

UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE MEDECINE

Année 2008

N° 131

THESE

Pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE
DES D'ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

par

François LECLAIR

Né le 07 juillet 1975 à Nantes

Présentée et soutenue publiquement le 29 septembre 2008

ETUDE DE LA TRANSLOCATION t(14 ;18) ET DU
REARRANGEMENT *bcl6* DANS LES LYMPHOMES
FOLLICULAIRES DE GRADES 3a ET 3b, DEUX ENTITES
CYTOGENETIQUEMENT DIFFERENTES ?

Président : Monsieur le Professeur AVET-LOISEAU Hervé

Directrice de thèse : Madame le Docteur MOREAU Anne

Table des matières

Introduction.....	7
Généralités sur les lymphome folliculaires.....	8
1- Historique.....	8
2- Epidémiologie.....	11
3- Clinique.....	12
4- Evolution.....	13
5- Facteurs pronostiques.....	15
5.1- cliniques.....	15
5.2- biologiques.....	16
5.3- histologiques et immunohistochimiques.....	16
5.4- cytogénétiques.....	17
5.5- persistance de la maladie après traitement, détectée par diverses méthodes.....	17
5.6- Le micro-environnement.....	18
5.7- index pronostiques.....	19
6- Anatomie pathologique.....	20
6.1- Morphologie.....	20
6.2- Immunohistochimie.....	25
6.2.1- marqueurs des cellules B.....	25
6.2.2- marqueurs des centres germinatifs.....	25
6.2.3- bcl2.....	27
6.2.4- autres marqueurs.....	29
6.3- Diagnostics différentiels.....	32
6.3.1- L'hyperplasie lymphoïde folliculaire.....	32
6.3.2- Le lymphome du manteau dans sa forme nodulaire.....	32
6.3.3- Le lymphome du manteau colonisant des centres germinatifs.....	33
6.3.4- Autres diagnostics différentiels.....	33
7- Cytogénétique.....	34
7.1- Translocation t(14 ;18).....	34
7.2- Anomalies du gène <i>bcl6</i>	38
7.3- Altérations génétiques additionnelles.....	41
7.3.1- Gains chromosomiques les plus fréquents.....	41
7.3.2- Pertes chromosomiques les plus fréquentes.....	43
8- Détection de la translocation t(14 ;18) et du réarrangement <i>bcl6</i>	45
8.1- La cytogénétique conventionnelle.....	45
8.2- Le Southern Blot.....	45
8.3- La Polymerase Chain Reaction.....	46
8.4- L'hybridation in situ fluorescente (FISH).....	46
9- Translocation t(14 ;18), réarrangement <i>bcl6</i> et grades histologiques.....	51
9.1- Translocation t(14 ;18) et grades histologiques.....	51
9.2- Réarrangement <i>bcl6</i> et grades histologiques.....	52

Matériels et méthodes.....	55
1- Matériels.....	55
2- Localisations tumorales.....	56
3- Classification et grading histologique.....	56
4- Immunohistochimie.....	56
5- FISH.....	58
6- Cytogénétique conventionnelle.....	61
7- Analyses statistiques.....	62
Résultats.....	63
1- Patients.....	63
1.1- Ages.....	63
1.2- Antécédents de lymphome folliculaire.....	63
2- Histologie.....	63
2.1- Grades histologiques.....	63
2.2- Immunohistochimie.....	64
3- Cytogénétique.....	66
3.1- FISH.....	66
3.2- Cytogénétique conventionnelle.....	69
Discussion.....	79
Annexe.....	88
Abréviations.....	89
Références bibliographiques.....	90

