-like afin de sélectionner les cas devant bénéficier d'une analyse FISH à la recherche d'un réarrangement du gène *IRF4*.

# INTRODUCTION

## I. Définition

Le lymphome folliculaire (LF) est le lymphome B à petites cellules indolent le plus fréquent et représente environ 20% de l'ensemble des lymphomes non-hodgkiniens (1).

Il est défini comme un néoplasme d'architecture au moins partiellement folliculaire et dont la population tumorale correspond à des cellules B provenant des centres germinatifs. Une définition aussi large permet d'englober de nombreux tableaux cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et génétiques différents et en fait une pathologie complexe et très hétérogène.

Durant ces dernières années, les avancées cliniques et biologiques ont permis de mieux caractériser la forme conventionnelle, de décrire plusieurs variants et sous-types morphologiques ou immunohistochimiques. La nouvelle classification OMS 2016 distingue également le lymphome folliculaire de type pédiatrique, entité à part entière, et le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4, entité provisoire avec des caractéristiques très proches du LF.

### A. Lymphome Folliculaire conventionnel et ses variants

Le lymphome folliculaire est caractérisé par une prolifération tumorale dont l'architecture est, pour la grande majorité, folliculaire. La prolifération lymphomateuse est composée d'un ensemble de centrocytes et de centroblastes.

En se basant sur sa localisation anatomique et sur ses critères morphologiques, immunohistochimiques et génétiques, 4 variants sont distingués dans la nouvelle classification OMS 2016 :

- La néoplasie folliculaire *in situ* (NFIS)

- Le variant diffus du lymphome folliculaire (VDLF)
- Le lymphome folliculaire de type duodéal (LFTD)
- Le lymphome folliculaire de type testiculaire (LFTT)

D'autres caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et cytogénétiques ont également permis de décrire plusieurs autres sous-types comme le LF avec différenciation plasmocytaire, le LF avec différenciation marginale, le LF composite, le LF CD10-/MUM1+, le LF CD5+ ou encore le LF « double-hit ».

### **B. Le lymphome folliculaire de type pédiatrique**

Le lymphome folliculaire de type pédiatrique (LFTP) est une nouvelle entité à part entière décrite dans la classification de l'OMS 2016. Il est défini par une prolifération de centroblastes ou de cellules tumorales de taille intermédiaire blastoïdes-like, s'organisant en larges follicules expansifs, parfois confluent. Ces caractéristiques morphologiques font de cette nouvelle entité un diagnostic différentiel du lymphome folliculaire de haut grade. Sa fréquence n'est aujourd'hui pas connue du fait d'un faible recul sur cette pathologie.

### **C. Le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4**

Le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4 est une nouvelle entité provisoire de la classification OMS 2016. Il est défini par une prolifération de cellules tumorales de grande taille, blastoïdes-like, dont l'architecture, bien que le plus souvent diffuse, peut être partiellement ou purement folliculaire. Ces caractéristiques morphologiques en font également un diagnostic différentiel du lymphome folliculaire de haut grade.

## **II. Historique**

L'histoire de la pathologie lymphomateuse débute au XIX<sup>ème</sup> siècle avec Thomas Hodgkin qui décrit le tableau clinique d'une cohorte de 7 patients présentant un « désordre des glandes absorbantes » autrement dit, des ganglions lymphatiques (2).

Mais ce n'est qu'en 1925, que l'équipe de Nathan E. Brill caractérisa, chez des patients présentant une splénomégalie et/ou de volumineuses adénopathies, une nouvelle pathologie ganglionnaire, définie par une prolifération de follicules lymphoïdes renfermant des petites cellules (3). En 1927, Douglas Symmers arriva aux mêmes observations et montra quelques années plus tard, que cette pathologie pouvait se transformer en une prolifération tumorale à grandes cellules, plus agressive (4).

En 1941, Edward Gall et Tracy Mallory reconnurent alors, dans la première classification moderne des lymphomes, le lymphome folliculaire comme une entité clinique et histologique distincte (5).

C'est dans les années 70 que la physiopathologie du lymphome folliculaire, dénommé à cette époque « lymphome nodulaire » par Henry Rappaport (6), fut mieux comprise. Elle fut définie comme la première pathologie du système immunitaire ayant comme origine les cellules B des follicules lymphoïdes (7).

La révolution génétique et immunologique permit, au début des années 80, la découverte de la translocation t(14;18)(q32;q21), l'altération génétique initiatrice de la cascade moléculaire conduisant au lymphome folliculaire (8).

## **III. Épidémiologie**

Le lymphome folliculaire est une pathologie fréquente qui représente plus de 20% de l'ensemble des lymphomes B. En 2018, en France, il a été diagnostiqué 3066 nouveaux

cas, avec une discrète prédominance chez l'homme (54% des nouveaux cas étaient des patients de sexe masculin soit un sexe-ratio homme/femme (H/F) de 1,2 (9)).

Le nombre de nouveaux cas a augmenté au cours des dernières décennies. En effet, en 1995, 1224 nouveaux cas avaient été recensés.

Le lymphome folliculaire survient à un âge médian de 65 ans chez la femme et 68 ans chez l'homme (9).

L'incidence du lymphome folliculaire en 2018 est évaluée à 5,3 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et à 4,2 pour 100 000 personnes-années chez la femme. Cette incidence augmente avec l'âge pour atteindre une valeur maximale de 17,1 pour 100 000 chez l'homme entre 70 et 74 ans et de 14,6 pour 100 000 chez la femme entre 75 et 79 ans (9).

Sa répartition varie en fonction des régions du globe, avec une nette prédominance dans les pays occidentaux (10).

Le lymphome folliculaire est un cancer indolent et incurable. En France, le taux de survie relatif à 5 ans est de 87% tout stade clinique et grade histologique confondus.

Environ 25% à 35% des patients atteints de cette maladie progressent vers un lymphome B diffus à grandes cellules (11).

Le lymphome folliculaire de type pédiatrique a une présentation épidémiologique très différente : même s'il est possible à tout âge, la plupart des patients sont diagnostiqués entre 5 et 25 ans, avec un âge médian du diagnostic compris entre 14 et 17 ans. Il existe une nette prédominance chez l'homme avec un sexe-ratio H/F égal à 10 (12). Son pronostic est excellent.

## **IV. Facteurs de risque**

L'exposition aux pesticides ou herbicides répétée augmente le nombre de cellules sanguines porteuses de la translocation t(14;18)(q32;q21), évènement génétique initiateur et caractéristique du lymphome folliculaire.

En effet, chez les agriculteurs où l'utilisation des pesticides ou herbicides est importante, on note une augmentation de la prévalence des lymphomes non-hodgkiniens, et plus particulièrement des lymphomes folliculaires (13) (14).

L'utilisation des teintures capillaires favoriserait également la survenue des lymphomes folliculaires. (15) (16)

## **V. Clinique**

La présentation clinique du lymphome folliculaire se caractérise par l'apparition de plusieurs adénopathies périphériques superficielles des aires ganglionnaires cervicale, axillaire ou inguinale, amenant généralement le patient à consulter.

Ces adénopathies sont le plus souvent bilatérales, fermes, non douloureuses et non inflammatoires.

Moins de 20% des patients présentent des signes généraux, ou signes dits « B », qui comprennent la fièvre (>38°C depuis plus de 5 jours), les sueurs nocturnes et l'amaigrissement (de >10% de la masse corporelle en moins de 6 mois).

Seulement 15 à 25 % des patients sont diagnostiqués à un stade localisé (stade 1 ou 2) de la maladie (17).

En effet, des adénopathies abdominales et pelviennes sont souvent présentes pouvant, exceptionnellement, entraîner des compressions de structures avoisinantes, qui se traduisent par une splénomégalie, un épanchement pleural ou encore une ascite.



Bien que 70% des patients présentent un envahissement médullaire, l'envahissement d'autres organes est rare (18).

Le bilan d'extension est, tout d'abord, clinique avec la recherche des signes « B » et des critères de forte masse tumorale. La palpation de l'ensemble des aires ganglionnaires superficielles est primordiale.

Le bilan biologique est effectué afin d'évaluer les comorbidités du patient (bilan rénal, sérologies,...) et de rechercher des facteurs pronostiques (anémie, neutropénie, augmentation des LDH et/ou de la bêta-2 microglobuline,...)

La biopsie ostéo-médullaire (BOM) reste indispensable dans le bilan d'extension, afin d'évaluer l'envahissement médullaire, souvent présent.

Le bilan d'imagerie comprend une TDM thoraco-abdomino-pelvienne complétée par une TEP/TDM au 18-Fluorodesoxyglucose (18-FDG), cette dernière étant plus performante dans l'évaluation de l'atteinte ganglionnaire et extra-ganglionnaire. Elle permet également d'identifier de façon précise les cibles en radiothérapie, traitement de référence du lymphome folliculaire de stade localisé (19).

## VI. Classifications

La classification d'Ann Arbor a longtemps été le Gold standard dans l'évaluation de l'extension clinique des lymphomes malins en définissant quatre stades. Les modifications de Cotswolds en 1989, ont permis de prendre en compte des critères radiologiques.

Stade	Description
Stade I	Atteinte d'un seul groupe ganglionnaire ou d'une seule structure lymphoïde (médiastin = 1 ; cervical gauche = 1 ; rate = 1 ; anneau de Waldeyer = 1)
Stade II	Atteinte de deux ou plusieurs groupes ganglionnaires d'un seul côté du diaphragme (le médiastin représente un seul territoire, les deux hiles sont considérés indépendamment du médiastin comme des « régions » ganglionnaires). Le nombre de territoires ganglionnaires est indiqué en indice (II <i>n</i> )
Stade III	Atteinte ganglionnaire des deux côtés du diaphragme
III1	Atteinte sous-diaphragmatique limitée à la rate, aux ganglions du hile splénique, aux ganglions coeliaques ou du tronc porte
III2	Atteinte des ganglions latéro-aortiques, iliaques, mésentériques s'associant ou non à l'atteinte détaillée dans le stade III1
Stade IV	Atteinte extra-ganglionnaire distincte d'une localisation viscérale contiguë, ou atteinte du foie ou de la moelle osseuse
A	Absence de signes généraux
B	Présence de fièvre, sueurs, ou amaigrissement
X	Importante masse tumorale : <ul style="list-style-type: none"> <li>= masse médiastinale de diamètre égal ou supérieur au tiers du diamètre transverse thoracique au niveau du disque intervertébral T5-T6 (sur un cliché thoracique de face)</li> <li>= masse ganglionnaire égale ou supérieure à 10 cm dans son diamètre maximum</li> </ul>
E	Atteinte d'un seul viscère contigu ou à proximité d'un territoire ganglionnaire atteint

**Figure 1. Classification d'Ann Arbor - Modifications dites « de Cotswolds ». HAS 2013**

Bien que la classification d'Ann Arbor modifiée reste utilisée en pratique courante, une révision simplifiée est recommandée par la société américaine d'oncologie : la classification de Lugano.

Stade	Envahissement	Statut <u>extraganglionnaire</u> (E)
<b>Localisé</b>		
I	Un ganglion ou un groupe de ganglions adjacents	Lésion <u>extraganglionnaire</u> simple sans atteinte ganglionnaire
II	Deux ou plusieurs groupes ganglionnaires d'un seul côté du diaphragme	Stade I ou II avec extension <u>extraganglionnaire</u> par <u>contiguïté</u>
II « bulky »	Stade II avec une maladie « bulky »	Non applicable
<b>Etendu</b>		
III	Ganglions des deux côtés du diaphragme; ganglions au dessus du diaphragme avec envahissement splénique	Non applicable
IV	Envahissement non contiguë <u>extralymphatique</u>	Non applicable

**Figure 2. Système de stadification révisé des lymphomes ganglionnaires primitifs – Classification de Lugano - Société américaine d'oncologie, 2014**

En effet, dans la pratique générale, les patients sont traités selon que la maladie soit localisée ou étendue. Le stade II dit « bulky », c'est à dire « volumineux », est un stade intermédiaire défini par la présence d'une masse ganglionnaire unique de plus de 6 cm ou de plus du tiers du diamètre thoracique. Il sera considéré comme un stade localisé ou étendu en fonction d'autres facteurs pronostiques associés.

La prise en compte de l'extension par contiguïté (E) reste seulement justifiée pour le stade localisé et l'utilisation des lettres A (asymptomatique) et B (symptomatique) de la classification d'Ann Arbor n'est plus requise (20).

## VII. Pronostic

Le pronostic des lymphomes folliculaires est fortement corrélé à l'âge et à l'extension de la maladie au moment du diagnostic.

Pour les lymphomes folliculaires dont le stade est étendu, de nombreux critères pronostiques sont à rechercher afin de déterminer si un traitement immédiat est préconisé.

Les deux index pronostiques internationaux des lymphomes folliculaires, le FLIPI, publié en 2004, et le FLIPI-2, publié en 2009, sont les meilleurs outils pour prédire le risque de progression de la maladie nouvellement diagnostiquée.

Le FLIPI est orienté sur la survie globale au moment du diagnostic et utilise 5 facteurs indépendants :

- L'âge (supérieur à 60 ans)
- Le taux de lactate déshydrogénase (LDH) (supérieur à la normale)
- Le taux d'hémoglobine sérique (inférieur à 12 g/dl)
- Les stades III ou IV d'Ann Arbor
- Le nombre d'aires ganglionnaires envahies (supérieur à 4)

La présence de 0 ou de 1, de 2, ou de plus de 3 de ces facteurs, définit respectivement les groupes de patients au risque faible, intermédiaire ou élevé (21).

Avant tout traitement, le groupe de patients au risque faible a 91% de survie globale à 5 ans et 71% à 10 ans. Le groupe intermédiaire a 78% de survie globale à 5 ans et 51% à 10 ans. Enfin, le risque élevé a 52% de survie globale à 5 ans et 36% à 10 ans (22).

Le FLIPI-2 est orienté sur la survie sans progression de la maladie et utilise également 5 facteurs indépendants :

- L'âge (supérieur à 60 ans)
- Le taux d'hémoglobine sérique (inférieur à 12 g/dl)
- La moelle osseuse (envahie)

- Le taux sérique de bêta-2-microglobuline (élevé)
- Le diamètre de la plus volumineuse masse (supérieur à 6 cm)

L'absence, la présence de 1 ou 2, et de plus de 3 de ces facteurs, définissent respectivement les groupes de patients au risque faible, intermédiaire et élevé pour la progression de la maladie (23).

L'index du GELF (Groupe d'Étude des Lymphomes Folliculaires) évalue l'existence ou non d'une forte masse tumorale et se détermine par différents critères:

- Une masse ganglionnaire ou extra-ganglionnaire > 7cm dans son plus grand axe
- La présence de symptômes « B »
- La présence de plus de 3 ganglions, de diamètre >3 cm, appartenant à au moins 3 aires ganglionnaires distinctes
- La présence d'un épanchement séreux (pleural ou péritonéal)
- Un syndrome compressif
- Une splénomégalie symptomatique >20 cm
- Un taux de LDH supérieur à la normale
- Un taux de Béta2-microglobuline supérieur à la normale

Les patients ne présentant aucun de ces critères sont considérés comme étant de « faible masse tumorale » et représentent environ un tiers de l'ensemble des patients au diagnostic. (24) Leur espérance de vie est meilleure que celle des sujets ayant une « forte masse tumorale ».

Sur le plan histologique, le pronostic se base sur la réalisation d'un grade cytologique, défini en fonction de la proportion de centroblastes par rapport à celle des centrocytes. Les grades 1-2 et 3A sont considérés comme des lymphomes de bas grade et le grade 3B comme un lymphome agressif de haut grade (25).

Le modèle pronostique le plus récent est le M7-FLIPI qui inclut le statut mutationnel de 7 gènes : *EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* et *CARD11*. Néanmoins, ce modèle apparaît peu applicable en dehors des pays européens ou nord-américains, en raison de l'indisponibilité de laboratoires de cytogénétiques spécialisés dans les autres régions du globe (26).

## VIII. Traitements de première ligne

La stratégie thérapeutique des lymphomes folliculaires a pour but d'identifier les patients nécessitant un traitement immédiat, de maintenir le patient stable ou en rémission avec un bon état général et une bonne qualité de vie, et d'augmenter la survie sans évènement ainsi que la survie globale. Elle va dépendre de l'âge du patient, du stade de la maladie (stade localisé ou étendu) et des facteurs pronostiques associés.

Les formes localisées de grade cytologique 1-2 ou 3A, sans critère de gravité associé, sont potentiellement curables. Le traitement de référence est la radiothérapie locale (27) délivrant une dose de 24 gray (Gy) en 12 fractions (28). Ce traitement permet un taux de survie sans rechute à 10 ans de l'ordre de 43-51% (27).

Pour les formes disséminées asymptomatiques sans forte masse tumorale (index de GELF=0), cytologiquement de bas grade, l'abstention thérapeutique associée à une surveillance est préconisée, afin de retarder le plus longtemps possible les effets secondaires de la chimiothérapie (29). De plus, une régression spontanée partielle est observée chez 23% de ces patients (11).

Pour les formes disséminées symptomatiques et/ou présentant une forte masse tumorale (index de GELF $\geq$ 1) avec un grade cytologique 1-2 ou 3A, l'immunochimiothérapie est le traitement d'induction de référence. Il associe le Rituximab (R) à une chimiothérapie telle que CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone), CVP

(cyclophosphamide, vincristine et prednisone) ou encore bendamustine, sur un total de 6 ou 8 cycles. Il sera suivi d'un traitement d'entretien par Rituximab seul tous les 2 mois pendant 2 ans permettant d'augmenter la survie sans progression (30). Ce traitement permet une survie sans progression à 10 ans de 51% et un taux de survie globale à 10 ans de 80% (30).

La stratégie thérapeutique du lymphome folliculaire de grade cytologique 3B est similaire à celle du lymphome B diffus à grandes cellules avec un traitement d'induction de 6 cycles par l'immunochimiothérapie R-CHOP.

## **IX. Les patients en rechute ou réfractaires**

L'ensemble des patients présentant une progression sous traitement ou une rechute doit bénéficier d'une TEP/TDM et d'une biopsie de la lésion la plus fixante afin d'éliminer une transformation de la maladie en lymphome B diffus à grandes cellules.

La stratégie de traitement varie alors en fonction du nouveau stade de la maladie, du traitement administré antérieurement et de l'âge du patient.

Pour les patients de moins de 65 ans, présentant une rechute ou une progression dans les deux premières années ou une transformation en lymphome B à grandes cellules, le traitement optimal est l'intensification thérapeutique, par l'utilisation de chimiothérapies à base de sels de platine suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques de consolidation.

Pour les patients de plus de 65 ans, réfractaires ou en rechute précoce (<6 mois après l'arrêt du Rituximab) après un schéma R-CHOP, une stratégie d'intensification par l'association de Bendamustine à dose fixe avec l'Obinituzumab dont la dose varie entre le 1<sup>er</sup> cycle et les 5 suivants, est indiquée. Elle est suivie d'un traitement d'entretien par Obinituzumab tous les deux mois pendant 2 ans (31).

Si la rechute est tardive, l'association Bendamustine avec le Rituximab est préconisée.

## **X. Nouvelles thérapeutiques**

De nombreuses nouvelles approches thérapeutiques incluant les anticorps monoclonaux, l'immunomodulation ou de nouvelles molécules telles que les inhibiteurs de tyrosine kinase ou les inhibiteurs de cibles épigénétiques, ont été développées ces dernières années.

### **A. Inhibiteurs de la PI3K**

La voie de signalisation de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K), tyrosine kinase, joue un rôle important dans de multiples fonctions cellulaires, comme la prolifération et la différenciation. Sa dérégulation est décrite dans de nombreux types de cancer dont notamment les cancers hématologiques (32). Les inhibiteurs des kinases ciblant la PI3K ont fait l'objet, ces dernières années, de nombreuses études et essais cliniques. Chez les patients ayant un lymphome folliculaire réfractaire ou en rechute, trois inhibiteurs de la PI3K ont prouvé leur efficacité sans distinction de supériorité les uns par rapport aux autres ; l'idélalisib (en prise orale) (33), le copanlisib (par voie intraveineuse) (34) et plus récemment le duvelisib (en prise orale) (35).

### **B. Nouvelle immunothérapie**

Les CAR (chimeric antigen receptor) T-cell ciblant l'antigène CD19 des cellules B, semblent être très prometteurs dans les lymphomes folliculaires en rechute. En effet, un taux de réponse de 71% a été rapporté chez 14 patients traités. Parmi ces répondeurs, 89% d'entre eux restaient sans progression de la maladie, après un suivi de 29 mois (36). Une seconde étude a montré que chez 8 patients traités par CART-cell ayant un LF en



rechute précoce ou réfractaire, le taux de rémission complète (RC) était de 88%, avec un maintien de tous les patients en RC après un suivi médian de 24 mois (37).

### **C. Immunomodulation**

Un des mécanismes permettant le développement et la survie des cellules cancéreuses est l'échappement à la reconnaissance et à l'élimination des cellules tumorales, par le système immunitaire du patient. Le but de l'immunomodulation est de rétablir cette capacité de réponse immunologique.

Le Lenalidomide, un immunomodulateur de la famille des IMiD (immunomodulatory drugs), a déjà prouvé son efficacité dans le lymphome folliculaire. Par exemple, le Lenalidomide associé au Rituximab a montré une meilleure survie sans progression par rapport au Rituximab seul, chez des patients atteints de LF réfractaire ou en rechute (38). De plus, chez les patients ayant un LF à un stade avancé, non traité auparavant, l'efficacité était similaire entre l'association Lenalidomide-Rituximab et le traitement de référence Rituximab-chimiothérapie, les deux protocoles étant suivis par un traitement d'entretien Rituximab seul (39).

### **D. Inhibiteurs d'EZH2**

La cible thérapeutique épigénétique est en plein essor. Comme nous le verrons par la suite, EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) est un régulateur épigénétique de l'expression des gènes qui joue un rôle fondamental dans de nombreuses formes de cancers, dont le lymphome folliculaire. La mutation activatrice EZH2 Y641, présente dans 22% des LF, est une cible thérapeutique prometteuse et efficace. Actuellement, un inhibiteur per os d'EZH2, EPZ6438 ou Tazemetostat est en cours d'essai clinique de phase II (essai

EPIZYME) chez des patients atteints de LF réfractaire ou en rechute, avec ou sans la mutation activatrice EZH2 Y641. Les derniers résultats ont montré une réponse globale significative de 77% (ORR (Objective Response Rate)=77%) chez les patients EZH2 muté, mais aussi, de façon intéressante, une réponse de l'ordre de 34% (ORR=34%) chez les patients EZH2 non muté (40).

## **XI. De la différenciation du lymphocyte B à la lymphomagénèse du lymphome folliculaire**

### **A. Différenciation du lymphocyte B**

Les immunoglobulines se caractérisent par des régions variables des chaînes légères et des chaînes lourdes, formant un domaine qui reconnaît, avec un haut degré d'affinité, l'antigène. La sécrétion de ces immunoglobulines par les lymphocytes B définit la réponse humorale.

Le lymphocyte B subit de nombreuses étapes de sélection et de maturation permettant sa différenciation en lymphocyte B mémoire ou plasmocyte. Les premières étapes débutent à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes de la moelle osseuse. Ces cellules souches vont successivement devenir des cellules progénitrices B (pro-B), des cellules précurseurs B (pré-B), des lymphocytes B immatures et enfin, des lymphocytes B matures. Ces différents stades de maturation impliquent différents réarrangements séquentiels impliquant des gènes variables V-D-J des immunoglobulines.

Les lymphocytes B matures formés quittent alors la moelle osseuse, passent dans le sang circulant et se regroupent dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, amygdales, rate ou tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT)) pour former les follicules lymphoïdes B « primaires ». A ce stade, les lymphocytes B n'ont pas encore été exposés aux antigènes externes et sont dits « naïfs ».

La rencontre du lymphocyte B « naïf » avec l'antigène active le lymphocyte et induit la formation de follicules secondaires, où aura lieu leur maturation. Ces derniers se caractérisent par un centre germinatif (CG) intra-folliculaire, renfermant les lymphocytes

« activés » en cours de maturation, et par une couronne lymphocytaire, appelée zone du manteau, composée de lymphocytes B naïfs non activés (41).

Les lymphocytes TFH (T folliculaires helpers) et les cellules folliculaires dendritiques (CFD) sont d'autres types cellulaires du centre germinatif, dont le principal but est de recruter les lymphocytes B activés (42) (32).

Le centre germinatif se polarise alors en 2 zones ; une zone sombre constituée majoritairement de centroblastes prolifératifs et une zone plus claire composée de centrocytes quiescents. Le centroblaste exprime très peu d'immunoglobulines de surface et se caractérise par une importante division cellulaire. Il va alors subir de nombreuses mutations ponctuelles sur les régions variables des gènes codant pour les chaînes lourdes et légères de ces immunoglobulines (41). Le centroblaste se différencie alors en centrocyte qui migre dans la zone claire du CG. Ce dernier se caractérise par un faible pouvoir de division et par une augmentation de l'expression des immunoglobulines de surface nouvellement formées. Lorsque l'affinité pour l'antigène est suffisamment élevée, les cellules TFH induisent la prolifération des lymphocytes B activés correspondants, leur expansion clonale ainsi que leur différenciation en cellules B mémoires et plasmocytes (sécrétant des anticorps à longue durée de vie). Si le degré d'affinité est insuffisant, les centrocytes ne reçoivent pas de signaux de survie et entrent en apoptose. Ils sont alors phagocytés et digérés par les macrophages (42) (43).

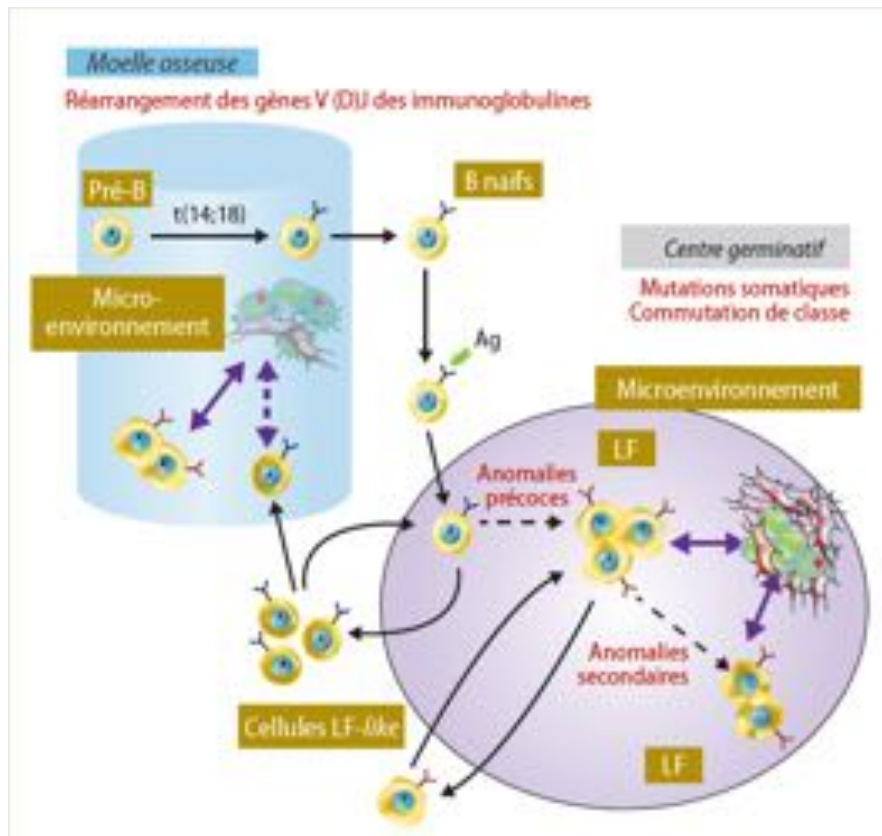
## **B. Lymphomagénèse du lymphome folliculaire**

La lymphomagénèse du LF débute à un stade précoce de la différenciation du lymphocyte B avec la survenue, dans la moelle osseuse, de la translocation caractéristique  $t(14;18)(q32;q21)$  qui aboutit à la surexpression de la protéine anti-apoptotique BCL2. Cet accident génétique survient au stade de maturation de la cellule précurseur B (pré-B), lors

des réarrangements des gènes variables des immunoglobulines. Fonctionnelles ou défailantes, les cellules B naïves porteuses de la t(14;18)(q32;q21), après avoir quitté la moelle osseuse jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires, ont alors un avantage de survie, les protégeant de l'apoptose. Ce phénomène va aboutir à la circulation, dans le sang, de lymphocytes B mémoires de type LF-like.

Cette anomalie génétique est le premier événement génétique à l'origine de la lymphomagenèse du LF mais n'est cependant pas suffisante pour expliquer sa survenue. En effet, environ 10% des patients atteints de LF ne présentent pas cette translocation au diagnostic (44). De plus, dans plus de 45% du sang circulant des sujets caucasiens sains, une très faible proportion de cellules B est porteuse de cette anomalie génétique (45).

Les cellules B naïves t(14 ;18), au cours de leur maturation dans le CG, par le biais de l'activation de l'enzyme AID, vont subir de nombreuses autres évènements génétiques précoces (majeures et clonales) ou tardifs (secondaires et présentes dans certains sous-clones) qui conduiront à leur transformation maligne et donc à l'apparition du LF. Ces anomalies intéressent notamment les gènes *MLL2* (gène codant pour des histone-méthyltransférases), *BCL6*, *TNFRSF14*, *CREBBP* (codant pour une histone acétylase) ou encore *EZH2* (46). Le microenvironnement du centre germinatif, également modifié par des facteurs extrinsèques environnementaux, interagit avec les cellules B t(14 ;18) et participe ainsi, à la transformation maligne.



**Figure 3. Lymphomagénèse du lymphome folliculaire**  
 (R. Houot - Onco-Hématologie - Vol. VIII - n° 2 - Mars-avril 2013)

## XII. Aspects histologique et immunohistochimique du ganglion lymphatique normal

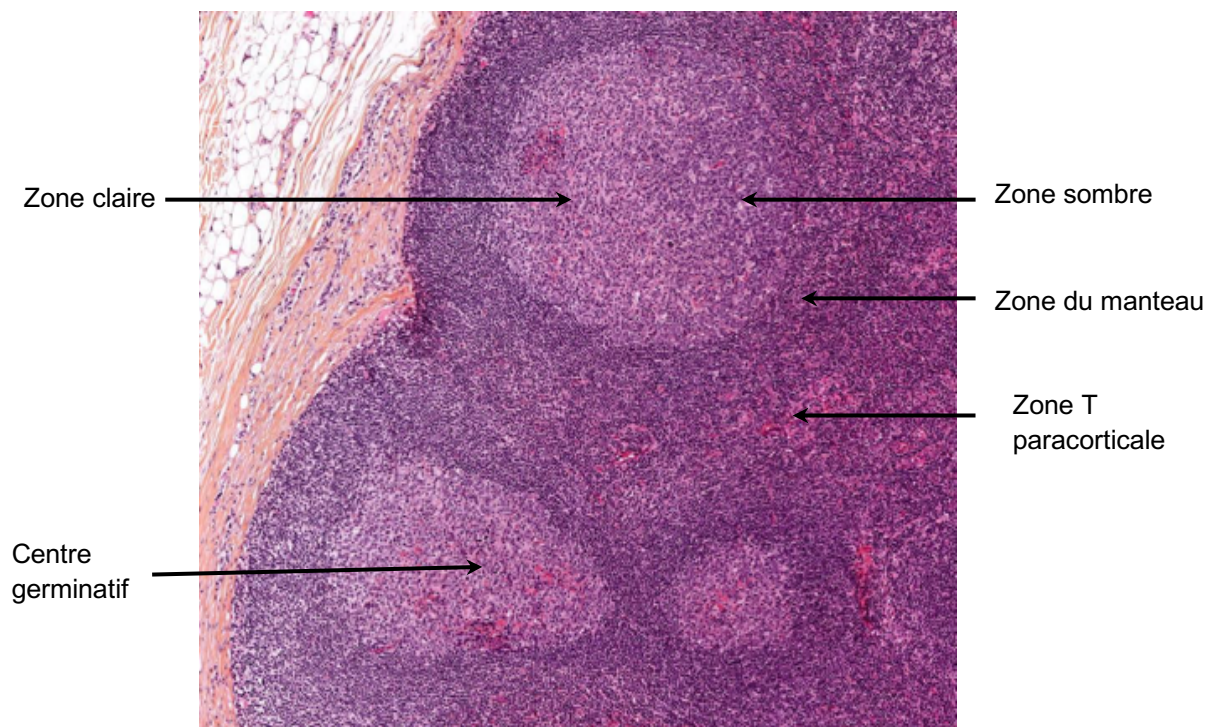
### A. Histologie

Le ganglion lymphatique comporte une zone corticale, une zone paracorticale et une zone médullaire. Il est délimité par une capsule fibreuse fine.

La zone corticale renferme les follicules lymphoïdes secondaires, constitués d'un centre germinatif et d'une zone du manteau. Le centre germinatif est polarisé par une zone sombre où siègent les centroblastes en division cellulaire, se traduisant histologiquement par la présence de cellules de grande taille et de nombreuses figures de mitose et une zone claire où siègent notamment les centrocytes et les macrophages à corps tingibles phagocytant les corps apoptotiques. Le CG renferme également des lymphocytes TFH et

les cellules folliculaires dendritiques (CFD) formant un réseau. La zone du manteau constitue une couronne autour du centre germinatif.

La zone T paracorticale est composée très majoritairement de lymphocytes T, de cellules réticulaires inter digitées et de veinules post-capillaires.

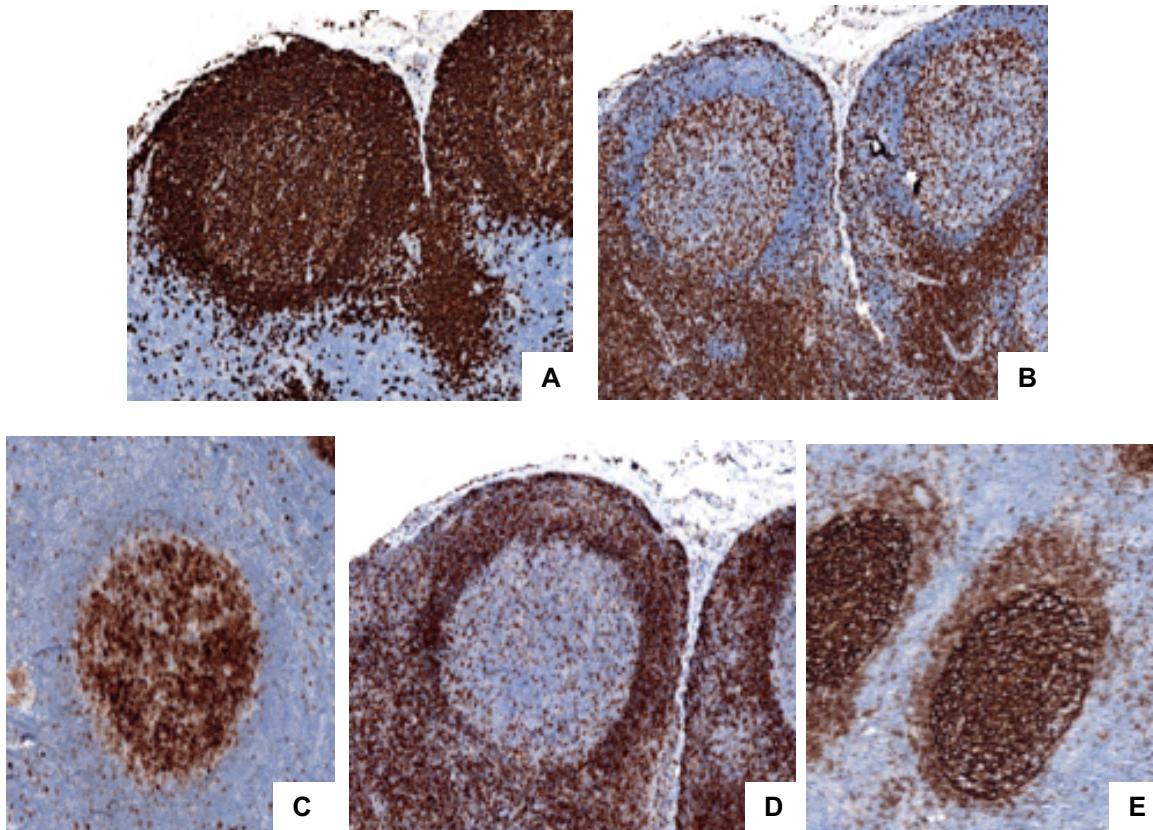


**Zones corticale et paracorticale du ganglion normal**

## **B. Immunohistochimie**

Les cellules B du follicule lymphoïde secondaire sont immunomarquées par l'anticorps anti-CD20, marqueur pan-B, avec un marquage plus intense de la zone du manteau. Les cellules T, immunomarquées par l'anticorps anti-CD3, sont majoritairement localisées au sein de la zone T paracorticale. Quelques cellules TFH exprimant le CD3, sont dispersées au sein de centre germinatif. Les anticorps anti-CD10 et anti-BCL6, marqueurs centro-germinatifs, sont exprimés par les cellules B activées du centre germinatif. La protéine BCL2 ne s'exprime pas au sein du centre germinatif, permettant l'apoptose des centrocytes ayant une trop faible affinité pour l'antigène. Cette protéine est néanmoins

exprimée par les lymphocytes B de la zone du manteau et de la zone paracorticale. Le réseau folliculaire dendritique (RFD), immunomarcqué, par l'anticorps anti-CD23 est bien limité.



**Figure 4. Immunohistochimie du ganglion normal** : l'anticorps anti-CD20 est positif dans les cellules B du centre germinatif et de la zone du manteau (A), l'anticorps anti-CD3 est exprimé par les cellules T de la zone paracorticale et les cellules TFH du centre germinatif (B). L'anticorps anti-CD10 est exprimé par les cellules B du centre germinatif (C), l'anticorps anti-BCL2 est négatif dans le centre germinatif (D) et l'anticorps anti-CD23 met en évidence le RFD bien limité.



### **XIII. Caractéristiques pathologiques et cytogénétiques du lymphome folliculaire**

La nouvelle classification OMS 2016 décrit le lymphome folliculaire ainsi que 4 variants distincts en se basant sur la localisation initiale, l'architecture et la cytologie tumorales et les caractéristiques immunohistochimiques et cytogénétiques. Deux nouvelles entités y sont également décrites, de diagnostic souvent difficile.

#### **A. Macroscopie**

Les ganglions sont de taille augmentée et ferme. A la tranche de section, ils apparaissent de couleur beige homogène, avec parfois la présence de petits nodules correspondant à l'architecture folliculaire de la prolifération lymphomateuse. Cet aspect macroscopique n'est pas spécifique, car il peut être observé dans les hyperplasies folliculaires réactionnelles.

L'envahissement splénique se caractérise par une augmentation du poids de la rate associée à une expansion uniforme de la pulpe blanche sans anomalie évidente de la pulpe rouge.

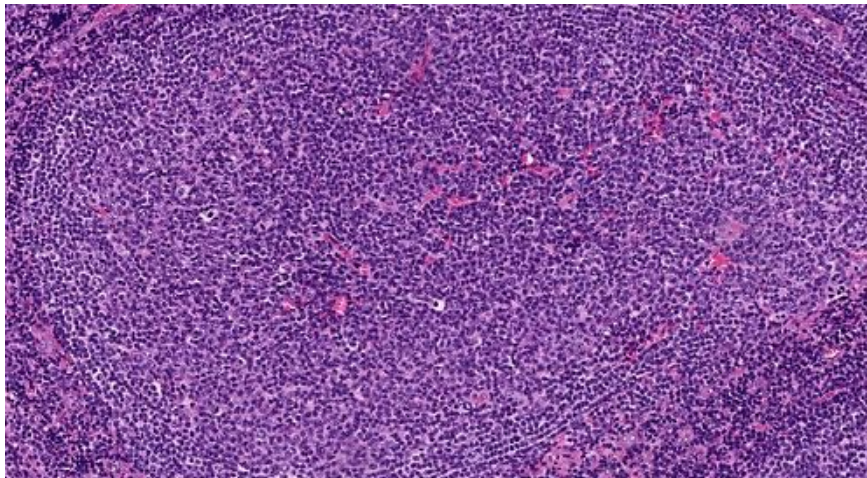
#### **B. Microscopie du lymphome folliculaire conventionnel**

##### **1. Morphologie**

L'architecture ganglionnaire est effacée par une prolifération lymphomateuse d'architecture au moins partiellement folliculaire caractérisée par de nombreux follicules tumoraux regroupés et parfois tassés les uns contre les autres. Une architecture diffuse peut être présente, en proportion variable ; elle se définit par une absence totale de

follicule. Il est recommandé de préciser pour chaque LF si l'architecture est : folliculaire (>75% d'architecture folliculaire), folliculaire et diffuse (25%-75% d'architecture folliculaire) ou focalement folliculaire avec une prédominance diffuse (<25% d'architecture folliculaire). Les contours des follicules tumoraux apparaissent mal limités et la zone du manteau est présente, parfois discrètement atténuée. Le réseau folliculaire dendritique est le plus souvent conservé et apparaît arrondi et bien limité. Il est composé de cellules folliculaires dendritiques parfois binuclées, dont le noyau est rond, avec une chromatine fine et dispersée et un petit nucléole central. Leur cytoplasme n'est pas visible en coloration standard.

La polarisation des centres germinatifs tumoraux est absente et la répartition des cellules lymphomateuses, anarchique.



**Figure 5. Follicule tumoral du LF : absence de polarisation du centre germinatif tumoral**

L'infiltration interfolliculaire par les cellules lymphomateuses est un signe fort en faveur de la malignité. Elle ne constitue pas un argument pour une architecture diffuse. Ce sont souvent des centrocytes de taille plus petite que ceux présents au sein des centres germinatifs.

## 2. Cytologie

La prolifération tumorale du LF est composée de deux types de cellules B physiologiquement présents dans les centres germinatifs. Tout d'abord, le centrocyte, de taille petite à moyenne, se caractérise par un noyau anguleux, allongé ou clivé comportant un petit nucléole. Son cytoplasme est peu abondant et pâle.

Le second type cellulaire est le centroblaste qui est de grande taille, faisant typiquement au moins trois fois la taille d'un lymphocyte. Son noyau est rond ou ovalaire avec une chromatine vésiculeuse et comporte un à trois nucléoles, souvent adjacents à la membrane nucléaire. Son cytoplasme est peu abondant.

Bien que dans la majorité des cas les centrocytes prédominent, les centroblastes sont toujours présents.

## 3. Microenvironnement

En plus des cellules folliculaires dendritiques, les follicules tumoraux contiennent de nombreux autres types cellulaires présents de façon physiologique dans les centres germinatifs incluant les immunoblastes, les lymphocytes TFH et les histiocytes. Les corps tingibles macrophagiques, caractéristiques des centres germinatifs d'aspect normal ou réactionnel, sont absents.

Les espaces interfolliculaires sont constitués d'une majorité de lymphocytes T réactionnels.

Différentes études ont suggéré que la composition du microenvironnement pouvait être un facteur pronostic indépendant. Par exemple, la détection par étude immunohistochimique et l'analyse de la répartition des lymphocytes T régulateurs FOXP3<sup>+</sup> (forkhead/winged helix transcription factor 3), facteur de transcription jouant un rôle majeur au sein des

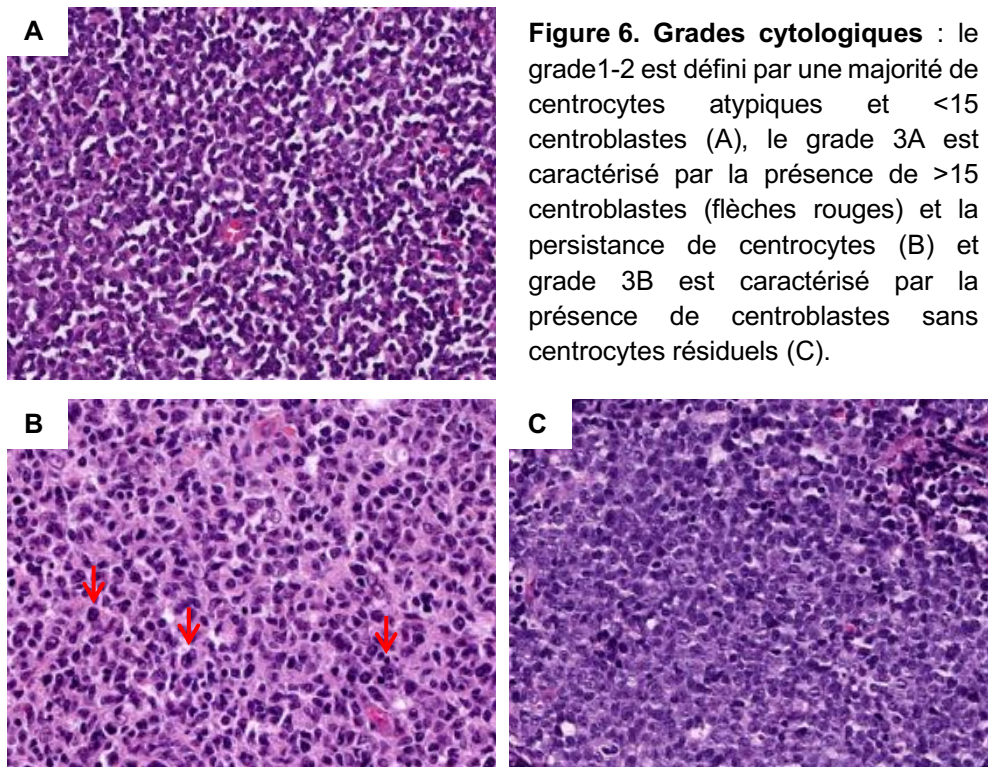
lymphocytes T régulateurs de l'homéostasie immune, pourrait prédire la survie et le risque de transformation des LF traités par chimiothérapie (47).

Le nombre de macrophages augmenté, détectés grâce à l'anticorps anti-CD68, serait associé à une meilleure survie (48). Ces observations suggèrent un rôle important des cellules non tumorales de l'immunité dans la biologie du LF.

#### 4. Grade cytologique

Le grade du lymphome folliculaire est basé sur le nombre absolu de centroblastes par champs au fort grossissement ou HPF (High power field) (x400, avec un champ = 0,159 mm<sup>2</sup>) évalué sur au moins 10 champs. Pour une bonne représentativité, il est recommandé d'avoir au moins 10 follicules tumoraux analysables. Le grade 1-2 représente 80 à 90% des cas et se caractérise par une prédominance de centrocytes (grade 1 : 0-5 centroblastes par HPF et grade 2 : 6-15 centroblastes par HPF). Depuis la classification de l'OMS de 2008, il n'est plus recommandé de distinguer ces deux grades du fait de l'absence de différence significative en clinique.

Le grade 3 est défini par la présence de >15 centroblastes par HPF. Il est subdivisé selon la persistance ou non de centrocytes : au sein du grade 3A, les centrocytes sont toujours présents alors que dans les follicules tumoraux de grade 3B, il ne persiste que des centroblastes mêlés à des immunoblastes.



**Figure 6. Grades cytologiques** : le grade 1-2 est défini par une majorité de centrocytes atypiques et <15 centroblastes (A), le grade 3A est caractérisé par la présence de >15 centroblastes (flèches rouges) et la persistance de centrocytes (B) et grade 3B est caractérisé par la présence de centroblastes sans centrocytes résiduels (C).

### C. Immunohistochimie

Les cellules lymphomateuses, d'origine B, expriment les antigènes associés aux cellules B ; les marqueurs pan-B tels que le CD20 ou le CD79a, sont donc positifs. Les marqueurs T tels que le CD3 ou le CD5 sont quant à eux, négatifs.

La protéine BCL2 (membre d'une famille de gènes anti-apoptotiques) est exprimée par les cellules lymphomateuses dans 85% à 90% des cas de grade 1-2 et entre 50 et 70% des cas de grade 3 (49). Dans certaines situations, l'absence d'expression de cette protéine en immunohistochimie, n'est qu'apparente, due à la présence de mutations du gène *BCL2* qui éliminent les épitopes reconnus par les anticorps anti-BCL2 utilisés le plus communément dans les laboratoires. Il est alors possible d'éliminer ces faux négatifs en utilisant un anticorps spécifique qui reconnaît les formes mutées de la protéine BCL2, comme par exemple, le clone E17.

L'anticorps anti-BCL2 est très utile pour éliminer le diagnostic différentiel d'hyperplasie folliculaire dont le marquage des follicules lymphoïdes secondaires, de type réactionnel, est toujours négatif.

Le phénotype centro-germinatif, CD10+/BCL6+, est présent. L'expression de CD10 est souvent plus intense au sein des follicules tumoraux que dans les cellules lymphomateuses interfolliculaires où elle apparaît faible voire absente. Dans certains cas, le plus souvent les LF de grade 3B, il peut y avoir une absence d'expression de CD10 associée à une persistance du marquage de BCL6. Des nouveaux marqueurs centro-germinatifs alternatifs, HGAL et LMO2, apparaissant plus sensibles et spécifiques, peuvent être également utiles, surtout lorsque l'architecture tumorale ou le phénotype ne sont pas typiques (50).

De façon cohérente avec l'origine centro-germinative des cellules tumorales, IRF4/MUM1 (interferon regulatory factor 4/multiple myeloma 1), qui joue un rôle important dans la formation du centre germinatif et la différenciation des cellules B en plasmocytes (51), est négatif dans la grande majorité des lymphomes folliculaires. Néanmoins, dans certaines séries, l'expression de MUM1 par les cellules lymphomateuses du LF, était présente dans 23% (52) à 37% (53) des cas, préférentiellement de grade 3A ou 3B (54), et serait associée à une plus courte survie sans progression (55).

L'index de prolifération du Ki67, évalué par l'anticorps anti-MIB1, est généralement corrélé avec le grade ; il est inférieur à 20% pour le grade 1-2 et supérieur à 20% pour le grade 3, voire supérieur à 70% pour le grade 3B (54). Néanmoins, l'association d'un grade 1-2 ou 3A avec un index de prolifération Ki67 élevé, pouvant aller jusqu'à 100% au sein des follicules tumoraux, est possible et serait d'évolutivité plus agressive et similaire à celle d'un grade 3B (56). Il est alors recommandé de préciser dans la conclusion anatomopathologique le caractère élevé de l'index de prolifération du Ki67 et l'évolution plus

agressive prévisible (57). Par ailleurs, un index de prolifération du Ki67 de plus de 10% des cellules lymphomateuses, chez un patient traité par R-CHOP, serait un marqueur de mauvais pronostic, avec une survie sans progression diminuée par rapport à un marquage inférieur à 10% (58).

Le réseau folliculaire dendritique, conservé ou hyperplasique, occupe généralement plus des deux tiers de la surface des follicules tumoraux; il est mis en évidence grâce aux anticorps anti-CD21 ou anti-CD23. L'utilisation de ces deux anticorps est donc utile en routine, afin de caractériser ce réseau.

Les lymphocytes T folliculaires et interfolliculaires expriment les marqueurs T tels que le CD3 ou encore le CD5.

## **D. Anomalies génétiques**

### **1. Translocation primaire t(14;18)(q32;q21)**

L'anomalie cytogénétique primaire du lymphome folliculaire est la translocation équilibrée t(14;18)(q32;q21), présente dans environ 85% à 90% des cas (44). Cette translocation juxtapose le gène *BCL2* (oncogène anti-apoptotique) situé sur les bras longs d'un chromosome 18, en position q21, avec la région codante pour le gène *IGH* (chaînes lourdes des immunoglobulines) située sur les bras longs d'un chromosome 14, en position q32. Elle place alors le gène *BCL2* sous le contrôle de l'*enhancer* («*amplificateur*») d'*IGH* aboutissant à une surexpression de la protéine BCL2, détectable par étude immunohistochimique, grâce à l'anticorps anti-BCL2.

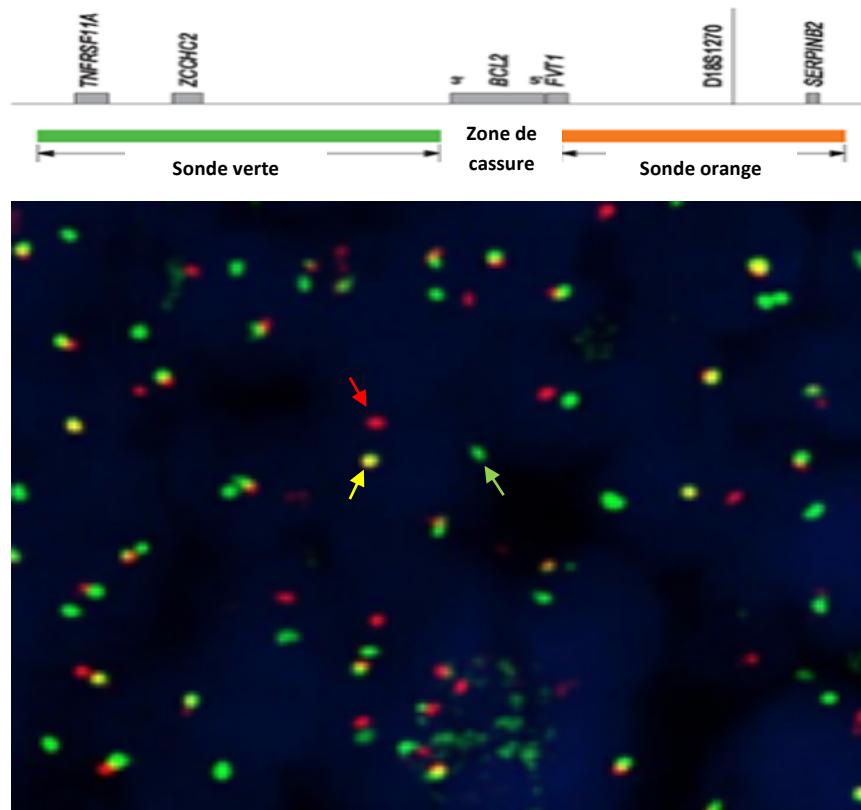
## 2. Modes de détection

### a) Technique d'hybridation in situ fluorescente (FISH) sur coupe de tissu

La technique FISH (fluorescente *in situ* hybridation) est une technique de cytogénétique permettant de détecter des séquences d'acides nucléiques sur métaphases (mitoses) ou sur interphases (noyaux). Elle utilise des sondes à ADN, fragments d'ADN simple brin marqués par immunofluorescence, qui vont se fixer sur une partie spécifique d'un chromosome.

Lorsque le marquage par l'anticorps anti-BCL2 est douteux ou négatif et que le diagnostic est difficile, la technique FISH interphasique, à partir de coupe de tissu inclus en paraffine, permet de confirmer l'absence de ce réarrangement. Au sein du laboratoire d'anatomopathologie du CHRU de Lille, nous utilisons la sonde « Break appart dual color BCL2 » du fournisseur Vysis. Elle comporte deux sondes fluorescentes couvrant le gène *BCL2* ; une sonde verte située en amont du gène et une sonde orange située en aval. Lorsque le réarrangement est présent, la cassure au sein du gène *BCL2* va entraîner une séparation des deux signaux aboutissant à un « split ». Au sein du noyau lymphomateux *BCL2* réarrangé, on observera alors une fusion verte-rouge persistante (correspondant au chromosome 18 non réarrangé) associée à un signal vert et un signal rouge séparé ou « splité », comme on peut l'observer dans la figure 7 ci-après.





**Figure 7. Design de la sonde BCL2 (fournisseur Vysis) et analyse FISH avec présence d'un réarrangement du gène BCL2.** Présence d'un signal rouge (flèche rouge), d'un signal vert (flèche verte) et d'un signal fusion rouge/vert (flèche jaune) au sein d'un noyau lymphomateux.

## *b) Cytogénétique*

### - Généralités

L'analyse cytogénétique est fortement recommandée dans la prise en charge des lymphomes. Le caryotype conventionnel représente l'examen de référence. Il apprécie l'ensemble du génome à l'échelle chromosomique, identifie rapidement sa complexité et met en évidence des anomalies de nombre et/ou de structure définissant des « signatures cytogénétiques » caractéristiques de certains types de lymphomes. L'analyse FISH métaphasique est généralement réalisée en complément du caryotype et permet l'identification plus aisée de partenaires de translocation, plus difficile à mettre en évidence par FISH interphasique. L'analyse cytogénétique joue un rôle majeur dans le diagnostic, par l'identification d'un clone anormal et la mise en évidence d'une translocation ou d'une

anomalie récurrente définissant une entité précise, dans le pronostic, par la mise en évidence d'anomalies associées à une évolution de la maladie plus ou moins favorable, ou encore dans certaines prises en charge thérapeutiques.

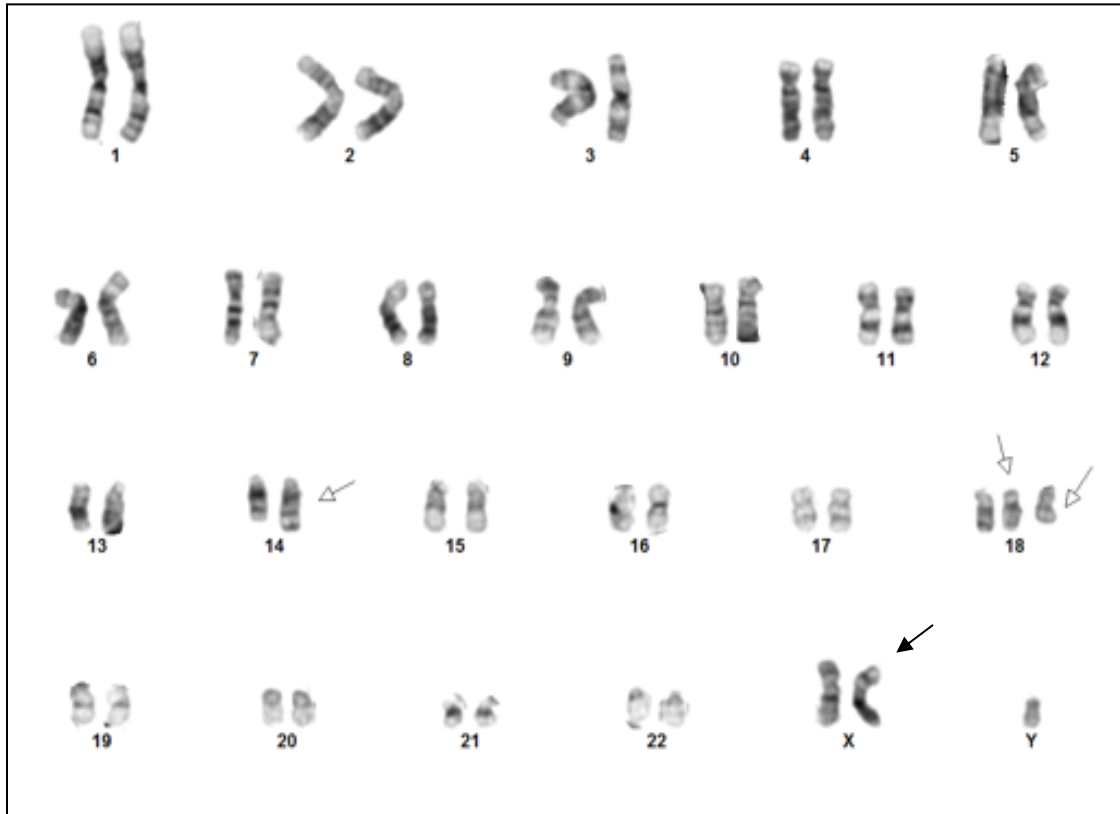
- **Translocation primaire t(14;18)(q32;q21)**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'anomalie cytogénétique caractéristique du lymphome folliculaire est la translocation équilibrée t(14;18)(q32;q21) bien visualisée sur la plupart des caryotypes. Néanmoins, ce réarrangement peut être, dans de rares cas, cryptique, c'est-à-dire non visible au caryotype ; l'analyse FISH sur métaphase est alors le meilleur outil pour la mettre en évidence. Des translocations variantes sont également observées dans environ 2% des cas, telles que la t(2;18)(p11;q21) aboutissant au réarrangement *IGK/BCL2* ou la t(18;22)(q21;q11), donnant le réarrangement *IGL/BCL2*.

- **Anomalies cytogénétiques additionnelles récurrentes**

Seuls 4% des LF ne présentent qu'une t(14;18) isolée. En effet, comme détaillée précédemment, cette anomalie génétique est le premier évènement oncogène mais ne suffit pas à l'émergence complète du lymphome folliculaire. Des anomalies additionnelles sont nécessaires conférant, à cette pathologie, une grande hétérogénéité cytogénétique. Les caryotypes sont, par conséquent, le plus souvent complexes ( $\geq 3$  anomalies) lors du diagnostic. Les sous-clones les plus fréquemment observés sont, par ordre de fréquence, les anomalies du chromosome 1 (délétion 1p36 ou gain de 1q), la délétion 6q, la trisomie 18 ou le gain d'un dérivé der(18)t(14;18), la présence d'un X surnuméraire, la trisomie 7, les anomalies 3q27, la trisomie 12 ou encore la délétion 17p. L'ensemble de ces anomalies additionnelles n'ont pas de valeur pronostique établie. En effet, la complexité du caryotype au diagnostic ou lors du suivi n'est pas corrélée au risque de transformation ou de rechute (59). Néanmoins, la présence de la translocation t(8;14)(q24;q32) aboutissant à une

amplification du gène *c-MYC*, est un facteur d'un mauvais pronostic, définissant le sous-type "double hit".



**Figure 8. Caryotype d'un LF : 48,XY,+X,t(14;18)(q32;q21),+18** - Caryotype complexe de type masculin mettant en évidence un clone anormal à 48 chromosomes caractérisé par une translocation réciproque t(14;18)(q32;q21) associée à une trisomie des chromosomes 18 et un chromosome X surnuméraire compatibles avec le diagnostic de lymphome folliculaire.

## E. Variants

### 1. Néoplasie folliculaire *in situ* (NFIS)

#### a) *Définition*

Ce variant est défini par une colonisation partielle ou totale, restreinte aux centres germinatifs d'un ganglion lymphatique ou d'un autre organe (tels que la thyroïde, la parathyroïde, l'amygdale, l'intestin ou encore la rate), de cellules B monoclonales ayant les caractéristiques immunophénotypiques et cytogénétiques caractéristiques du lymphome folliculaire.

#### b) *Épidémiologie*

L'incidence de la NFIS est difficile à évaluer du fait de sa présentation paucisymptomatique. Elle est le plus souvent de découverte fortuite. Au sein de séries de ganglions lymphatiques réactionnels réséqués, entre 2,3% et 3,2% des cas renfermaient une NFIS (60) (61), montrant une incidence beaucoup plus importante que celle du lymphome folliculaire conventionnel. Elle survient, en moyenne, dans la cinquième décennie de vie et est très rare avant l'âge de 40 ans.

#### c) *Morphologie*

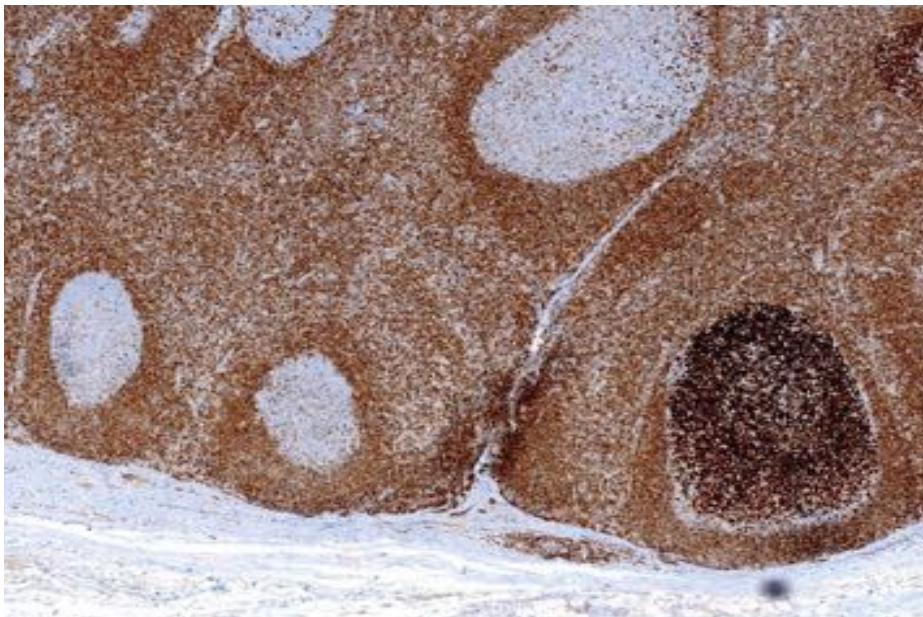
Le ganglion est d'architecture conservée avec souvent une hyperplasie folliculaire réactionnelle associée. Les follicules néoplasiques sont dispersés au sein du ganglion, de manière non contiguë. Ils apparaissent en grande majorité bien limités et de taille normale ou augmentée, leur donnant un aspect réactionnel. Ils peuvent également être similaires aux follicules tumoraux du lymphome folliculaire de grade 1, caractérisés, alors, par une prolifération de centrocytes monotones et une disparition des macrophages à corps

tingibles. La zone du manteau est sans particularité, mais peut être parfois étendue ou plus rarement atténuée (62).

*d) Immunohistochimie*

L'analyse immunohistochimique est indispensable pour le diagnostic de NFIS.

La surexpression homogène de la protéine BCL2 au sein du centre germinatif néoplasique est pathognomonique de la NFIS. Ce marquage aberrant est typiquement plus intense en comparaison au marquage des cellules de la zone du manteau ou des lymphocytes T des espaces interfolliculaires (63).



Néoplasie folliculaire in situ, lame scannée, anticorps anti-BCL2 x4

Par ailleurs, les cellules néoplasiques ont un profil immunohistochimique similaire à ceux du lymphome folliculaire de grade 1; en effet, elles expriment les marqueurs pan-B (CD20/CD79a) ainsi que les marqueurs classiques centro-germinatifs (CD10/BCL6). L'expression du Ki67 est faible, généralement inférieure à 10%.

#### e) Cytogénétique

L'ensemble des cellules néoplasiques comporte la translocation réciproque t(14;18)(q32;q21). Plusieurs études ont récemment montré qu'il n'y avait pas ou très peu d'altérations génétiques secondaires associées, habituellement observées dans le lymphome folliculaire conventionnel (64) (65). Ces résultats génétiques suggèrent que la NFIS correspond à un stade précoce de la lymphomagenèse et qu'elle est constituée de cellules présentant un clone précurseur et non de réelles cellules lymphomateuses.

En plus de la translocation du gène *BCL2*, des mutations ponctuelles du gène *EZH2* (Y641) ont également été rapportées (65).

#### f) Pronostic

Les conséquences cliniques de la NFIS ne sont pas entièrement comprises en partie à cause de la période de suivi des cohortes relativement courte au sein des études.

Cependant, il a été démontré récemment que la NFIS, diagnostiquée fortuitement chez un patient sans antécédent, a un très faible taux de progression clinique.

Par exemple, l'équipe de Jegalian *et al.* a montré, chez les patients dont la NFIS avait été diagnostiquée de façon fortuite et sans aucune preuve de LF conventionnel associée lors de l'évaluation clinique, que le risque de la présence d'un LF était de 4,8% après une médiane de suivi de 41 mois (66). Aujourd'hui, aucun facteur clinique, histologique ou moléculaire prédictif d'une évolution vers un lymphome manifeste n'a été identifié.

Néanmoins, de rares NFIS peuvent être associées à un lymphome déjà présent. Comme attendu, il s'agit le plus souvent d'un lymphome folliculaire conventionnel. Mais d'autres types de lymphomes ont été décrits comme, par exemple, le lymphome B diffus à grandes cellules, le lymphome de la zone marginale (60), ou encore le lymphome T périphérique (67). Le pronostic dépend alors du type de lymphome associé.

### *g) Diagnostics différentiels*

Les caractéristiques de ce variant font de l'hyperplasie folliculaire réactionnelle, un important diagnostic différentiel. En effet, la colonisation des centres germinatifs par les cellules porteuses de la t(14;18), observée dans la NFIS, ne permet pas à elle seule d'expliquer l'aspect hypertrophique du ganglion, suggérant que l'hyperplasie folliculaire est présente en arrière-plan. Bien que le follicule de la NFIS puisse montrer une absence de polarisation, une absence de macrophage à corps tingibles ou du nombre de mitoses et un aspect globalement plus monomorphe, c'est l'analyse immunohistochimique, par l'absence de marquage des follicules par l'anticorps anti-BCL2, qui permettra d'écarter le diagnostic d'hyperplasie folliculaire réactionnelle.

Le second diagnostic différentiel est l'atteinte partielle du ganglion par un lymphome folliculaire conventionnel dénommé alors « envahissement partiel par un lymphome folliculaire » (EPLF). Ce diagnostic est important à différencier de la NFIS car il présente un risque plus élevé d'évolution vers un LF manifeste. En effet, une étude a montré, sur une période de suivi de 14 ans, que près de la moitié des patients atteints d'EPLF et non traités, développait un LF conventionnel (66). Contrairement à la NFIS, l'EPLF présente une architecture partiellement altérée. Les follicules tumoraux sont regroupés entre eux, mal limités et le plus souvent augmentés en taille. Ils ne sont pas seulement constitués de centrocytes, mais aussi de quelques centroblastes. Le marquage des anticorps anti-CD10 et anti-BCL2 des centres germinatifs tumoraux est plus variable en intensité que ceux de la NFIS. De plus, les cellules atypiques ne sont pas seulement limitées au sein des centres germinatifs tumoraux, mais peuvent aussi être observées dans les espaces interfolliculaires.

## 2. Variant diffus du lymphome folliculaire

### a) *Définition*

Ce variant est défini par son architecture diffuse prédominante et par l'absence de la translocation équilibrée  $t(14;18)(q32;q21)$ , caractéristique du LF.

### b) *Épidémiologie*

Ce variant est rare et survient à un âge moyen d'environ 57 ans, sans distinction de genre. Sa topographie se situe préférentiellement dans la région inguinale. Il est caractérisé cliniquement par une masse tumorale, en moyenne plus volumineuse, mais avec une tendance moindre à disséminer (68).

### c) *Morphologie*

L'architecture ganglionnaire est effacée par une prolifération lymphomateuse dont l'architecture prédominante est diffuse (>75% de la prolifération tumorale). De rares petits follicules tumoraux résiduels y sont entremêlés au sein desquels siège une majorité de centrocytes associée à quelques centroblastes. Les zones diffuses renferment une population lymphomateuse majoritairement centrocytaire, de grade cytologique 1-2. Par ailleurs, les noyaux tumoraux sont peu incisurés et plus arrondis.

### d) *Immunohistochimie*

L'architecture diffuse de la prolifération tumorale est confirmée par l'absence de réseau folliculaire dendritique (RFD) normalement marqué par les anticorps anti-CD21 et anti-CD23. Néanmoins, ces anticorps permettent la mise en évidence du RFD des petits follicules tumoraux résiduels, souvent difficile à identifier sur coloration standard.



Les cellules lymphomateuses expriment les anticorps anti-CD20, anti-BCL6, anti-CD10 mais ont également la particularité d'exprimer l'anticorps anti-CD23 de manière intense et diffuse.

Les follicules tumoraux résiduels n'expriment pas la protéine BCL2 et l'index de prolifération du Ki67 y est plus élevé que dans les zones diffuses (69). L'anticorps anti-STAT6 marque 10 à 20 % de la prolifération tumorale dans plus de 80% des cas (70).

#### *e) Cytogénétique et biologie moléculaire*

Ce variant est caractérisé par l'absence de la translocation caractéristique t(14;18)(q32;q21). L'anomalie cytogénétique récurrente la plus souvent observée, est la délétion des bras courts d'un chromosome 1 en position 36 ou del(1p36) (69). Cette délétion contient le gène *TNFRSF14* (tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member)). Des mutations ponctuelles de STAT6 ont également été décrites dans plus de 80% des cas d'une série de 11 lymphomes folliculaires de variant diffus, contre 11% des lymphomes folliculaires conventionnels (70). Ces mutations étaient détectables par étude immunohistochimique grâce à l'anticorps anti-STAT6 (marquage nucléaire). L'association LF et mutation activatrice de STAT6 entraînerait, au sein des cellules lymphomateuses, une réponse transcriptionnelle exagérée à l'IL4 (interleukine 4) aboutissant à une augmentation de la prolifération tumorale.

#### *f) Pronostic*

Ce variant est le plus souvent diagnostiqué à un stade localisé. Sur une médiane de suivi de 19 mois, une étude a montré que pratiquement l'ensemble des patients était en rémission complète après traitement (61).

### *g) Diagnostics différentiels*

L'architecture principalement diffuse de ce variant amène le problème des diagnostics différentiels de lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) et du lymphome de la zone marginale. Néanmoins, les cellules tumorales du DLBCL sont de plus grande taille, de type centroblastique, écartant ce diagnostic.

L'étude immunohistochimique permet également d'écarter le diagnostic de lymphome de la zone marginale.

## 3. Lymphome folliculaire de type duodénal (LFTD)

### *a) Définition*

Ce variant est défini comme un lymphome folliculaire indolent, de stade localisé et de topographie intestinale, préférentiellement dans la seconde portion du duodénum. Il est le plus souvent diagnostiqué fortuitement par endoscopie digestive haute réalisée lors d'un bilan pour une toute autre cause. Il se présente sous la forme de multiples petites lésions polypoïdes.

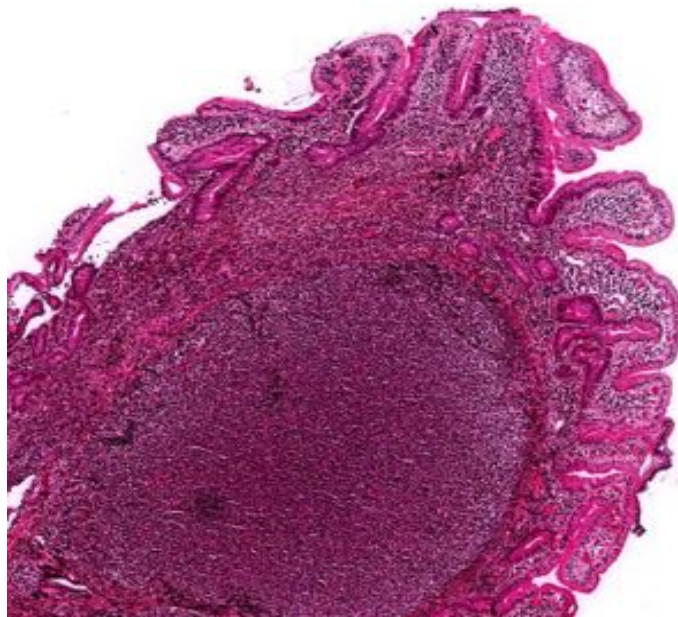
### *b) Épidémiologie*

Bien que le lymphome folliculaire soit fréquent, ce variant ne représente qu'entre 1 et 4% de l'ensemble des lymphomes du tube digestif (71). Il survient à un âge moyen, sans distinction de genre.

### *c) Morphologie*

Ce variant renferme au sein de la muqueuse et/ou de la sous-muqueuse duodénale des follicules tumoraux constitués, dans plus de 95% des cas, d'une population de centrocytes mêlés à de rares centroblastes équivalent à un grade 1-2 selon le grade cytologique du

lymphome folliculaire (72). Les cellules lymphomateuses infiltrent également les villosités duodénales et peuvent dépasser la lame basale.



Lymphome folliculaire de type duodénal, lame scannée, HES x4

#### *d) Immunohistochimie*

Le profil immunohistochimique du lymphome folliculaire de type duodénal est similaire au lymphome folliculaire conventionnel de bas grade.

Néanmoins, le réseau folliculaire dendritique, mis en évidence par les anticorps anti-CD21 et anti-CD23, a la particularité d'être restreint à la périphérie du follicule tumoral, occupant alors moins de 10% de l'ensemble de sa surface. De façon intéressante, l'équipe de Takata a montré que l'interaction des cellules folliculaires dendritiques, au sein des centres germinatifs, favorisait la prolifération des cellules lymphomateuses (73). Une faible quantité de RFD pourrait alors expliquer le caractère très indolent du LFTD.

Les protéines AID (activation-induced cytidine Deaminase) et BACH2 jouent un rôle clé dans le changement de classe et les hypermutations somatiques des cellules B normales et tumorales. Dans le lymphome folliculaire conventionnel, le profil d'expression retrouvé est AID+/BACH2-. Le lymphome folliculaire de type duodénal, quant à lui, se caractérise

par un profil spécifique AID-/BACH2+, avec BACH2 exprimé en périphérie des follicules tumoraux et au sein des villosités duodénales. Le CD27 (marqueur spécifique de différenciation des lymphocytes B mémoires) est également positif montrant que les cellules tumorales possèdent des caractéristiques du lymphocyte B mémoire (74).

#### *e) Génétique et cytogénétique*

La translocation t(14;18)(q32;q21) est présente dans environ 90% des cas de LFTD confirmant son appartenance à la famille du lymphome folliculaire. Néanmoins, les anomalies additionnelles sont moins nombreuses que dans le LF conventionnel systémique.

L'équipe de Takata a montré, en définissant le profil d'expression génétique de ce variant, une surexpression des gènes *CCL20* et *MADCAM1*, non retrouvée dans le profil habituel du LF conventionnel mais observée dans celui du lymphome de la zone marginale de type MALT (75).

L'utilisation restreinte de la région variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV) est également décrite, autre caractéristique habituelle du lymphome du MALT (76). Ces résultats suggèrent que le LFTD partage des caractéristiques communes avec le lymphome du MALT et le lymphome folliculaire conventionnel systémique.

#### *f) Pronostic*

Contrairement à la forme conventionnelle, les LFTD sont pour la très grande majorité de stade localisé, selon la classification de Lugano. Le risque de dissémination et de transformation est très faible, inférieur à 10%. Le grade cytologique du LF conventionnel ne s'applique donc pas en raison du caractère très indolent associé. Une stratégie de surveillance est le plus souvent préconisée.

*g) Diagnostics différentiels*

Le principal diagnostic différentiel est le lymphome folliculaire conventionnel systémique ayant disséminé dans le tube digestif. Cependant, un ensemble d'arguments, décrit dans le tableau I, permet d'écarter ce diagnostic.

L'histologie de lymphome B de bas grade et la topographie digestive de ce variant permettent également d'évoquer les diagnostics différentiels de lymphome du manteau et de la zone marginale de type MALT. Néanmoins, les caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques spécifiques de chacune de ces entités permettent de les écarter. En effet, le lymphome du manteau a une architecture nodulaire et est constitué de petites cellules lymphomateuses exprimant le CD5 et la cycline D1.

Le lymphome de type MALT est plus souvent de localisation gastrique, et les cellules lymphomateuses n'expriment pas le BCL6 ou le CD10.

<b>Lymphome folliculaire de type duodéal</b>	<b>Lymphome folliculaire conventionnel disséminé au duodénum</b>
Très indolent	Indolent
Absence d'adénopathie mésentérique associée	Présence d'adénopathies mésentériques associées
Risque de transformation très faible	Risque de transformation entre 30-50%
RFD occupant <10% du follicule et localisé dans sa périphérie	RFD occupant environ 75% du follicule
Grade 1-2	Grade 1-2 ou grade 3
AID-/BACH2+	AID+/BACH2-
CD27+	CD27-
Caractéristiques moléculaires communes avec le lymphome de type MALT	Caractéristiques moléculaires du lymphome folliculaire conventionnel

**Tableau I. Critères spécifiques du LFTD et du LF systémique localisé dans le tube digestif.**

#### 4. Lymphome folliculaire de type testiculaire

##### a) *Définition*

Ce variant est défini comme un lymphome folliculaire de grade 3, indolent et localisé au testicule.

##### b) *Épidémiologie*

Ce variant est rare et survient préférentiellement chez l'enfant ou l'adolescent mais peut également s'observer chez l'adulte (77). Le mode de révélation se fait par une augmentation unilatérale et non douloureuse de la taille d'un testicule, sans autre symptôme associé. Le stade de la maladie au diagnostic est localisé, de stade IE, selon la classification d'Ann Arbor.

##### c) *Morphologie*

Les parenchymes testiculaire et de l'épididyme sont partiellement remplacés par une prolifération de cellules lymphomateuses avec le plus souvent les caractéristiques du lymphome folliculaire de grade 3A. Une fibrose plus ou moins abondante peut être associée (78).

##### d) *Immunohistochimie*

Les cellules lymphomateuses possèdent le phénotype centro-germinatif habituel, en exprimant le CD10 et le BCL6. Néanmoins, les cellules tumorales de l'ensemble des follicules tumoraux n'expriment pas la protéine BCL2. L'index de prolifération du Ki67 est élevé, entre 40% et 80% (77).

e) *Cytogénétique*

Ce variant est caractérisé par l'absence de la translocation équilibrée t(14;18)(q32;q21).

f) *Pronostic*

Malgré le grade cytologique élevé, ce variant est de bon pronostic et un traitement par orchidectomie simple, sans traitement adjuvant associé, est préconisé (79).

g) *Diagnostic différentiel*

Le principal diagnostic différentiel est le lymphome B diffus à grandes cellules, plus fréquemment présent chez l'adulte.

## **F. Autres sous-types**

De nombreux sous-types morphologiques et immunophénotypiques sont décrits dans la littérature, confirmant la grande hétérogénéité du LF.

### 1. Sous-types morphologiques

a) *LF avec différenciation marginale*

La présence d'une différenciation des cellules tumorales en cellules de la zone marginale, anciennement appelé différenciation monocytoïde, est fréquente, observée dans environ 9% des LF. Néanmoins, cette différenciation mime rarement un lymphome de la zone marginale du fait de son caractère très focal (80). Le sous-type de LF avec une différenciation en zone marginale totale, et donc mimant un lymphome de la zone marginale, est exceptionnel. Il se caractérise par une prolifération lymphomateuse d'architecture nodulaire, laissant apparaître des petits follicules englobés résiduels. Le

phénotype immunohistochimique est classique du LF conventionnel avec une expression de la protéine BCL2 et d'au moins un marqueur centro germinatif. L'expression de CD10 comme de BCL6, peut être diminuée au sein des follicules résiduels rendant le diagnostic difficile. Les anticorps centro-germinatifs anti-LMO2 et anti-HGAL, plus sensibles et spécifiques, peuvent alors être utiles pour confirmer le phénotype centro-germinatif des cellules lymphomateuses (50).

De façon intéressante, les anomalies cytogénétiques secondaires sont en plus grand nombre particulièrement au niveau du chromosome 3, caractérisées par une trisomie 3 ou un gain des bras longs d'un chromosome 3 (81).

*b) LF avec différenciation plasmocytaire*

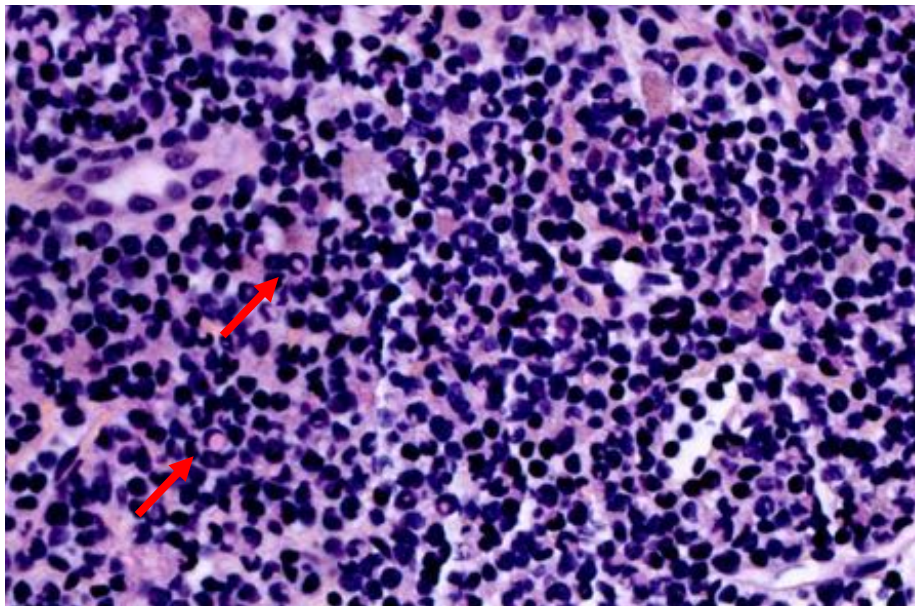
Le plasmocyte est la cellule effectrice ultime du système immunitaire humoral et se développe à partir des lymphocytes B. La différenciation plasmocytoïde dans le lymphome folliculaire est rare.