Introduction

La classification OMS des lymphomes B isole les lymphomes folliculaires (LF) et les divise en 3 grades histologiques (1, 2 et 3) en fonction de leur richesse croissante en centroblastes. Elle subdivise également les LF de grade 3 en 3a (LF3a) et 3b (LF3b) selon les critères de Mann et Berard. Récemment, des équipes européennes et asiatiques ont rapporté des différences biologiques entre les LF de hauts grades (grade 3) et de bas grades (grades 1 et 2). Les premiers semblent en effet exprimer moins fréquemment les protéines CD10, *bcl2* et *bcl6*, présenter moins souvent une translocation $t(14 ;18)$ et posséder un index de prolifération et une fréquence de réarrangement *bcl6* supérieurs. Par contre, alors que certains auteurs décrivent un comportement particulier des LF3b et que certains centres traitent ce sous-groupe différemment des LF3a, les données sur d'éventuelles différences de comportement biologique entre LF3a et LF3b sont moins nombreuses et plus controversées. Notre étude a donc tenté de savoir, sur une large cohorte de LF de grades 3, si les LF3a et LF3b constituaient des entités biologiquement distinctes. Pour cela, nous avons comparé l'expression protéique de CD10 et *bcl2*, l'index de prolifération et les fréquences des translocation $t(14 ;18)$ et réarrangement *bcl6* dans ces 2 sous-groupes.

Quelques généralités sur les LF donneront tout d'abord l'occasion de préciser l'historique de ces lymphomes, leur épidémiologie, leur clinique, leur évolution, leurs facteurs pronostiques, leurs aspects anatomopathologiques, leurs principaux diagnostics différentiels et leurs particularités cytogénétiques. Nous exposerons ensuite le matériel utilisé dans cette étude rétrospective d'une large série de cas ayant fait l'objet d'une double relecture pour validation du grade histologique et dont la plupart proviennent des archives du service d'Anatomie Pathologique de l'Hôtel Dieu, CHU de Nantes. Nous préciserons les méthodes d'immunohistochimie et de FISH sur coupes déparaffinées utilisées, cette dernière technique ayant été validée par comparaison de ses résultats avec ceux de la cytogénétique moléculaire réalisée en routine. Nous détaillerons ensuite les résultats obtenus. Nous commenterons enfin ces derniers tout en les comparant aux données de la littérature et tenterons de répondre à la question d'une éventuelle différence biologique entre les LF3a et les LF3b.

Généralités sur les lymphomes folliculaires

Cette étude n'a pas concerné les lymphomes folliculaires primitifs cutanés, individualisés par la classification OMS 2001 comme « primary cutaneous follicle center lymphoma », entité partageant certaines caractéristiques avec les lymphomes folliculaires mais dont la biologie semble être différente comme en témoigne l'absence habituelle de translocation t(14 ;18) et d'expression de bcl2. Les lymphomes folliculaires de l'enfant et ceux intéressant les testicules apparaissent également comme des entités à part et ne seront pas discutés ici.

1- Historique

Les lymphomes folliculaires (LF) sont des proliférations cellulaires malignes monoclonales dérivant des lymphocytes B des centres germinatifs des follicules lymphoïdes (Jaffe ES *et al*, 1974). C'est dans la littérature allemande, en 1901, que Becker évoque le premier cette affection (Becker E, 1917) dont Brill fera le premier une entité en 1938 dans le Journal of the American Medical Association (Brill NE *et al*, 1925). Cette même année, Symmers rapporte une pathologie caractérisée morphologiquement par une lymphadénopathie à follicules géants pouvant atteindre la rate (Symmers D, 1938), mais ce n'est qu'en 1942 que Gall et Mallory décrivent le « lymphome à follicules géants » (« *giant follicle lymphoma* ») qui deviendra alors une entité morphologiquement et cliniquement spécifique et identifiée comme telle (Gall EA *et al*, 1942).