Histologiquement, elle se présente sous deux formes. La première forme se caractérise par une localisation majoritairement interfolliculaire des cellules plasmocytoïdes et s'associe préférentiellement à un réarrangement du gène *BCL2* alors que la seconde forme s'associe à une différenciation plasmocytoïde intra ou périfolliculaire et se caractérise par une absence du réarrangement du gène *BCL2* (82).

D'un point de vue cytologique, le degré de cette différenciation peut varier, allant de la présence de plasmocytes bien différenciés visibles sur coloration HES standard, à des cellules au noyau excentré et au cytoplasme discrètement basophile sans les autres critères classiques du plasmocyte ou à des cellules dont le caractère plasmocytaire est mis en évidence uniquement par étude immunohistochimique. Les marqueurs plasmocytaires sont les anticorps anti-CD138 ou anti-MUM1 (83). La présence de cellules avec des corps de Dutcher proéminents (pseudo-inclusion intranucléaire volumineuse



correspondant à une accumulation d'immunoglobulines au sein du cytoplasme qui s'invagine dans le noyau) est possible mais non constante. Ces cellules correspondraient à des lymphocytes B du centre post-germinatif partiellement différenciées en plasmocyte et sont le plus souvent mêlées à des plasmocytes bien différenciés (84). Le grading cytologique est majoritairement de grade 1-2 mais peut être de grade 3A ou 3B. Le phénotype des cellules tumorales de ce sous-type peut être CD10- et de façon plus rare BCL6- (83).



Lymphome folliculaire avec différenciation plasmocytaire et présence de corps de Dutcher (flèches rouges) lame scannée, HES x40

*c) LF avec des caractéristiques Castleman-like*

Le lymphome folliculaire comportant des caractéristiques morphologiques rappelant la maladie de Castleman (« Castleman-like ») est un sous-type très rare. Il se caractérise d'une part, par la présence de follicules tumoraux dont les centres germinatifs sont pénétrés par des vaisseaux sanguins hyalinisés réalisant des lésions de type « lollipop », et d'autre part, par un aspect dit en « bulbe d'oignon » de la zone du manteau, dû à une disposition concentrique des cellules folliculaires dendritiques. Cette présentation histologique, typiquement observée dans la maladie de Castleman de forme hyaline

vasculaire, est toujours associée à au moins un secteur, plus ou moins focal, de LF conventionnel, comme l'a observée l'équipe de Pina-Oviedo, dans une série de 6 cas. Néanmoins, certains follicules tumoraux de type conventionnel peuvent se localiser exclusivement au sein du tissu adipeux péri-ganglionnaire, rendant alors le diagnostic périlleux. L'étude par immunohistochimie des cas rapportés montrait l'expression des marqueurs CD20, CD79a, BCL2, CD10 et BCL6 (85).

De façon intéressante, quelques cas rapportés ont montré, au sein des cellules folliculaires dendritiques des lésions de type Castleman, une co-expression de CD23/CD21, marqueurs spécifiques de ce type de cellule, et de CD20 (86).

## 2. Sous types immunophénotypiques

### a) *Lymphome folliculaire CD5+*

Le marqueur CD5 est habituellement négatif dans le LF et son utilisation en routine est très utile afin de le distinguer d'autres types de lymphome B de bas grade, comme par exemple, le lymphome à cellules du manteau ou encore le lymphome de type lymphocytaire.

Cependant, l'équipe de C. Cameron Yin a montré que 2,7% des LF exprimaient le CD5, dont la majorité était détecté seulement par cytométrie de flux (87). Elle a également confirmé que ce sous-type possédait des caractéristiques cliniques globalement plus agressives. En effet, au sein de leur série de 88 patients atteints de LF exprimant le CD5 (détecté par immunohistochimie et/ou cytométrie de flux), une grande majorité se présentait par un stade clinique plus avancé, un index pronostique IPI plus élevé, un risque de transformation en DLBCL augmenté et une survie sans progression diminuée.

Histologiquement, l'architecture folliculaire prédominait et la répartition du grade cytologique était comparable aux LF CD5-.

En comparaison avec l'immunohistochimie, où seuls 37% des cas analysés par l'anticorps anti-CD5 étaient positifs, la cytométrie de flux était plus performante, détectant 99% des cas CD5+. Une seconde étude de 22 cas rapportés, a montré les mêmes caractéristiques cliniques et histologiques, mais décrivait également une positivité augmentée pour les marqueurs MUM1 et CD25 (88).

Au sein des deux séries, la fréquence de la translocation t(14;18) caractéristique du LF était diminuée, retrouvée dans seulement 50% des cas.

#### *b) Lymphome folliculaire CD10-/MUM1+*

La perte d'expression du marqueur centro-germinatif CD10 accompagnée de l'expression du marqueur des cellules B au stade tardif du centre germinatif (CG) ou « post-CG », MUM1, est inhabituelle dans le LF. Ce sous-type, décrit par l'équipe de Karube, survient à un âge globalement plus avancé. Histologiquement, il se caractérise par une prolifération lymphomateuse d'architecture plus fréquemment diffuse et par un grade cytologique plus fréquemment de grade 3A ou 3B. En effet, au sein de leur série de 22 cas CD10-/MUM1+, 91% d'entre eux étaient classés en grade 3A ou 3B contre environ 10 à 20% pour les LF de forme conventionnelle. L'expression du marqueur BCL2 était moins fréquente et la translocation t(14;18) était typiquement absente (observée dans seulement 5% des cas). Néanmoins, des anomalies du gène *BCL6* (translocation ou amplification) ont été observées dans 88% des cas (89).

Le diagnostic différentiel majeur de ce sous-type est le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement du gène *IRF4*, surtout lorsque le prélèvement est localisé dans la région tête et cou. En effet, bien que cette entité exprime les marqueurs centro-germinatifs

CD10 et BCL6, du fait de l'expression constante de MUM1, de l'absence d'expression habituelle de la protéine BCL2 et de l'absence du réarrangement du gène *BCL2*, le médecin pathologiste se doit d'éliminer ce diagnostic différentiel en recherchant le réarrangement du gène *IRF4* par technique FISH et non se baser uniquement sur la morphologie et l'immunophénotype des cellules lymphomateuses (90).

### 3. Lymphome folliculaire composite

Le lymphome composite est défini par la présence d'au moins 2 types histopathologiques de lymphome entremêlés entre eux. Environ 1 à 4% des lymphomes sont composites (91). Il peut être composé par un lymphome de Hodgkin et non-hodgkinien ou par deux lymphomes non-hodgkiniens distincts.

Le LF composite est rare et peut s'associer par exemple à un lymphome de Hodgkin (92) ou un lymphome non-hodgkinien de type lymphocytaire (93) ou encore à un lymphome non-hodgkinien à cellules du manteau.

### 4. Lymphome folliculaire « double hit » et « triple hit »

La combinaison d'un réarrangement du gène *MYC*, caractérisé le plus souvent par la translocation t(8;14)(q24;q23) et impliquant le gène *IGH*, avec le réarrangement d'un autre oncogène, le plus souvent *BCL2* mais aussi possiblement *BCL6*, définit le lymphome « double hit ». Le caractère « triple hit » implique les réarrangements des gènes *MYC*, *BCL2* et *BCL6*. Selon la classification OMS 2016, ces définitions ne concernent que les DLBCL et les lymphomes de haut grade, et apparaissent comme de plus mauvais pronostic (94).

Un peu moins de 3% des lymphomes folliculaires possèdent la caractéristique cytogénétique « double hit » (95). Plusieurs études récentes ont tenté de mieux caractériser ce sous-type afin de savoir si une prise en charge plus agressive devait être privilégiée.

Une première étude a décrit une série de 10 patients ayant un lymphome folliculaire « double hit ». Les réarrangements présents concernaient, pour la majorité, les gènes *MYC* et *BCL2* (8 patients). L'âge médian au diagnostic était de 67 ans, avec une prédominance chez la femme (sexe ratio F/H=2,3). La présentation clinique de la maladie était le plus souvent à un stade avancé. Toutes les caractéristiques histologiques du lymphome folliculaire conventionnel étaient présentes et le grade cytologique était faible pour la grande majorité. L'étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-MYC retrouvait un marquage de plus de 50% des cellules tumorales dans presque tous les cas.

Cette étude a, par la suite, comparé cette série avec une seconde cohorte de patients ayant un lymphome de haut grade « double hit » et montra une différence significative concernant l'intensité du marquage de l'anticorps MYC (plus intense dans les lymphomes de haut grade), la positivité de l'anticorps anti-MIB1 (plus élevée pour les lymphomes de haut grade) et le profil génomique (similaire au LF conventionnel pour le groupe de LF « double hit »). Cette étude semble donc suggérer que le LF « double hit » tend à être agressif mais se différencie tout de même du lymphome de haut grade « double hit » (96).

Dans une autre étude, décrivant une série de 7 patients, la présentation clinique était semblable, c'est à dire le plus souvent de stade disséminé. L'ensemble des cas apparaissait cytologiquement de bas grade, avec parfois un grade cytologique de haut grade associé, mais de façon très focale, ou un index Ki67 élevé mais là aussi de façon très localisé. Néanmoins, les patients répondaient plus efficacement à un schéma

thérapeutique plus agressive, généralement utilisé pour les lymphomes de haut grade « double hit ». Cette étude suggère alors contrairement à la précédente, que ces tumeurs pourraient appartenir au spectre de lymphome de haut grade « double hit » et présenteraient donc un intérêt à les identifier (97).

Une étude très récente en décrivant 1 LF « double hit » et 2 LF « triple hit » a montré les mêmes caractéristiques cliniques plus agressives et histologiques de bas grade. Elle a conclu à l'intérêt d'un traitement plus agressif sans pouvoir l'affirmer à cause d'un trop faible niveau de preuve (98).

## **G. Lymphome folliculaire de type pédiatrique**

Le lymphome folliculaire de type pédiatrique est une nouvelle entité à part entière décrite dans la nouvelle classification OMS 2016.

### **1. Épidémiologie**

Il survient majoritairement chez l'enfant ou l'adulte jeune avec un âge médian au diagnostic compris entre 14 et 17 ans.

Il y a une nette prédominance masculine avec un sexe ratio H/F égal à 10. La présentation clinique se caractérise par une volumineuse adénopathie unique de la région de la tête et du cou (en cervical, submental, submandibulaire, post-auriculaire ou encore périparotidien). Les localisations inguinale ou fémorale sont possibles mais plus rares. Le stade clinique est localisé, de grade I selon la classification d'Ann Arbor (99) (100).

## 2. Morphologie

L'architecture ganglionnaire est effacée par une prolifération lymphomateuse d'architecture folliculaire pure. Elle est constituée par des larges follicules tumoraux aux contours serpigneux, expansifs, parfois confluent, pouvant atteindre un diamètre de plus de 2 mm. A faible grossissement, ces follicules ont un aspect en ciel étoilé, du fait de la présence de macrophages à corps tingibles. Les cellules lymphomateuses y sont monomorphes, d'aspect blastoïde-like ou centroblastique ; elles se caractérisent par une taille moyenne à grande, un cytoplasme peu abondant et un noyau rond ou ovalaire avec une chromatine vésiculeuse et agglomérée, et un petit nucléole. Les centrocytes sont présents mais rares. Le grade cytologique, bien que non applicable pour cette entité, est similaire à un grade élevé, 3A ou 3B.

La zone du manteau est fine voire absente. A la périphérie de la prolifération lymphomateuse, un rim de parenchyme ganglionnaire normal peut persister, «node within a node» (99).

## 3. Immunohistochimie

L'ensemble des cellules lymphomateuses expriment les marqueurs pan-B (CD79a et CD20) ainsi que les marqueurs centro-germinatifs (CD10 et BCL6). En contraste avec le lymphome folliculaire conventionnel, les cellules néoplasiques de cette entité sont généralement négatives, ou partiellement positives sans marquage intense, avec l'anticorps anti-BCL2 (100).

L'index de prolifération du Ki67, évalué avec l'anticorps anti-MIB1, est typiquement élevé, compris entre 40% et 95%. Le marquage nucléaire intense des cellules néoplasiques par

l'anticorps anti-MIB1 souligne également l'absence de polarisation des volumineux follicules tumoraux. L'anticorps anti-MUM1 est positif dans environ 20% des cas (99).

Les anticorps anti-CD21 et anti-CD23 mettent en évidence un réseau folliculaire dendritique marqué et intact. L'anticorps anti-IgD est négatif pour les cellules lymphomateuses et identifie une zone du manteau atténuée et fine (101).

#### 4. Cytogénétique et biologie moléculaire

Les réarrangements des gènes *BCL2*, *BCL6*, *MYC* ou *IRF4* ainsi que l'amplification du gène *BCL2* sont toujours absents et la présence d'une de ces anomalies exclut le diagnostic de LFTP.

Cette entité se caractérise par une prolifération monoclonale de cellules B où une clonalité y est détectée dans 100% des cas (102).

Néanmoins, contrairement au LF conventionnel, il a été démontré que le lymphome folliculaire de type pédiatrique se caractérisait par une complexité génomique extrêmement faible. Les altérations du gène *TNFRSF14*, par une perte d'hétérozygotie récurrente au locus 1p36 du chromosome 1, ont été décrites comme l'un des événements génétiques majeurs et sont présentes dans 54% des cas (102). Les deux autres gènes les plus fréquemment altérés sont *IRF8* (facteur de transcription interféron 8) (103) et *MAP2K* (activant la voie de signalisation MEK/ERK) (104).

Les mutations épigénétiques, notamment des gènes *EZH2* et *CREBBP* sont rarement observées dans le LFTP suggérant un mécanisme physiopathologique différent et propre à cette entité. Dans presque 20% des cas, aucune altération génétique n'est identifiée hormis la clonalité B.



## 5. Pronostic

L'évolution clinique est typiquement indolente avec un pronostic excellent, évalué à plus de 95% de survie à 5 ans (99).

La stratégie thérapeutique n'est pas consensuelle. En effet, même si une surveillance seule (« watch and wait ») ou une prise en charge chirurgicale par excision de l'adénopathie ont prouvé leur efficacité (105), la plupart des patients adultes sont traités par radiothérapie ou immunochimiothérapie, principalement en raison de la cytologie compatible avec un grade 3B. Le pathologiste émet alors le plus souvent une réserve.

## 6. Diagnostics différentiels

Plusieurs diagnostics différentiels sont à écarter lors du diagnostic de cette entité.

Tout d'abord, de rares cas d'hyperplasie folliculaire réactionnelle mimant morphologiquement un LFTP, par ses volumineux follicules en ciel étoilé associés à une clonalité monoclonale CD10+ des lymphocytes B, ont été décrits (106) prouvant que la présence de cette dernière n'est pas suffisante à elle seule pour trancher entre ces deux diagnostics. Cependant, leur distinction est généralement possible ; en effet, contrairement à l'hyperplasie folliculaire réactionnelle, la plupart des cas de LFTP ont plutôt des follicules de forme irrégulière, confluants et non polarisés. De plus, ils présentent une zone du manteau anormalement atténuée. L'étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-PD1 peut également être utile en mettant en évidence un nombre diminué de lymphocytes TFH, localisés seulement dans la périphérie des follicules néoplasiques (102). De plus, une étude récente a montré que l'expression de FOX-P1 (Forkhead Box P1), facteur de transcription impliqué notamment dans le développement des cellules B et la régulation de

la réponse immune, était constante dans le LFTP et absente dans l'hyperplasie folliculaire réactionnelle (100).

Ensuite, il faut écarter le diagnostic de lymphome B à grandes cellules avec réarrangement du gène *IRF4*. De façon similaire au LFTP, cette entité provisoire de l'OMS 2016 survient préférentiellement chez les enfants et adultes jeunes mais sans distinction de genre. Le stade clinique est le plus souvent localisé et la maladie se localise dans la région de la tête et du cou. Morphologiquement, son architecture peut être folliculaire pure et les cellules lymphomateuses sont de grande taille, blastoïdes-like. Le réarrangement du gène *BCL2* est également absent (107). Néanmoins, l'absence d'aspect en ciel étoilé des follicules, l'immunopositivité plus fréquente de *BCL2* (63% contre 18% pour le LFTP) et constante de *MUM1*, ainsi que la présence du réarrangement du gène *IRF4*, détecté par technique FISH, permettent d'écarter ce diagnostic.

Le diagnostic de lymphome folliculaire de grade 3B d'architecture folliculaire pure sans réarrangement du gène *BCL2* doit également être évoqué comme diagnostic différentiel. L'immunophénotype de ces cellules lymphomateuses, préférentiellement CD10-, aide à l'identifier. De plus, une partie d'entre elles possède un réarrangement du gène *BCL6*, ce qui n'est jamais le cas pour le LFTP (108).

Le dernier diagnostic différentiel à évoquer devant un LFTP est le lymphome pédiatrique de la zone marginale. En effet, cette entité survient chez l'enfant ou l'adulte jeune et peut morphologiquement être d'architecture folliculaire. Cependant, la disposition des follicules non accolée ou consécutive, la zone interfolliculaire renfermant un nombre beaucoup plus élevé de cellules B, la population lymphomateuse plus polymorphe avec de rares blastes et l'immunophénotype tumoral non centrogerminatif (CD10-/BCL6-) permettent d'écarter ce diagnostic.

## H. Le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4

Le lymphome B à grande cellules avec réarrangement IRF4 est une entité provisoire de la nouvelle classification 2016 de l’OMS.

### 1. Épidémiologie

Cette nouvelle entité est rare et représente selon l’OMS 0,05% de l’ensemble des lymphomes B diffus à grandes cellules (25). Même si l’âge médian au diagnostic est de 12 ans, il peut survenir à tout âge, avec des cas décrits allant de 4 à 79 ans. Néanmoins cette maladie est plus significativement fréquente chez les enfants (<18 ans) que chez les adultes (107). Il n’est pas observé de distinction de genre. Sa localisation est préférentiellement dans la région tête et cou, en particulier au sein de l’anneau de Waldeyer (101).

### 2. Morphologie

L’architecture de la prolifération lymphomateuse est variable : elle peut être entièrement diffuse comme partiellement ou totalement folliculaire.

Les cellules tumorales sont de taille moyenne à grande, d’aspect blastoïde-like. Leur noyau possède une chromatine un peu moins dense que celle habituellement observée au sein des centrocytes et il comporte un petit nucléole basophile. Lorsque l’architecture est folliculaire, les follicules néoplasiques sont volumineux et plutôt bien limités et la zone du manteau est atténuée ou absente. Par ailleurs, les figures de mitose sont peu fréquentes et l’aspect en ciel étoilé absent.

### 3. Immunohistochimie

Les cellules lymphomateuses expriment les marqueurs pan-B (CD20 et CD79). Le marqueur centro-germinatif BCL6 est généralement fortement exprimé alors que le CD10 et la protéine BCL2 ne sont exprimés que dans 66% des cas (107). Le marqueur MUM1 est typiquement fortement exprimé par l'ensemble de la lymphoprolifération. L'index de prolifération du Ki67 est généralement élevé, sans polarisation des follicules néoplasiques éventuels.

La co-expression de CD10, BCL6 et MUM1 au sein d'une prolifération lymphomateuse doit être un signe d'appel fort en faveur de ce diagnostic.

### 4. Cytogénétique

L'évènement cytogénétique majeur de cette nouvelle entité est le réarrangement du gène *IRF4* avec le gène *IGH*.

L'analyse FISH permet de mettre en évidence, avec une sonde Break-apart couvrant le gène *IRF4*, ce réarrangement, confirmant ainsi le diagnostic.

A noter que cette translocation réciproque est le plus souvent cryptique donc non visible au caryotype.

Un réarrangement du gène *BCL6* associé peut être présent mais n'est pas constant. Cependant, les réarrangements des gènes *MYC* et *BCL2* sont toujours absents (107).

## 5. Pronostic

Cette maladie est cliniquement indolente. Après un traitement chirurgical et un protocole par immunochimiothérapie (R-CHOP), les patients ont une évolution favorable, sans récurrence notable, contrastant avec l'évolution du lymphome folliculaire de haut grade ou du lymphome B diffus à grandes cellules (100).

## 6. Diagnostics différentiels

Comme décrit précédemment, le LFTP est un important diagnostic différentiel.

Par ailleurs, du fait de son architecture diffuse ou folliculaire avec des cellules lymphomateuses de grande taille, d'aspect blastoïde-like, mimant un grade cytologique de haut grade, le lymphome folliculaire de grade 3B et le lymphome B diffus à grandes cellules sont des diagnostics différentiels importants, souvent évoqués en première hypothèse diagnostique, car plus communément rencontrés en routine.

## **XIV. L'épigénétique dans le lymphome folliculaire : la cible EZH2**

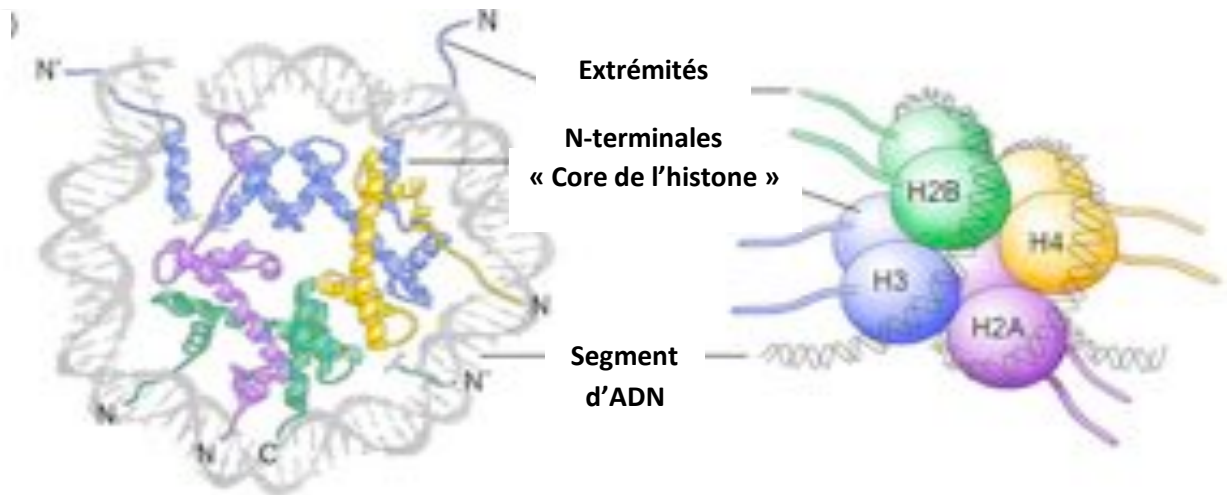
EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) est un régulateur épigénétique de l'expression des gènes et joue un rôle fondamental dans de nombreuses formes de cancers. Il s'agit d'une enzyme histone méthyl-transférase (HMT) pouvant catalyser la mono-méthylation, la di-méthylation et la tri-méthylation du résidu lysine 27 de l'histone H3 (respectivement H3K27me1, H3K27me2 et H3K27me3), cette dernière étant impliquée dans le maintien de la répression de la transcription de gènes.

Une surexpression ainsi que des mutations activatrices d'EZH2, définies comme *drivers* oncogéniques, ont été récemment décrites au sein des lymphomes folliculaires, constituant une récente cible thérapeutique.

### **A. Généralités d'épigénétique**

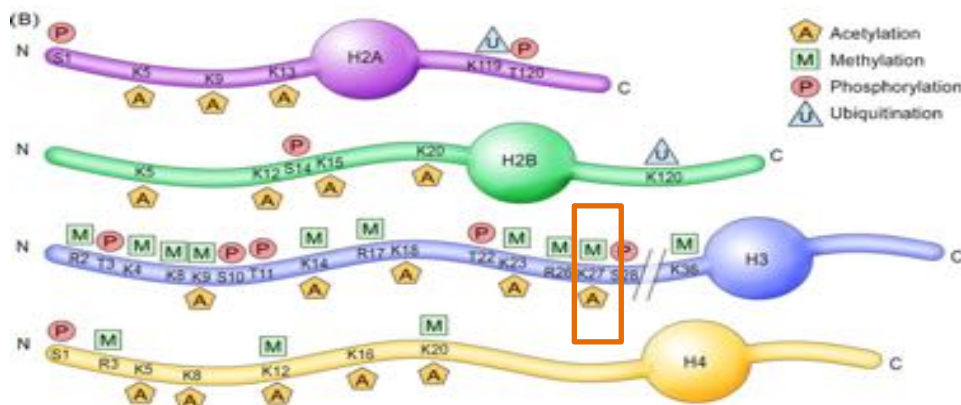
Le matériel génétique, constitué par l'ADN, est condensé, au sein des noyaux, grâce à des protéines. La chromatine est définie par cette association ADN-protéines et a comme unité de base, le nucléosome. Ce dernier est constitué d'un octamère d'histones : deux dimères H2A et H2B et un tétramère H3-H4, autour duquel s'enroule un segment d'ADN de 147 paires de bases (pb).

Les histones sont des protéines de petite taille (11 à 15 kDa) qui comportent une partie centrale, nommée « core de l'histone », constitué de trois hélices  $\alpha$  reliées par deux boucles  $\beta$ . Ces protéines forment le nucléosome qui se lie à l'ADN. Les extrémités N-terminales, également appelées « queue de l'histone », font saillies à l'extérieur du nucléosome et ont la particularité d'être riche en résidus lysine (K) et arginine (R) (109).



**Figure 9. Structure du nucléosome** : il est constitué d'un octamère d'histones H2A, H2B, H3 et H4 autour duquel s'enroule un segment d'ADN. Les extrémités N-terminales dépassent du « core d'histone » (d'après Gräff et Mansuy, Behavioural Brain Research, 2008).

Ces résidus lysines et arginines sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles par des acétylations, méthylations ou encore par des phosphorylations, aboutissant à différents degrés de compaction de l'ADN. Cet ensemble de modifications définit le « code des histones » et constitue un mécanisme clé du contrôle de l'expression des gènes.



**Figure 10. « code des histones »** : les résidus lysines, arginines et plus rarement sérines/thréonines des extrémités N-terminales des histones sont la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles constituant le « code des histones», impliqué dans le contrôle de l'expression des gènes (d'après Gräff et Mansuy, Behavioural Brain Research, 2008)

En particulier, les méthylations des histones, contrairement aux acétylations ou aux phosphorylations, ne modifient pas la charge de l'ADN, mais entraînent seulement un changement de condensation de la chromatine, impliqué dans l'activation ou la répression de la transcription. Elles peuvent survenir simultanément au sein d'une même histone ou au sein d'histones différentes.

Les résidus lysines peuvent être mono-, di-, ou tri méthylés par des enzymes histones méthyl-transférases (HMT) qui sont caractérisées par un domaine SET (Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax), responsable de l'activité enzymatique.

Lors de la méthylation du résidu lysine 27 de l'Histone H3 (H3K27), la protéine à domaine SET intervenante est EZH2 qui est située sur les bras longs du chromosome 7 en position q36 et qui appartient au complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2).

## **B. Le complexe PRC2**

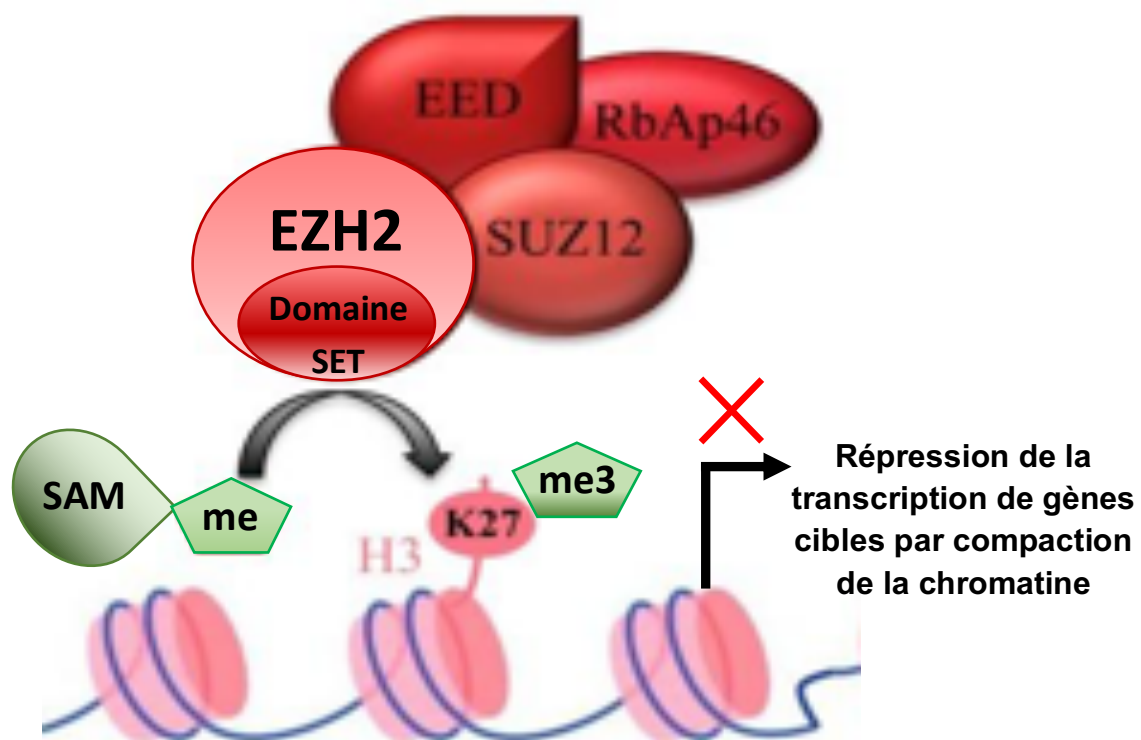
Le complexe PRC2 est principalement composé de 4 protéines EED (Embryonic Ectoderm Development), SUZ12 (SUppressor of Zeste 12), RBAP46/48 (RBBP4 ; Retinoblastoma binding protein 46/48) et EZH1/2 (Enhancer of Zeste 1/2). Bien que EZH2 comporte l'activité enzymatique du complexe, le domaine SET de EZH2 isolé, sans ses partenaires EED et SUZ12, adopte une conformation inactive, empêchant la liaison entre le donneur de méthyl, appelé SAM (S-adenosyl-l-méthionine), et le résidu lysine. Le recrutement de l'ensemble du complexe par différentes interactions est donc nécessaire afin de lever cette auto-inhibition.

Par exemple, la protéine EED permet de reconnaître et de fixer des marques histones comme H3K27me3. Cette fixation entraîne l'activation du complexe PRC2 favorisant ainsi la propagation de cette tri-méthylation à l'ensemble de la chromatine.



Une fois l'ensemble du complexe recruté au niveau de séquences cibles de la chromatine, la lysine 27 peut être méthylée. Cette méthylation est processive, c'est-à-dire qu'elle se déroule par étapes successives. Afin d'aboutir à la marque H3K27me3, il va alors être nécessaire que cette lysine soit au préalable mono- puis di-méthylée.

L'état de méthylation de H3K27 modifie la fonction de l'histone H3. En effet, la marque H3K27me1 est associée aux gènes activement transcrits. H3K27me2 représente environ 70% des histones H3 et correspond à un état transitoire de protection de la lysine, empêchant cette dernière d'être acétylée, favorisant ainsi le passage à l'H3K27me3 (110). La marque H3K27me3 permet la répression de la transcription de différents gènes spécifiques.



**Figure 11. Modèle du complexe PRC2 :** le complexe est composé de 4 partenaires dont, EZH2 qui porte l'activité catalytique par son domaine SET. L'interaction de l'ensemble de ces partenaires active le domaine SET permettant au donneur de méthyle SAM de se lier à la marque H3K27me2 et d'y ajouter un méthyle pour aboutir à la marque H3K27me3. Cette dernière diminue la transcription de gènes cibles. (D'après Herviou L, Oncotarget 2016)

## C. Rôle d'EZH2 dans la lymphopoïèse des cellules B

EZH2 joue un rôle fondamental lors de la prolifération et la différenciation normale des cellules B.

Dans un premier temps, l'expression d'EZH2 varie au sein des cellules progénitrices B de la moelle osseuse. En effet, le niveau d'EZH2 est élevé dans les cellules progénitrices pro-B et largement diminué dans les cellules pré-génitrices pré-B, suggérant le rôle d'EZH2 dans le mécanisme de la transition des cellules pro-B vers les cellules pré-B. De plus, en conditions expérimentales *in vivo*, les cellules pro-B déficientes en EZH2 sont altérées dans leur développement, principalement en raison d'un manque de production de chaînes  $\mu$  d'immunoglobuline (111).

Dans un second temps, EZH2 est grandement impliquée dans le développement des cellules B du centre germinatif (CG), dont le principal rôle est la création et le maintien d'une réponse immunitaire humorale adéquate.

Lorsque les lymphocytes B activés pénètrent dans le centre germinatif et se différencient en centroblastes, ces derniers entrent en division cellulaire; le taux de la marque H3K27me3 augmente alors sensiblement, grâce à une hausse de l'expression d'EZH2. Ce phénomène va engendrer une répression de l'expression des régulateurs négatifs du cycle cellulaire (CDKN2A et CDKN1A) (112) et des facteurs de transcription de la différenciation cellulaire (BLIMP1 et IRF4), empêchant transitoirement la différenciation des cellules immatures du CG. L'augmentation d'H3k27me3 va par la suite, inhiber les voies de réponse aux dommages de l'ADN, permettant la survie des centrocytes.

Lorsque les centrocytes quittent le CG, l'expression d'EZH2 diminue conduisant à la « dé-répression » des gènes cibles d'EZH2 cités précédemment, dans le but de favoriser la maturation des plasmocytes (113).

## **D. Surexpression d'EZH2**

La surexpression d'EZH2, s'observant dans de nombreux types de cancer solides ou lymphomateux, est corrélée à un plus mauvais pronostic par augmentation de la prolifération cellulaire et de l'agressivité des cellules tumorales.

Elle est décrite dans plusieurs types de lymphome agressif, tels que le lymphome de Burkitt (100%), le LF de grade 3 (87%) ou encore le DLBCL (85%) (114).

Cette surexpression permet au complexe PRC2 d'augmenter la proportion de la marque H3K27me3 qui va se placer au niveau de différents gènes cibles suppresseurs de tumeur, aboutissant à une diminution de leur expression.

## **E. Mutations somatiques activatrices de l'EZH2**

Des mutations récurrentes de l'exon 15 du domaine catalytique SET de l'EZH2 ont été décrites dans 25% des lymphomes folliculaires ou des lymphomes B diffus à grandes cellules de type centre germinatif (115).

La principale mutation ponctuelle, présente dans 22% des LF entraîne un échange de la tyrosine en position 641 (Y641) avec un autre acide aminé (Y641X), tel que la phénylalanine (Y641F), l'alanine (Y641A), l'histidine (Y641H) ou encore la sérine (Y641S) (116).

Cette mutation est hétérozygote, c'est-à-dire qu'un allèle mutant est toujours associé à un allèle sauvage.

L'équipe de Sneeringer C. et *al.* a cependant constaté que les variants EZH2 agissaient de façon dominante au sein de la cellule tumorale mutée ; en effet, même si les quantités d'allèles mutantes et sauvages étaient équimolaires, les cellules lymphomateuses EZH2

Y641X affichaient un taux d'H3K27me3 significativement plus élevé et un H3K27me2 diminué.

Le mécanisme probable suggéré est qu'EZH2 non muté ou « wild type » (EZH2 WT) a comme cible préférentielle H3K27 non méthylé ou H3k27me1 et favorise donc la mono-méthylation ou la di-méthylation de H3K27. Or, le mutant EZH2 Y641X quant à lui, cible de préférence H3K27me2, et possède une affinité plus faible pour H3K27 et H3K27me1 (117) (118).

Ce mécanisme est donc dépendant de la coordination entre l'activité enzymatique normale (EZH2-WT) qui va dans un premier temps mono- et di-méthyler H3K27 et l'activité enzymatique muté (EZH2 Y641X) qui va catalyser la mise en place de la marque H3K27me3.

D'autres mutations somatiques du domaine SET, beaucoup moins fréquentes, ont été identifiées, comme par exemple au niveau de l'acide aminé alanine en position 677 (A677) (119). Le mécanisme de la mutation A677, caractérisée par le remplacement de l'alanine par une glycine (A677G), ne nécessite pas de coopération avec l'allèle normal. En effet, cette mutation favorise la méthylation de H3K27me2, tout en gardant sa capacité de mono-, di- ou tri-méthyler H3K27.

# OBJECTIFS DE L'ETUDE

## I. Objectif principal

Le lymphome folliculaire est une entité regroupant une grande variété de présentations morphologiques et phénotypiques, et abonde de subtilités diagnostiques (grade cytologique, variants, diagnostics différentiels,...).

La classification OMS 2016 des lymphomes a démembré deux nouvelles entités à part entière qui complexifient davantage le diagnostic de lymphome folliculaire : le lymphome folliculaire de type pédiatrique, et le lymphome B diffus à grandes cellules avec réarrangement d'IRF4, dont les pronostics sont meilleurs que celui d'un lymphome folliculaire classique.

L'objectif principal de notre étude était donc, à partir d'une cohorte de lymphomes folliculaires recueillie sur 2 années au sein de notre Institut :

- de décrire précisément les différents variants du lymphome folliculaire,
- de décrire les atypies morphologiques et phénotypiques du lymphome folliculaire,
- de reclasser certains diagnostics dans les nouvelles catégories OMS 2016 ; le lymphome folliculaire de type pédiatrique ou le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4
- et de proposer, à la lumière de ces précisions, une stratégie d'examens complémentaires permettant d'éliminer les diagnostics différentiels du lymphome folliculaire « classique ».

## **II. Objectifs secondaires**

### **A. Impact de la relecture des lymphomes folliculaires dans le cadre du réseau national LYMPHOPATH**

Le diagnostic anatomopathologique de lymphome folliculaire est difficile et nécessite dans certains cas une seconde lecture par un pathologiste spécialisé en hématopathologie, par le biais du réseau national LYMPHOPATH.

Un des objectifs secondaires était d'analyser la concordance entre le diagnostic initial avant relecture et le diagnostic final après relecture de l'expert, afin d'identifier l'impact potentiel de la relecture dans la prise en charge thérapeutique des patients, et d'identifier par la suite, les critères diagnostiques les plus souvent discordants dans le but de proposer un algorithme permettant de trier les diagnostics nécessitant réellement une relecture.

### **B. Prédiction de la réponse au traitement anti-EZH2**

La mutation activatrice Y641 du domaine catalytique d'EZH2 est décrite dans plus de 20% des lymphomes folliculaires et représente une nouvelle cible thérapeutique très prometteuse grâce au développement de molécules inhibitrices d'EZH2. Toutefois, il est difficile d'identifier les patients susceptibles de répondre au mieux à cette cible thérapeutique. En effet, même si les patients traités porteurs de la mutation activatrice Y641 d'EZH2 ont montré une bonne réponse thérapeutique (ORR (Objective Response Rate)=77%)) dans les premiers résultats de l'essai clinique EPIZYME de phase 2 du Tazemetostat, les patients EZH2 WT traités, ont également montré une réponse non négligeable (ORR=34%).

L'objectif secondaire de l'étude était d'identifier si une technique simple d'immunohistochimie pouvait distinguer des profils de méthylation H3K27 de type muté

(EZH2 Y641-like) et non muté (EZH2 WT-like), et de montrer si ces différents profils étaient corrélés au statut mutationnel EZH2 obtenu par séquençage haut débit.

## **MATERIELS ET METHODES**

- *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 2020-493). 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.

### **I. Objectif principal**

#### **A. Sélection des cas**

Les patients ont été inclus rétrospectivement sur une période de 2 ans entre le 1<sup>er</sup> janvier 2017 et le 31 décembre 2018, sur la base d'un diagnostic de lymphome folliculaire ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, posé dans l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille. L'identification de ces patients a été effectuée par le logiciel Diamic® en utilisant la codification ADICAP (codes lésions J7F4 et J7F5 correspondant respectivement au lymphome B folliculaire et au lymphome B folliculaire et diffus). S'agissant d'une période de transition après la publication de la version 2016 de l'OMS, le diagnostic avait été posé selon les critères de l'OMS 2008 ou 2016.

Les dossiers anatomopathologiques inclus correspondaient :

- Soit aux patients pris en charge initialement par le CHRU de Lille ; le prélèvement a été directement adressé à l'Institut de Pathologie du CHRU de Lille.
- Soit aux patients pris en charge initialement en dehors du CHRU de Lille ; le prélèvement était alors adressé à l'Institut de pathologie de Lille par un autre laboratoire d'anatomo-pathologie, pour relecture ou avis diagnostique, dans le



cadre du réseau national LYMPHOPATH, sous forme de bloc d'inclusion et de lames colorées et/ou immunomarquées.

Différents types de prélèvements ont constitué la cohorte : des biopsies à l'aiguille, des biopsies chirurgicales, des exérèses d'adénopathie ou de masse extra-ganglionnaire, des biopsies ostéo-médullaires ou encore des pièces opératoires.

Les critères d'exclusion ont été :

- Les lymphomes folliculaires à présentation cutanée (primitifs ou systémiques), dont la codification ADICAP J7F7 (correspondant au diagnostic lymphome B centro-folliculaire cutané) était parfois associée.
- les biopsies ostéo-médullaires (BOM) adressées dans le cadre du bilan d'extension d'un lymphome folliculaire déjà connu.

## **B. Données recueillies**

Lors du diagnostic, les prélèvements ont été interprétés par un médecin pathologiste du CHRU de Lille, spécialisé en Hématopathologie. Pour chaque dossier nous avons recueilli, grâce aux comptes rendus anatomo-pathologiques archivés sur la plateforme Diamic® :

- L'âge du patient lors de la réalisation du prélèvement
- Le sexe du patient
- Le type de prélèvement (biopsie à l'aiguille, exérèse ganglionnaire chirurgicale, BOM, pièce opératoire en dehors des exérèses ganglionnaires)
- La localisation du prélèvement : pour les prélèvements ganglionnaires, la localisation de l'aire ganglionnaire. Pour les prélèvements extra-ganglionnaires, le type d'organe prélevé.
- L'architecture de la prolifération lymphomateuse.

- Les grades cytologiques 1-2, 3A ou 3B selon l'OMS 2016, ainsi que la présence d'une zone de transformation en lymphome B diffus à grandes cellules.
- Les résultats immunohistochimiques des anticorps anti-CD20, CD5, CD21, CD23, BCL2, BCL6, CD10, MIB1 et MUM1.
- La présence d'un réarrangement du gène *BCL2*, mise en évidence par technique FISH à partir de coupes de tissu.
- La présence d'une clonalité B, mise en évidence par biologie moléculaire.
- Le diagnostic final avec précision du variant le cas échéant (*in situ*, diffus, de type duodénal, testiculaire) ou d'une variante morphologique (à différenciation marginale ou plasmocytaire, avec des caractéristiques Castleman-like ou encore le LF composite) ou phénotypique (BCL2-, CD5+, CD10-/MUM1+)

### **C. Relecture histologique**

Afin de décrire précisément l'hétérogénéité morphologique et phénotypique de notre série de lymphomes folliculaires, l'ensemble des cas dont la morphologie et/ou le phénotype tumoral n'étaient pas conventionnels, a été relu.

La morphologie non conventionnelle était définie par :

- une architecture diffuse pure
- une différenciation marginale caractérisée par un aspect monocytoïde des cellules lymphomateuses.
- une différenciation plasmocytaire des cellules lymphomateuses.
- la présence de centres germinatifs de type « lollipop » et d'une zone du manteau en « bulbe d'oignon », caractéristiques de la maladie de Castleman de forme hyaline vasculaire.

Le phénotype tumoral non conventionnel était défini par des cellules lymphomateuses:

- BCL2-
- CD23+
- CD5+
- CD10 négatif, plus ou moins associé à une expression de MUM1+

Afin de répondre à notre objectif de décrire et reclasser certains lymphomes folliculaires de la série dans les nouvelles catégories de lymphome folliculaire de type pédiatrique (LFTP) ou lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4, nous avons également centré et réduit notre relecture sur les cas les plus susceptibles de posséder les critères diagnostiques définis par la classification OMS 2016.

Ainsi, les cas de lymphome folliculaire de grade 3A et 3B, ou avec transformation ont été sélectionnés puisqu'une majorité des lymphomes pédiatriques se définissent par une morphologie de haut grade (120).

L'architecture purement folliculaire des LF de grade 3A ou 3B était un critère majeur morphologique des LFTP.

Les lymphomes folliculaires de grade cytologique 1-2 dont la morphologie et l'immunophénotype étaient « classiques » n'étaient pas relus. L'ensemble de la relecture a été faite par deux pathologistes (un junior et un sénior en hématopathologie).

## **D. Analyses complémentaires dans la série de LF de grade 3A et 3B et des LF transformés**

Afin de limiter l'impact de ce travail sur les secteurs techniques de notre Institut, une pré-sélection morphologique des cas du groupe 3A, 3B ou transformés a été réalisée avant études complémentaires.

Seuls les cas sélectionnés qui présentaient des critères faisant suspecter un LFTP ou un lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4 (morphologie d'aspect monotone, avec des cellules tumorales de taille moyenne, blastoïdes-like, différentes des centrocytes et centroblastes habituels) ont fait l'objet d'analyses complémentaires afin de confirmer le diagnostic de ces nouvelles entités ou d'écartier un diagnostic différentiel.

### 1. Étude immunohistochimique

Après la relecture histologique, une analyse immunohistochimique complémentaire a été réalisée, en utilisant les anticorps suivants :

- Cycline D1 et/ou SOX11, pour les LF CD5+, afin d'éliminer le diagnostic différentiel de lymphome à cellules du manteau (LM).
- MUM1, pour les LF ayant des caractéristiques morphologiques communes avec le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4.
- STAT6, pour les LF ayant des caractéristiques compatibles avec le variant diffus.

Les différentes étapes de la technique comprenant le déparaffinage, le prétraitement, le blocage de l'activité peroxydase endogène, l'incubation, l'amplification et la révélation étaient effectuées à l'aide d'un automate VENTANA BENCHMARK ULTRA.

Les caractéristiques relatives aux anticorps utilisés sont présentées dans le tableau suivant :

Anticorps	Fournisseur	Clone	Dilution	Prétraitement	Incubation
<b>Cycline D1</b>	Ventana	SP4-R	prédilué	CC1 30'	32'
<b>SOX11</b>	Sigma		1/50	CC1 60'	32'
<b>MUM1</b>	Dako	MUM1P	1/100	CC1 60'	32'
<b>STAT6</b>	Abcam	YE361	1/100	CC1 60'	32'

**Tableau II. Caractéristiques des anticorps primaires**

L'ensemble des anticorps nécessaires pour cette analyse complémentaire est utilisé en routine au sein du laboratoire.

L'interprétation de l'immunomarquage est détaillée dans le tableau suivant :

Anticorps	Type d'évaluation et seuil de positivité	Type de marquage	Témoin interne	Intérêt
<b>Cycline D1</b>	Qualitative	Nucléaire	Cellules endothéliales	Marquage des cellules lymphomateuses dans le LM
<b>SOX11</b>	Qualitative	Nucléaire	Cellules endothéliales	Marquage des cellules lymphomateuses dans le LM
<b>MUM1</b>	Qualitative et semi-quantitative (positivité si >30% de cellules tumorales marquées (121))	Nucléaire	Cellules post-centre germinatif	Marquage des cellules lymphomateuses dans de rares sous-types de LF CD10/MUM1+ ou dans le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4
<b>STAT6</b>	Qualitative	Nucléaire	/	Marquage nucléaire des cellules lymphomateuses dans environ 80% des variants diffus du LF

**Tableau III. Interprétation de l'immunomarquage**

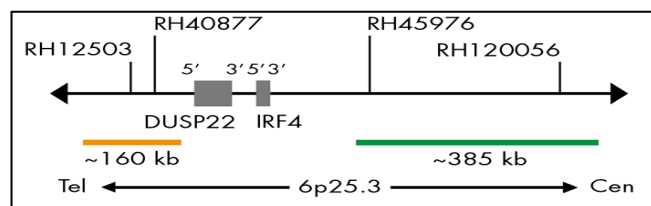
## 2. Étude par FISH interphasique

### a) Sélection des cas

Les cas qui présentaient à la fois une morphologie compatible et un marquage positif des cellules tumorales par l'anticorps anti-MUM1 ont été testés par technique FISH.

### b) Choix et mise au point de la sonde *IRF4*

La sonde break apart, SPEC *IRF4*, *DUSP22* Dual Color Break Apart probe, du fournisseur Zytovision, a été commandée et mise au point dans notre Institut à l'occasion de ce travail de thèse. Cette sonde, dont le design est représenté en figure 12, couvre le gène *IRF4* avec un signal vert en amont et un signal rouge en aval du gène *IRF4*.



**Figure 12. Design de la sonde *IRF4*, Break Apart, Zytolight®**

Lors de la mise au point de cette sonde, un partenariat a été mis en place avec le CHRU de Bordeaux, afin de nous faire parvenir des échantillons tissulaires contrôles, avec ou sans réarrangement *IRF4*. La mise au point a donc consisté à appliquer le protocole de la sonde sur ces différents prélèvements.

### c) Technique FISH

Des coupes tissulaires de 3 µm ont été réalisées à partir de chaque bloc de tissu inclus en paraffine.

Le tampon de lavage (WASH BUFFER, dilution 1/20, de l'Histology FISH accessory kit (DAKO®)) et la solution de prétraitement (pretreatment, dilution 1/20, de l'Histology FISH accessory kit (DAKO®)) étaient préparés en début de technique.

## **1) Préparation des tissus inclus en paraffine**

### **- Déparaffinage**

Les coupes étaient déparaffinées dans du xylène (pendant 30 minutes (min)), réhydratées progressivement (éthanol 100%, 2×3 min ; éthanol à 95%, 3 min ; éthanol à 70%, 3 min) puis rincées dans le tampon de lavage (2×3min).

### **- Prétraitement**

Les lames étaient ensuite immergées dans la solution de prétraitement chauffée au bain-marie à une température de 97°C +/- 2°C, pendant 10 minutes, puis laissées dans cette même solution à température ambiante pendant 15 minutes.

Elles étaient ensuite à nouveau rincées dans la solution de lavage (2×3 min).

### **- Digestion enzymatique**

Cette digestion consistait à un traitement par la pepsine DAKO contenue dans le kit. 100µl de pepsine froide étaient déposés sur chaque lame préalablement disposée dans le thermobrite pendant 7 minutes à 37°C. Les lames étaient à nouveau rincées dans le tampon de lavage (2×3 min).

### **- Déshydratation**

L'étape de déshydratation consistait à l'immersion des coupes dans plusieurs bains successifs d'éthanol (éthanol à 70%, 2 min ; éthanol à 95%, 2 min puis éthanol absolu, 2 min).

## **2) Utilisation de la sonde**

L'hybridation a été effectuée avec la sonde SPEC IRF4, DUSP22 Dual Color Break Apart probe (zytolight®).

La sonde a été centrifugée au préalable puis utilisée pure, en semi-obscurité, sous hotte. Après séchage des lames, 10 µL de sonde ont été appliqués puis une lamelle a été placée pour recouvrir l'échantillon.

## **3) Co-dénaturation**

Les lames ont été ensuite placées dans le thermobrite, pendant 10 minutes à une température de 75°C.

## **4) Hybridation**

Les lames étaient ensuite déposées dans les chambres d'hybridation, à 37°C, pendant environ 16h.

## **5) Post-hybridation**

Le lendemain était réalisé le lavage post-hybridation. Les lamelles étaient retirées des lames qui étaient ensuite rincées dans une solution de tampon SSC (soluté de citrate de sodium) à température ambiante puis immergées dans ce même type de solution à 65°C pendant 10 minutes. Cette étape permet la suppression de fixations non spécifiques. Les lames étaient ensuite rincées avec le tampon de lavage (2x3min).

Puis, les coupes étaient déshydratées par bains successifs d'éthanol (éthanol 70%, 2 min ; éthanol 95%, 2 min puis éthanol 100%, 2 min). Elles étaient séchées à température ambiante pendant 5 à 10 minutes puis environ 10µl de DAPI (ABOTT®, dilution 1/3) étaient déposés sur la zone préalablement hybridée. La préparation était recouverte d'une lamelle scellée au vernis.



## **6) Lecture**

La lecture des lames s'effectuait en semi-obscurité au microscope à épifluorescence OLYMPUS BX61 relié au logiciel BIOVIEW®.

### *d) Interprétation*

L'interprétation a été faite par un biologiste, un pathologiste junior et un technicien. Les critères de validation ont été établis selon l'expérience importante de notre laboratoire concernant les sondes Break Apart, les recommandations du CHU de Bordeaux et les données de la littérature. Le seuil de positivité a été établi à 15%. Un réarrangement était alors présent si un signal rouge et un signal vert séparé étaient associés à une fusion de deux signaux rouge-vert, dans plus de 15% des noyaux tumoraux.

L'absence de réarrangement correspondait à la présence de 2 signaux de fusion rouge-vert dans plus de 85% des noyaux tumoraux.

## II. Objectifs secondaires

### A. Analyse de l'impact de la relecture par les experts du réseau LYMPHOPATH

Pour chaque cas de notre cohorte, nous avons spécifié s'il était adressé pour une relecture dans le cadre du réseau LYMPHOPATH ou non.

Lorsqu'il s'agissait d'une relecture, le diagnostic initial ainsi que le grade cytologique initial étaient recueillis, tout en précisant leurs concordances avec le diagnostic final de l'expert.

Pour évaluer l'impact de la relecture LYMPHOPATH sur la prise en charge du patient, les modifications des éléments du diagnostic étaient également recueillies et classées en deux catégories en se basant sur la méthode de Laurent C. *et al.* (1) ; les modifications majeures ou mineures.

Les modifications majeures engendraient un impact potentiel dans la prise en charge des patients et correspondaient à:

- Un diagnostic de lésion bénigne initial modifié en LF et vice versa.
- Un diagnostic de lymphome initial modifié en un diagnostic d'un autre type de tumeur maligne et vice versa.
- Une mauvaise classification du sous-type de lymphome :
  - o Un lymphome non-hodgkinien de phénotype T modifié en lymphome folliculaire et vice versa.
  - o Un lymphome non-hodgkinien à petites cellules B autre que lymphome folliculaire (lymphome du manteau, lymphome de la zone marginale...) modifié en lymphome folliculaire et vice versa.
  - o Un lymphome de Hodgkin modifié en lymphome folliculaire et vice versa.
- Une modification du grade cytologique :

- Un lymphome folliculaire de grade cytologique 1-2 ou 3A modifié en lymphome folliculaire de grade 3B ou avec zone de transformation en lymphome B diffus à grandes cellules et vice versa.
- Un lymphome folliculaire sans grade cytologique initial.
- Un lymphome non classé et/ou non typé correspondant à un lymphome folliculaire après relecture.
- Une absence d'hypothèse diagnostique initiale.

Les modifications mineures concernaient les changements ne modifiant pas la prise en charge finale du patient et correspondaient à :

- Un lymphome folliculaire de grade 1-2 modifié en lymphome folliculaire de grade 3A et vice versa.
- Un lymphome folliculaire de grade 3B modifié en lymphome B diffus à grandes cellules et vice versa.

## **B. Prédiction de la réponse au traitement anti-EZH2**

### 1. Sélection des cas

Afin de pouvoir étudier la faisabilité et la valeur d'une étude immunohistochimique du profil de méthylation d'une cohorte de patients EZH2 WT ou mutés Y641, nous avons sélectionné une nouvelle cohorte de patients issus de l'étude EPIZYME évaluant la réponse du Tazemetostat, inhibiteur d'EZH2, chez les patients ayant un lymphome folliculaire ou un lymphome B diffus à grandes cellules, réfractaires ou en rechute. Les prélèvements correspondants avaient tous été séquencés, au préalable, dans le cadre de l'essai, au niveau des hot spots des mutations activatrices d'EZH2 connus. Le statut mutationnel d'EZH2 pour l'ensemble des patients était donc connu.

Seuls les lymphomes folliculaires étaient inclus dans notre étude.

Si le matériel tissulaire initialement séquencé était épuisé ou non disponible pour la réalisation de l'étude immunohistochimique, un autre prélèvement du même patient, réalisé ultérieurement, était utilisé. Si aucun prélèvement n'était disponible, le patient était exclu de notre cohorte.

### 2. Étude immunohistochimique

Sur l'ensemble des lymphomes folliculaires de la cohorte EPIZYME, nous avons réalisé une étude immunohistochimique avec les anticorps anti-EZH2, anti-H3K27me2 et anti-H3K27me3 afin d'étudier le profil de méthylation H3K27, en se basant sur la méthode employée par Jardin et *al.* (122).

#### *a) Mise au point de la technique*

Le protocole de l'anticorps anti-H3K27me3, avec les mises au point adéquates, était déjà réalisé dans notre service.

La technique a été mise au point à partir de prélèvements comportant 6 types d'organes différents (peau, appendice, placenta, foie, rein et poumon) pour l'anticorps anti-H3K27me2 et à partir de prélèvements hépatique (témoin positif) et testiculaire (témoin négatif) pour l'anticorps anti-EZH2. Des prélèvements de ganglion hyperplasique et de lymphome folliculaire ont également été testés au préalable.

Les blocs d'inclusion ont été coupés avec 5 µm d'épaisseur.

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur l'automate Benchmark Ultra – Ventana® Roche. Cet automate permet la réalisation, de façon automatisée, des différentes étapes de l'immunomarquage :

- 1) Déparaffinage : suppression de la paraffine et réhydratation de la lame
- 2) Démasquage : restauration des sites antigéniques en supprimant les ponts de méthylènes formés à cause de l'utilisation du formol comme fixateur.
- 3) Incubation : mise en contact des lames avec les anticorps primaires qui seront détectés par les anticorps secondaires.
- 4) Révélation : utilisation d'un chromogène afin de mettre en évidence les sites d'accrochage de l'anticorps primaire, par un précipité brun. Le Kit de révélation utilisé, spécifiquement dirigé contre les anticorps de souris ou de lapin, était l'ultra View Ventana Roche® (référence 760-500)
- 5) Contre-coloration : mise en évidence des structures tissulaires.

Avant l'utilisation de chaque marqueur sur les échantillons d'intérêt de la cohorte, plusieurs paramètres de ces différentes étapes ont été déterminés lors d'une phase de mise au point.

Cette mise au point a, tout d'abord, consisté à tester l'ensemble des méthodes de démasquage disponible sur l'automate. Les deux grands principes de démasquage antigénique étant :

- Le démasquage par la chaleur : deux tampons possédant des pH différents ont été testés : le Tampon CC1 de type TRIS/Borate/EDTA (pH 8.4) (retenu à l'issue de la mise au point) et le Tampon CC2 de type Citrate (pH 6).
- Le démasquage enzymatique : testé avec l'enzyme Protéase 1 (équivalent Pro-nase) de la société Ventana Roche ®

Ensuite, la mise au point devait définir la meilleure dilution pour les anticorps primaires afin d'obtenir un marquage optimal. Dans un premier temps, les dilutions testées correspondaient à la plus faible gamme indiquée sur les fiches techniques des fournisseurs. Elles étaient, par la suite, progressivement augmentées, jusqu'à l'obtention du marquage adéquat. Un temps d'incubation standard de 32 min à 37°C a été appliqué pour l'ensemble des anticorps.

Après cette phase de mise au point, les protocoles retenus étaient les suivants :

Anticorps	Fabricant - Distributeur	Référence	Dilution	Hôte	Clone	Étapes IHC supplémentaires
H3K27me3 - Histone H3 tri-methyl K27	Diagenode	C15410069	1/750	Rabbit	poly	«Option 1» 20 min + Ultrawash
EZH2	Cell Signaling	#5246	1/50	Rabbit	D2C9	
H3K27 me2 - Histone H3 di-Methyl K27	Abcam	ab24684	1/1000	Rabbit	Polyclonal	

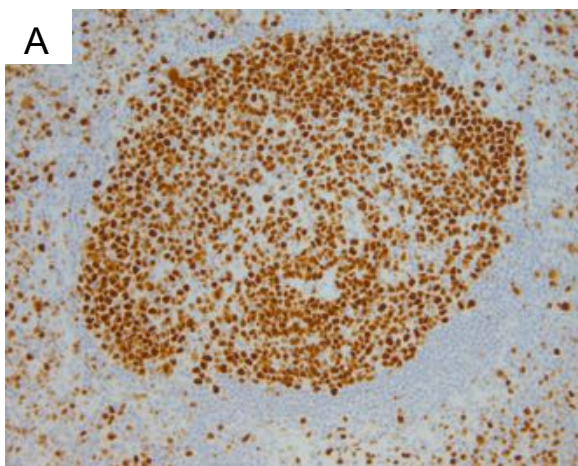
**Tableau IV. Caractéristiques des anticorps**

Le protocole de l'anticorps H3K27me3 comporte deux étapes supplémentaires, afin de diminuer un bruit de fond important observé lors de sa mise au point initiale au sein de notre Institut.

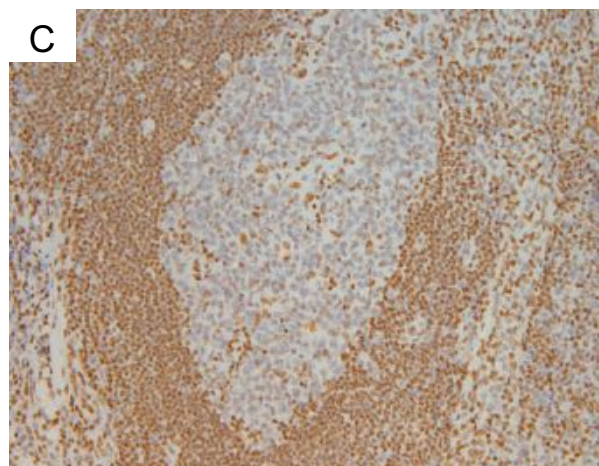
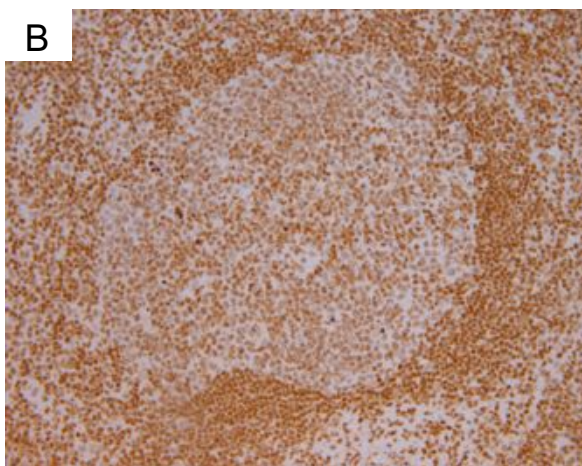
La première étape, nommée « option 1 » consiste à ajouter un diluant d'anticorps contenant des immunoglobulines stabilisantes qui saturent les sites de fixation aspécifiques de l'anticorps primaire. La solution de dilution utilisée provient de la société Roche Ventana®.

La seconde étape, « UltraWash », permet la réalisation, par l'automate, de rinçages supplémentaires des lames à la suite de l'étape de révélation.

La figure 13 représente, aux termes de cette mise au point, les différents marquages des anticorps anti-EZH2, H3K27me2 et H3K27me3 au sein d'un ganglion lymphatique hyperplasique non tumoral.



**Figure 13. Immunomarquage des anticorps anti-EZH2, H3K27me2 et H3K27me3.** EZH2 est exprimé de façon intense par les cellules du centre germinatif mais n'est pas exprimé par les cellules du manteau (A). H3K27me2 est exprimé de façon intense par les cellules du manteau et de façon modérée par les cellules centro-germinatives (B). H3K27me3 est exprimé par les cellules du manteau et n'est pas exprimé par les cellules lymphoïdes du centre germinatif (C).



### b) Interprétation

L'interprétation des marquages de chaque anticorps est tirée de l'article de F. Jardin et al. (122) et prend en compte l'intensité du marquage et la quantification de cellules tumorales marquées, dans le but d'établir un score immunohistochimique (score IHC) EZH2, H3K27me2 et H3K27me3.

Le niveau d'intensité était classé de façon semi-quantitative de 1 à 3, 1 correspondant à un marquage faible, 2 à un marquage modéré et 3 à un marquage fort.

Le score de la quantification correspondait au pourcentage de cellules tumorales marquées par tranche de 10%, allant de 0 et 10, avec 0 l'absence de marquage présent, 1 représentant 1 à 10% de noyaux tumoraux positifs et 10 représentant 91 à 100% de noyaux positifs.

Le produit de ces deux scores a été calculé afin d'établir le score IHC de méthylation pour chaque anticorps, compris entre 0 et 30.

Afin de représenter le statut de méthylation H3K27 pour chaque patient, et ainsi permettre son étude, un score me3/me2 a été calculé, selon la formule logarithmique de l'équipe de F. Jardin (122) :

$$\text{me3/me2 score} = \log_2 \left( \frac{\text{me3 score} + 1}{\text{me2 score} + 1} \right)$$

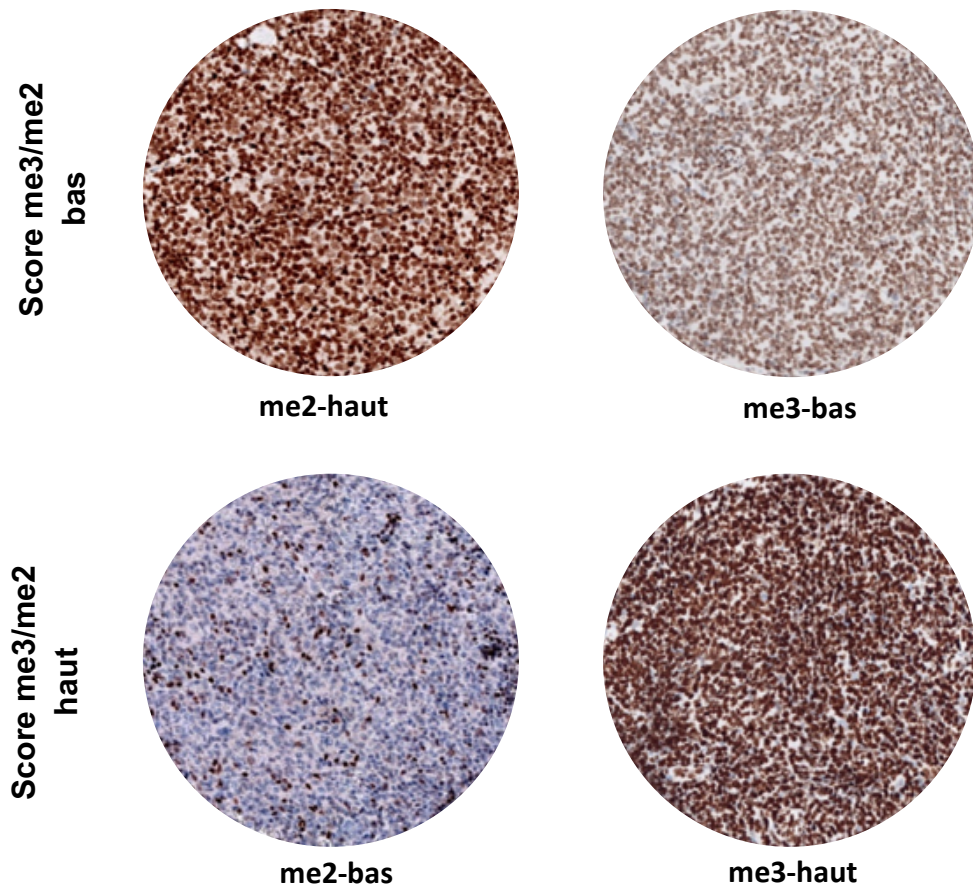
L'approche logarithmique était utilisée afin d'obtenir une distribution plus large.

Les différents scores me3/me2 étaient ensuite classés en 3 profils de méthylation immunohistochimique distincts, également établis selon le même article:

- Le profil H3k27me3-haut/H3K27me2-bas (score me3/me2>0)
- Le profil H3K27me3-bas/H3K27me2-haut (score me3/me2<0)
- Le profil intermédiaire (me3/me2=0)



La figure 14 ci-dessous représente les différents exemples d'immunomarquage définissant 2 profils de méthylation pour les anticorps anti-H3K27me2 et H3K27me3



**Figure 14. Immunomarquages de H3K27me2 et H3K27me3 en fonction de l'intensité du marquage et du pourcentage de cellules tumorales immunomarquées.**

# RESULTATS

## I. Objectif principal

### A. Nombre de cas analysés

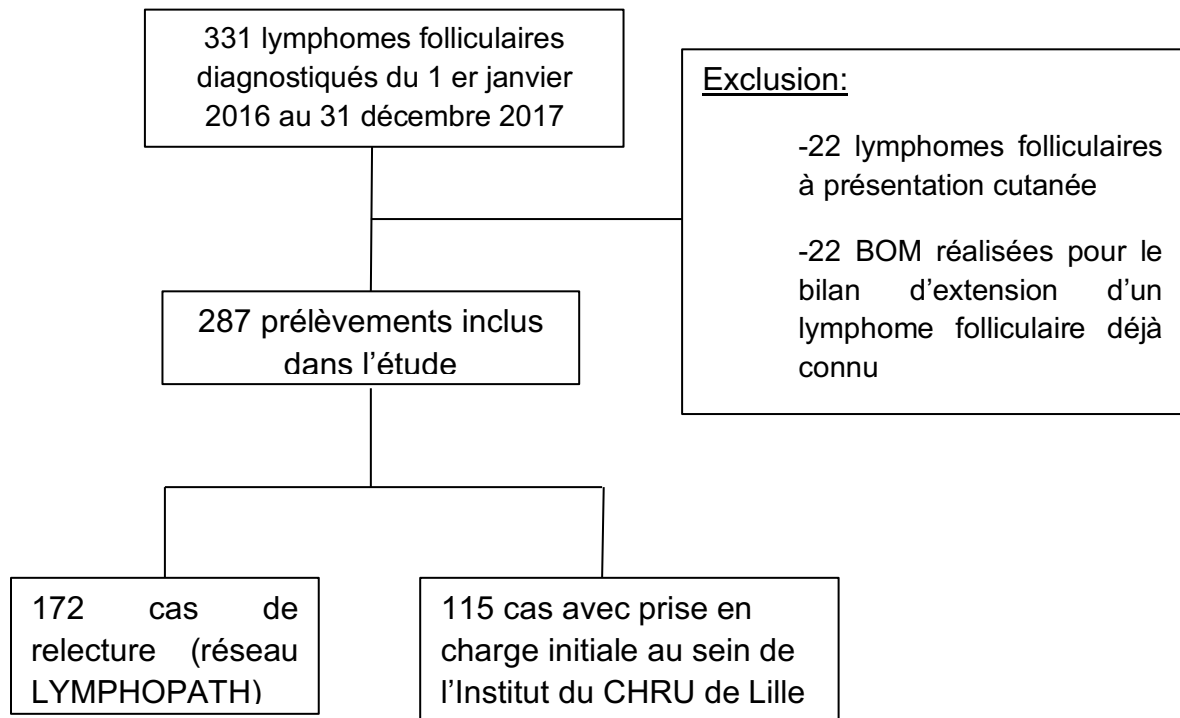
Du 1<sup>er</sup> janvier 2017 au 31 décembre 2018, 331 lymphomes folliculaires ont été analysés. Cela représentait 17,4% (331/1903) de l'ensemble des lymphomes non-hodgkiniens et 15,1% (331/2195) de tous les lymphomes diagnostiqués au sein de l'Institut durant cette période.

44 dossiers ont été exclus de l'étude :

- 22 dossiers correspondaient à des biopsies ostéo-médullaires réalisées dans le cadre du suivi d'un lymphome folliculaire déjà diagnostiqué.
- 22 dossiers concernaient un diagnostic de lymphome folliculaire de localisation cutanée.

Après l'application des critères d'exclusion, l'étude comprenait donc 287 LF, dont 172 demandes de relecture dans le cadre du réseau national LYMPHOPATH. Cela représentait 15,1% (287/1903) de l'ensemble des lymphomes non-hodgkiniens et 13,1% (287/2195) de tous les lymphomes, diagnostiqués au sein de l'Institut.

## FLOW CHART :



## **B. Données épidémiologiques**

La population étudiée comprenait 48% de femmes (137/287) et 52% d'hommes (150/287) correspondant à un sexe ratio homme/femme de 1,08. L'âge des patients était compris entre 5 et 90 ans. L'âge médian était de 63 ans, aussi bien chez les femmes que chez les hommes. Le premier quartile était de 55 ans et 3 mois et le troisième quartile était de 73 ans, quel que soit le genre.

## C. Types et localisations des prélèvements

### 1. Type de prélèvement

Mode de prélèvement	Effectifs	Pourcentage
Biopsie-exérèse ganglionnaire	131	46 %
Biopsie à l'aiguille ganglionnaire	90	31 %
Biopsie ostéo-médullaire (BOM)	5	2 %
Pièce opératoire	10	3 %
Autre	51	18 %
Total	287	100 %

**Tableau V. Répartition des modes de prélèvement**

Les exérèses ganglionnaires constituaient le mode de prélèvement le plus fréquent (131/287, 46%), suivies par les biopsies à l'aiguille ganglionnaires (90/287, 31%), les pièces opératoires (10/287, 3%) et les biopsies ostéo-médullaires diagnostiques (5/287, 2%).

La catégorie « Pièce opératoire » comportait 3 pièces de résection grêlique, 2 pièces de mastectomie partielle, 2 pièces d'amygdalectomie, une tumorectomie intramusculaire du triangle de Scarpa droit et 3 parotidectomies.

La catégorie « Autre » comprenait plusieurs types de prélèvement, le plus souvent de petite taille, dont :

- 9 biopsies digestives (1 gastrique, 6 duodénales, 1 colique et 1 rectale)
- 9 biopsies de masse péritonéale dont 2 entièrement tumorales
- 7 biopsies de tissu mou (4 biopsies paravertébrales, 1 intercostale, 1 pectorale et 1 para-iliaque)
- 6 liquides (3 péritonéaux, 1 rétropéritonéal, 1 pleural et 1 d'ascite)
- 5 biopsies de la sphère ORL (2 biopsies de cavum, 1 biopsie pharyngée, 1 biopsie du voile du palais et 1 biopsie des fosses nasales)

- 3 ponction-biopsies hépatiques
- 3 biopsies osseuses (2 vertébrales et une humérale)
- 2 biopsies mammaires
- 2 biopsies pulmonaires (1 biopsie bronchique et 1 biopsie lobaire supérieure gauche)
- 2 biopsies de la tête (1 biopsie de l'orbite et 1 biopsie d'une masse frontale extra-crânienne)
- 2 biopsies de l'épiploon
- 1 biopsie pleurale

## 2. Localisation du prélèvement

Localisation ganglionnaire	Effectifs	Pourcentage
Cervicale	61	28 %
Axillaire	43	20%
Inguinale	80	36%
Médiastinale	7	3 %
Retropéritonéale	7	3 %
Mésentérique	7	3 %
Pelvienne	3	1%
Lombo-aortique	2	1%
Non précisée	11	5 %
Total	221	100 %

**Tableau VI. Répartition des sites ganglionnaires prélevés**

Les prélèvements ganglionnaires, regroupant les biopsie-exérèses et les biopsies à l'aiguille, représentaient 77% (221/287) de l'ensemble des cas de l'étude. Les aires ganglionnaires superficielles constituaient le site de prélèvement ganglionnaire majeur (184/221, 84%) ; l'aire inguinale était la plus souvent prélevée (80/221, 36%) suivie par l'aire cervicale (61/221, 28%) puis par l'aire axillaire (43/221, 20%). Les aires ganglionnaires profondes étaient plus rarement prélevées, représentant seulement 11%

(26/221) des prélèvements ganglionnaires. Il y avait 11 cas dont 10 de relecture où le site ganglionnaire prélevé n'était pas précisé.

## **D. Caractéristiques histopathologiques**

### 1. Architecture

Les 6 types d'architecture observés dans notre étude étaient diffus, nodulaire, folliculaire, diffus et nodulaire, folliculaire et diffus, folliculaire et nodulaire. Le caractère nodulaire était retenu lorsque la prolifération lymphomateuse formait des nodules mais sans renfermer un réel RFD.

L'architecture folliculaire était observée dans 106 cas (36.9%), l'architecture nodulaire dans 35 cas (12.2%), l'architecture diffuse (>75% de la prolifération tumorale) dans 42 cas (14.6%). L'architecture folliculaire et diffuse était présente dans 45 cas (15,7%), l'architecture folliculaire et nodulaire dans 6 cas (2,1%) et l'architecture nodulaire et diffuse dans 32 cas (11,2%). Dans 21 cas (7,3%), le type d'architecture n'était pas précisé dans le compte-rendu anatomopathologique. Ils correspondaient aux 6 prélèvements liquidiens, à 6 biopsies osseuses dont 4 BOM et à 9 prélèvements de trop petite taille pour apprécier l'architecture globale de la prolifération tumorale (6 biopsies ganglionnaires à l'aiguille, 2 biopsies de tissu mou et une biopsie pulmonaire).

### 2. Grade cytologique

Le grade cytologique était réalisé pour 204/287 cas (71,1%). Le grade le plus représenté, avec 142/204 cas (69.6%), était le grade 1-2. Le grade 3A intéressait 39/204 cas (19.1%). Pour 8 LF de grade 1-2 et 4 LF de grade 3A, le pathologiste émettait une réserve concernant la représentativité du grade à cause de la petite taille du prélèvement. L'ensemble des lymphomes folliculaires de bas grade (grade 1-2 et 3A) représentait donc,

88.7% des lymphomes gradés. Le grade 3B, définissant le LF de haut grade, intéressait 20/204 cas, soit 9,8% des LF gradés. Trois cas de LF de grade 3B (1,5%) renfermaient une zone de transformation en DLBCL.

Le grade cytologique n'était pas réalisé pour 83/287 cas (28.9%).

Pour 46 d'entre eux (55.4%), le grade n'était pas réalisable à cause :

- de la trop petite taille du prélèvement : 19 biopsies ganglionnaires à l'aiguille représentant 21.1% (19/90) de l'ensemble des biopsies ganglionnaires à l'aiguille de notre étude et 12 prélèvements biopsiques non ganglionnaires (localisations hépatique, digestive, tissu mou, sphère ORL, pulmonaire et rétropéritonéale)
- du caractère cytologique du prélèvement (6 liquides)
- de la mauvaise préservation du prélèvement : 1 exérèse ganglionnaire était écrasée
- du caractère décalcifié des 5 BOM et des 3 biopsies osseuses.

Pour les 37 autres cas non gradés (44.6%), le grade cytologique n'était pas nécessaire ou applicable à cause des caractéristiques propres au LF : 19 cas renfermaient une zone de transformation en DLBCL, caractéristique suffisante pour établir une prise en charge optimale pour le patient, et 18 cas correspondaient à des variants ou sous-types de LF.

## **E. Caractéristiques immunohistochimiques**

Dans 236 cas sur 287, le phénotype était classique, exprimant au moins un marqueur de différenciation B (CD20 ou CD79), au moins un marqueur centro-germinatif (CD10+ et/ou BCL6+) ainsi que la protéine BCL2, lorsque celle-ci était réalisée. Le tableau représente les résultats de l'analyse immunohistochimique, recueillis au sein des comptes rendus

anatomo-pathologiques ou réalisés secondairement après la relecture histologique des cas d'intérêt.

<u>Anticorps</u>	Nombre de cas positifs / nombre de cas testés avec l'anticorps correspondant	Pourcentage de cas positifs pour chaque anticorps testé
CD20 ou CD79	286/286	100%
CD5	9/237	3,8%
<u>Marqueurs centro-germinatifs</u>	284/287	99%
- CD10	263/280	93,9%
- BCL6	173/185	95,1%
BCL2 (clone 100/D5 et E17)	225/249	90,4%
MUM1	12/49	24,5%
<u>CD23</u>		
-RFD organisé ou hyperplasique	110/180	61,1%
-Cellules tumorales positives	47/180	26,1%
-Absence de RFD	23/180	12,8%
<u>CD21</u>		
-RFD organisé ou hyperplasique	10/15	66,7%
-Absence de RFD	5/15	33,3%
<u>Ki67</u>		
<10%	57/214	26,6%
11 à 30%	78/214	36,4%
>30%	79/214	36,9%

RFD : Réseau Folliculaire Dendritique

#### **Tableau VII. Immunohistochimie**

##### 1. Anticorps anti-CD20 ou CD79a

L'ensemble des cellules tumorales de 286 cas de notre étude présentait un marquage cytoplasmique et membranaire avec les anticorps anti-CD20 et/ou anti-CD79a. L'étude immunohistochimique n'a pas été réalisée pour un prélèvement liquidien.



## 2. Anticorps anti-CD5

Au moins un marqueur T était systématiquement utilisé, sauf pour un prélèvement liquidien. L'anticorps anti-CD5 a été utilisé dans 237 cas et les cellules tumorales étaient positives dans 9 cas, soit 3,8%.

## 3. Marqueurs centro-germinatifs

L'étude immunohistochimique avec les marqueurs CD10 et/ou BCL6 a été réalisée pour 284/287 cas. Les 3 cas non testés pour ces anticorps, correspondaient à un prélèvement liquidien, où la technique n'était pas possible, et 2 cas de récurrence.

Les cellules tumorales présentaient un immunomarquage avec l'anticorps anti-CD10 dans 263 cas sur 280 cas testés (93,9%), et avec l'anticorps anti-BCL6 dans 173 cas sur 185 testés (93,5%). Pour l'ensemble des cas BCL6 négatifs, les cellules tumorales exprimaient le CD10 et inversement, pour l'ensemble des cas CD10 négatifs, les cellules tumorales exprimaient le BCL6.

Au sein des LF gradés, l'expression de CD10 était présente dans 95,8% (136/142) des cas de grade 1-2, 94,9% (37/39) des cas de grade 3A et 82,6% (19/23) des cas de grade 3B.

## 4. Anticorps anti-BCL2 (clone 100/D5 et clone E17)

L'étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-BCL2 de routine (clone 100/D5) a été réalisée pour 249 cas de notre étude. L'immunomarquage au sein des cellules tumorales était présent pour 213 cas. Parmi les cas négatifs, l'anticorps anti-BCL2 (clone E17) a été utilisé dans 13 cas dont 12 d'entre eux étaient positifs. Au total, l'expression immunohistochimique de BCL2 était présente dans 225/249 cas (90,4%), tout grade confondu.

Au sein des LF gradés, 92,8% (167/180) des grades 1-2 et 3A exprimaient la protéine BCL2. Parmi les cas de grade 3B, 80,9% (4/21) exprimaient cette protéine.

#### 5. Anticorps anti-MUM1

Les cellules tumorales présentaient un immunomarquage avec l'anticorps anti-MUM1 pour 12 cas sur les 49 cas testés.

#### 6. Anticorps anti-CD21 et anti-CD23

Les anticorps mettant en évidence le réseau folliculaire dendritique ont été utilisés dans 195 cas.

L'anticorps anti-CD23 était le plus souvent utilisé au sein notre institut, et mettait en évidence pour 110 des 180 cas testés, un réseau folliculaire dendritique arrondi et bien limité, parfois hyperplasique, sans marquage des cellules tumorales associé. Pour 47/180 cas, un immunomarquage était présent au sein de la totalité ou d'une partie des cellules lymphomateuses, avec une prédominance pour les présentations inguinales (29,4%, 15/51) par rapport aux autres localisations (24,8%, 32/129). Les LF de grade 1-2 exprimaient le CD23 dans 25% des cas (24/96) et le groupe des grades 3A-3B dans 16% des cas (6/37). Aucun marquage (RFD ou cellules tumorales) n'était présent pour 23/180 cas.

L'anticorps anti-CD21 a été réalisé pour 15 cas, dont 10 cas avec RFD et 5 cas sans.

#### 7. Anticorps MIB1

Une étude de l'index de prolifération du Ki67 avec l'anticorps MIB1 était réalisée dans une très grande majorité des cas, avec 214 cas analysés : 57 cas présentaient un pourcentage

faible (<10%) de marquage des cellules tumorales, 78 cas présentaient un pourcentage modéré (entre 11 et 30%) et 79 cas un pourcentage élevé (>30%).

Au sein des LF gradés, l'index de prolifération du Ki67 faible était dans 88,3% (38/43) des cas de grade 1-2, dans 9,3% (4/43) de grade 3A et dans 2,3% (1/43) des cas de grade 3B. L'index de prolifération du K67 élevé était dans 30,9% (17/55) des cas de grade 1-2, dans 38,2% (21/55) de grade 3A et dans 30,9% (17/55) de grade 3B.