L'entité « lymphome folliculaire » n'apparaît pourtant pas dans la première classification des lymphomes, purement morphologique, proposée en 1956 par Rappaport et améliorée jusqu'à sa publication en 1966 (Rappaport H, 1966). Les LF se retrouvent en effet divisés en « lymphosarcomes lymphocytiques nodulaires peu différenciés », « lymphosarcomes mixtes lymphocytiques-histiocytaires », « lymphosarcomes histiocytaires » et « lymphosarcomes indifférenciés ». Dans les classifications suivantes, les LF se trouvèrent

divisés en « lymphome folliculaire centroblastique/centrocytique », « lymphome folliculaire et diffus », « lymphome centroblastique » et « lymphome folliculaire » dans la classification de Kiel en 1974 (Gerard-Marchant R *et al*, 1974) ou en « lymphome à petites cellules clivées », « lymphome à grandes cellules clivées », « lymphome à petites ou grandes cellules centro-folliculaires non clivées » dans celle de Lukes-Collins en 1977 (Lukes RJ, Collins RD, 1977). Ce n'est qu'en 1982, dans la classification de la Working Formulation, que les LF sont individualisés en tant qu'entité ([3], 1982). Cette classification est née d'une grande étude coopérative internationale débutée dans la fin des années 70 à l'initiative du National Cancer Institute pour améliorer la concordance entre les nombreuses classifications pré-existantes. S'avérant finalement plus pratique que celles-ci, la classification de la Working Formulation les a remplacées. Cette classification est également purement morphologique et individualise les « lymphomes folliculaires à petites cellules (classe B) » (comportant moins de 25% de grandes cellules) et les « lymphomes folliculaires mixtes, à petites et grandes cellules (classe C) », classés dans le groupe de malignité faible et les « lymphomes folliculaires à grandes cellules (classe D) » (comportant au moins 50% de grandes cellules) classés dans le groupe de malignité intermédiaire. La classification suivante, celle de « Kiel actualisée » parue en 1988 (Stansfeld AG *et al*, 1988) a été essentiellement utilisée en Europe et en Asie. Prenant en compte les critères morphologiques et immunologiques, elle est la première à diviser les lymphomes B des lymphomes T. Les LF y sont séparés en « lymphomes centroblasto-centrocytiques folliculaires et/diffus » et en « lymphomes centrocytiques » classés dans le groupe de faible malignité et en « lymphomes centroblastiques » classés dans le groupe de malignité intermédiaire. En 1994, la classification REAL (Revised European American Lymphoma) (Harris NL *et al*, 1994), réalisée par le Groupe International d'Etude des Lymphomes rassemblant des pathologistes experts américains et européens, a eu pour but de créer un consensus autour d'entités considérées comme reconnues et diagnostiquables en techniques de routine. Intégrant les données cliniques, morphologiques, immunologiques et génétiques, elle a été la base de la classification actuelle de l'OMS. Les lymphomes y sont regroupés par entités et non plus par groupes pronostiques. Les LF y apparaissent sous la dénomination de « lymphomes centro-folliculaires ». Pour la première fois, les experts recommandent de grader ces LF en « grade I » (prédominance de petites cellules), « grade II » (mélange de petites et grandes cellules) et « grade III » (à prédominance de grandes cellules). Les auteurs précisent qu'ils ne sont cependant « pas aptes à recommander des critères spécifiques pour les grading » mais suggèrent que « comme pour d'autres tumeurs, chaque pathologiste ou institution doit adopter un schéma de grading et l'utiliser rigoureusement avant que des

données soient disponibles pour suggérer une méthode uniforme». Ces auteurs citent toutefois les critères de Mann et Berard (Mann RB, Berard CW, 1983) qui recommandent le grading des LF selon le nombre moyen de grandes cellules (centroblastes) dans 10 follicules néoplasiques représentatifs et non sélectionnés pour leur richesse en grandes cellules (cf détail de ce compte dans le chapitre « Morphologie » p. 21). La classification suivante fut celle de l’OMS, réalisée en 1997 par l’Association Européenne d’Hématopathologie (EAHP) et la Société américaine d’Hématopathologie (Harris NL *et al*, 2000). Cette classification adopte la classification REAL de 1994. Le terme de « lymphome folliculaire » (« follicular lymphoma ») remplace celui de « lymphome centro-folliculaire » (« follicle center lymphoma »). Les critères de Mann et Berard sont ceux retenus pour le grading de ces LF. Les auteurs précisent que les LF forment deux sous-groupes, l’un comportant les LF de grades 1 et 2, l’autre les LF de grade 3. Leur justification est que, sur des biopsies itératives, le passage du grade 1 vers le grade 2 ou du grade 2 vers le grade 1 est observable alors qu’il est exceptionnel de voir le passage d’un grade 1 vers un grade 3. De plus, le délai avant la rechute est plus court dans les LF de grade 3 par rapport aux LF de grades inférieurs. Les auteurs soulignent que les LF de grade 3 ne sont cependant pas des lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) puisqu’ils ont un taux de rechute plus important et une meilleure survie globale. S’il existe des plages diffuses, elles doivent être mentionnées et quantifiées selon les recommandations de la REAL : LF « à prédominance folliculaire », « folliculaire et diffus » ou « à prédominance diffus » pour une architecture folliculaire représentant respectivement plus de 75%, entre 25% et 75% ou moins de 25% de la surface ganglionnaire. Dans les LF de grade 3, ces plages diffuses doivent être considérées comme du lymphome B diffus à grandes cellules et inciter à un traitement plus agressif. Une nouvelle édition de cette classification a été publiée en 2001 (cf « Annexe » page 88) (Jaffe ES *et al*, 2001) dans laquelle les auteurs proposent la subdivision des LF de grade 3 en LF de grade 3a (LF3a) et LF de grade 3b (LF3b). Dans les LF3a, on compte plus de 15 centroblastes par champs à fort grossissement mais il persiste des centrocytes alors que les LF3b comportent uniquement des centroblastes (cf façon de compter dans le chapitre « Morphologie », p. 21).

2- Epidémiologie.

Les LF représentent 35% des lymphomes malins non-Hodgkiniens (LMNH) aux Etats-Unis et 22% dans le monde entier (Jaffe ES *et al*, 2001) ce qui en fait le deuxième LMNH le plus fréquent derrière les LBDGC (40%). Ce sont les lymphomes de bas grade les plus fréquents (70% dans une étude américaine (Glass AG *et al*, 1997)). Depuis plusieurs années, leur fréquence semble régulièrement augmenter sans que l'on sache s'il s'agit d'une épidémiologie particulière ou d'une meilleure reconnaissance de cette entité. Le lymphome folliculaire est rare avant 40 ans et s'observe avec un pic de fréquence entre 55 et 60 ans. Il touche autant les hommes que les femmes.

Ces lymphomes sont rares dans les pays en voie de développement, notamment en Afrique et dans les pays d'Europe de l'Est (Müller AM *et al*, 2005). Ils sont également plus rares dans les pays asiatiques où ils représentent 3 à 12% des lymphomes non-Hodgkiniens (Biaggi JJ *et al*, 2002) avec, par exemple, des taux de 3,8% en Thaïlande (Intragumtornchai T *et al*, 1996) et de 6,7% au Japon ([4], 2000).

De légères différences dans la répartition des grades histologiques sont également observées selon la zone géographique avec des grades 3, et notamment 3b, un peu plus fréquemment rapportés dans les pays asiatiques. Ainsi, alors qu'une étude anglaise de Chau *et al* sur 215 LF européens rapporte la distribution suivante : grade 1 : 43%, grade 2 : 32% et grade 3 : 25% avec un ratio 3a/3b de 4/1 (Chau I *et al*, 2003), 2 études japonaises de Miyazato *et al* (Miyazato H *et al*, 2002) et Guo *et al* (Guo Y *et al*, 2005) rapportent les distributions respectives suivantes : grade 1 : 38% et 26%, grade 2 : 29% et 48%, grade 3 : 33% et 26% avec un ratio 3a/3b de 2/1 pour l'équipe de Guo *et al*. Une étude malaisienne de Peh *et al* rapporte : grade 1 : 22%, grade 2 : 39%, grade 3 : 39% avec un ratio 3a/3b de 3,8/1 (Peh SC *et al*, 2004) et une étude coréenne : grade 1 : 30%, grade 2 : 13% et grade 3 : 57% avec un ratio 3a/3b de 2,2/1 (Lee D *et al*, 2008).