## F. Caractéristiques moléculaires

### 1. Analyse FISH BCL2

La technique FISH BCL2 avait été réalisée pour 23 cas d'analyse difficile ou présentant des caractéristiques inhabituelles :

- 5 prélèvements biopsiques de petite taille
- 4 LF caractérisés par une absence d'expression de la protéine BCL2 en immunohistochimie
- 7 LF avec des anomalies phénotypiques (3 LF exclusivement BCL2 E17 +, 2 LF CD10-/MUM1+, 1 LF CD10- et 1 LF CD5+)
- 4 LF avec des anomalies morphologiques (3 LF d'architecture diffuse, 1 LF avec différenciation plasmocytaire et 1 LF dont l'involution adipeuse ganglionnaire était importante rendant l'analyse difficile)
- 1 néoplasie folliculaire *in situ*
- 1 LF de type pédiatrique
- 1 LF caractérisé par des centrocytes de grande taille.

L'analyse FISH mettait en évidence un réarrangement du gène *BCL2* dans 11/23 cas.

## 2. Clonalité B en biologie moléculaire

La biologie moléculaire à la recherche d'une clonalité B avait été réalisée pour 9 cas :

- 2 LF caractérisés par une absence d'expression de la protéine BCL2 en immunohistochimie
- 2 cas de relecture dont le diagnostic initial était bénin
- 1 biopsie osseuse d'interprétation difficile
- 1 LF de type pédiatrique
- 1 LF caractérisé par une expression de la protéine BCL2 seulement après utilisation du clone E17
- 1 LF sans réarrangement du gène *BCL2* après l'analyse FISH
- 1 prélèvement de petite taille

La biologie moléculaire mettait en évidence une clonalité B dans 4/9 cas.

## G. Relecture histologique

1. Variants de LF ou LF présentant une morphologie ou un phénotype non conventionnel.

### *a) Description histologique*

Au sein de notre cohorte de 287 LF et à l'exception des grades 3 qui ont fait l'objet d'une autre cohorte, 41 sur les 52 LF, présentant des caractéristiques de variant ou une morphologie et/ou un immunophénotype non classiques, selon nos critères, ont fait l'objet d'une relecture, qui a permis la réalisation d'une description histologique détaillée sous forme de planche-photo. Les 11 LF de ce groupe non relus étaient des cas de relecture dont le matériel (lames et blocs) n'était pas disponible.

Au décours de cette relecture, 22 variants ont été identifiés:

- 9 néoplasies folliculaires *in situ* (3,1%) (*planche 1*)
- 8 variants diffus du lymphome folliculaire (2,8%) (*planche 2*)
- 5 lymphomes folliculaires de type duodéal (1,7%) (*planche 3*)
- 0 lymphome folliculaire de type testiculaire.

Six LF avec une morphologie non conventionnelle, hors variants, ont été identifiés :

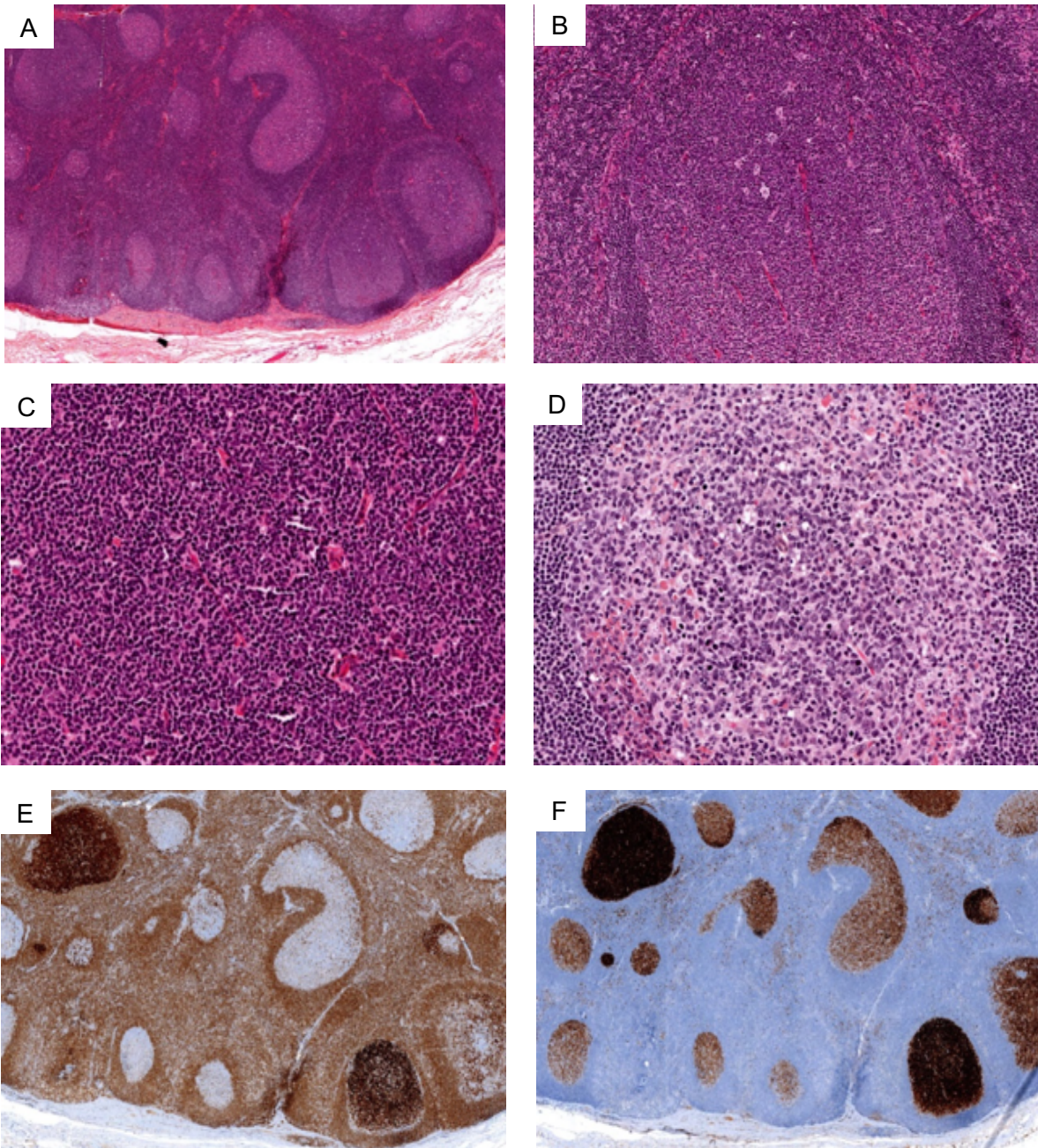
- 3 lymphomes folliculaires avec différenciation plasmocytaire (1%) (*planche 4*)
- 2 lymphomes folliculaires avec caractéristiques Castleman-like (1%) (*planche 5*)
- 1 lymphome folliculaire avec différenciation marginale (*planche 6*)

Vingt-huit LF avec un phénotype non conventionnel ont été identifiés :

- 19 lymphomes folliculaires dont la protéine BCL2 n'était pas exprimée par immunohistochimie (6,6%), mais dont la morphologie et le reste du phénotype étaient, par ailleurs, classiques.
- 5 lymphomes folliculaires CD5+ (*planche 7*)
- 4 lymphomes folliculaires CD10-/MUM1+ (*planche 8*)

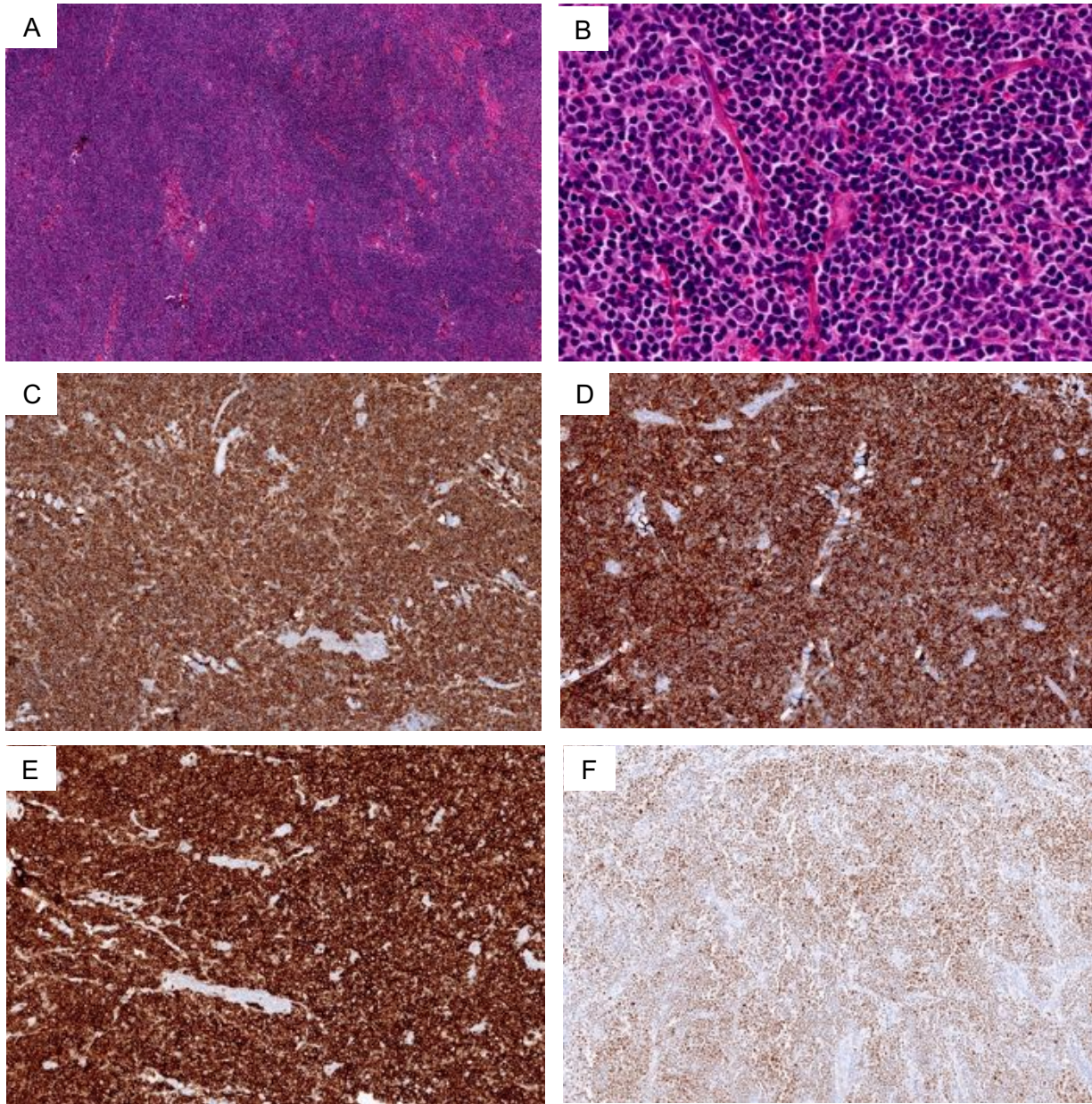
Par ailleurs, 3 lymphomes composites renfermant à la fois un LF de forme conventionnelle et un lymphome de Hodgkin étaient également présents et décrits. (*planche 9*).

**Planche 1 :**



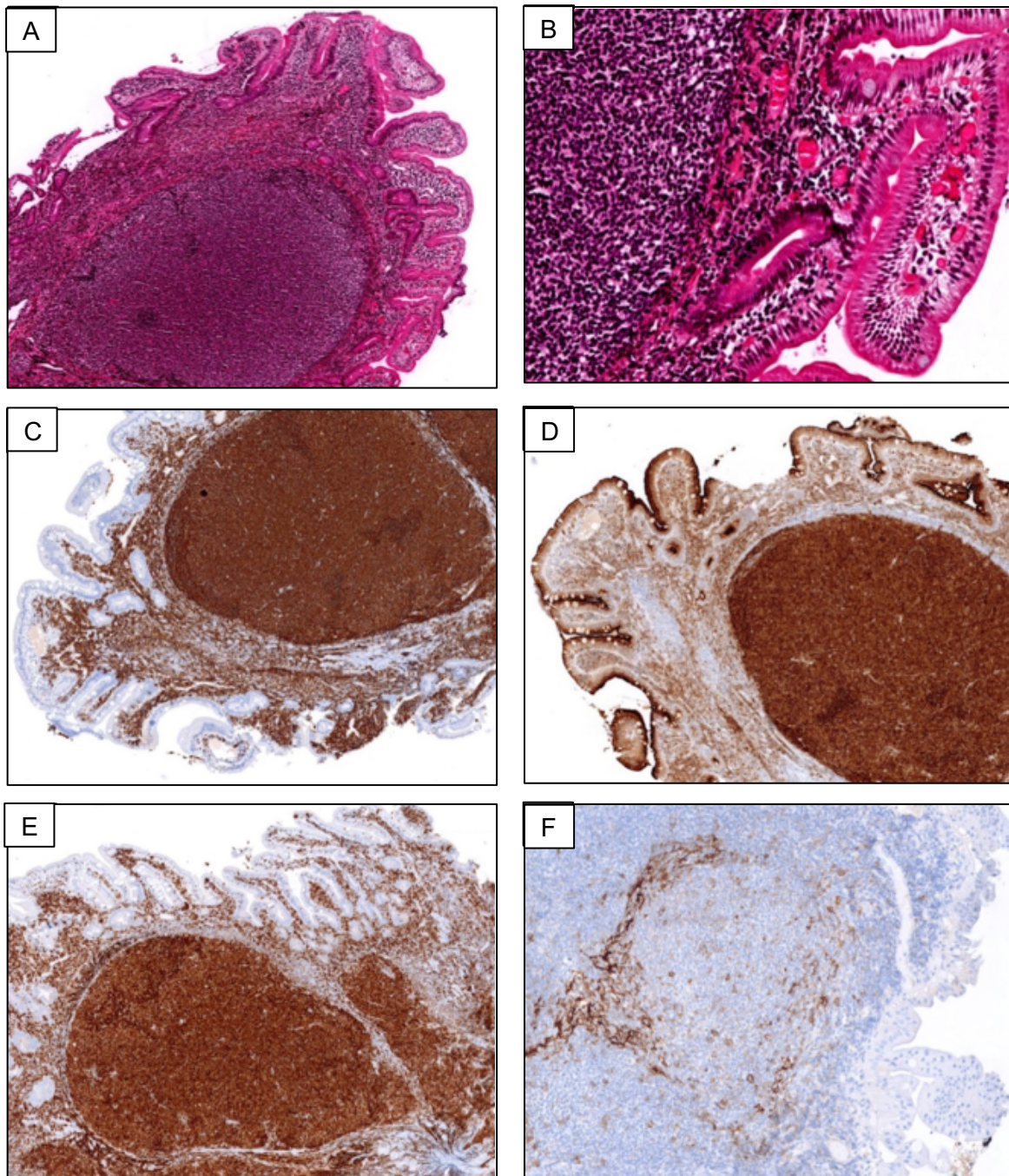
**Néoplasie folliculaire *in situ*.** L'architecture ganglionnaire folliculaire est conservée (A). Elle est le siège de follicules néoplasiques épars (B) constitués par une population de type centrocytique monomorphe (C). Des follicules hyperplasiques sont également présents (D). L'anticorps anti-BCL2 est positif au sein des follicules néoplasiques et négatif au sein des follicules hyperplasiques non tumoraux, majoritaires (E). L'anticorps anti-CD10 est plus intense au sein des follicules néoplasiques (F).

**Planche 2 :**



**Variant diffus du lymphome folliculaire.** La prolifération lymphomateuse est d'architecture diffuse (A) et est constituée par une population cellulaire de type centrocytique, de grade 1-2 (B). L'anticorps anti-CD20 est positif (C) et l'anticorps anti-CD23 est positif, de manière intense et diffuse, sans distinction de RFD résiduel (D). Les marqueurs centro-germinatifs CD10 (E) et BCL6 (F) sont également exprimés.

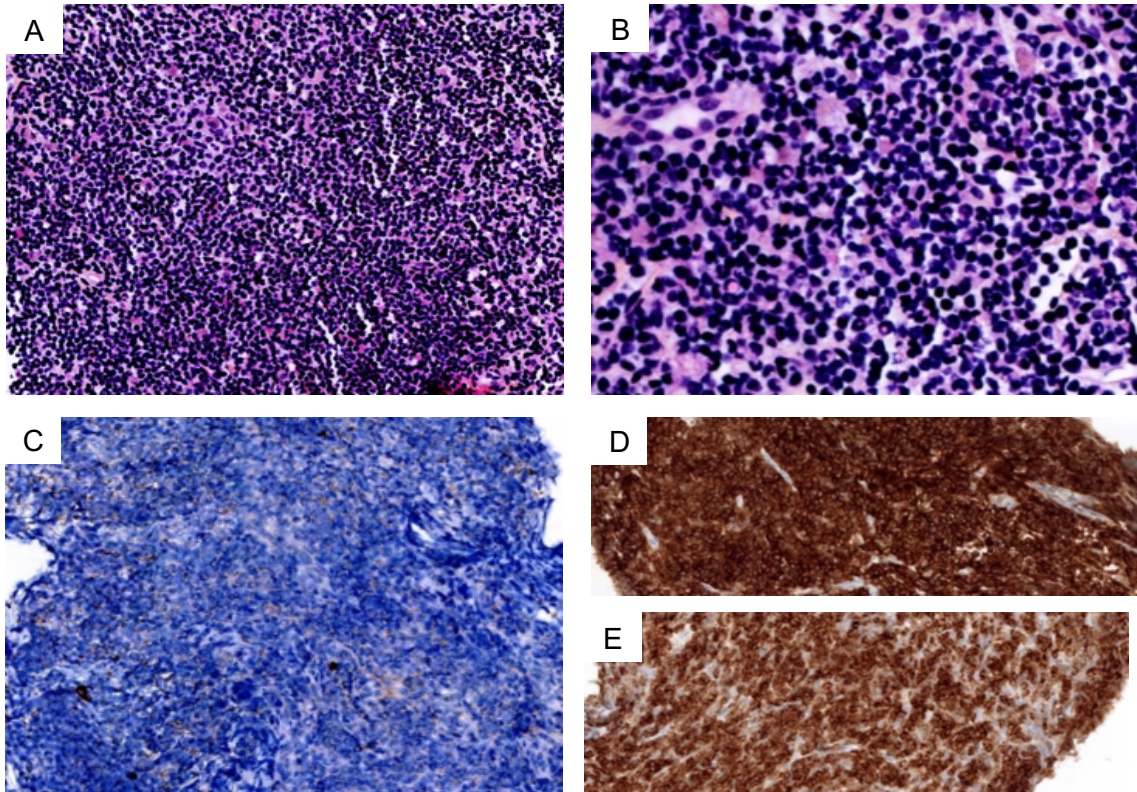
**Planche 3 :**



**Lymphome folliculaire de type duodénal.** L'infiltration lymphomateuse d'architecture folliculaire de la muqueuse et de la sous-muqueuse duodénale (A) est constituée par une population de type centrocytique (B). Elle infiltre également les villosités (B). Les anticorps anti-CD20 (C) CD10 (D) et BCL2 (E) sont positifs. L'anticorps anti-CD23 montre un RFD réduit et localisé en périphérie du follicule tumoral (F).

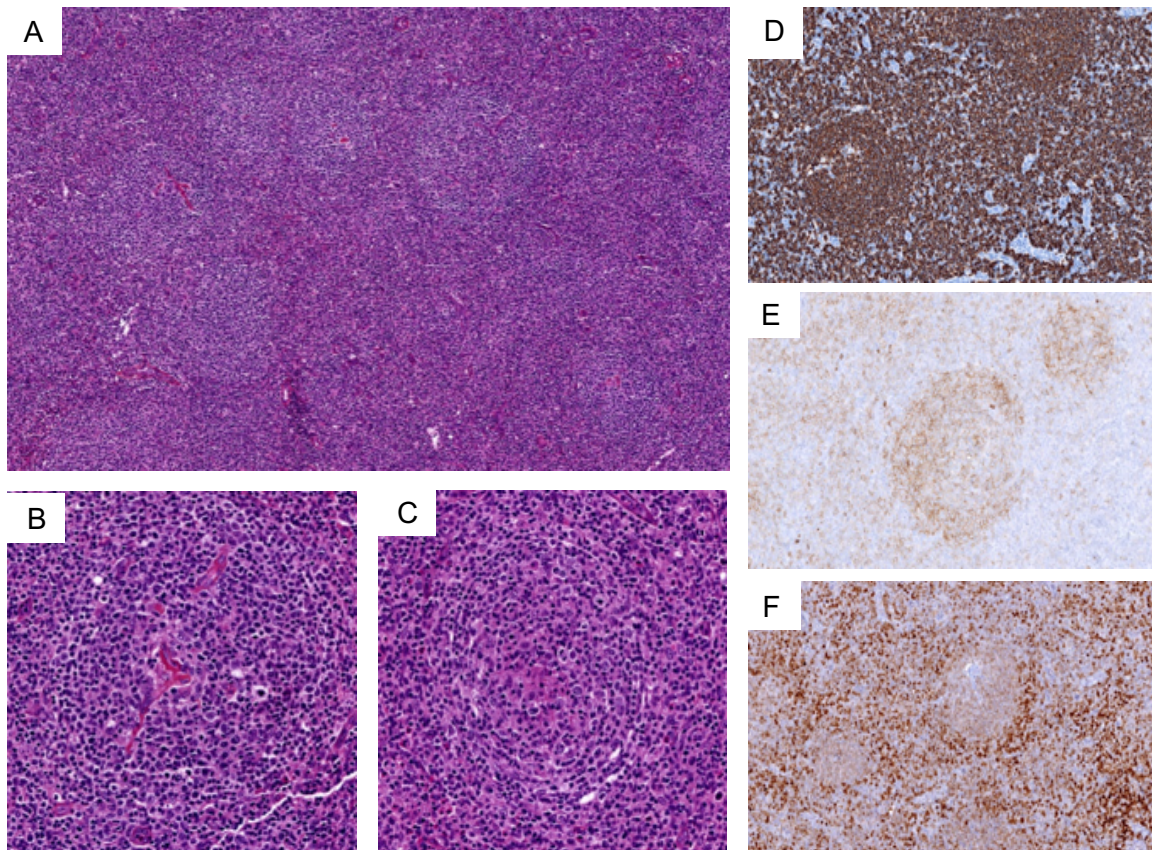


**Planche 4 :**



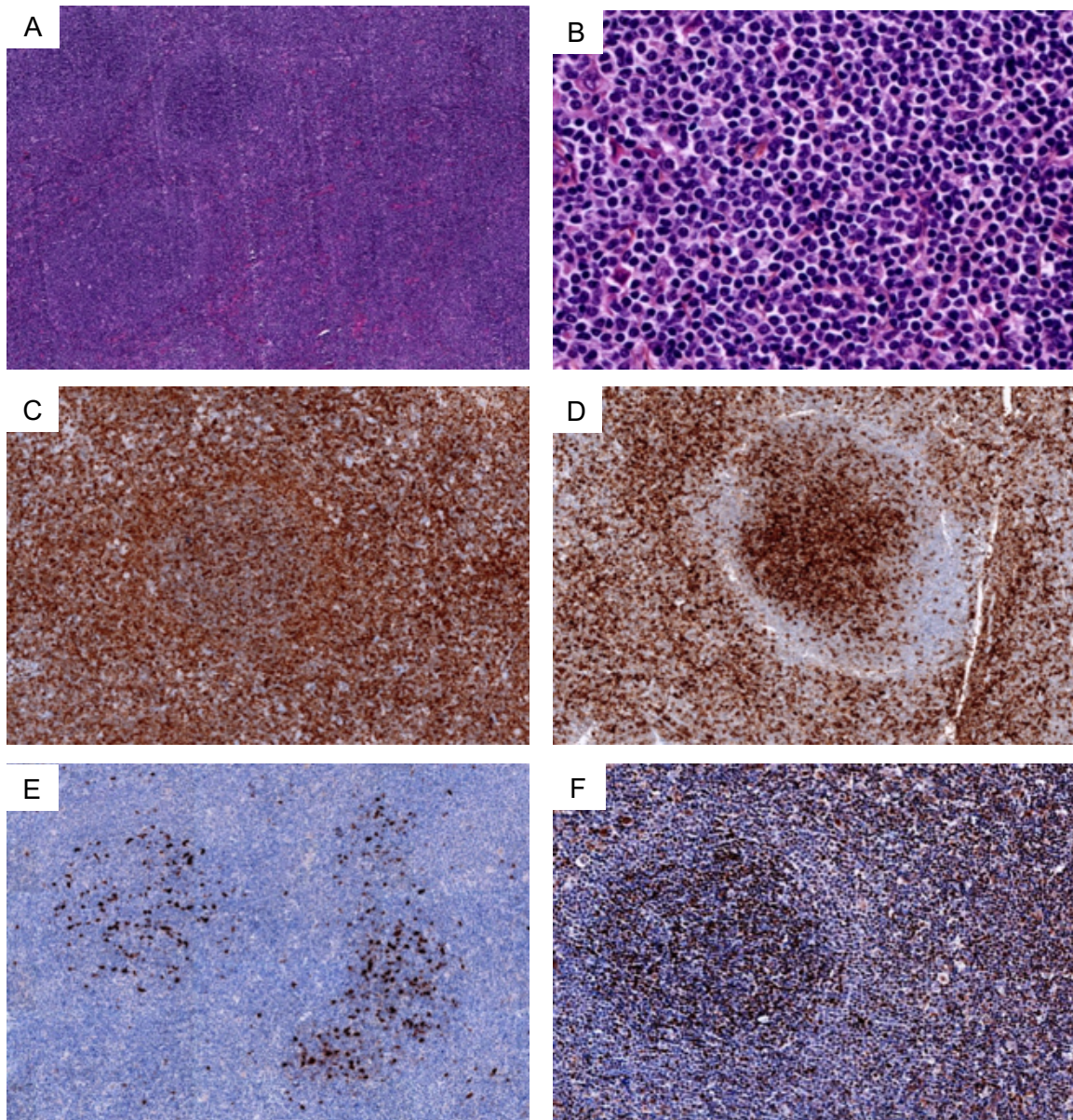
**Lymphome folliculaire avec différenciation plasmocytaire.** La prolifération lymphomateuse est d'architecture diffuse (A) et est constituée de cellules tumorales de petite taille à différenciation plasmocytaire. Les noyaux comportent des corps de Dutcher (B). L'anticorps anti-CD138 n'est pas exprimé par les cellules lymphomateuses (C). Les anticorps anti-CD20 (D) et anti-CD10 (E) sont positifs.

**Planche 5 :**



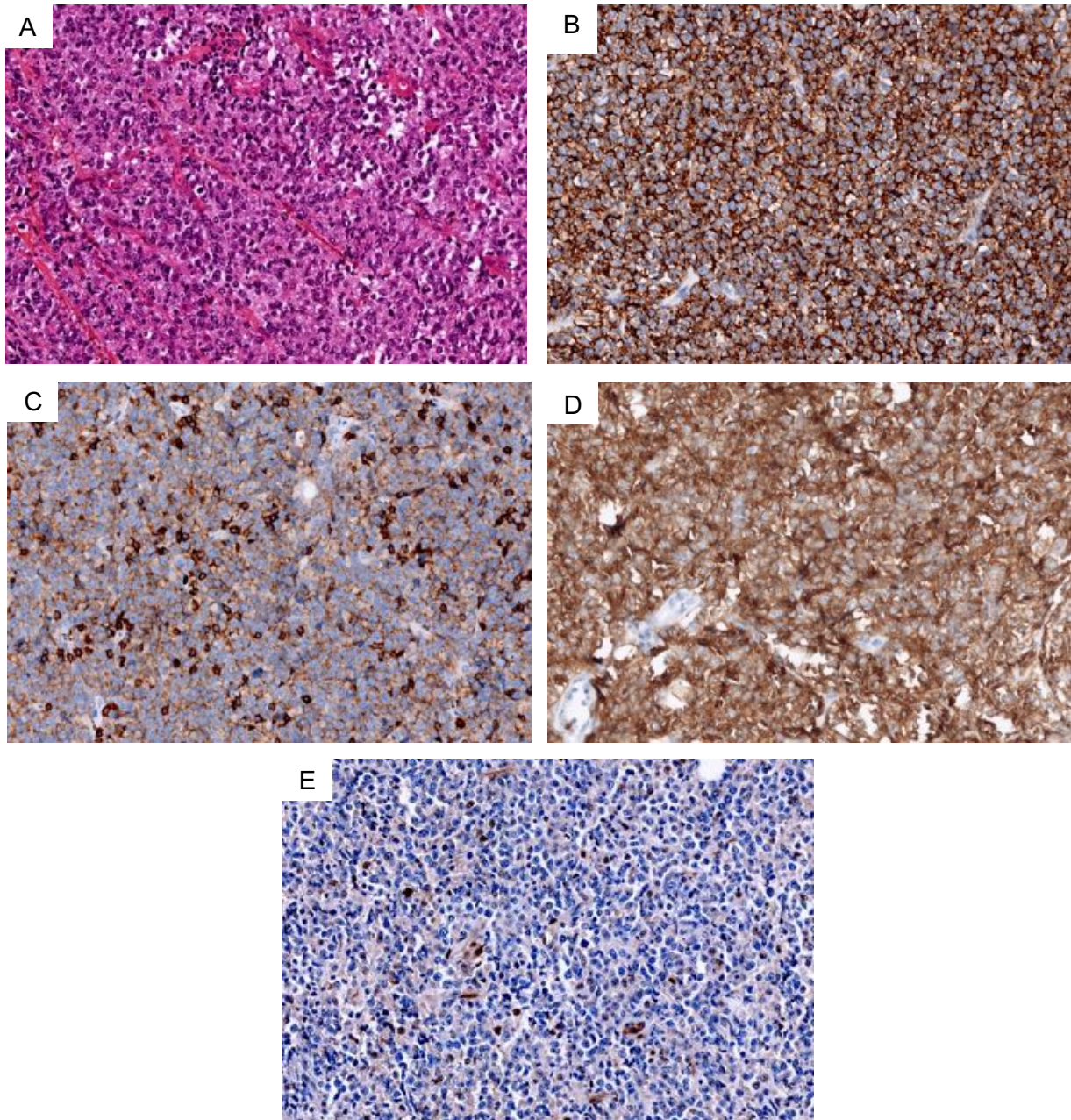
**Lymphome folliculaire avec caractéristiques Castleman-like.** L'architecture de la lymphoprolifération est nodulaire et diffuse (A). Le centre germinatif tumoral est pénétré par des vaisseaux sanguins hyalins réalisant des images de type « lollipop » (B) et la zone du manteau se dispose en « bulbe d'oignon » (C). Les anticorps anti-CD20 (D), CD10(E) et BCL2 sont positifs.

**Planche 6 :**



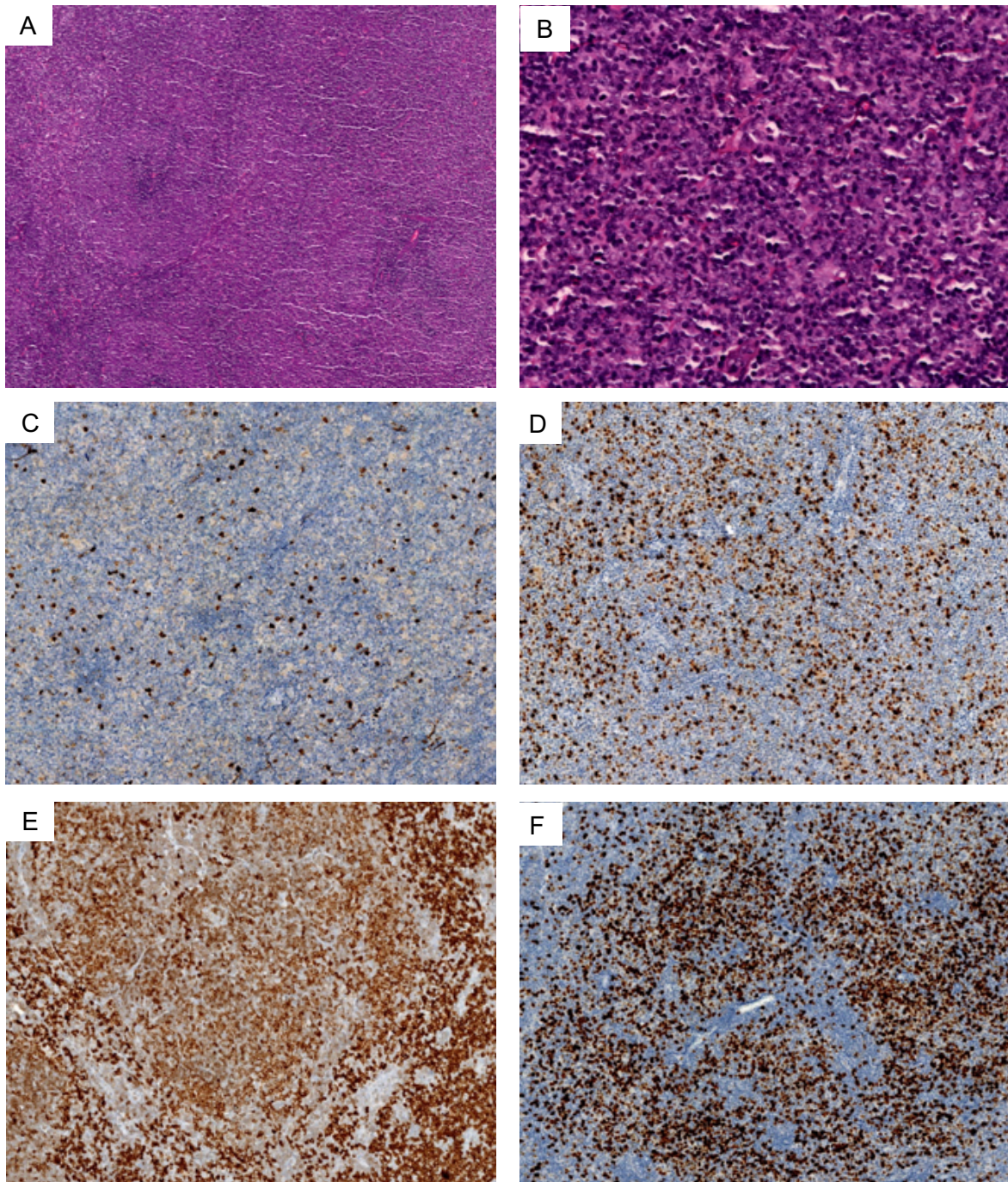
**Lymphome folliculaire avec différenciation marginale.** La prolifération lymphomateuse est d'architecture nodulaire et diffuse (A). Les cellules lymphomateuses présentent une différenciation monocytoïde (B) et expriment la protéine BCL2 (C). Le CD5 marque de nombreux lymphocytes T entre les nodules et dans les nodules (D). Les cellules lymphomateuses sont négatives pour le CD10 (E) et positives pour le BCL6 (F).

## Planche 7



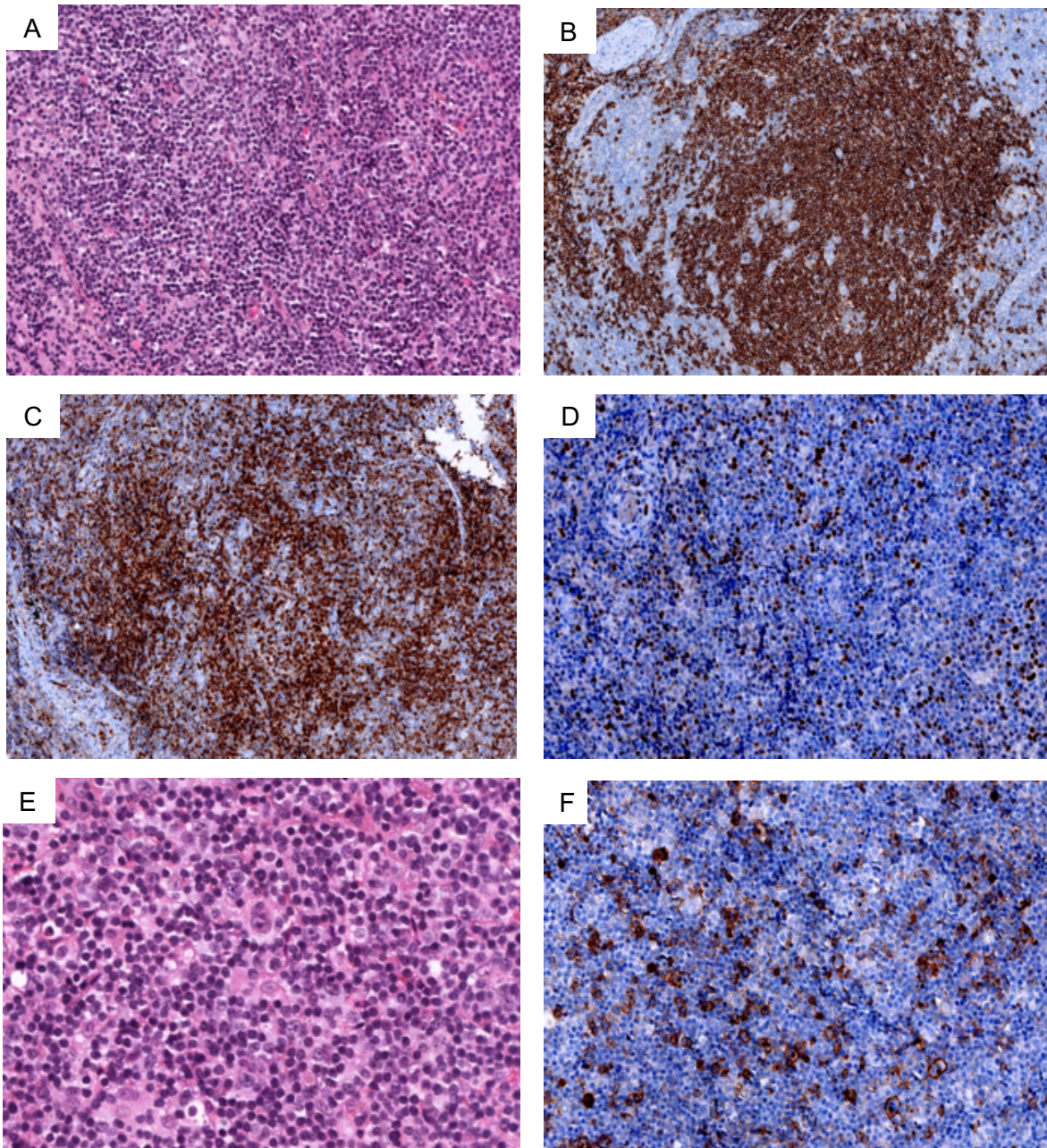
**Transformation d'un lymphome folliculaire CD5+.** La prolifération est d'architecture diffuse et est constituée de cellules lymphomateuses de grande taille (A). Ces cellules tumorales expriment le CD20 de façon intense et diffuse (B). Le CD5 est exprimé de façon intense par les lymphocytes T dispersés et de façon plus modérée par les cellules tumorales (C). Le CD10 est positif (D). L'anticorps anti-cycline D1 n'est pas exprimé (E).

**Planche 8 :**



**Lymphome folliculaire CD10-/MUM1+.** La prolifération lymphomateuse est d'architecture diffuse (A) et est constituée par des secteurs centroblastiques correspondant à un grade cytologique 3B (B). L'anticorps anti-CD10 est négatif (C) et l'anticorps anti-MUM1 est positif dans >30% des cellules tumorales (D). L'anticorps anti-BCL2 est positif (E). L'index de prolifération du Ki67 est élevé, proche de 100% dans certains secteurs (F).

**Planche 9 :**



**Lymphome folliculaire composite.** La prolifération lymphomateuse renferme des secteurs d'architecture nodulaire composés de cellules de type centrocytique (A) exprimant le CD20 (B), la protéine BCL2 (C) et très faiblement le BCL6 (D). Elle est également le siège de secteurs plus polymorphes composés de petits lymphocytes réactionnels, de polynucléaires éosinophiles, de plasmocytes et de quelques cellules tumorales non cohésives de type Reed Sternberg ou de type Hodgkin (E). Ces cellules tumorales dispersées expriment le CD30 (F).

## *b) Examens complémentaires*

Au sein de ce groupe de LF non conventionnels ou variants, la relecture a aussi porté sur le résultat des techniques complémentaires visant à éliminer les diagnostics différentiels. La plupart de ces techniques complémentaires indispensables avaient déjà été réalisées lors du diagnostic initial.