Les causes et facteurs de risque des LF restent mal connus. Une étude a rapporté une corrélation positive entre le risque de développer un LF et le tabac mais la force de cette association n'augmente pas avec la durée d'exposition au tabac et son intensité, amenant les auteurs à conclure que la relation entre tabac et LF reste incertaine (Herrinton LJ *et al*, 1998). Globalement, des auteurs suggèrent que l'exposition environnementale à des solvants et à

certaines produits chimiques jouerait un rôle dans de nombreux cancers, dont le LF (Vitolo U *et al*, 2008).

3- Clinique

Le LF touche essentiellement des sujets âgés ou d'âge moyen même s'il peut être diagnostiqué dès la 3^{ème} décennie. Cliniquement, les patients atteints sont longtemps asymptomatiques et le diagnostic est souvent porté après plusieurs mois ou années d'évolution. La présentation clinique est alors en général celle d'un tableau de polyadénopathies superficielles (principalement cervicales, axillaires et inguinales) et profondes (thoraciques et abdominales). Ces adénopathies sont peu symptomatiques, non inflammatoires, elles évoluent par poussées et peuvent régresser (Horning SJ *et al*, 1984). Elles peuvent également être responsables de douleurs abdominales ou dorsales (en cas de volumineux ganglions abdominaux, principalement para-aortiques) ou de signes de compression, notamment des uretères par des ganglions rétropéritonéaux (Solal-Céligny PH *et al*, 1997). L'état général est le plus souvent conservé, seuls environ 20% des patients présentant des symptômes systémiques comme une fièvre, des sueurs nocturnes ou une perte de poids (symptômes B) (Warnke RA *et al*, 1994 ; Solal-Céligny PH *et al*, 1997).

Les lymphomes folliculaires se présentent le plus souvent comme une pathologie disséminée, environ 2/3 étant de stade III ou IV de Ann Arbor lors de leur mise en évidence ([1], 1997). La moelle osseuse est envahie dans 40 à 60% des cas (Coller BS *et al*, 1977 ; Salles AG, 2007). Une atteinte splénique, associée ou non à une splénomégalie, est observée dans 25 à 55 % des cas (Castellani R *et al*, 1977 ; Chabner BA *et al*, 1978 ; Goffinet DR *et al*, 1977). Une dissémination sanguine leucémique est moins fréquente que pour les autres lymphomes de bas grade (Vitolo U *et al*, 2008). Une atteinte hépatique peut également être observée, débutant par et se limitant souvent à un envahissement des espaces portes (Kim H *et al*, 1976). Des localisations gastro-intestinales primitives sont rares. Elles concernent plus volontiers les femmes et se localisent essentiellement au niveau de l'intestin grêle (Shia J *et al*, 2002 ; Damaj G *et al*, 2003). Enfin, des localisations cutanées secondaires, prédominant sur la face et le cou et différentes des lymphomes primitifs cutanés sont possibles (Dabski K *et al*, 1989).

4- Evolution

L'histoire naturelle des LF est celle d'une pathologie d'évolution indolente avec une réponse au traitement initial mais une rechute dans la plupart des cas. Au terme d'un nombre variable de phases de traitements et de rechutes, une transformation en lymphome à grandes cellules, plus agressif survient dans 20 à 30% des cas (Ersbøll J *et al*, 1989 ; Bastion Y *et al*, 1997 ; Said J, 2003). Ces lymphomes de haut grade sont essentiellement des lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) (Lossos IS *et al*, 2003) même si de rares cas de transformation en lymphome de Burkitt ou en lymphome lymphoblastique ont été décrits (De Jong D *et al*, 1988 ; Gauwerky CE *et al*, 1988 ; Mukhopadhyay S *et al*, 2005).

Dans le cas d'une transformation en LBDGC, un clone plus agressif émerge, proliférant sous forme de nappes diffuses au niveau desquelles l'architecture nodulaire a disparu. La fréquence de cette transformation varie de 10 à 70% selon les séries, reflétant l'absence de consensus sur la définition anatomo-pathologique précise de la transformation et la variabilité des habitudes de chaque centre dans la réalisation ou non d'une biopsie ganglionnaire à chaque récurrence (Cullen MH *et al*, 1979 ; Bastion Y *et al*, 1997; Lossos IS, 2005 ; Gine'E *et al*, 2006). Les résultats d'études autopsiques de patients atteints de LF montrent une transformation dans plus de 60% des cas (Garvin AJ *et al*, 1983 ; Risdall R *et al*, 1979). Cette transformation peut survenir à tout moment de l'évolution du LF, que le patient ait été traité ou non et quel que soit le stade (Rohatiner AZ *et al*, 2005).

Les mécanismes biologiques expliquant cette transformation restent encore incomplètement caractérisés même si certaines altérations géniques, éventuellement associées entre elles, lui ont été associées : une accumulation d'altérations géniques secondaires dues à une instabilité génétique (Richardson ME *et al*, 1987; Armitage JO *et al*, 1988), un réarrangement de c-MYC (Yano T *et al*, 1992), une mutation de p53 (Sander CA *et al*, 1993; Lo Coco F *et al*, 1993; Davies AJ *et al*, 2005), des altérations spécifiques de p16^{INK4A}, p15^{INK4B} (Pinyol M *et al*, 1998; Elenitoba-Johnson KS *et al*, 1998) et de bcl-6 (Akasaka T *et al*, 2003).

La valeur pronostique d'une composante de LBDGC dans les LF est débattue. Alors que certaines études suggèrent que cette composante ne modifie pas la survie (Osborne CK *et al*, 1980; Glick JH *et al*, 1982; Kantarjian HM *et al*, 1984; Wendum D *et al*, 1997; Rodriguez J *et al*, 1999; Horning SJ *et al*, 1987), d'autres l'associent à un pronostic défavorable avec notamment une diminution de la survie globale (Warnke RA *et al*, 1977; Bartlett NL *et al*, 1994; Yuen AR *et al*, 1995 ; Freedman AS,

2005) ou de la survie sans évènement (Anderson JR *et al*, 1993). Deux études récentes sur des séries de 190 et 421 LF observent une évolution plus péjorative des LF de grade 3 si ceux-ci sont accompagnés d'une composante de LBDGC supérieure ou égale à 50% avec des survies globales de 9,4 ans si la composante de LBDGC est inférieure à 50% et 5 ans si elle lui est supérieure ou égale (Hans CP *et al*, 2003 ; Ganti AK *et al*, 2006).

Certaines études indiquent qu'un traitement précoce et une réponse complète après une thérapie de première ligne sont associés à un plus faible risque de transformation (Bastion Y *et al*, 1997 ; Montoto S *et al*, 2007). Giné et collaborateurs ont montré que le grade histologique (grade 3) et le FLIPI (élevé) seraient les meilleurs indicateurs du risque de transformation en LBDGC (Gine E *et al*, 2006).

La médiane de survie du lymphome folliculaire a longtemps été de 8-10 ans (Bastion Y *et al*, 1991 ; Horning SJ, 1993; Jaffe ES *et al*, 2001). Des données récentes provenant de différentes études montrent que leur pronostic a été amélioré ces dernières années, en particulier grâce à une meilleure prise en charge thérapeutique et notamment l'introduction du rituximab dans l'arsenal thérapeutique (Fisher RI *et al*, 2005 ; Sacchi S *et al*, 2007 ; Swenson WT *et al*, 2005). L'analyse de la survie globale et de la survie sans évènement dans 5 études américaines consécutives sur des LF de stade avancé entre 1972 et 2002 montre que la survie globale est passée de 64% à 95% et la survie sans évènement de 29% à 60% (Liu Q *et al*, 2006). La majorité des malades atteints de LF meure cependant de sa maladie et 10 à 20% décèdent dans les 2 premières années après le diagnostic (Horning SJ, 1993; Horning SJ, 2000).