Ainsi :

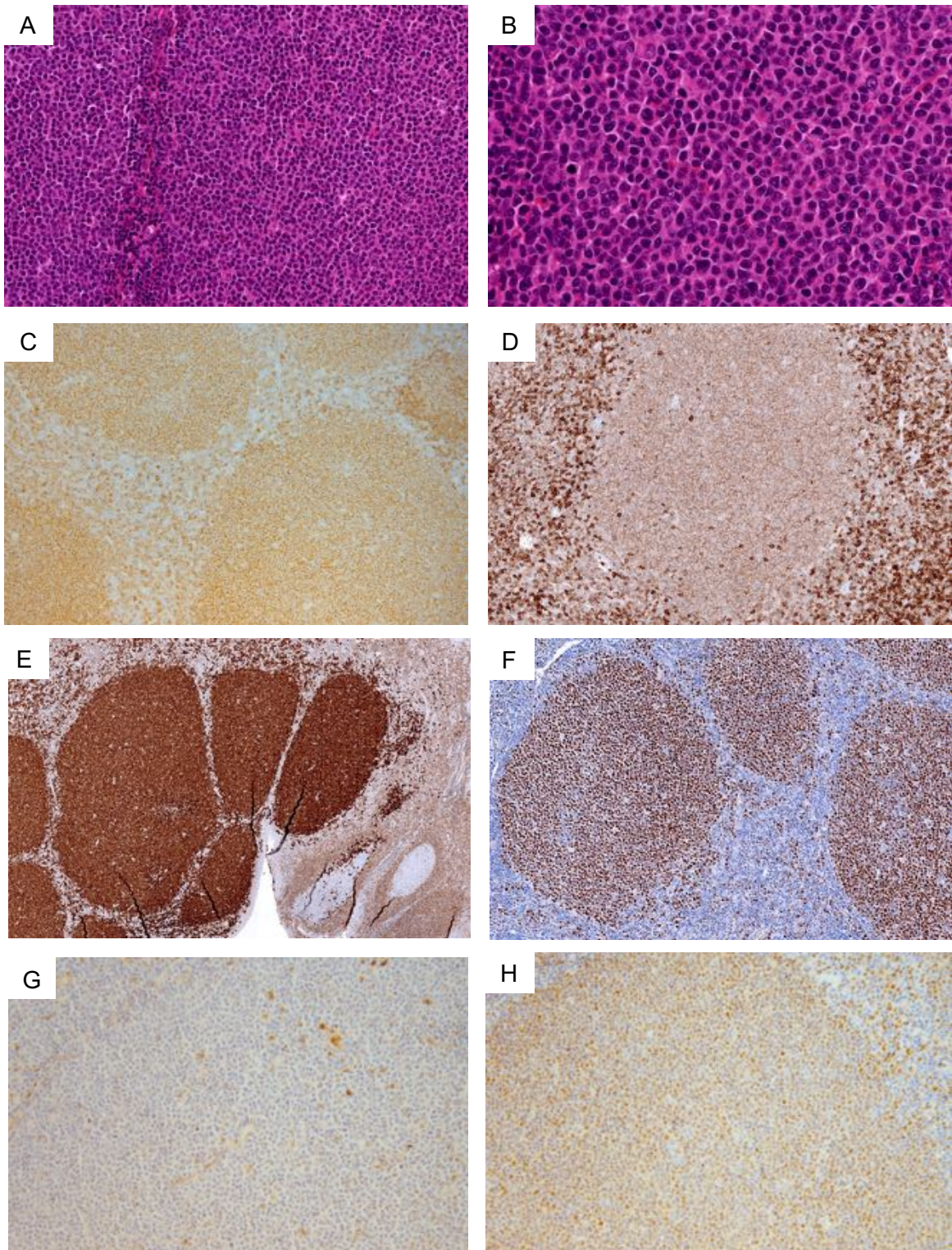
- pour chaque LF avec différenciation plasmocytaire, l'étude de l'expression du CD138 avait été réalisée au diagnostic et aucun ne l'exprimait.
- Pour les LF avec IHC BCL2 (clone 100/D5) négative :
  - 13 IHC BCL2 (clone E17) réalisées au diagnostic, dont 12 d'entre eux l'exprimaient.
  - 9 FISH BCL2 réalisées au diagnostic, dont 6 cas ne comportaient pas de réarrangement du gène *BCL2* (conclus en vrai LF BCL2-) et 3 cas comportaient un réarrangement du gène *BCL2* (conclus faux négatifs).
  - La biologie moléculaire, réalisée pour 4 cas, mettait en évidence une clonalité B dans 2 cas.
  - Pour 23 LF, aucune technique complémentaire n'était réalisée.
- Au sein des 8 LF classés en variant diffus, l'anticorps anti-STAT6 a été testé pour 3 cas, afin d'apporter un argument supplémentaire en faveur de cette forme. Aucun des cas testés n'exprimait cet anticorps.
- Au sein des 9 LF CD5+ recensés, afin d'éliminer le diagnostic différentiel de lymphome à cellules du manteau, l'utilisation des anticorps anti-cycline D1 et/ou anti-SOX11 était préconisée : 5 LF CD5+ avaient été testés pour au moins un de ces deux anticorps au moment du diagnostic et les 4 autres restants, ont été testés après relecture histologique de cette cohorte.

Un seul de ces 9 cas présentait un immunomarquage pour l'anticorps anti-SOX11 permettant de modifier le diagnostic initial de LF CD5+ de grade 3B, en lymphome à cellules du manteau de variant blastique.

Après relecture histologique attentive de ce cas, quelques éléments en faveur du lymphome à cellules du manteau de variant blastique étaient présents, comme l'architecture nodulaire et non folliculaire de la prolifération, avec absence totale de RFD, ou encore l'absence de lésion au sein de follicules résiduels persistants en périphérie. Par ailleurs, l'analyse FISH ne mettait pas en évidence de réarrangement des gènes *BCL2*, *BCL6*, *IRF4* et *CCND1*. Les caractéristiques de ce cas sont décrites sur la planche-photo 10.



**Planche 10 :**



**Lymphome à cellules du manteau de variant blastique.** La prolifération lymphomateuse est d'architecture nodulaire et diffuse (A). Elle est constituée de cellules de taille moyenne, d'aspect blastique (B). Ces cellules tumorales expriment le CD20 (C) et le CD5 (D), le BCL2 (E) et le BCL6 (F). L'anticorps anti-cycline D1 est négatif (G). Un immunomarquage nucléaire modéré est présent dans l'ensemble des cellules lymphomateuses avec l'anticorps anti-SOX11(H).

## 2. LF de grade 3A/3B et transformés

### a) *Analyse histologique*

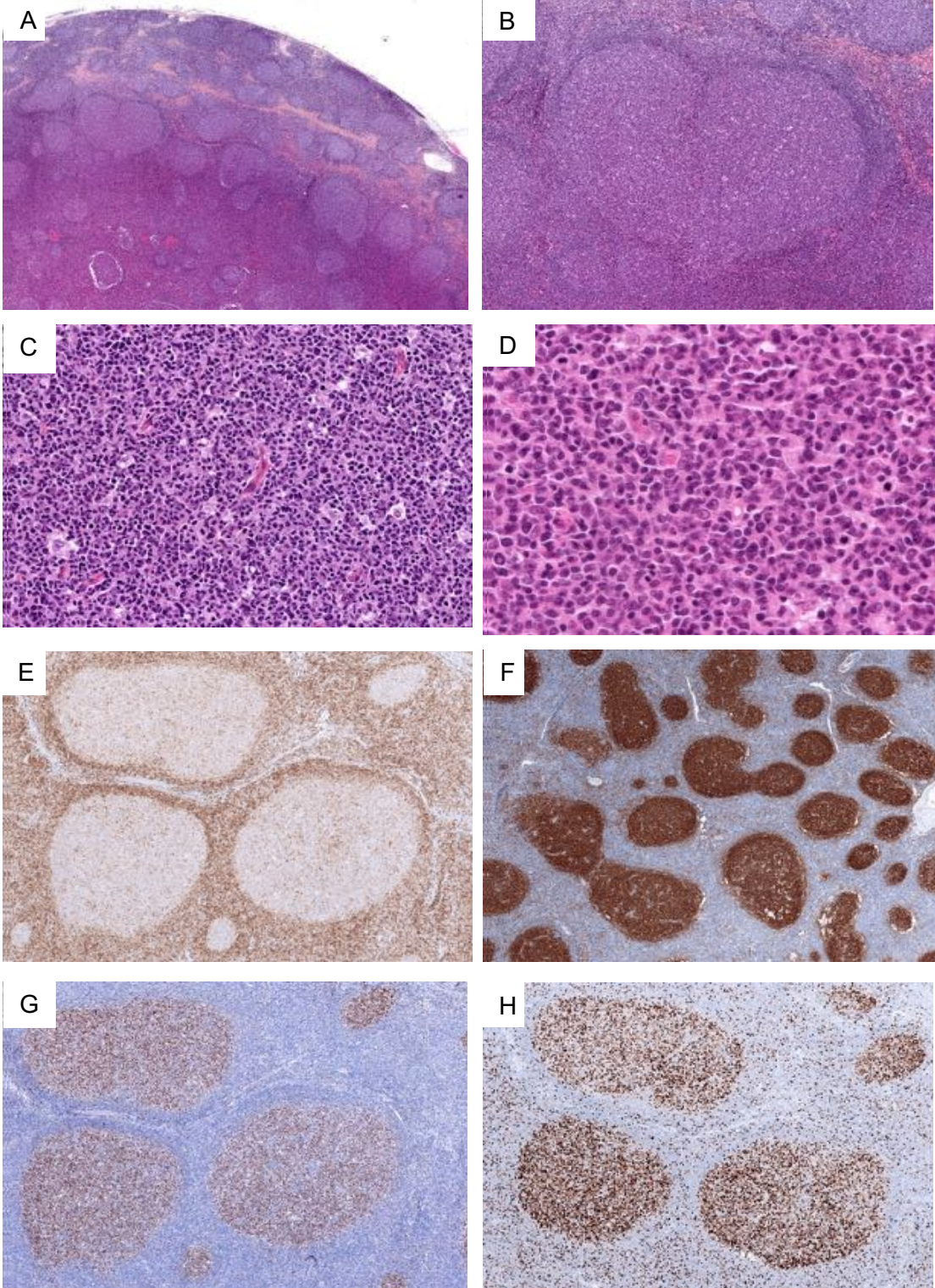
Au sein de notre cohorte de 287 LF, 54 sur les 64 LF de grade 3A, 3B ou transformés ont fait l'objet d'une relecture, en étant particulièrement attentifs aux critères diagnostiques des lymphomes de type pédiatrique et des lymphomes à grandes cellules avec réarrangement d'IRF4, énoncés précédemment. Les 10 cas non relus correspondaient à des relectures.

Au sein de cette série, l'aspect blastoïde-like de la prolifération lymphomateuse était observé au sein de 13 cas.

L'architecture folliculaire pure, caractéristique indispensable au diagnostic de LFTP, était présente dans un seul cas, dont le diagnostic de LFTP avait déjà été proposé en 1ère hypothèse. La description détaillée correspond à la planche-photo 11.

L'analyse FISH confirmait l'absence de réarrangement des gènes *BCL2* et *IRF4*.

**Planche 11 :**



**Lymphome folliculaire de type pédiatrique.** La prolifération lymphomateuse est d'architecture folliculaire (A). Les follicules tumoraux sont volumineux et souvent confluent entre eux (B). Les cellules lymphomateuses sont de taille moyenne blastoïdes-like et associées à des mitoses et des macrophages à corps tingibles (C et D). Elles expriment le CD10 (F) et le BCL6 (G) et n'expriment pas le BCL2 (E). L'index du ki67 est élevé, proche de 100% au sein des follicules tumoraux (H).

### *b) Examens complémentaires*

Parmi les 13 cas dont la morphologie était compatible avec un lymphome B à grandes cellules avec réarrangement *IRF4*, la relecture s'est attardée sur le statut IHC de MUM1. L'étude immunohistochimique de MUM1 était déjà réalisée et positive pour 6 cas et 7 IHC MUM1 ont été réalisées en complément, après relecture. Deux de ces 7 LF nouvellement testés, présentaient un immunomarquage MUM1 au sein de >30% des cellules tumorales. Au total, 8 LF d'aspect blastoïde-like et exprimant le MUM1 ont été sélectionnés lors de la relecture histologique, pour la recherche du réarrangement du gène *IRF4* par technique FISH.

### *c) Analyse du gène IRF4 par FISH interphasique*

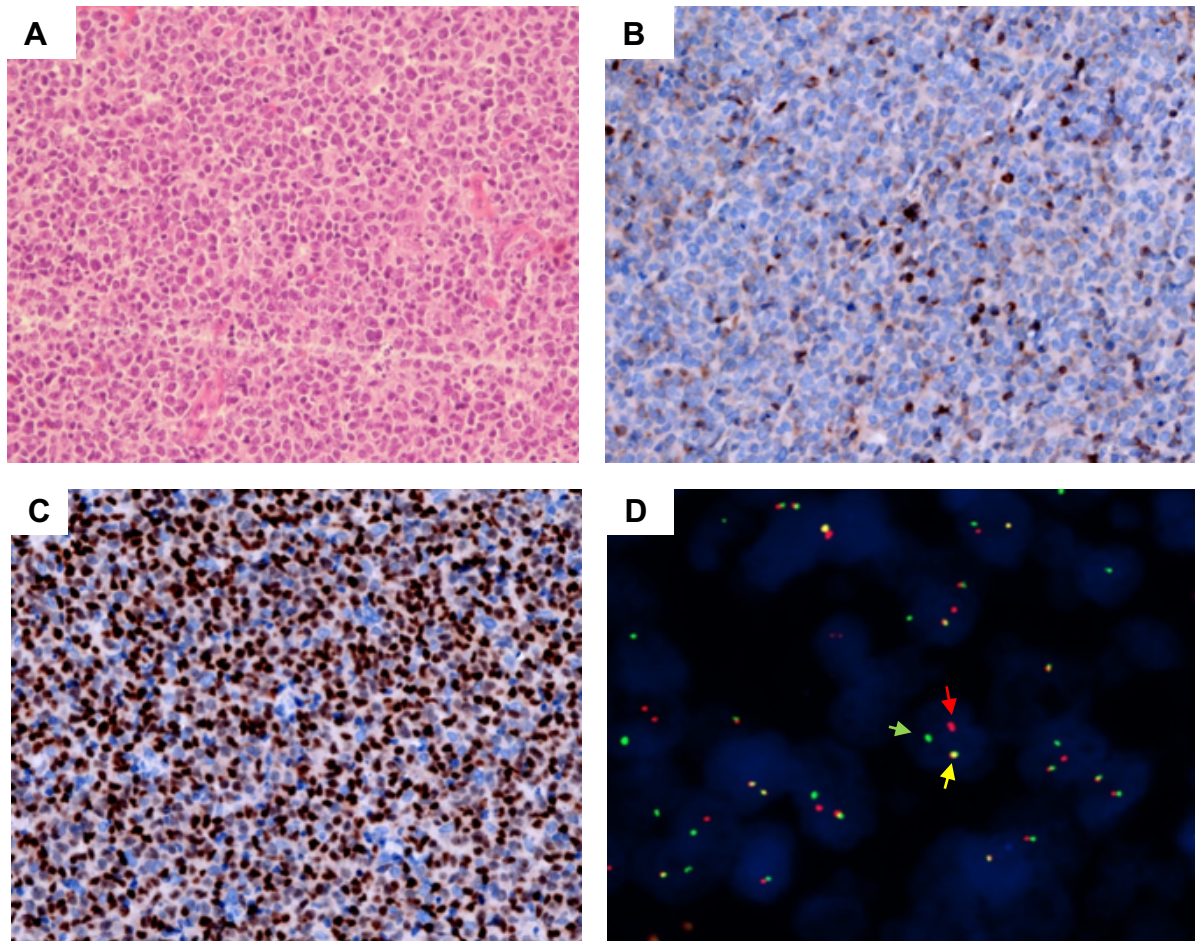
La technique FISH avec la sonde *IRF4* a donc été réalisée pour les 8 lymphomes folliculaires exprimant MUM1 et dont la morphologie était monomorphe, blastoïde-like et de grade 3.

Parmi ces 8 cas testés, l'analyse FISH a mis en évidence un réarrangement du gène *IRF4*, au sein d'un seul cas.

En effet, au sein de 53,77% (57/106) des noyaux tumoraux de ce cas, une fusion rouge-verte et un « split » ou séparation de deux autres signaux rouge et vert, étaient visualisées. Il s'agissait d'une amygdalectomie d'un jeune patient âgé de 5 ans, pour lequel le diagnostic de lymphome folliculaire transformé en lymphome B diffus à grandes cellules avait été initialement posé. Ce résultat cytogénétique a permis de reclasser ce diagnostic en lymphome B à grandes cellules avec réarrangement *IRF4*, selon la

classification OMS 2016. L'ensemble des caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et cytogénétiques de ce cas est détaillé dans la figure 14.

Les 7 autres cas analysés ne possédaient pas de réarrangement IRF4. Leur diagnostic initial de LF de grade 3 a donc été confirmé.

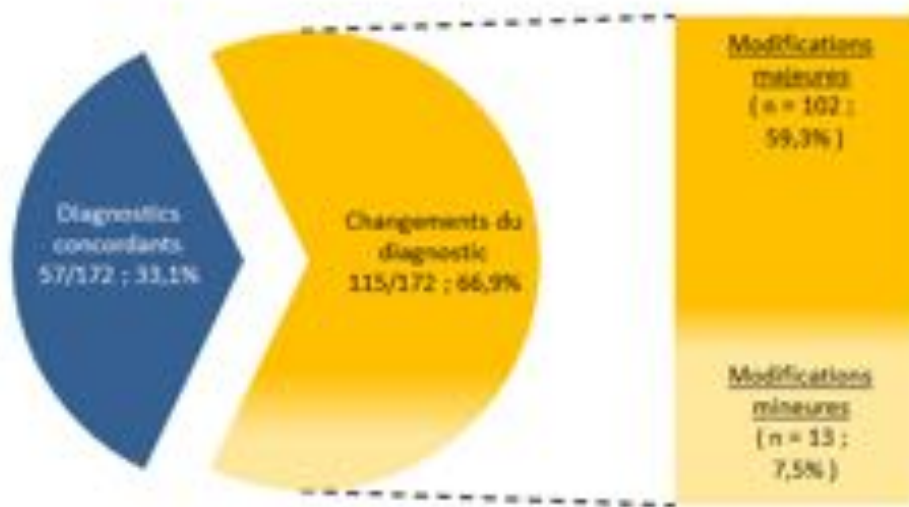


**Figure 14. Caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et cytogénétiques du lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4 :** l'architecture amygdalienne est totalement effacée par une prolifération lymphomateuse diffuse caractérisée par des cellules tumorales de grande taille (A; HES). Ces cellules lymphomateuses sont négatives pour l'anticorps anti-BCL2 (B; BCL2) et fortement positives pour l'anticorps anti-MUM1 (C; MUM1). L'étude FISH avec la sonde Break-Apart IRF4 montre au sein des noyaux une fusion de signaux rouge et vert (flèche jaune) et un « split », avec un signal rouge (flèche rouge) et un signal vert (flèche verte) séparés, correspondant à un réarrangement du gène *IRF4* (D).

## II. Objectifs secondaires

### A. Impact de la relecture du réseau LYMPHOPATH dans la prise en charge des patients

Notre étude comprenait 60% (172/287) de cas de relecture. La répartition du taux de concordance et des changements du diagnostic sont représentés dans la figure 15 ci-dessous.



**Figure 15.** Représentation schématique du taux de concordance et des changements entre le diagnostic initial avant relecture et le diagnostic final après relecture parmi les 172 cas révisés dans le cadre du réseau LYMPHOPATH.

Les diagnostics concordants étaient minoritaires avec seulement 33,1% (57/172) des cas. Au sein de ces diagnostics concordants, 13 cas étaient des lymphomes folliculaires non gradables (avant et après relecture) : 4 prélèvements étaient de trop petite taille pour la réalisation d'un grade significatif, 2 cas correspondaient à un variant ou un sous-type dont le grade n'était pas applicable (2 lymphomes de type duodéal) et 7 cas renfermaient une zone de transformation en DLBCL, impliquant le grade le plus élevé. Sur les 44 cas dont le diagnostic et le grade étaient concordants, 22 cas avaient été gradés selon l'ancienne

classification de l'OMS 2001, avec l'utilisation des termes « bas grade », pour désigner les grades 1-2 et 3A (17/22 cas) ou des termes « grade 1 » - « grade 2 » seuls, pour désigner les grades 1-2 (4/22) ou encore du terme « grade 3 transformé » seul pour désigner un grade 3B transformé.

Modifications majeures et mineures	Modifications diagnostiques parmi toutes les modifications diagnostiques		% parmi tous les cas de relecture
	Effectifs	%	
<b>Modifications majeures</b> ( <i>avec impact potentiel sur la prise en charge du patient</i> )	<b><u>102</u></b>	<b><u>88,7</u></b>	<b><u>59,3</u></b>
- Lésion bénigne à LF et vice versa	14	12,2	8,1
- Lymphome classé en autre tumeur maligne	0	0	0
- Lymphome sans classification	13	11,3	7,6
- Mauvaise classification du sous-type de lymphome :	12	10,5	7
- LNH T en LF et vice versa	0	0	0
- LH en LF et vice versa	1	0,8	0,6
- LNH B mature autre que LF en LF et vice versa	11	9,7	6,4
- Modification du grade cytologique :	48	41,7	27,9
- LF de grade 1-2 ou 3A en LF de grade 3B ou avec DLBCL et vice versa	16	13,9	9,3
- LF non gradé en LF gradé	32	27,8	18,6
- Absence d'hypothèse diagnostique initiale	15	13	8,7
<b>Modifications mineures</b> ( <i>sans impact potentiel sur la prise en charge du patient</i> )	<b><u>13</u></b>	<b><u>11,3</u></b>	<b><u>7,5</u></b>
- LF de grade 1-2 en grade 3A et vice versa	5	4,35	2,9
- LF de grade 3B en DLBCL et vice versa	0	0	0
- LF non gradé avec zone de DLBCL en LF gradé avec zone de DLBCL et vice versa	5	4,35	2,9
- LF de grade 1-2 en LF non gradable	3	2,6	1,7
<b>Total</b>	<b><u>115</u></b>		<b><u>66,9%</u></b>

**Tableau VIII. Modifications majeures et mineures entre le diagnostic initial et le diagnostic final, après relecture par les experts du réseau LYMPHOPATH.**

Les diagnostics non concordants, caractérisés par une modification majeure ou mineure dans le diagnostic final, représentaient 66,9% (115/172) de l'ensemble des cas de relecture.

Les modifications majeures, ayant un potentiel impact dans la prise en charge du patient, étaient largement majoritaires avec 102 cas (59,3% des cas de relecture). Les modifications mineures étaient au nombre de 13 cas (7,5% des cas de relecture).

Les modifications majeures du grade cytologique représentaient le plus grand nombre et comprenaient 16 cas de LF de grade 1-2 ou 3A modifiés en LF de grade 3B ou avec zone de transformation en DLBCL, et 32 cas de LF non gradés initialement devenus gradés après la relecture.

Ensuite, la mauvaise classification du sous-type de lymphome ayant un impact dans la prise en charge du patient (n=12 ; 10,5% de l'ensemble des modifications) incluait un lymphome de Hodgkin (LH) modifié en LF et 11 lymphomes non-hodgkiniens B matures autre que le LF modifiés en LF (avec comme diagnostics initiaux ; 5 lymphomes de la zone marginale ou de MALT, 1 lymphome de Burkitt, 1 lymphome lympho-plasmocytaire, 1 lymphome de type lymphocytaire, 1 lymphome B diffus à grandes cellules riche en T, 1 néoplasie folliculaire *in situ* reclassée en LF et 1 lymphome B diffus à grandes cellules reclassé en LF composite avec LH associé). Dans notre étude, aucun diagnostic initial de lymphome non-hodgkinien de phénotype T n'était présent.

Les autres modifications majeures correspondaient à 14 cas de reclassification de lésions bénignes ou possiblement bénignes en LF (avec 6 lymphadénites, 1 maladie de Castleman, 5 hypothèses diagnostiques évoquant soit une lymphadénite ou soit un LF et 2 hypothèses diagnostiques évoquant soit une lymphadénite ou soit un DLBCL), à 15 prélèvements adressés pour avis diagnostique, sans hypothèse diagnostique initiale



formulée et à 13 lymphomes sans classification initiale. Dans notre étude, aucun diagnostic initial de tumeur maligne autre que lymphomateuse n'était présent.

Les modifications mineures, c'est-à-dire, sans impact dans la prise en charge du patient, étaient minoritaires (n=13; 11,3% de l'ensemble des modifications diagnostiques). Les modifications mineures du grade cytologique comprenaient 5 cas de grade 1-2 modifiés en grade 3A et 5 cas non gradés comportant une zone de transformation modifiés en LF gradés avec zone de transformation. Les 3 LF gradés initialement 1-2, étant considérés comme non gradables par l'expert du réseau LYMPHOPATH à cause de la petite taille du prélèvement, appartenaient également aux modifications mineures, sans impact dans la prise en charge du patient.

Sur les 172 cas de relecture, 36 diagnostics initiaux avant la relecture du réseau LYMPHOPATH correspondaient à un diagnostic conforme à la classification de l'OMS. Au sein de ce petit groupe, la concordance après la relecture était plus élevée, de 58,3% (21/36).

## B. Prédiction de la réponse au traitement anti-EZH2

La cohorte totale fournie par l'équipe du professeur Morschhauser était constituée de 50 patients, ayant soit un lymphome folliculaire ou soit un lymphome B diffus à grandes cellules, réfractaires aux dernières lignes de traitement ou en rechute. Seuls 18 patients, dont le diagnostic était un lymphome folliculaire, ont été sélectionnés pour notre étude.

Trois patients sans aucun matériel tissulaire analysable ont été exclus.

Au total, 15 patients ont été inclus dans notre étude. Un prélèvement ultérieur au séquençage a été utilisé pour 3 d'entre eux, le matériel tissulaire initialement séquençé étant épuisé ou non disponible.

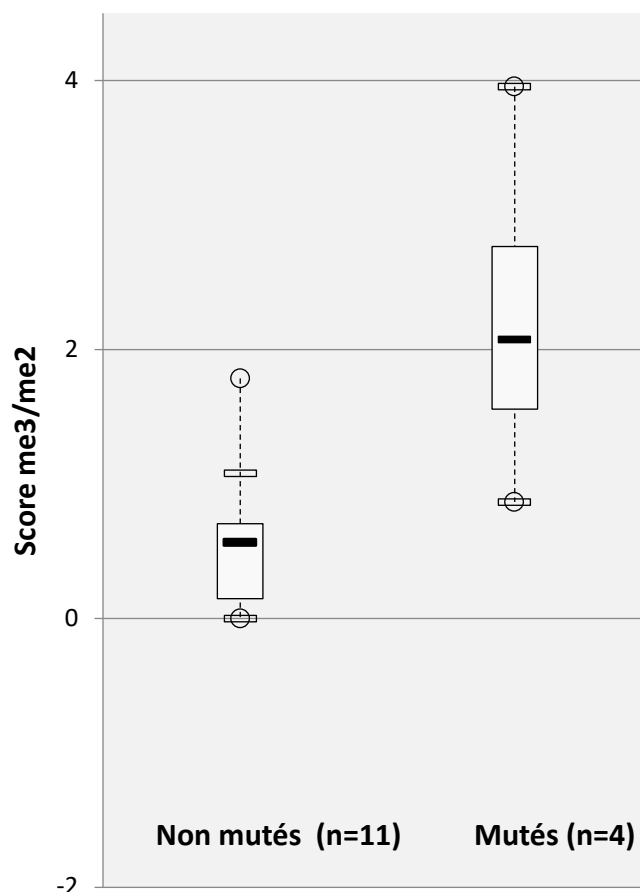
Le statut mutationnel de 4 patients se caractérisait par la présence de la mutation Y641 du gène *EZH2* et le statut mutationnel pour les 11 autres patients inclus n'était pas muté pour *EZH2*. Le tableau IX décrit les différentes caractéristiques de l'ensemble des patients inclus, la médiane des différents scores IHC pour chaque anticorps (*EZH2*, H3K27me2 et H3K27me3) ainsi que la médiane du score me3/me2 calculé, correspondant au profil de méthylation.

<b>Caractéristiques</b>	<b>Total</b>	<b>EZH2 non muté</b>	<b>EZH2 Y641 muté</b>
- Nombre de patients	15	11	4
- Sexe :			
- Femme	10	6	4
- Homme	5	5	0
- Age (années) médiane ( <i>intervalle</i> )	62 (41-85)	60 (53-85)	65,5 (41-68)
- Grade cytologique :			
- 1-2	7	5	2
- 3A	1	1	0
- non renseigné	7	5	2
- Score IHC EZH2 médiane ( <i>intervalle</i> )	15 (8-30)	15 (8-30)	13,5 (10-15)
- Score IHC H3K27me2 médiane ( <i>intervalle</i> )	18 (1-30)	20 (8-30)	6,5 (1-16)
- Score IHC H3K27me3 médiane ( <i>intervalle</i> )	30 (18-30)	30 (18-30)	30
- Score me3/me2 médiane ( <i>intervalle</i> )	0,71 (0-3,95)	0,56 (0-1,78)	2,08 (0,87-3,95)

**Tableau IX. Patients selon leur statut mutationnel EZH2**

Les scores IHC EZH2 et H3K27me3 étaient semblables entre les patients mutés et non mutés. En revanche, les patients avec la mutation Y641 EZH2 avaient un score IHC H3K27me2 globalement plus bas que les patients non mutés.

Pour chaque patient le score me3/me2 a alors été calculé. La médiane de ce score pour les patients EZH2 Y641 muté (médiane=2,08) était plus élevée que pour les patients EZH2 non mutés (médiane=0,56). Le diagramme en boîte de la figure 16 montre la répartition des différents scores.



**Figure 16. Diagramme en boîte représentant les scores me3/me2 calculés selon le statut mutationnel d'EZH2, montrant un score plus élevé au sein des prélèvements de patients mutés EZH2.**

Les 15 patients ont été classés selon les 3 profils IHC de méthylation :

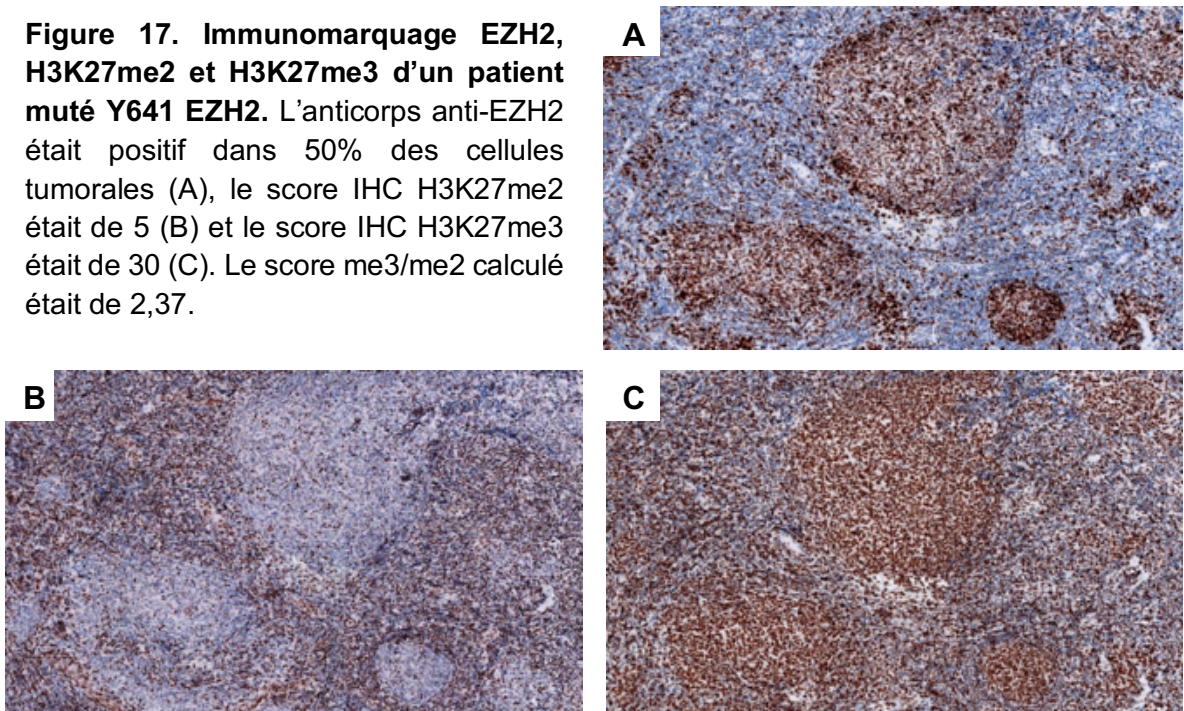
- 13 patients avaient un profil H3K27me3-haut/H3K27me2-bas (score me3/me2 > 0).
- 2 patients avaient un profil intermédiaire (score me3/me2 = 0).
- Aucun patient H3K27me3-bas/H3K27me2-haut (score me3/me2 < 0)

Au sein des profils H3K27me3-haut/H3K27me2-bas, les patients mutés avaient un score me3/me2 élevé, le plus souvent supérieur à 1,5 (sauf pour un patient dont le score était de 0,87). Les patients non mutés avaient, quant à eux, un score me3/me2 le plus souvent

inférieur à 1 (sauf pour 2 patients dont les scores étaient de 1,08 et 1,78). Les 2 patients ayant un profil intermédiaire avaient un statut EZH2 non mutés.

La figure 17 représente le profil de méthylation d'un patient EZH2 Y641.

**Figure 17. Immunomarquage EZH2, H3K27me2 et H3K27me3 d'un patient muté Y641 EZH2.** L'anticorps anti-EZH2 était positif dans 50% des cellules tumorales (A), le score IHC H3K27me2 était de 5 (B) et le score IHC H3K27me3 était de 30 (C). Le score me3/me2 calculé était de 2,37.



# DISCUSSION

## I. Objectif principal

Le lymphome folliculaire se définit par une grande hétérogénéité morphologique, phénotypique et génétique entraînant de nombreuses subtilités diagnostiques et de nomenclature qui ont des conséquences dans la prise en charge des patients. La classification OMS 2016 décrit le lymphome folliculaire de type pédiatrique et le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4, deux nouvelles entités de bon pronostic. L'ensemble de ces données font du lymphome folliculaire un enjeu diagnostique réel pour le pathologiste.

Au sein de notre étude de 287 cas, nous avons décrit plusieurs types d'architecture et caractéristiques cytologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques permettant la mise en lumière des différents variants, de plusieurs sous-types morphologiques ou immunophénotypiques ainsi que des nouvelles entités.

### A. Données épidémiologiques

Au sein de notre cohorte, les LF représentaient 15,1% des lymphomes non-hodgkiniens et 13,1% de tous les lymphomes diagnostiqués au sein de notre Institut entre le 1<sup>er</sup> janvier 2017 et le 31 décembre 2018. Cette répartition était en accord avec celle enregistrée par le réseau national LYMPHOPATH : en effet, les LF représentaient 15,2% (2463/16121) de tous les lymphomes jusqu'alors enregistrés pour cette même période.

La discrète prédominance masculine observée au sein de notre série, dont le sexe-ratio homme/femme (H/F) était de 1,08, était également retrouvée dans les chiffres publiés par

l'Institut National du Cancer (INCa) (sexe-ratio H/F à 1,2) (9), ainsi qu'au sein de la série de 505 lymphomes folliculaires de Wahlin et *al.* (sexe ratio H/F de 1,13) (123).

L'âge médian de 63 ans que ce soit chez l'homme ou chez la femme, était également comparable avec les données de l'INCa, dont l'âge médian était de 65 ans chez l'homme et 68 ans chez la femme. Wahlin et *al.* retrouvaient un âge médian plus jeune, de 57 ans.

## **B. Type et localisation des prélèvements**

### **1. Type de prélèvement**

La biopsie-exérèse ganglionnaire constituait le mode de prélèvement le plus fréquent de notre série, de même que celle de Wahlin et *al.* (123). En effet, la cytoponction ganglionnaire, bien que moins invasive, n'est pas adaptée pour apprécier l'architecture globale de la prolifération lymphomateuse et évaluer la proportion de centrocytes par rapport à celle des centroblastes (124).

La biopsie ganglionnaire à l'aiguille, représentant le second mode de prélèvement le plus fréquent de notre série, est normalement recommandée chez les patients ne présentant pas de ganglion lymphatique facilement accessible (124). En effet, ce type de prélèvement présente un problème de représentativité et la réalisation d'un grade cytologique significatif, nécessitant au moins 10 follicules analysables, est parfois impossible.

Au sein de notre série, 21,1% (19/90) des biopsies ganglionnaires à l'aiguille ne permettaient pas la réalisation du grade cytologique. De plus, au sein des 204 LF gradés, des réserves sur la représentativité du grade cytologique étaient émises par le pathologiste, pour 12 cas, dont 10 correspondaient à des biopsies ganglionnaires à

l'aiguille. Ces constatations confirment que ce type de prélèvement n'est pas adapté à l'établissement d'un grade précis, dans un nombre non négligeable de cas.

De plus, il est également difficile, sur ces prélèvements de petite taille, d'apprécier l'architecture globale (une architecture semblant diffuse pourrait correspondre à une zone interfolliculaire) ou d'affirmer l'absence totale de transformation en DLBCL, qui peut être focale. Les techniques immunohistochimiques, cytogénétiques ou de biologie moléculaire, souvent indispensables au diagnostic, sont parfois non réalisables, par manque de matériel tumoral, rendant le travail du pathologiste périlleux et incertain.

Dans notre série, ces mêmes difficultés s'observaient également pour d'autres prélèvements biopsiques de petite taille (hépatique, digestive, tissu mou, sphère ORL, pulmonaire et rétro-péritonéale).

Il convient donc de privilégier l'exérèse ganglionnaire par rapport à la biopsie ganglionnaire à l'aiguille. Si cette option est contre-indiquée à cause de la présence de comorbidités chez le patient (comme une thrombopénie), il faut alors être très prudent et proposer, le cas échéant, la réalisation d'un nouveau prélèvement.

## 2. Localisation des prélèvements

Le ganglion était le type d'organe le plus fréquemment prélevé avec 77% de l'ensemble des prélèvements de notre série, en accord avec les directives de pratique clinique de la Société Européenne de l'oncologie médicale (124). L'aire inguinale était le site ganglionnaire le plus fréquent et représentait 36% de l'ensemble des prélèvements ganglionnaires. Cette donnée concordait avec la répartition anatomique du LF.



## C. Données histopathologiques

L'architecture prédominante de notre série était folliculaire, en cohérence avec la définition du LF de la classification OMS 2016. L'architecture diffuse était la forme la plus rare de notre série, avec 14,6% (42/287) des cas, mais plus fréquente que dans l'étude de Wahlin et *al.* (123) où elle représentait seulement 4% de la série de 505 LF. Cette différence pourrait s'expliquer par le grand nombre de prélèvements de petite taille d'architecture diffuse de notre série. En effet, sur les 42 cas d'architecture diffuse, 32 prélèvements correspondaient à des biopsies de petite taille (21 biopsies à l'aiguille et 11 biopsies d'autres sites).

En accord avec les études précédentes (tableau X), le grade cytologique 1-2 était le plus représenté (123) (1) (125) (126). Depuis la classification de l'OMS 2008, le grade cytologique 3 est subdivisé en 3A et 3B. Le lymphome folliculaire de bas grade, regroupant les grades cytologiques 1-2 et 3A, du fait d'une survie globale semblable, à la lumière de la série de Wahlin et *al.*, représentait la très grande majorité des cas de l'ensemble des séries. Le grade 3B était globalement plus rare.

	Série actuelle	Wahlin et <i>al.</i> (2011)	Philippe Gaulard et <i>al.</i> (2017)	Réseau LYMPHOPATH national français (2016-2017)	Zhou XG et <i>al.</i> (2018)	Maeshima A et <i>al.</i> (2013)
Nombre de cas gradés	204	505	4760	2463	350	255
Grade 1-2	70%	75%	96%	84,8%	61,4%	80%
Grade 3A	19,1%	20%		11,4%	30%	18%
Grade 3B	9,8%	5%	4%	3,8%	8,6%	2%

**Tableau X. Répartition des grades cytologiques au sein des 204 cas de lymphome folliculaire gradés de notre série et au sein des séries de la littérature.**

Le nombre de cas non gradés de notre série était assez important avec 83/287 cas (28,9%). Plus de la moitié de ces cas (46/83 ; 55,4%) correspondait à des prélèvements de trop petite taille. Le grade cytologique des autres cas n'était pas nécessaire ou applicable à cause des caractéristiques propres au LF ; 19 cas renfermaient une zone de transformation en DLBCL, caractéristique suffisante pour établir une prise en charge optimale pour le patient et 18 cas correspondaient à des variants ou sous-types de LF.

## D. Données immunohistochimiques

Le tableau XI compare différents marquages immunohistochimiques de notre série avec d'autres séries de la littérature (127) (54) (126) (49) (123) (128).

### 1. Expression de BCL2

L'expression de la protéine BCL2 au sein des follicules tumoraux est une des caractéristiques du LF. En effet, elle traduit une surexpression de la protéine BCL2 jouant un rôle majeur dans la lymphomagenèse grâce à ses propriétés anti-apoptotiques. Néanmoins, l'expression de cette protéine, détectée par immunohistochimie (IHC), et la réelle présence d'un réarrangement du gène *BCL2* au sein des cellules lymphomateuses n'est pas toujours corrélée. L'équipe de Masir N., par exemple, a montré qu'au sein d'un groupe de 26 LF sans réarrangement du gène *BCL2*, les cellules tumorales de 11 LF, soit environ 42%, exprimaient l'anticorps anti-BCL2 mais de façon plus hétérogène. Au sein de notre série, 3 cas n'exprimant pas la protéine BCL2 en IHC avec le clone BCL2 100/D5, étaient réarrangés pour le gène *BCL2*, en analyse FISH.

Les anticorps anti-BCL2 peuvent également présenter une positivité variable d'un cas à l'autre en raison de mutations dans le gène *BCL2* et de l'altération d'épitopes. Il est alors

possible d'éliminer ces faux négatifs en utilisant un anticorps spécifique qui reconnaît les formes mutées de la protéine BCL2, comme par exemple, le clone E17. Dans notre série, 12 des 13 cas négatifs avec le clone utilisé en routine, le BCL2 100/D5, étaient positifs avec le clone BCL2 E17.

Il est également important de garder en tête, afin d'éviter des situations diagnostiques piégeuses, que les cellules B des follicules primaires du ganglion lymphatique expriment la protéine BCL2 de façon physiologique. C'est pourquoi la co-expression de CD20 (marqueur des lymphocytes B) et de la protéine BCL2 doit être interprétée de façon prudente et n'est pas un critère suffisant de malignité (129). C'est la répartition anormale des cellules centro-germinatives (CD10+/BCL6+) en dehors des centres germinatifs qui est le signe le plus robuste de malignité.

A la lumière de ces éléments, l'absence d'expression de la protéine BCL2, en immunohistochimie, ne doit pas être utilisée pour exclure un diagnostic de lymphome folliculaire si les autres caractéristiques du LF sont présentes.

Au sein de notre série, cette démarche diagnostique explique que, pour la majorité des LF n'exprimant pas la protéine BCL2 (clone 100/D5), soient 23 cas sur 36, aucune autre technique complémentaire par IHC BCL2 E17 ou par FISH BCL2 n'avait été réalisée, du fait de la présence des autres critères de malignité énoncés suffisants.

De façon intéressante, plusieurs études ont montré une corrélation entre le grade cytologique et l'expression de la protéine BCL2. En effet, 85% à 90% des LF de grade 1-2 expriment la protéine BCL2 contre 50 à 70% pour les LF de grade 3A et 3B (49) (123) (126). Au sein de notre série, 92,8% des LF de bas grade (grade 1-2 et 3A) sur-exprimaient la protéine BCL2 contre 80,9% pour les LF de grade 3B. La série de Horn H et *al.* ne comportait que 70% de cas exprimant la protéine BCL2 en IHC du fait d'un biais de sélection, où 67% des LF étaient au moins de grade 3A (49).