Des différences de survie en fonction du grade histologique sont reconnues. Il est admis que l'évolution des LF de grades 1 et 2 est similaire et considérée comme indolente (Harris NL *et al*, 1997) avec une survie globale de 11 ans dans une série de 421 LF dont 59 grades 1 et 135 grades 2 (Ganti AK *et al*, 2006). Au contraire, celle des LF de grade 3 est sujette à controverse. De nombreuses études se sont penchées sur le comportement de ces lymphomes (Jones SE *et al*, 1973; Osborne CK *et al*, 1980; Glick JH *et al*, 1982; [3], 1982; Stewart ML *et al*, 1986; Horning SJ *et al*, 1987; Anderson JR *et al*, 1993; Longo DL, 1993; Bartlett NL *et al*, 1994; Wendum D *et al*, 1997; Miller TP *et al*, 1997; Rodriguez J *et al*, 1999; Rodriguez J *et al*, 2000; Chau I *et al*, 2003). La survie médiane s'étend de 25 mois (Stewart ML *et al*, 1986) à 266 mois (Chau I *et al*, 2003.) et la survie globale de 35% à 4,5 ans (Jones SE *et al*, 1973) à 72% à 5 ans (Rodriguez J *et al*, 1999). Cette grande diversité peut s'expliquer en partie par l'étendue de la période au cours de laquelle ces études se sont déroulées, impliquant des systèmes de classification et des traitements parfois différents. Quelles que soient ces divergences, de nombreux auteurs pensent que les LF de grade 3

évoluent de manière plus agressive et doivent donc être traités en fonction (Kantarjian HM *et al*, 1984; Anderson JR *et al*, 1993; Bartlett NL *et al*, 1994 ; Martin AR *et al*, 1995 ; Rodriguez J *et al*, 1999 ; Rodriguez J *et al*, 2000). Aucune différence d'évolution entre les LF3a et les LF3b n'est retrouvée dans plusieurs études. Ott et collaborateurs observent des taux de survies globale ou sans évènement non significativement différents entre ces deux groupes (Ott G *et al*, 2002) ; de même, l'équipe d'Armitage, dans deux études, n'objective pas de différence de survie entre LF3a et LF3b si les cas avec composante de LBDGC sont exclus (Ganti AK *et al*, 2006 ; Hans CP *et al*, 2003).

5- Facteurs pronostiques

Comme nous l'avons vu, classiquement d'évolution indolente, certains LF peuvent progresser de manière plus péjorative. Pour tenter d'isoler ce sous-groupe, de nombreux facteurs pronostiques ont été étudiés ces vingt dernières années. Ceux associés à une évolution péjorative sont :

5.1- cliniques :

- .Le sexe masculin (Steward WF *et al*, 1988; Romaguera JE *et al*, 1991).
- .Un âge avancé (Leonard RCF *et al*, 1991) supérieur à 70 ans dans une étude du groupe de Gospodarowicz *et al* (Gospodarowicz MK *et al*, 1984) ou supérieur à 60 ans dans une étude de Soubeyran et collaborateurs (Soubeyran P *et al*, 1991).
- .Un lymphome disséminé selon la classification d'Ann Arbor (Leonard RCF *et al*, 1991 ; Horning ST, 1993).
- .De nombreuses localisations ganglionnaires et / ou extra-ganglionnaires (Gospodarowicz MK *et al*, 1984 ; Leonard RCF *et al*, 1991; Cameron DA *et al*, 1993; Decaudin D *et al*, 1999).
- .La présence d'une volumineuse masse tumorale (« bulky » tumor) : (Gospodarowicz MK *et al*, 1984 ; Soubeyran P *et al*, 1991).
- .Un faible « performans status » (Cameron DA *et al*, 1993; Gospodarowicz MK *et al*, 1994).
- .Des symptômes B (Gallagher CJ *et al*, 1986 ; Bastion Y *et al*, 1991).