## 2. Expression des marqueurs centro-germinatifs (CD10/BCL6)

Au sein de l'ensemble des cas de notre série, au moins un marqueur centro-germinatif (CD10 et/ou BCL6) était positif. De façon similaire à l'expression de la protéine BCL2, l'expression de CD10 par immunohistochimie peut être faible ou non exprimée des cellules lymphomateuses du LF, phénomène plus fréquemment observé au sein des grades cytologiques 3A et 3B (123) (49). Cette corrélation était également présente au sein de notre série, dont 95,6% des LF de grade 1-2 ou 3A exprimaient le CD10 contre 82,6% des cas de grade 3B. Dans ce cas, le pathologiste s'était assuré du phénotype centro-germinatif en réalisant une technique IHC avec l'anticorps anti BCL6.

## 3. Expression de CD23 et CD21

Les anticorps anti-CD23 et anti-CD21 sont utiles afin de mettre en évidence le réseau folliculaire dendritique de la prolifération lymphomateuse. Au sein de notre série, il avait été mis en évidence dans 120/195 cas un RFD, parfois hyperplasique, confirmant l'architecture folliculaire au moins partielle de la prolifération. Les différents types d'architecture du RFD étaient rarement précisés dans les comptes rendus anatomopathologiques. Pourtant, l'équipe de Kurshumliu et *al.* a montré que différents types d'architecture mis en évidence par l'anticorps anti-CD23, pouvaient être corrélés avec le grade cytologique. Un RFD complet ou partiellement détruit au sein du follicule néoplasique ou un RFD partiellement détruit sans follicule néoplasique visible était plus fréquemment observé au sein des LF de grade 1-2. L'absence de RFD était plus fréquente au sein des LF de grade 3 (130).

De manière intéressante, l'anticorps anti-CD23 était positif sur les cellules lymphomateuses de 26,1% (47/180) des cas tout grade confondu. Il s'agissait

préférentiellement de LF à présentation inguinale et de grade 1-2. L'équipe de Thorns est arrivée au même constat, avec 28% des LF de sa série exprimant le CD23 et avec une proportion plus importante de LF à présentation inguinale ou de grade 1 (127). L'équipe de Olteanu a montré une expression de CD23 dans 70% des LF de leur série, mais grâce à une technique plus sensible que l'IHC: la cytométrie de flux (CMF). Il s'agissait également de LF de grade 1-2 ou de présentation inguinale (131).

#### 4. Expression de MIB1

L'index de prolifération du Ki67, évalué par l'anticorps MIB1, est communément utilisé en routine comme marqueur pronostique du LF. En effet, de nombreuses études ont montré l'existence d'une corrélation entre l'index de prolifération du Ki67 et le grade cytologique. Plus celui-ci était élevé et plus le grade cytologique était élevé également (126) (132) (54) (56) (123).

Au sein de notre série, nous avons constaté cette même corrélation. En fixant des seuils à 10 et 30%, nous avons mis en évidence un index de prolifération du Ki67 faible (<10%) ou intermédiaire (de 10 à 30%) dans la majorité des cas (63,1% ; 135/214), tout grade confondu. Un index du Ki67 faible était présent dans la grande majorité des cas de grade 1-2 (88,3% des LF de grade 1-2 avait un index Ki67<10%). L'index de prolifération élevé (>30%) correspondait dans 69,1% à des grades 3A ou 3B. L'index de prolifération intermédiaire, était en revanche plus difficile à extrapoler. En effet, ce groupe renfermait aussi bien des LF de grade 1-2 que de grade 3A ou 3B.

Au sein de notre série, on constatait donc une tendance entre l'association LF de grade 1-2 et index de prolifération du Ki67 faible et entre l'association LF de grade 3 et index de prolifération Ki67 élevé.

Toutefois, le pourcentage de cellules tumorales immunomarquées est souvent hétérogène rendant l'interprétation souvent difficile pour le pathologiste. En effet, lors de la relecture histologique, nous avons observé que l'index du Ki67 était souvent plus élevée au sein des follicules tumoraux et plus faible au niveau des aires interfolliculaires. L'équipe de Koster A et *al*, en comparant la corrélation du grade cytologique avec l'index de prolifération Ki67, a recommandé, lorsque la prolifération était d'architecture folliculaire, de ne prendre en compte que le marquage intra-folliculaire. Les cellules T interfolliculaires étant très nombreuses et souvent immunomarquées par l'anticorps MIB1, le marquage intra-folliculaire demeurerait être le plus représentatif (132).

Néanmoins, la valeur prédictive de ce marqueur reste débattue par de nombreux cas discordants décrits dans la littérature, ayant un grade 1-2 plutôt rassurant mais un index de prolifération du Ki67 élevé.

Par exemple, au sein de la série de Wang SA et *al.*, 18% des LF de grade 1-2 avaient un index de prolifération du Ki67 élevé (>30%) d'évolution clinique mimant celle d'un LF de haut grade. La série de 127 patients de Bastion Y et *al.* arrivait au même constat (133). Il convient alors de spécifier dans la conclusion du compte-rendu anatomopathologique l'index de prolifération Ki67 élevé pour les LF de grade 1-2, tout en précisant l'évolution plus agressive possible.

Au vu de ces discordances, la recherche de nouveaux marqueurs pronostiques immunohistochimiques est justifiée. Une étude a, par exemple, montré l'existence d'une forte corrélation entre l'immunomarquage élevé des cellules tumorales pour l'anticorps anti-MUM1 et le raccourcissement de la survie sans progression, faisant de MUM1 un marqueur pronostique fort et robuste (55).

Une seconde piste a concerné SKP2 (S-phase kinase-associated protein 2) décrit comme étant un très bon marqueur de prolifération, car présent uniquement lors de la

phase S du cycle cellulaire (134). L'équipe de Kai Zhang et *al.* a montré que l'analyse quantitative d'image du marquage SPK2 par un logiciel, pouvait être un moyen utile et plus performant dans le grading d'un LF, par rapport au traditionnel grade cytologique ou encore, par rapport à l'index de prolifération Ki67 (135).

Au sein de notre institut, l'analyse du marquage de l'anticorps MIB1 est réalisée par « eyeballing », c'est à dire en évaluant le pourcentage de cellules immunomarquées à l'œil nu, et que d'une manière générale, un compte automatisé par un logiciel adapté serait plus reproductible.

#### 5. Expression de MUM1

L'expression de MUM1 est un marqueur de mauvais pronostic (55). Cette donnée de la littérature est peu connue des pathologistes, raison pour laquelle cet anticorps n'était pas utilisé systématiquement au sein de notre série, mais plutôt dans les cas où des critères de gravité ou des aspects inhabituels étaient présents (grade cytologique élevé, variant morphologique, phénotype CD10-, index de prolifération Ki67 élevé,...), dans le but d'éliminer d'autres diagnostics différentiels éventuels, dont notamment le lymphome à grandes cellules avec réarrangement IRF4.

Les données de notre série, de même que celle des deux séries de Horn H. et *al.* à quelques années d'intervalle, étaient comparables avec environ 25% de LF immunomarqués MUM1.

	<b>Série actuelle</b>	<b>Wahlin BE et al. (2012)</b>	<b>Horn H et al. (2018)</b>	<b>Maeshima A. et al. (2013)</b>	<b>Horn H. et al. (2011)</b>	<b>Goteri G. et al. (2011)</b>	<b>Thorns et al. (2007)</b>
<b>Nombre de cas étudiés</b>	287	462	53	255	100	82	219
<b>CD20/CD79a</b>	284/284	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>CD5</b>	9/237	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<b>BCL2</b>	225/249	128/142	34/46	243/255	70/100	72/82	201/219
<b>CD10</b>	263/280	94% (grades 1-2 et 3A) 87% (grade 3B)	27/32	239/255	62/97	74/82	95%
<b>BCL6</b>	173/185	97%	35/40	NR	NR	76/82	NR
<b>MUM1</b>	12/48	NR	8/33	NR	20/74	NR	NR
<b>CD23</b>	47/180	NR	NR	NR	NR	NR	57/211

**NR: Non renseigné**

**Tableau XI. Caractéristiques immunohistochimiques du LF**



## **E. Données de cytogénétique**

L'analyse FISH est très peu demandée en deuxième intention par les pathologistes de notre Institut. En effet, seulement 23 prélèvements (soit environ 8% de l'ensemble des prélèvements de notre série) ont bénéficié de cette analyse, à la demande du pathologiste, afin de rechercher un réarrangement du gène *BCL2*. Ce réarrangement était présent dans 12 cas, apportant un argument fort en faveur du diagnostic de LF.

Cependant fin 2017, lorsque le prélèvement comporte assez de matériel tumoral, une analyse cytogénétique systématique est effectuée par le laboratoire de Cytogénétique de l'hôpital Jeanne de Flandre du CHRU de Lille. Elle consiste à la réalisation d'un caryotype, complétée, lorsque cela est indiqué, par une analyse FISH métaphasique et interphasique. Ces données cytogénétiques apportent des éléments complémentaires précieux pour de nombreux diagnostics hématologiques de notre Institut, dont le lymphome folliculaire.

## **F. Ce qu'il faut retenir des variants du lymphome folliculaire**

### *1. Néoplasie folliculaire in situ*

Les 9 néoplasies folliculaires *in situ* de notre série comportaient les mêmes caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques (planche 1) que celles décrites dans la littérature (63) (129) (57). En effet, le parenchyme ganglionnaire était d'architecture conservée, purement folliculaire, et était le siège d'un unique ou de quelques follicules néoplasiques non contigus. Ces follicules néoplasiques étaient caractérisés par une population lymphomateuse de type centrocytique. Le grade cytologique, bien que non applicable en raison de la définition même de ce variant, avait

été réalisé pour seulement 2 cas, un grade 1-2 et un grade 3A. L'expression de CD10, par les follicules néoplasiques, était d'intensité plus forte qu'au sein des follicules non tumoraux. Cette particularité doit donc être un élément d'alerte pour le pathologiste. L'expression de la protéine BCL2 était présente au sein de chaque follicule néoplasique. Aucune cellule lymphoïde interfolliculaire n'exprimait la protéine BCL2, confirmant le caractère *in situ* de cette lésion. Bien que ce variant soit souvent associé à un autre type de lymphome, préférentiellement à un lymphome folliculaire conventionnel, les 9 cas de notre série étaient purement intra-folliculaire. En effet, les NFIS associées à un LF conventionnel ne sont généralement pas décrites en raison du pronostic inchangé de cette association. Toutefois, lorsque la NFIS est diagnostiquée, il convient de préciser de la nécessité d'un bilan d'extension complet, afin d'éliminer un éventuel lymphome associé.

## 2. Lymphome folliculaire de type duodéal

Les 5 lymphomes folliculaires de type duodéal représentaient 1,7% de l'ensemble des cas de notre série. Le réseau LYMPHOPATH national français, sur la même période (années 2017 et 2018), avait enregistré 9 LFTD, ce qui représentait 0,37% (9/2463) des lymphomes folliculaires enregistrés.

Les caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques (planche 3) correspondaient à celles décrites dans la littérature (72) (136) (137). En effet, même si ce variant possède la même morphologie et le même phénotype que le LF conventionnel systémique de grade 1-2, principal diagnostic différentiel de ce variant, quelques particularités spécifiques sont à rechercher. Tout d'abord, le RFD, mis en évidence par les anticorps anti-CD23 et anti-CD21, est décrit dans la littérature comme largement diminué, occupant en périphérie du follicule néoplasique moins de 10% de sa surface

(73). Ce RFD réduit était observé au sein des 2 cas où l'étude du CD23 avait été réalisée (illustré par la photo F de la planche 3) et apparaîtrait donc un élément diagnostique intéressant.

Certains auteurs soulignent que l'expression du CD10 serait diminuée dans 20% des LFTD (72), ce qui n'était pas le cas dans notre série.

Dans la littérature, d'autres caractéristiques apparaîtraient comme spécifiques au LFTD, comme le profil d'expression moléculaire AID-/BACH2+, l'expression de CD27 ou encore de l'IgA (72).

### 3. Variant diffus du Lymphome folliculaire

Les 8 LF de notre série, pouvant correspondre au variant diffus selon la classification OMS 2016, ne comportaient pas l'ensemble des caractéristiques décrites dans la littérature.

Tout d'abord, la localisation inguinale typique de ce variant ne concernait que la moitié de notre série et le CD23 était exprimé au sein de 6 cas.

L'expression de STAT6 est décrite comme présente dans 80% des cas la série de 11 variants diffus de LF de Siddigi et *al.* (69). Néanmoins, l'anticorps anti-STAT6 que nous avons testé au sein de 3 prélèvements, ne montrait aucun immunomarquage du noyau des cellules tumorales.

L'analyse FISH BCL2 avait également été réalisée pour 3 prélèvements, dont un seul été caractérisé par une absence de réarrangement, autre caractéristique typiquement retrouvée chez ce variant.

De plus, 4 des 8 cas de notre série correspondaient à des biopsies ganglionnaires à l'aiguille ou d'un autre site, de petite taille, où l'architecture dite diffuse était sûrement faiblement représentative de l'ensemble de la prolifération.

Néanmoins, le grade cytologique, lorsqu'il était réalisable, était de bas grade (6 grades 1-2 et 1 grade 3A), en accord avec les données de la littérature.

Devant ces constatations, nous remarquons que ce variant est difficile à mettre en évidence en se limitant aux caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques seules. En effet, les analyses cytogénétique et de biologie moléculaire, détectant la délétion 1p36, caractéristique de ce variant, pourraient être un argument supplémentaire important en sa faveur.

Cependant, l'expression de STAT6 au sein d'un LF d'architecture diffuse avec expression de CD23 associée, pourrait constituer un argument simple et efficace en faveur de ce variant, et l'étude de cette expression pourrait donc être indiquée devant un LF d'architecture diffuse exprimant le CD23.

## **G. Ce qu'il faut retenir des sous-types de lymphome folliculaire**

Les nombreux sous-types morphologiques et immunophénotypiques du LF décrits dans notre série et dans la littérature confirment la grande hétérogénéité de cette maladie et le risque non négligeable pour le pathologiste de tomber dans le piège d'un autre diagnostic différentiel.

### **1. Sous-types morphologiques**

Au sein de notre cohorte, 3 sous-types morphologiques étaient présents.

Tout d'abord, le sous-type comportant des caractéristiques Castleman-like intéressait 2 cas de notre cohorte. Ils renfermaient tous les deux, des lésions focales de type « lollipop » ou en « bulbe d'oignon ». Le phénotype était par ailleurs classique du LF, avec les expressions de CD20, d'au moins un marqueur centro-germinatif et de la protéine BCL2. Ces caractéristiques étaient également décrites dans la littérature (85) (138).

L'enjeu majeur de ce sous-type morphologique, concerne principalement les cas renfermant les lésions Castleman-like de façon très majoritaire ou lors de l'analyse de petits prélèvements biopsiques. En effet, les follicules néoplasiques de morphologie conventionnelle, sont alors peu nombreux, atrophiques, voire absents de l'échantillon, rendant le diagnostic de LF difficile. Il est donc important que le médecin pathologiste ait en mémoire l'existence de ce sous-type, lorsqu'il réalise le diagnostic d'une maladie de Castleman de forme vasculaire hyaline, afin de ne pas passer à côté d'un diagnostic de LF, modifiant alors la prise en charge du patient de façon radicale.

Ensuite, 3 LF comportaient une différenciation plasmocytaire dont 2 étaient associés à de nombreux corps de Dutcher. Le grade cytologique était de grade 1-2 pour l'unique cas où

il était réalisé. Pour le cas où le CD10 était négatif, l'origine centro-germinative des cellules lymphomateuses avait été confirmée par la positivité de BCL6. La protéine BCL2 était exprimée pour les 2 cas testés.

La série de Gradowski J. et *al.* comportait les mêmes caractéristiques phénotypiques, 12/14 cas exprimant le CD10, 14/14 cas exprimant le BCL6 et 14/14 cas exprimant la protéine BCL2 (83). L'expression du CD138, marqueur plasmocytaire, était présente au sein des 14 cas de la série de Gradowski J. et permettait de décrire la distribution de la différenciation plasmocytaire, plutôt intra ou en inter folliculaire. Parfois, même seule l'expression de CD138 permettait de visualiser cette différenciation plasmocytaire. Au sein de notre série, l'expression de CD138 était absente dans les 3 cas. Ce sous-type était donc mentionné en ne prenant en compte que la différenciation plasmocytaire morphologique présente.

Enfin, le dernier sous type morphologique concernait un LF avec une différenciation marginale. Au sein de notre institut, seuls les LF avec une différenciation marginale complète étaient stipulés dans le compte-rendu anatomopathologique, expliquant l'unique cas présent de notre série contre les 9% observés dans la littérature (80). L'expression de CD10 de notre unique cas était absente concordant avec les observations de Xerri L et *al.* (57). Contrairement à notre cas où le BCL6 était exprimé, ce marqueur centro-germinatif est décrit comme plus fréquemment perdu, surtout sur les cellules tumorales interfolliculaires. Les marqueurs centro-germinatifs HGAL et LMO2, décrits comme plus sensibles et plus spécifiques, peuvent alors être utiles afin de confirmer l'origine centro-germinative des cellules tumorales d'aspect monocytoïde (50). Il pourrait donc être utile à l'avenir de développer au moins l'un de ces marqueurs dans notre Institut, pour remédier à ces situations diagnostiques difficiles.

## 2. Sous-types immunophénotypiques

Le sous-type LF CD5+ représentait 1,7% des cas (5/287) de notre cohorte. Bien que l'équipe de Li Y. ait décrit une prévalence de 2,7% de LF exprimant le CD5, moins de la moitié avait été détectée par méthode IHC seule, les autres étant seulement positif en cytométrie de flux. Les 5 cas de notre cohorte étaient de haut grade et 3 d'entre eux étaient le siège d'une zone de transformation en lymphome B diffus à grandes cellules, concordant avec le caractère plus agressif de ce sous-type observé dans les deux principales séries de la littérature (87) (88).

L'enjeu majeur, lors de l'analyse de ce sous-type, est d'éliminer les 2 diagnostics différentiels de lymphome exprimant habituellement le CD5. Tout d'abord, le lymphome à cellules du manteau doit être éliminé par la confirmation systématique en immunohistochimie, de l'absence d'expression de la Cycline D1 et/ou de SOX11. Au sein de notre cohorte, la relecture histologique et la réalisation systématique d'au moins 1 de ces anticorps pour l'ensemble des LF CD5+, ont permis de reclasser un LF CD5+ exprimant le SOX11, en lymphome à cellules du manteau de variant blastique.

Ensuite, le second lymphome exprimant habituellement le CD5, à éliminer systématiquement, est le lymphome de type lymphocytaire. L'utilisation de l'anticorps anti-CD23 est alors utile et serait à privilégier par rapport à celle de l'anticorps anti-CD21 : en effet, il permet à la fois de mettre en évidence le RFD et de détecter une expression éventuelle de cet anticorps par les cellules lymphomateuses en faveur d'un variant du LF ou d'un lymphome de type lymphocytaire.

Le phénotype CD10-/MUM1+ concernait 4 cas de notre cohorte. Deux cas étaient le siège d'une transformation en lymphome B diffus à grandes cellules, un cas était de grade 3B

et le dernier cas était de grade 3A. Ces observations étaient en accord avec la série de 22 LF CD10-/MUM1+ de Karube et *al.*, où environ 90% des cas étaient de grade 3A ou 3B (89). L'utilisation de cet anticorps n'étant pas systématique au sein de notre Institut, la prévalence de ce phénotype est probablement sous-estimée au sein de notre série.

Comme nous l'avons stipulé précédemment, le médecin pathologiste doit éliminer, devant tout LF exprimant le MUM1, le diagnostic de lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4, par technique FISH.

### 3. Le lymphome composite

Trois lymphomes composites caractérisés par l'association à la fois d'un LF et d'un lymphome de Hodgkin étaient présents dans notre cohorte. En effet, ces prélèvements renfermaient à la fois les caractéristiques pathologiques d'un LF conventionnel mais aussi celles d'un lymphome de Hodgkin classique (population cellulaire polymorphe, constituée de petits lymphocytes réactionnels, de polynucléaires éosinophiles, de plasmocytes et de quelques cellules tumorales non cohésives de type Reed-Sternberg ou de type Hodgkin). Ces données concordaient avec la description de l'équipe de Kuppers et *al.* du lymphome composite (92).



## H. Ce qu'il faut retenir des deux nouvelles entités de la classification OMS 2016

L'un de nos principaux objectifs était de nous pencher sur les caractéristiques et les outils permettant de faire le diagnostic différentiel des LF de grade 3, qui sont ceux qui partagent des caractéristiques morphologiques et phénotypiques communes avec les nouvelles entités de la classification OMS 2016.

### 1. Le lymphome folliculaire de type pédiatrique

Le LFTP est la nouvelle entité à part entière de la classification OMS 2016. Au sein de notre série de 287 LF, nous avons recensé un seul cas de LFTP même après relecture histologique de l'ensemble des grades 3A et 3B. Le réseau LYMPHOPATH national avait quant à lui, enregistré 2 LFTP sur la même période, confirmant la rareté de ce variant, encore peu connu.

Il s'agissait, pour notre cas, d'un jeune patient de 27 ans, en accord avec les données de la littérature sur la nette prédominance chez l'homme (sexe ratio H/F=10) et l'âge jeune de survenue (99).

L'ensemble des caractéristiques, décrites sur la planche-photo 10, correspondait à celle de la littérature (99), de par sa morphologie (architecture folliculaire pure, volumineux follicules néoplasiques aux contours serpiginieux, parfois confluent, d'aspect en ciel étoilé et constitués de cellules lymphomateuse d'aspect blastoïde-like) mais également de par son phénotype (CD20+, BCL2-, CD10+/BCL6+, MUM1- et index du Ki67 proche de 100% avec perte de la polarisation). L'analyse FISH confirmait l'absence de réarrangement des gènes *BCL2* et *IRF4*.

Lors de la relecture histologique, les diagnostics différentiels de lymphome folliculaire conventionnel d'architecture folliculaire pure et de grade 3B, de lymphome B à grandes cellules avec réarrangement *IRF4* et d'hyperplasie folliculaire réactionnelle avaient été éliminés par l'analyse d'un ensemble d'arguments.

La difficulté résidait, en effet, dans les caractéristiques communes de ces différentes entités :

- Le LF de grade 3B se définit par des cellules de grande taille, de type centroblastique, une expression de la protéine *BCL2* dans 50 à 70% des cas et un index de prolifération du *Ki67* élevé (49). Ces caractéristiques miment fortement le LFTP. Néanmoins, l'âge jeune du patient, la localisation au niveau de la tête et du cou, la présence de volumineux follicules confluent, l'atrophie de la zone du manteau et l'absence de réarrangement du gène *BCL2* en analyse FISH ont permis de retenir le diagnostic de LFTP.
- Le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement *IRF4*, nouvelle entité provisoire de la classification OMS 2016, également peu connue, partage avec le LFTP l'architecture possiblement folliculaire pure de la prolifération, l'aspect blastoïde-like des cellules lymphomateuses, le phénotype centro-germinatif des cellules tumorales et l'absence de réarrangement du gène *BCL2*. Mais l'absence d'expression de *MUM1* et l'absence de réarrangement du gène *IRF4* après analyse FISH ont permis d'éliminer ce diagnostic.
- L'hyperplasie folliculaire réactionnelle est évoquée devant la morphologie des volumineux follicules d'aspect en ciel étoilé, traduisant la présence de macrophages à corps tingibles, l'absence d'expression de la protéine *BCL2* en IHC et l'absence de réarrangement du gène *BCL2* par FISH. Cependant, les contours serpiginieux des follicules néoplasiques, l'aspect blastoïde-like des cellules

tumorales et la perte de polarisation du Ki67 ont permis de retenir le diagnostic de LFTP.

Comme nous venons de le voir, ce diagnostic est difficile et nous préconisons donc une démarche diagnostique spécifique, en plusieurs étapes, qui permettra au pathologiste de rassembler un ensemble d'arguments affirmant le LFTP.

L'obtention de renseignements cliniques complétée par une discussion avec le clinicien apparaissent, tout d'abord, essentielles. En effet, l'âge de survenu jeune, le sexe masculin, l'absence de contexte infectieux, la présence d'une unique adénopathie localisée dans la région tête et cou, volumineuse, sans autres symptômes associés, sont des éléments importants, en faveur du LFTP.

Ensuite, la morphologie de la prolifération du LFTP est importante à reconnaître et peut orienter le pathologiste : bien que les follicules volumineux, parfois confluent, avec un aspect en ciel étoilé puissent être observés dans l'hyperplasie folliculaire d'aspect réactionnel, les contours plus serpiginieux des follicules néoplasiques associés à l'aspect blastoïde-like et à une perte de polarisation du follicule par le Ki67 sont plus spécifiques de cette entité.

L'utilisation de plusieurs outils diagnostiques complémentaires apportant des arguments forts pour le diagnostic de LFTP est importante dans la suite de la démarche. L'étude immunohistochimique est primordiale pour montrer l'origine B (CD20+) et centro-germinative (CD10+/BCL6) des cellules lymphomateuses et confirmer leur présence en dehors des centres germinatifs. Elle permet également d'identifier l'absence d'expression de la protéine BCL2 ainsi que l'index de prolifération élevé du Ki67 avec la perte de la polarisation des follicules associée.

L'anticorps anti-IgD, mettant en évidence la zone de manteau des follicules, pourrait également apporter une aide diagnostique, cette dernière étant atténuée ou absente dans le LFTP et persistante dans le LF conventionnel. Cet anticorps n'étant pas mis au point au sein de notre Institut, il pourrait donc être intéressant de le développer, dans ce but précis.

L'utilisation systématique de l'anticorps anti-MUM1, devant toute prolifération lymphomateuse blastoïde-like, de phénotype centro-germinatif, est nécessaire afin d'éliminer le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement *IRF4*. Si le marquage est présent ou douteux, une analyse FISH complémentaire à la recherche du réarrangement du gène *IRF4* doit être systématique.

L'analyse FISH confirmant l'absence de réarrangement du gène *BCL2* est obligatoire.

Si le doute persiste avec le diagnostic d'hyperplasie folliculaire d'aspect réactionnel, la biologie moléculaire à la recherche d'un clone B peut être d'une grande aide. En effet, même si d'exceptionnels cas d'hyperplasie folliculaire ayant une clonalité CD10+ ont été décrits dans la littérature, la présence d'une clonalité B est un bon signe discriminant l'hyperplasie. Cette démarche diagnostique permettra d'obtenir assez d'arguments forts pour affirmer le LFTP.

## 2. Le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement *IRF4*

Le second diagnostic différentiel à évoquer devant un LF de grade 3, est le lymphome à grandes cellules avec réarrangement *IRF4*, nouvelle entité provisoire de la classification de l'OMS 2016.

Initialement, notre cohorte de 287 LF n'en comportait aucun, du fait de son caractère très récent et peu connu mais aussi et surtout, de par l'absence de la sonde IRF4, au sein du secteur FISH de notre Institut.

L'un des objectifs de cette thèse était donc de mettre au point cette analyse FISH et de décrire une démarche fiable permettant d'aboutir à ce diagnostic.

Nous avons donc commandé la sonde break apart, SPEC IRF4, DUSP22 Dual Color Break Apart probe, de chez Zytovision, et l'avons mise au point en suivant le protocole de ce fournisseur. Une collaboration avec le CHU de Bordeaux, a été nécessaire, afin de nous fournir des échantillons de contrôle positif et négatif fiables, permettant la validation de notre technique.

La relecture histologique de l'ensemble des LF de grade 3A et 3B et l'analyse FISH avec la sonde IRF4 des 8 LF d'aspect blastoïde-like exprimant MUM1, ont permis de reclasser un cas en lymphome B à grandes cellules avec réarrangement *IRF4*.

Il s'agissait d'un très jeune patient âgé de 5 ans, opéré d'une amygdalectomie, et dont le diagnostic de « LF transformé en lymphome B diffus à grandes cellules » avait été initialement posé. Les renseignements cliniques n'étaient pas disponibles. L'ensemble des caractéristiques décrites dans la figure 14 étaient en accord avec la littérature. La prolifération lymphomateuse était d'architecture diffuse et composée de cellules tumorales de grande taille de type centroblastique ou parfois d'aspect blastoïde-like. (107) Les cellules lymphomateuses avaient un phénotype B (CD20+), centro-germinatif (BCL6+) et n'exprimaient pas la protéine BCL2. L'anticorps anti-MUM1 était exprimé par l'ensemble des cellules tumorales et l'analyse FISH mettait en évidence, au sein de 53,77% (57/106) des noyaux tumoraux, une fusion rouge-verte associée à un « split » de deux autres signaux rouge et vert, confirmant la présence d'un réarrangement du gène *IRF4*.

Afin d'aboutir à ce diagnostic, une démarche méthodique permettant d'éliminer les 3 principaux diagnostics différentiels de cette entité, à savoir le LFTP, le LF conventionnel de grade 3B et le lymphome B diffus à grandes cellules, a été établie.

De façon similaire à la démarche diagnostique du LFTP, la connaissance des renseignements cliniques est nécessaire et apporte une aide précieuse pour le raisonnement initial. En effet, même si l'âge de survenue jeune est commun avec le LFTP, cette tranche d'âge est très rare pour le LF de grade 3B ou le lymphome B diffus à grandes cellules. L'absence de distinction de genre caractérisant cette entité provisoire, peut également être un argument contre le LFTP, qui survient essentiellement chez les hommes. La localisation au niveau de l'anneau de Waldeyer est classique.

L'architecture, quant à elle, est peu discriminante ; en effet, qu'elle soit folliculaire pure, partiellement folliculaire ou diffuse, elle ne doit pas faire éliminer le diagnostic de lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4. Néanmoins, une architecture diffuse permet d'éliminer le LFTP.

La suite de la démarche diagnostique intéresse la conduite à tenir devant tout LF d'aspect blastoïde-like. En effet, même si cet aspect morphologique est caractéristique de cette nouvelle entité, elle peut également se rencontrer dans le LFTP, le LF de grade 3B ou encore le lymphome B diffus à grandes cellules. Plusieurs outils complémentaires sont donc nécessaires afin de ne méconnaître aucun de ces diagnostics.

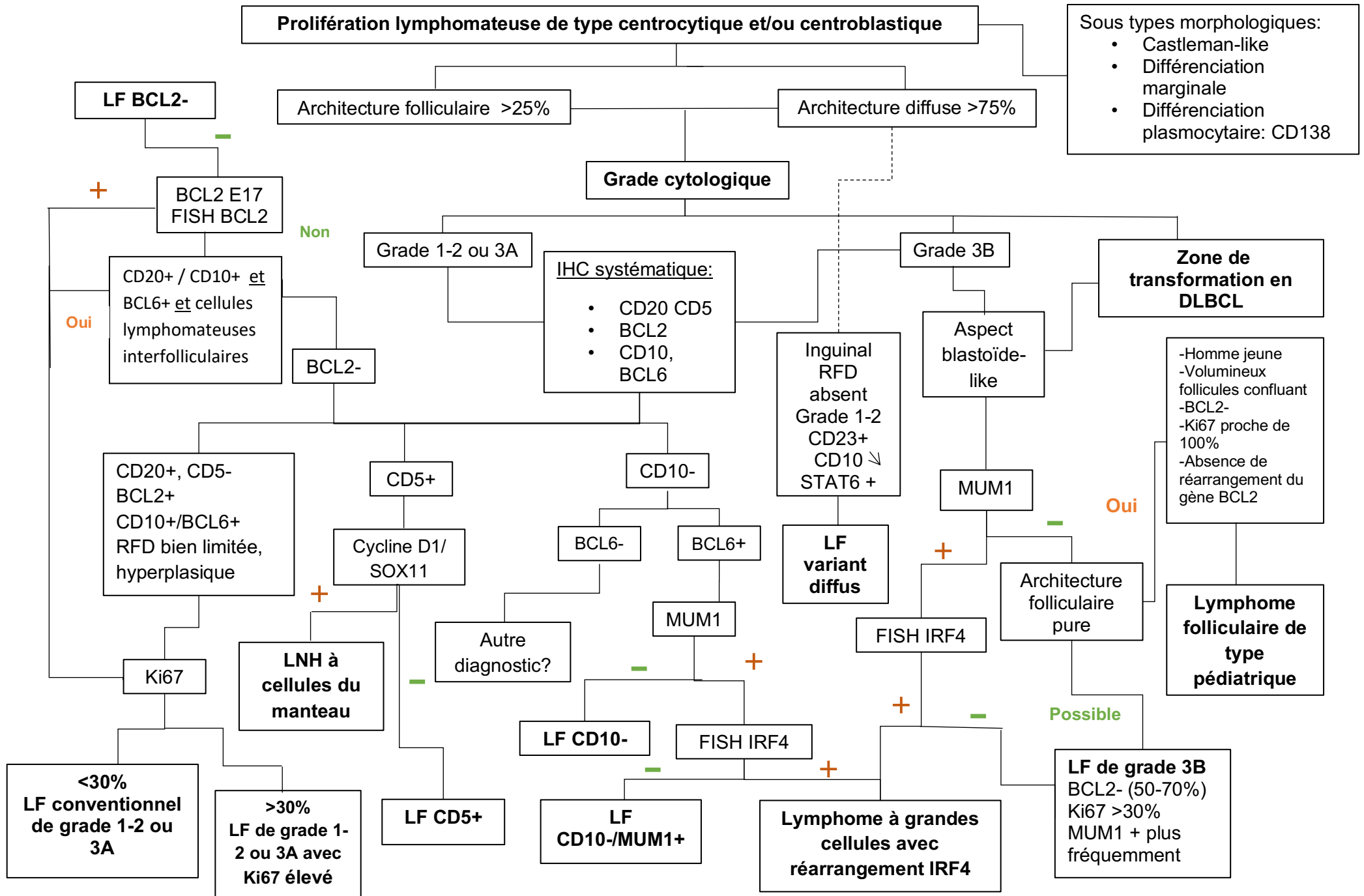
Tout d'abord, l'utilisation de l'anticorps anti-MUM1 est primordiale. En effet, l'expression de MUM1, dans >30% des cellules lymphomateuses, est un argument fort en faveur du lymphome à grandes cellules avec réarrangement IRF4. Néanmoins, cette expression n'est pas spécifique car fréquente au sein des LF de grade 3B et des lymphomes B diffus à grandes cellules. Cette analyse IHC va donc constituer une étape nécessaire dans la démarche diagnostique, sans pour autant constituer un argument pathognomonique. Elle

permettra d'une part, l'élimination du diagnostic de LFTP et d'autre part, de sélectionner les LF transformés ou non, d'aspect blastoïde-like et exprimant MUM1, pour une analyse FISH systématique à la recherche d'un réarrangement du gène *IRF4*.

Cette démarche était également recommandée par *Chapman J. et al. (90)* Cet auteur préconisait également d'élargir l'analyse FISH à tous les LF exprimant MUM1, même lorsqu'il s'agissait vraisemblablement d'un LF de sous-type CD10-/MUM1+. Une utilisation plus large de l'anticorps anti-MUM1 pourrait donc être envisagée.

### **I. Arbre décisionnel diagnostique du lymphome folliculaire**

Notre étude a donc démontré la grande hétérogénéité du lymphome folliculaire et l'importance de garder en mémoire les différents variants, sous-types ou encore les différents diagnostics différentiels possibles. Nous proposons cet arbre décisionnel ci-après, qui résume la stratégie diagnostique à adopter face à une prolifération lymphomateuse à petites cellules de type centrocytique et/ou centroblastique.





## II. Objectifs secondaires

### A. Impact de la relecture du réseau LYMPHOPATH dans la prise en charge du patient

Au sein de notre cohorte, plus de la moitié des cas (60%, 172/287) avait été adressée pour une relecture dans le cadre du réseau LYMPHOPATH. La grande série de Laurent C. et *al.*, qui répertoriait l'ensemble des diagnostics de lymphome ayant bénéficié d'une relecture au sein du réseau LYMPHOPATH français entre janvier 2010 et décembre 2013 (correspondant à 42 145 cas, dont 36 920 cas de lymphomes avérés après relecture de l'expert), a montré que le réseau LYMPHOPATH couvrait plus de 70% de tous les nouveaux diagnostics de lymphome en France. (1)

#### 1. Un faible taux de concordance

Au sein de nos 172 cas de relecture, les diagnostics concordants étaient minoritaires avec seulement 33,1% (57/172) des cas. L'ensemble de ces cas correspondait à 40 LF de grade 1-2, 3 LF de grade 3A, 7 LF transformés et 7 LF non gradables (prélèvements de trop petite taille ou dont le grade cytologique n'était non applicable). Néanmoins, la moitié des grades cytologiques concordants (22/44) avait été réalisée selon la classification de l'OMS 2001 qui dissociait le grade 1 et le grade 2.

Si l'on ne tenait compte que des 108 cas de grade 1-2 et 3A de notre série de relecture, la concordance était discrètement plus élevée, de 38,8% (43/108). Cependant, ce taux de concordance était bien moindre que celui décrit dans la littérature. En effet, dans la série de Laurent C. et *al.*, ce taux était de 85,5% (3910/4572) (1). De façon similaire, au sein des LF de grade 1-2 des séries de Bowen J. et *al.* et de la LaCasce et *al.*, ce taux de concordance était respectivement de 84,5% (139) et 87,1%. (140)

Aucun des 12 LF de grade 3B de notre série diagnostiqués après relecture de l'expert, n'avait été établi lors du diagnostic initial. La série de Laurent C. et *al.* montrait également une concordance des diagnostics de LF de grade 3B, avant et après relecture, plus faible que celle des diagnostics de LF de bas grade (46,3% ; 87/188). La série de Bowen et *al.* arrivait également au même constat avec 40,7% de concordance.

Au sein de notre étude, une part de ce très faible taux de concordance pourrait s'expliquer par le fait que, parmi les laboratoires ayant adressé à notre Institut les cas de relecture, une très large majorité n'appartenait pas à des centres universitaires. En effet, l'équipe de Bowen a montré un plus haut taux de discordances majeures au sein des cas provenant des centres non universitaires.

Les diagnostics établis avant la relecture, respectant la classification de l'OMS étaient très minoritaires ; en effet sur les 172 cas de relecture, seulement 36 diagnostics étaient en accord avec les classifications OMS 2016 ou antérieures. Au sein de ce petit groupe, la concordance après la relecture était plus élevée, de 58,3% (21/36). L'équipe de Laurent C. a aussi montré une concordance plus élevée lorsque les diagnostics initiaux étaient posés de façon formelle, par rapport aux diagnostics provisoires, en attente de l'avis de l'expert.

## 2. Une majorité de modifications majeures

Les modifications majeures au sein des diagnostics non concordants, définies comme ayant un impact potentiel dans la prise en charge des patients, étaient largement majoritaires et représentaient 88,7% de l'ensemble des modifications réalisées par les experts. De façon similaire, l'équipe de Laurent C. décrivait cette même répartition, avec un taux de modifications majeures de 88,3% parmi l'ensemble des modifications présentes.

### *a) De grandes difficultés à établir le grade cytologique*

Au sein de notre série, les discordances majeures de grade cytologique représentaient le plus grand groupe, avec 41,7% (48/115) de l'ensemble des modifications et 27,9% (48/172) de l'ensemble des relectures. Elles correspondaient à 16 cas de LF de bas grade (grade 1-2 ou 3A) modifiés en LF de haut grade (grade 3B ou avec zone de transformation en DLBCL) et 32 cas de LF non gradés initialement mais gradables après la relecture.

Notre choix de comptabiliser les LF non gradés initialement comme une modification majeure se justifiait par le fait que l'absence de grade cytologique lors d'un diagnostic de LF pose problème au clinicien dans le choix du traitement, comme le confirme le nombre de discussions sur ce sujet, avec nos confrères cliniciens.

Contrairement à notre série, au sein des données de la littérature, on constatait une plus faible proportion de LF non gradés initialement et parfois même aucun LF non gradé initialement. Par exemple, les séries de Laurent C. *et al.* et de Bowen *et al.* ne décrivaient pas de LF non gradé initialement. La série de LaCasce *et al.* contenait

quant à elle, seulement 13 LF non gradés dits « not other specified » sur les 246 diagnostics initiaux de LF présents dans l'étude.

Dans notre série, sur les 32 LF non gradés initialement, 20 cas étaient de grade 1-2, 8 étaient de grade 3A et seulement 4 de grade 3B. Nous pourrions alors nous demander si l'absence de grade lors d'un diagnostic de LF, réalisé au sein des laboratoires de la région, n'équivaudrait pas implicitement à un bas grade.

#### *b) Autres modifications majeures*

Les lésions bénignes ou possiblement bénignes modifiées en LF représentaient 12,2% de l'ensemble des modifications, les diagnostics initiaux de lymphome non classés, 11,3%, la mauvaise classification du sous type de lymphome, 10,5% et l'absence d'hypothèse diagnostique initiale, 13%.

### 3. Des modifications mineures en faible nombre

Les modifications mineures représentant 11,3% de l'ensemble des modifications, ne constituent pas le plus grand enjeu de la relecture. Ce constat était également fait dans la série de Laurent C. et *al.*.

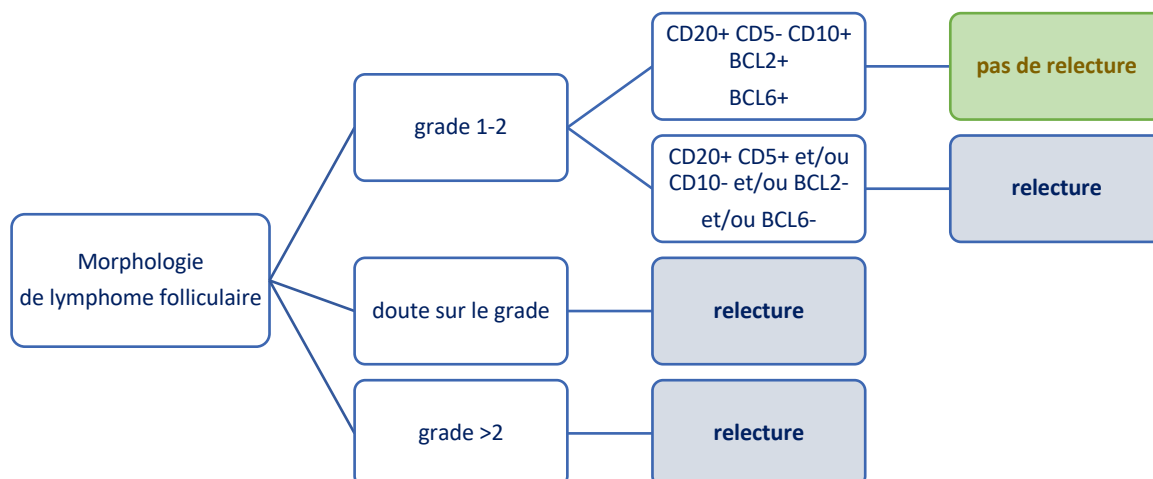
Au sein de notre série, il s'agissait soit de LF initialement de grade 1-2 modifiés en LF de grade 3A, soit de LF transformés non gradés initialement modifiés en LF gradés et transformés ou encore, soit de LF initialement de grade 1-2 modifiés en LF non gradables. L'OMS a d'ailleurs convenu que la distinction des grades 1-2 et 3A était trop subjective et peu reproductible (25).

#### 4. Un réseau LYMPHOPATH indispensable

L'ensemble de ces constatations montrent que le réseau LYMPHOPATH de la région Hauts-de-France reste indispensable en raison d'un taux de discordance très élevé, entre les diagnostics initiaux et après relecture. Le diagnostic de lymphome folliculaire de grade 3B et la réalisation du grade cytologique semblent poser le plus de difficulté. Dans la série de Bowen et al, le plus haut taux de révision correspondait aux lymphomes folliculaires et dans la série de LaCasce et al. le LF de grade 3B comportait le plus haut taux de discordance, confirmant la difficulté réelle du diagnostic de LF pour l'ensemble des pathologistes.

Au sein de notre Institut, le nombre de relecture est très prépondérant par rapport aux prélèvements adressés directement par le CHRU de Lille. Ce travail d'analyse des relectures, limité au diagnostic de LF, illustre bien ce constat, où plus de 60% de l'ensemble des LF diagnostiqués en 2017 et 2018 correspondaient à des demandes de relecture.

Afin d'alléger cette charge de travail très importante pour notre Institut, nos hématopathologistes ont proposé de réduire les indications de relecture pour les principales pathologies hématologiques. Pour le diagnostic de lymphome folliculaire, un arbre décisionnel (figure 18) avait été transmis à l'ensemble des laboratoires de la région, qui recommandait de ne plus envoyer à l'Institut les LF classiques de grade cytologique 1-2. Cependant, au vu de notre analyse, nous remarquons que ce diagnostic reste difficile même dans sa forme la plus classique.



**Figure 18. Arbre décisionnel de l'indication des relectures pour les lymphomes folliculaires – Réseau LYMPHOPATH région Haut-de-France**

## B. Prédiction de la réponse au traitement anti-EZH2

Nous avons analysé la relation entre les expressions d'EZH2, d'H3K27me2 et d'H3K27me3 et le statut mutationnel d'EZH2, au sein d'une cohorte de 15 LF et montré la faisabilité d'une technique d'immunohistochimie simple dans la réalisation d'un score IHC exploitable. Le calcul de ce score me3/me2, permettant l'étude du profil de méthylation H3K27, a permis d'obtenir des premiers résultats encourageants, dans la limite du nombre de cas très faible de notre cohorte.

Au sein de notre étude, l'expression d'EZH2 et d'H3K27me3 était semblable entre les patients EZH2 WT ou muté Y641. Ces résultats sont en accord avec l'étude de l'équipe de Bodor C. qui décrit des niveaux d'expression hétérogènes d'EZH2 et d'H3K27me3 allant de faible à fort, quel que soit le statut mutationnel du patient. Ces résultats étaient également observés en Western Blot par cette même équipe (141).

Dans l'étude de Jardin F. et *al.*, aucune différence d'expression d'EZH2 entre les patients WT ou mutés n'était observée, confirmant que la mutation activatrice Y641

affecte uniquement l'activité d'EZH2. (122) Cependant, cette même équipe a montré une différence significative entre l'expression d'H3K27me3 chez les patients WT et mutés EZH2, caractérisée avec une expression d'H3K27me3 plus élevée chez les patients mutés et plus faible chez les patients WT. Cette différence n'était pas observée dans notre étude, où l'expression était élevée quel que soit le statut mutationnel initial (la médiane du score IHC H3K27me3 était de 30 chez les patients WT ou mutés EZH2).

Cette différence pourrait s'expliquer par notre mise au point technique de l'anticorps anti-H3K27me3. En effet, nous avons conservé la mise au point initiale de notre institut, réalisée pour l'étude de la perte d'expression d'H3K27me3 au sein des gliomes de la ligne médiane, donc à partir d'un tissu très différent du ganglion. Cette mise au point sera donc à revoir.

Cependant, le score IHC H3K27me2, de façon similaire à l'étude de Jardin et *al.*, paraissait plus élevée chez les patients EZH2 WT (médiane des scores IHC H3K27me2=20) et plus faible chez les patients EZH2 Y641 (médiane des scores IHC d'H3K27me3=6,5).

Le score calculé me3/me2 de notre étude correspondait, dans la grande majorité, à un profil me3/me2>0 dont la valeur semblait être préférentiellement supérieure à 1,5 pour les patients EZH2 mutés et inférieure à 1 pour les patients EZH2 WT. Aucun profil « non muté » établi par l'équipe de Jardin et *al.*, c'est-à-dire avec un score me3/me2<0, n'était observé dans notre étude, du fait de l'absence de différence d'expression d'H3K27me3 pour notre cohorte.

De manière intéressante, 2 patients EZH2 non mutés de notre cohorte, avaient une expression faible d'H3K27me2 et donc un score me3/me2 calculé >1,5, c'est-à-dire sensiblement similaire au profil de méthylation des patients mutés de notre étude. Or,

l'équipe de Copeland RA a constaté au sein de modèles in vitro, que la détection de faibles niveaux d'H3K27me2 par rapport à ceux d'H3K27me3, par l'utilisation de techniques telles que le western blot ou l'IHC, pouvait être utilisée pour identifier les patients répondeurs au traitement par l'inhibiteur EZH2 (142).

On peut alors judicieusement se poser la question si ces deux patients non mutés étaient répondeurs au sein de l'essai EPIZYME, faisant possiblement du profil de méthylation IHC un possible moyen simple de détection de l'ensemble des répondeurs, indépendamment du statut mutationnel initial du patient et expliquant ainsi, la réponse globale non négligeable (ORR=34%) chez les patients EZH2 WT traités par Tazemetostat.

Ainsi, l'étude du profil de méthylation grâce au calcul du score me3/me2 pourrait maximiser les bénéfices des inhibiteurs EZH2 en permettant l'identification des patients répondeurs au sein des patients non mutés, et donc permettre d'élargir l'éligibilité de ce traitement.

Une étude comparant le profil de méthylation d'H3K27 et le statut répondeur de patients ayant un LF réfractaire ou en rechute et traités par Tazemetostat serait alors justifiée, afin de pouvoir confirmer ou infirmer ces premiers résultats encourageants.



## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous rapportons une série de 287 cas de lymphome folliculaire en précisant leurs caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et cytogénétiques.

Nos données confirment la très grande hétérogénéité de cette pathologie ainsi que les nombreuses difficultés diagnostiques rencontrées.

La caractérisation de l'architecture et la réalisation du grade cytologique sont à réaliser de façon prudente sur les prélèvements de petite taille, dont notamment les biopsies ganglionnaires à l'aiguille, qui restent un mode de prélèvement à éviter dans le diagnostic de cette pathologie.

La connaissance de variants morphologiques est indispensable pour ne pas négliger un diagnostic différentiel avec un autre LNH à petites cellules B.

Les phénotypes non conventionnels tels que l'absence d'expression de CD10 ou BCL2, l'expression du CD5 ou du CD23 justifie la réalisation de techniques immunohistochimiques ou d'hybridation in situ complémentaires pour éliminer d'autres diagnostics.

Le lymphome folliculaire de grade 3 amène systématiquement à discuter les diagnostics différentiels de lymphome folliculaire de type pédiatrique et de lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4, nouvelles entités de la classification OMS 2016. L'étude de l'expression de MUM1 au sein de tous les LF d'aspect bastoïde-like est donc indispensable afin de sélectionner les cas devant bénéficier d'une analyse FISH à la recherche d'un réarrangement du gène *IRF4*, et ainsi permettre le diagnostic du lymphome à grandes cellules avec réarrangement IRF4.

Le lymphome folliculaire de type pédiatrique est un diagnostic difficile, nécessitant la présence d'un ensemble d'argument, dont notamment l'architecture purement

folliculaire, l'aspect blastoïde-like des cellules tumorales et la confirmation par analyse FISH de l'absence de réarrangement des gènes *BCL2* et *IRF4*.

La relecture dans le cadre de réseau LYMPHOPATH reste indispensable pour les LF non conventionnels ou difficiles à grader du fait des implications thérapeutiques potentielles pour le patient. Il est également important que l'ensemble des pathologistes se réfèrent à la nouvelle classification OMS 2016 afin d'être vigilants sur les nouvelles entités et nouveaux éléments de classification.

EZH2 est une cible thérapeutique prometteuse grâce au développement d'inhibiteurs d'EZH2, comme le Tazemetostat. L'étude du profil de méthylation d'H3K27 grâce au calcul du score me3/me2 semblerait pouvoir identifier le statut mutationnel d'EZH2 des patients ainsi que des profils répondeurs potentiels indépendamment de la mutation activatrice Y641 EZH2, permettant l'élargir l'indication de cette molécule.

Une étude plus large comparant le profil de méthylation d'H3K27 et le statut répondeur des patients ayant un LF réfractaire ou en rechute et traités par Tazemetostat serait alors justifiée, afin de pouvoir confirmer ou infirmer ces premiers résultats encourageants.

# Références Bibliographiques

1. Laurent C, Baron M, Amara N, Haioun C, Dandoit M, Maynadié M, et al. Impact of Expert Pathologic Review of Lymphoma Diagnosis: Study of Patients From the French Lymphopath Network. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Jun 20;35(18):2008–17.
2. Hodgkin. On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *J R Soc Med*. 1832 Jan;MCT-17(1):68–114.
3. Brill NE, Baehr G, Rosenthal N. Generalized giant lymph follicle hyperplasia of lymph nodes and spleen. *Am J Med*. 1952 Nov;13(5):570–4.
4. Combes FC, Bluefarb SM. GIANT FOLLICULAR LYMPHADENOPATHY: ASSOCIATION OF GIANT FOLLICULAR LYMPHADENOPATHY AND ITS POLYMORPHOUS CELL SARCOMA DERIVATIVE, SYMMERS' DISEASE, WITH LESIONS OF THE SKIN. *Arch Dermatol Syphilol*. 1941 Sep 1;44(3):409–19.
5. Gall EA, Mallory TB. Malignant Lymphoma: A Clinico-Pathologic Survey of 618 Cases. *Am J Pathol*. 1942 May;18(3):381–429.
6. Hicks EB, Rappaport H, Winter WJ. Follicular lymphoma; a re-evaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based on a survey of 253 cases. *Cancer*. 1956 Aug;9(4):792–821.
7. Jaffe ES, Shevach EM, Frank MM, Berard CW, Green I. Nodular lymphoma--evidence for origin from follicular B lymphocytes. *N Engl J Med*. 1974 Apr 11;290(15):813–9.
8. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008 Dec 1;112(12):4384–99.
9. Le Guyader-Peyrou S. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Volume 2 : Hémopathies malignes : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. 2019.
10. Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1998 Jul;9(7):717–20.
11. Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med*. 1984 Dec 6;311(23):1471–5.
12. Quintanilla-Martinez L, Sander B, Chan JKC, Xerri L, Ott G, Campo E, et al. Indolent lymphomas in the pediatric population: follicular lymphoma, IRF4/MUM1+ lymphoma, nodal marginal zone lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Virchows Arch*. 2016 Feb;468(2):141–57.
13. Fritschi L, Benke G, Hughes AM, Krickler A, Turner J, Vajdic CM, et al. Occupational exposure to pesticides and risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Epidemiol*. 2005 Nov 1;162(9):849–57.
14. Schinasi L, Leon ME. Non-Hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: a systematic review and meta-analysis. *Int J Environ*

Res Public Health. 2014 Apr 23;11(4):4449–527.

15. 't Mannelte A, De Roos AJ, Boffetta P, Vermeulen R, Benke G, Fritschi L, et al. Occupation and Risk of Non-Hodgkin Lymphoma and Its Subtypes: A Pooled Analysis from the InterLymph Consortium. *Environ Health Perspect*. 2016 Apr;124(4):396–405.
16. Zhang Y, Sanjose SD, Bracci PM, Morton LM, Wang R, Brennan P, et al. Personal use of hair dye and the risk of certain subtypes of non-Hodgkin lymphoma. *Am J Epidemiol*. 2008 Jun 1;167(11):1321–31.
17. Hiddemann W, Cheson BD. How we manage follicular lymphoma. *Leukemia*. 2014 Jul;28(7):1388–95.
18. Freedman A. Follicular lymphoma: 2018 update on diagnosis and management. *Am J Hematol*. 2018 Feb;93(2):296–305.
19. Wirth A, Foo M, Seymour JF, Macmanus MP, Hicks RJ. Impact of [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography on staging and management of early-stage follicular non-hodgkin lymphoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008 May 1;71(1):213–9.
20. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for Initial Evaluation, Staging, and Response Assessment of Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 20;32(27):3059–67.
21. Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004 Sep 1;104(5):1258–65.
22. Solal-Celigny P. Follicular Lymphoma International Prognostic Index. *Curr Treat Options Oncol*. 2006 Jul;7(4):270–5.
23. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009 Sep 20;27(27):4555–62.
24. Brice P, Bastion Y, Lepage E, Brousse N, Haioun C, Moreau P, et al. Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte*. *J Clin Oncol*. 1997 Mar;15(3):1110–7.
25. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4th).
26. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. *Lancet Oncol*. 2015 Sep;16(9):1111–22.
27. Ghilmini M, Vitolo U, Kimby E, Montoto S, Walewski J, Pfreundschuh M, et al. ESMO Guidelines consensus conference on malignant lymphoma 2011 part 1: diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), follicular lymphoma (FL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Ann Oncol*. 2013 Mar 1;24(3):561–76.

28. Tsang RW, Gospodarowicz MK. Radiation therapy for localized low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *Hematol Oncol*. 2005;23(1):10–7.
29. Ardeshtna KM, Smith P, Norton A, Hancock BW, Hoskin PJ, MacLennan KA, et al. Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2003 Aug 16;362(9383):516–22.
30. Salles G, Seymour JF, Offner F, López-Guillermo A, Belada D, Xerri L, et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2011 Jan 1;377(9759):42–51.
31. Cheson BD, Chua N, Mayer J, Dueck G, Trněný M, Bouabdallah K, et al. Overall Survival Benefit in Patients With Rituximab-Refractory Indolent Non-Hodgkin Lymphoma Who Received Obinutuzumab Plus Bendamustine Induction and Obinutuzumab Maintenance in the GADOLIN Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2018 01;36(22):2259–66.
32. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2010 Feb 20;28(6):1075–83.
33. Gopal AK, Kahl BS, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Schuster SJ, Jurczak WJ, et al. PI3K $\delta$  inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med*. 2014 Mar 13;370(11):1008–18.
34. Dreyling M, Santoro A, Mollica L, Leppä S, Follows GA, Lenz G, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by Copanlisib in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2017 Dec 10;35(35):3898–905.
35. Flinn IW, Miller CB, Ardeshtna KM, Tetreault S, Assouline SE, Mayer J, et al. DYNAMO: A Phase II Study of Duvelisib (IPI-145) in Patients With Refractory Indolent Non-Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2019 10;37(11):912–22.
36. Schuster SJ, Svoboda J, Chong EA, Nasta SD, Mato AR, Anak Ö, et al. Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 2017 28;377(26):2545–54.
37. Hirayama AV, Gauthier J, Hay KA, Voutsinas JM, Wu Q, Pender BS, et al. High rate of durable complete remission in follicular lymphoma after CD19 CAR-T cell immunotherapy. *Blood*. 2019 15;134(7):636–40.
38. Leonard JP, Trneny M, Izutsu K, Fowler NH, Hong X, Zhu J, et al. AUGMENT: A Phase III Study of Lenalidomide Plus Rituximab Versus Placebo Plus Rituximab in Relapsed or Refractory Indolent Lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2019 10;37(14):1188–99.
39. Morschhauser F, Fowler NH, Feugier P, Bouabdallah R, Tilly H, Palomba ML, et al. Rituximab plus Lenalidomide in Advanced Untreated Follicular Lymphoma. *N Engl J Med*. 2018 06;379(10):934–47.
40. Morschhauser F, Tilly H, Chaidos A, Phillips TJ, Ribrag V, Campbell P, et al. Phase 2 Multicenter Study of Tazemetostat, an EZH2 Inhibitor, in Patients with Relapsed or Refractory Follicular Lymphoma. *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement\_1):123–123.

41. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016 20;45(3):471–82.
42. Stebegg M, Kumar SD, Silva-Cayetano A, Fonseca VR, Linterman MA, Graca L. Regulation of the Germinal Center Response. *Front Immunol*. 2018;9:2469.
43. Gars E, Butzmann A, Ohgami R, Balakrishna JP, O'Malley DP. The life and death of the germinal center. *Ann Diagn Pathol*. 2020 Feb;44:151421.
44. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 1982 Nov 11;307(20):1231–6.
45. Schüler F, Dölken L, Hirt C, Kiefer T, Berg T, Fusch G, et al. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. *Int J Cancer*. 2009 Feb 15;124(4):958–63.
46. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. *J Clin Invest*. 2012 Oct;122(10):3424–31.
47. Farinha P, Al-Tourah A, Gill K, Klasa R, Connors JM, Gascoyne RD. The architectural pattern of FOXP3-positive T cells in follicular lymphoma is an independent predictor of survival and histologic transformation. *Blood*. 2010 Jan 14;115(2):289–95.
48. Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, Shumansky K, Spinelli JJ, Gill K, et al. Analysis of multiple biomarkers shows that lymphoma-associated macrophage (LAM) content is an independent predictor of survival in follicular lymphoma (FL). *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):2169–74.
49. Horn H, Schmelter C, Leich E, Salaverria I, Katzenberger T, Ott MM, et al. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. *Haematologica*. 2011 Sep;96(9):1327–34.
50. Younes SF, Beck AH, Lossos IS, Levy R, Warnke RA, Natkunam Y. Immunoarchitectural Patterns in Follicular Lymphoma: Efficacy of HGAL and LMO2 in the Detection of the Interfollicular and Diffuse Components: *Am J Surg Pathol*. 2010 Sep;34(9):1266–76.
51. Bollig N, Brüstle A, Kellner K, Ackermann W, Abass E, Raifer H, et al. Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 29;109(22):8664–9.
52. Natkunam Y, Warnke RA, Montgomery K, Falini B, van De Rijn M. Analysis of MUM1/IRF4 protein expression using tissue microarrays and immunohistochemistry. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2001 Jul;14(7):686–94.
53. Naresh KN. MUM1 expression dichotomises follicular lymphoma into predominantly, MUM1-negative low-grade and MUM1-positive high-grade subtypes. *Haematologica*. 2007 Feb;92(2):267–8.
54. Horn H, Kohler C, Witzig R, Kreuz M, Leich E, Klapper W, et al. Gene expression profiling reveals a close relationship between follicular lymphoma grade 3A and 3B, but distinct profiles of follicular lymphoma grade 1 and 2. *Haematologica*. 2018 Jul;103(7):1182–90.

55. Xerri L, Bachy E, Fabiani B, Canioni D, Chassagne-Clément C, Dartigues-Cuillères P, et al. Identification of MUM1 as a prognostic immunohistochemical marker in follicular lymphoma using computerized image analysis. *Hum Pathol.* 2014 Oct;45(10):2085–93.
56. Wang SA, Wang L, Hochberg EP, Muzikansky A, Harris NL, Hasserjian RP. Low histologic grade follicular lymphoma with high proliferation index: morphologic and clinical features. *Am J Surg Pathol.* 2005 Nov;29(11):1490–6.
57. Xerri L, Dirnhofer S, Quintanilla-Martinez L, Sander B, Chan JKC, Campo E, et al. The heterogeneity of follicular lymphomas: from early development to transformation. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2016 Feb;468(2):127–39.
58. Yamamoto E, Tomita N, Sakata S, Tsuyama N, Takeuchi K, Nakajima Y, et al. MIB-1 labeling index as a prognostic factor for patients with follicular lymphoma treated with rituximab plus CHOP therapy. *Cancer Sci.* 2013 Dec;104(12):1670–4.
59. Johnson NA, Al-Tourah A, Brown CJ, Connors JM, Gascoyne RD, Horsman DE. Prognostic significance of secondary cytogenetic alterations in follicular lymphomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008 Dec;47(12):1038–48.
60. Bermudez G, González de Villambrosía S, Martínez-López A, Batlle A, Revert-Arce JB, Cereceda Company L, et al. Incidental and Isolated Follicular Lymphoma In Situ and Mantle Cell Lymphoma In Situ Lack Clinical Significance. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(7):943–9.
61. Henopp T, Quintanilla-Martínez L, Fend F, Adam P. Prevalence of follicular lymphoma in situ in consecutively analysed reactive lymph nodes. *Histopathology.* 2011 Jul;59(1):139–42.
62. Mamessier E, Broussais-Guillaumot F, Chetaille B, Bouabdallah R, Xerri L, Jaffe ES, et al. Nature and importance of follicular lymphoma precursors. *Haematologica.* 2014 May;99(5):802–10.
63. Fend F, Cabecadas J, Gaulard P, Jaffe ES, Kluin P, Kuzu I, et al. Early lesions in lymphoid neoplasia: Conclusions based on the Workshop of the XV. Meeting of the European Association of Hematopathology and the Society of Hematopathology, in Uppsala, Sweden. *J Hematop.* 2012 Sep;5(3).
64. Schmidt J, Salaverria I, Haake A, Bonzheim I, Adam P, Montes-Moreno S, et al. Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma. *Leukemia.* 2014 May;28(5):1103–12.
65. Schmidt J, Salaverria I, Haake A, Bonzheim I, Adam P, Montes-Moreno S, et al. Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma. *Leukemia.* 2014 May;28(5):1103–12.
66. Jegalian AG, Eberle FC, Pack SD, Mirvis M, Raffeld M, Pittaluga S, et al. Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma. *Blood.* 2011 Sep 15;118(11):2976–84.
67. Carbone A, Della Libera D, Zannier L, Selva A, Ceolin P, Gualeni A, et al. In situ follicular lymphoma associated with overt B- or T-cell lymphomas in the same lymph node. *Am J Hematol.* 2011 Dec;86(12):E66-70.
68. Katzenberger T, Kalla J, Leich E, Stöcklein H, Hartmann E, Barnickel S, et al. A distinctive

subtype of t(14;18)-negative nodal follicular non-Hodgkin lymphoma characterized by a predominantly diffuse growth pattern and deletions in the chromosomal region 1p36. *Blood*. 2009 Jan 29;113(5):1053–61.

69. Siddiqi IN, Friedman J, Barry-Holson KQ, Ma C, Thodima V, Kang I, et al. Characterization of a variant of t(14;18) negative nodal diffuse follicular lymphoma with CD23 expression, 1p36/TNFRSF14 abnormalities, and STAT6 mutations. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2016;29(6):570–81.

70. Yildiz M, Li H, Bernard D, Amin NA, Ouillette P, Jones S, et al. Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. *Blood*. 2015 Jan 22;125(4):668–79.

71. Yoshino T, Miyake K, Ichimura K, Mannami T, Ohara N, Hamazaki S, et al. Increased incidence of follicular lymphoma in the duodenum. *Am J Surg Pathol*. 2000 May;24(5):688–93.

72. Takata K, Miyata-Takata T, Sato Y, Iwamuro M, Okada H, Tari A, et al. Gastrointestinal follicular lymphoma: Current knowledge and future challenges. *Pathol Int*. 2018 Jan;68(1):1–6.

73. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Kikuti YY, Ichimura K, Tanaka T, et al. Duodenal and nodal follicular lymphomas are distinct: the former lacks activation-induced cytidine deaminase and follicular dendritic cells despite ongoing somatic hypermutations. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2009 Jul;22(7):940–9.

74. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Tokunaka M, Miki Y, Yukie Kikuti Y, et al. Duodenal follicular lymphoma lacks AID but expresses BACH2 and has memory B-cell characteristics. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2013 Jan;26(1):22–31.

75. Takata K, Tanino M, Ennishi D, Tari A, Sato Y, Okada H, et al. Duodenal follicular lymphoma: comprehensive gene expression analysis with insights into pathogenesis. *Cancer Sci*. 2014 May;105(5):608–15.

76. Sato Y, Ichimura K, Tanaka T, Takata K, Morito T, Sato H, et al. Duodenal follicular lymphomas share common characteristics with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *J Clin Pathol*. 2008 Mar;61(3):377–81.

77. Bacon CM, Ye H, Diss TC, McNamara C, Kueck B, Hasserjian RP, et al. Primary follicular lymphoma of the testis and epididymis in adults. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jul;31(7):1050–8.

78. Pileri SA, Sabattini E, Rosito P, Zinzani PL, Ascani S, Fraternali-Orcioni G, et al. Primary follicular lymphoma of the testis in childhood: an entity with peculiar clinical and molecular characteristics. *J Clin Pathol*. 2002 Sep;55(9):684–8.

79. Heller KN, Teruya-Feldstein J, La Quaglia MP, Wexler LH. Primary follicular lymphoma of the testis: excellent outcome following surgical resection without adjuvant chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004 Feb;26(2):104–7.

80. Nathwani BN, Anderson JR, Armitage JO, Cavalli F, Diebold J, Drachenberg MR, et al. Clinical significance of follicular lymphoma with monocytoid B cells. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Hum Pathol*. 1999 Mar;30(3):263–8.

81. Torlakovic EE, Aamot HV, Heim S. A marginal zone phenotype in follicular lymphoma with t(14;18) is associated with secondary cytogenetic aberrations typical of marginal zone lymphoma. *J*



Pathol. 2006 Jun;209(2):258–64.

82. Gradowski JF, Jaffe ES, Warnke RA, Pittaluga S, Surti U, Gole LA, et al. Follicular lymphomas with plasmacytic differentiation include two subtypes. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2010 Jan;23(1):71–9.
83. Gradowski JF, Jaffe ES, Warnke RA, Pittaluga S, Surti U, Gole LA, et al. Follicular lymphomas with plasmacytic differentiation include two subtypes. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2010 Jan;23(1):71–9.
84. Wang E, Stoecker M, Burchette J, Rehder C. Follicular lymphoma with prominent Dutcher body formation: a pathologic study of 3 cases in comparison with nodal or splenic lymphoplasmacytic lymphoma and marginal zone lymphoma. *Hum Pathol.* 2012 Nov;43(11):2001–11.
85. Pina-Oviedo S, Miranda RN, Lin P, Manning JT, Medeiros LJ. Follicular lymphoma with hyaline-vascular Castleman-like features: analysis of 6 cases and review of the literature. *Hum Pathol.* 2017;68:136–46.
86. Pina-Oviedo S, Wang W, Vicknair E, Manning JT, Medeiros LJ. Follicular lymphoma with hyaline-vascular Castleman disease-like follicles and CD20 positive follicular dendritic cells. *Pathology (Phila).* 2017 Aug;49(5):544–7.
87. Li Y, Hu S, Zuo Z, Hong M, Lin P, Li S, et al. CD5-positive follicular lymphoma: clinicopathologic correlations and outcome in 88 cases. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2015 Jun;28(6):787–98.
88. Miyoshi H, Sato K, Yoshida M, Kimura Y, Kiyasu J, Ichikawa A, et al. CD5-positive follicular lymphoma characterized by CD25, MUM1, low frequency of t(14;18) and poor prognosis. *Pathol Int.* 2014 Mar;64(3):95–103.
89. Karube K, Guo Y, Suzumiya J, Sugita Y, Nomura Y, Yamamoto K, et al. CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood.* 2007 Apr 1;109(7):3076–9.
90. Chapman JR, Alvarez JP, White K, Sanchez S, Khanlari M, Algashaamy K, et al. Unusual Variants of Follicular Lymphoma: Case-based Review. *Am J Surg Pathol.* 2020 Mar;44(3):329–39.
91. Amini R-M, Enblad G. Relationship between Hodgkin’s and non-Hodgkin’s lymphomas. *Med Oncol Northwood Lond Engl.* 2003;20(3):211–20.
92. Küppers R, Dührsen U, Hansmann M-L. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of composite lymphomas. *Lancet Oncol.* 2014 Sep;15(10):e435-446.
93. Jelloul FZ, Chen QH, Yang T, Haghi N, Brody J, Zhang X, et al. Composite Small Lymphocytic Lymphoma/Chronic Lymphocytic Leukemia and Follicular Lymphoma: A Clinicopathological Study of Six Cases. *Int J Surg Pathol.* 2018 Apr;26(2):135–44.
94. Lin P, Medeiros LJ. High-grade B-cell lymphoma/leukemia associated with t(14;18) and 8q24/MYC rearrangement: a neoplasm of germinal center immunophenotype with poor prognosis. *Haematologica.* 2007 Oct;92(10):1297–301.
95. Christie L, Kernohan N, Levison D, Sales M, Cunningham J, Gillespie K, et al. C-MYC

translocation in t(14;18) positive follicular lymphoma at presentation: An adverse prognostic indicator? *Leuk Lymphoma*. 2008 Mar;49(3):470–6.

96. Miyaoka M, Kikuti YY, Carreras J, Ikoma H, Hiraiwa S, Ichiki A, et al. Clinicopathological and genomic analysis of double-hit follicular lymphoma: comparison with high-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2018;31(2):313–26.
97. Miao Y, Hu S, Lu X, Li S, Wang W, Medeiros LJ, et al. Double-hit follicular lymphoma with MYC and BCL2 translocations: a study of 7 cases with a review of literature. *Hum Pathol*. 2016;58:72–7.
98. Ziemba JB, Wolf Z, Weinstock M, Asakrah S. Double-Hit and Triple-Hit Follicular Lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 2020 Feb 29;
99. Louissaint A, Ackerman AM, Dias-Santagata D, Ferry JA, Hochberg EP, Huang MS, et al. Pediatric-type nodal follicular lymphoma: an indolent clonal proliferation in children and adults with high proliferation index and no BCL2 rearrangement. *Blood*. 2012 Sep 20;120(12):2395–404.
100. Agostinelli C, Akarca AU, Ramsay A, Rizvi H, Rodriguez-Justo M, Pomplun S, et al. Novel markers in pediatric-type follicular lymphoma. *Virchows Arch*. 2019 Dec;475(6):771–9.
101. Liu Q, Salaverria I, Pittaluga S, Jegalian AG, Xi L, Siebert R, et al. Follicular lymphomas in children and young adults: a comparison of the pediatric variant with usual follicular lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 2013 Mar;37(3):333–43.
102. Schmidt J, Gong S, Marafioti T, Mankel B, Gonzalez-Farre B, Balagué O, et al. Genome-wide analysis of pediatric-type follicular lymphoma reveals low genetic complexity and recurrent alterations of TNFRSF14 gene. *Blood*. 2016 25;128(8):1101–11.
103. Ozawa MG, Bhaduri A, Chisholm KM, Baker SA, Ma L, Zehnder JL, et al. A study of the mutational landscape of pediatric-type follicular lymphoma and pediatric nodal marginal zone lymphoma. *Mod Pathol*. 2016 Oct;29(10):1212–20.
104. Louissaint A, Schafernak KT, Geyer JT, Kovach AE, Ghandi M, Gratzinger D, et al. Pediatric-type nodal follicular lymphoma: a biologically distinct lymphoma with frequent MAPK pathway mutations. *Blood*. 2016 25;128(8):1093–100.
105. Attarbaschi A, Beishuizen A, Mann G, Rosolen A, Mori T, Uyttendaele A, et al. Children and adolescents with follicular lymphoma have an excellent prognosis with either limited chemotherapy or with a ‘Watch and wait’ strategy after complete resection. *Ann Hematol*. 2013 Nov;92(11):1537–41.
106. Kussick SJ, Kalnoski M, Brazier RM, Wood BL. Prominent clonal B-cell populations identified by flow cytometry in histologically reactive lymphoid proliferations. *Am J Clin Pathol*. 2004 Apr;121(4):464–72.
107. Salaverria I, Philipp C, Oshlies I, Kohler CW, Kreuz M, Szczepanowski M, et al. Translocations activating IRF4 identify a subtype of germinal center-derived B-cell lymphoma affecting predominantly children and young adults. *Blood*. 2011 Jul 7;118(1):139–47.
108. Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, et al. Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations. *Blood*.

2009 Jul 23;114(4):826–34.

109. Cutter AR, Hayes JJ. A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.* 2015 Oct 7;589(20PartA):2914–22.
110. Ferrari KJ, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A, et al. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell.* 2014 Jan 9;53(1):49–62.
111. Su I-H, Basavaraj A, Krutchinsky AN, Hobert O, Ullrich A, Chait BT, et al. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat Immunol.* 2003 Feb;4(2):124–31.
112. Béguelin W, Rivas MA, Calvo Fernández MT, Teater M, Purwada A, Redmond D, et al. EZH2 enables germinal centre formation through epigenetic silencing of CDKN1A and an Rb-E2F1 feedback loop. *Nat Commun.* 2017 12;8(1):877.
113. Herviou L, Cavalli G, Cartron G, Klein B, Moreaux J. EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Oncotarget.* 2016 Jan 19;7(3):2284–96.
114. Abd Al Kader L, Oka T, Takata K, Sun X, Sato H, Murakami I, et al. In aggressive variants of non-Hodgkin lymphomas, Ezh2 is strongly expressed and polycomb repressive complex PRC1.4 dominates over PRC1.2. *Virchows Arch Int J Pathol.* 2013 Nov;463(5):697–711.
115. Bödör C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O’Riain C, Tan K, et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. *Blood.* 2013 Oct 31;122(18):3165–8.
116. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet.* 2010 Feb;42(2):181–5.
117. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng S-WG, Moradian A, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood.* 2011 Feb 24;117(8):2451–9.
118. Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, et al. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec 7;107(49):20980–5.
119. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, Jiang Y, et al. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Feb 21;109(8):2989–94.
120. Lorsbach RB, Shay-Seymore D, Moore J, Banks PM, Hasserjian RP, Sandlund JT, et al. Clinicopathologic analysis of follicular lymphoma occurring in children. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):1959–64.
121. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 2004 Jan 1;103(1):275–82.

122. Dubois S, Mareschal S, Picquenot J-M, Viailly P-J, Bohers E, Cornic M, et al. Immunohistochemical and genomic profiles of diffuse large B-cell lymphomas: implications for targeted EZH2 inhibitor therapy? *Oncotarget*. 2015 Jun 30;6(18):16712–24.
123. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, Holte H, Delabie J, Smeland EB, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. *Br J Haematol*. 2012 Jan;156(2):225–33.
124. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, Salles G, Vitolo U, Ladetto M, et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2016;27(suppl 5):v83–90.
125. Hou WH, Duan XK, Wei P, Xie JL, Zheng YY, Zhang YL, et al. [Cut-off value of Ki-67 labeling index in the pathologic grading of follicular lymphoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2018 Sep 8;47(9):696–9.
126. Maeshima AM, Taniguchi H, Nomoto J, Miyamoto K, Fukuhara S, Munakata W, et al. Prognostic implications of histologic grade and intensity of Bcl-2 expression in follicular lymphomas undergoing rituximab-containing therapy. *Hum Pathol*. 2013 Nov;44(11):2529–35.
127. Thorns C, Kalies K, Fischer U, Höfig K, Krokowski M, Feller AC, et al. Significant high expression of CD23 in follicular lymphoma of the inguinal region. *Histopathology*. 2007 May;50(6):716–9.
128. Goteri G, Lucarini G, Zizzi A, Costagliola A, Giantomassi F, Stramazzotti D, et al. Comparison of germinal center markers CD10, BCL6 and human germinal center-associated lymphoma (HGAL) in follicular lymphomas. *Diagn Pathol*. 2011 Oct 11;6:97.
129. Choi SM, Betz BL, Perry AM. Follicular Lymphoma Diagnostic Caveats and Updates. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(11):1330–40.
130. Kurshumliu F, Sadiku-Zehri F, Qerimi A, Vela Z, Jashari F, Bytyci S, et al. Divergent immunohistochemical expression of CD21 and CD23 by follicular dendritic cells with increasing grade of follicular lymphoma. *World J Surg Oncol*. 2019 Jul 3;17(1):115.
131. Olteanu H, Fenske TS, Harrington AM, Szabo A, He P, Kroft SH. CD23 expression in follicular lymphoma: clinicopathologic correlations. *Am J Clin Pathol*. 2011 Jan;135(1):46–53.
132. Koster A, Tromp HA, Raemaekers JMM, Borm GF, Hebeda K, Mackenzie MA, et al. The prognostic significance of the intra-follicular tumor cell proliferative rate in follicular lymphoma. *Haematologica*. 2007 Feb;92(2):184–90.
133. Bastion Y, Berger F, Bryon PA, Felman P, Ffrench M, Coiffier B. Follicular lymphomas: assessment of prognostic factors in 127 patients followed for 10 years. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 1991 Feb;2 Suppl 2:123–9.
134. Chiarle R, Fan Y, Piva R, Boggino H, Skolnik J, Novero D, et al. S-phase kinase-associated protein 2 expression in non-Hodgkin's lymphoma inversely correlates with p27 expression and defines cells in S phase. *Am J Pathol*. 2002 Apr;160(4):1457–66.
135. Zhang K, Prichard JW, Yoder S, De J, Lin F. Utility of SKP2 and MIB-1 in grading follicular lymphoma using quantitative imaging analysis. *Hum Pathol*. 2007 Jun;38(6):878–82.

136. Yoshino T, Takata K, Tanaka T, Sato Y, Tari A, Okada H. Recent progress in follicular lymphoma in Japan and characteristics of the duodenal type. *Pathol Int.* 2018 Dec;68(12):665–76.
137. Duffles Amarante G, Collins G, Rocha V. What do we know about duodenal-type follicular lymphoma? From pathological definition to treatment options. *Br J Haematol.* 2020 Mar;188(6):831–7.
138. Koh J, Jeon YK. Morphologic variant of follicular lymphoma reminiscent of hyaline-vascular Castleman disease. *J Pathol Transl Med.* 2020 Feb 5;
139. Bowen JM, Perry AM, Laurini JA, Smith LM, Klinetobe K, Bast M, et al. Lymphoma diagnosis at an academic centre: rate of revision and impact on patient care. *Br J Haematol.* 2014 Jul;166(2):202–8.
140. LaCasce AS, Kho ME, Friedberg JW, Niland JC, Abel GA, Rodriguez MA, et al. Comparison of referring and final pathology for patients with non-Hodgkin’s lymphoma in the National Comprehensive Cancer Network. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008 Nov 1;26(31):5107–12.
141. Bödör C, O’Riain C, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, Tayyib H, et al. EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia.* 2011 Apr;25(4):726–9.
142. Robert A. Copeland. Inhibitors of human EZH2 and methods of use thereof <https://patents.google.com/patent/US8691507>.



**AUTEUR : Nom : BENOZENE**

**Prénom : Mélanie**

**Date de Soutenance : Jeudi 7 mai 2020**

**Titre de la Thèse : Caractérisation anatomopathologique des lymphomes folliculaires basée sur la nouvelle classification OMS 2016 : à propos de 287 cas diagnostiqués dans un centre expert LYMPHOPATH**

**Thèse - Médecine - Lille 2020**

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

**DES + spécialité : Anatomie et Cytologie Pathologiques**

**Mots-clés : lymphome folliculaire ; lymphome folliculaire de type pédiatrique ; lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4 ; relecture LYMPHOPATH ; EZH2 ; profil de méthylation H3K27**

**Résumé :**

**Contexte :** Le lymphome folliculaire (LF) est le lymphome B à petites cellules indolent le plus fréquent. Il se caractérise par une grande variété de présentations morphologiques et phénotypiques, justifiant fréquemment une expertise LYMPHOPATH. La classification OMS 2016 a identifié 2 nouvelles entités se rapprochant des caractéristiques anatomopathologiques des LF de grade 3 (le LF de type pédiatrique et le lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4), qui complexifient l'étude des diagnostics différentiels dans cette catégorie. L'établissement d'une stratégie diagnostique permettant de repérer ces nouvelles entités est donc primordial.

**Méthode :** Nous avons recueilli les données épidémiologiques et anatomopathologiques des LF diagnostiqués au sein de l'Institut de pathologie du CHRU de Lille (centre expert LYMPHOPATH), entre le 1<sup>er</sup> janvier 2017 et le 31 décembre 2018 en les comparant aux données du réseau LYMPHOPATH. Nous avons, par la suite, effectué une relecture de l'ensemble des LF « non conventionnels » et/ou de grade 3. Les cas présentant des caractéristiques communes avec les diagnostics différentiels du LF ont fait l'objet de techniques complémentaires : IHC MUM1 et FISH IRF4.

**Résultats :** Notre analyse comportait 287 LF dont 105 LF ont été relus (41 LF non conventionnels et 64 LF de grade 3A ou 3B). Parmi les LF non conventionnels, nous avons décrits les principaux variants morphologiques et phénotypiques recensés dans la classification OMS 2016 et reclassé un LF en lymphome du manteau de variant blastique. Parmi les LF de grade 3, nous avons recensé 1 LF de type pédiatrique et un lymphome B à grandes cellules avec réarrangement IRF4.

Notre cohorte comportait 60% de cas adressés pour une relecture d'expert dans le cadre du réseau LYMPHOPATH. Le taux de discordance entre le diagnostic initial et le diagnostic de l'expert était de 66,9%, dont 88,7% étaient des modifications majeures, ayant un impact potentiel dans la prise en charge du patient.

**Conclusion :** Notre étude confirme la très grande hétérogénéité du LF et l'intérêt d'une relecture lorsque le diagnostic n'est pas aisé. Nous mettons en avant l'intérêt d'une étude immunohistochimique avec l'anticorps anti-MUM1 à tous les LF d'aspect bazoïde-like afin de sélectionner les cas devant bénéficier d'une analyse FISH à la recherche d'un réarrangement du gène IRF4.

**Composition du Jury :**

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

**Asseseurs :** Madame le Professeur Catherine ROCHE-LESTIENNE ;

Monsieur le Professeur Franck MORSCHHAUSER

**Directeur de thèse :** Monsieur le docteur Romain DUBOIS