.Un envahissement médullaire (Bastion Y *et al*, 1991 ; Romaguera JE *et al*, 1991).

.Une hépatosplénomégalie (Gallagher CJ *et al*, 1986).

5.2- biologiques :

.Une augmentation du taux de LDH et/ou de $\beta 2$ microglobuline (Bastion Y *et al*, 1991).

.Une anémie (Leonard RCF *et al*, 1991).

5.3- histologiques et immunohistochimiques

. Un pourcentage élevé de grandes cellules (Gallagher CJ *et al*, 1986 ; Gospodarowicz MK *et al*, 1994) et donc un grade histologique élevé (grade 3) (Martin AR *et al*, 1995).

. Une architecture en partie diffuse (au moins 25% de la surface ganglionnaire) et non uniquement folliculaire (Ezdinli EZ *et al*, 1987).

. La présence d'une sclérose au sein du ganglion lymphomateux a été associée à une survie globale diminuée dans une étude allemande sur 158 LF (Klapper W *et al*, 2007).

. Les LF possédant un contingent de cellules B-monocytoïdes extra-folliculaire supérieur à 5% auraient une survie significativement plus courte que les LF « purs », selon une étude de Nathwani et collaborateurs, (Nathwani BN *et al*, 1999) résultat non retrouvé par l'équipe de Klapper (Klapper W *et al*, 2007).

. Un index de prolifération (IP) élevé : comme dans d'autres lymphomes, il a été montré que l'IP estimé par le marquage par le Ki67 en immunohistochimie a une valeur pronostique dans les LF (Akerman M *et al*, 1987; Hall PA *et al*, 1988 ; Holte H *et al*, 1989; Miller TP *et al*, 1994; Koster A *et al*, 2007). Un IP élevé serait associé à un grade élevé (Llanos M *et al*, 2001; Pruneri G *et al*, 2004) même si l'équipe de Wang *et al* a mis en évidence l'existence d'un sous-groupe de LF de bas grade histologique (grades 1 et 2) ayant de manière discordante un IP élevé. Ce sous-groupe aurait d'ailleurs un comportement clinique plus agressif, proche de celui des LF de grade 3 (Wang SA *et al*, 2005). Un IP élevé a également été corrélé à une moins bonne survie globale d'une part (Martin AR *et al*, 1995) et à une moins bonne réponse au traitement rituximab plus chimiothérapie d'autre part (Saito B *et al*, 2004). Cette corrélation entre IP élevé et pronostic défavorable n'est pas retrouvé par l'équipe de Klapper (Klapper W *et al*, 2007).

. Selon une étude sur 73 LF, une forte expression de bcl6 en immunohistochimie serait également associée à une meilleure survie globale, de même qu'un marquage avec le CD10, mais de façon non-indépendante vis-à-vis de bcl6 (Bilalovic N *et al*, 2004).

. Une hyperexpression de SOCS3 en immunohistochimie serait associée à une médiane de survie significativement inférieure dans des LF *de novo* et corrélait à une incidence de transformation en LBDGC accrue (Krishnadasan R *et al*, 2006). Le rôle du gène SOCS3, membre d'une famille de suppresseurs de cytokines, reste cependant à définir dans la pathogénie des LF.

5.4- cytogénétiques :

La plupart des équipes observe l'association entre un moins bon pronostic des LF et l'augmentation du nombre de leurs anomalies génétiques (Yunis JJ *et al*, 1987; Horsman DE *et al*, 2005). Tilly et collaborateurs montrent ainsi que plus de 90% de métaphases anormales ou plus de 6 cassures chromosomiques, sont associées à un pronostic défavorable (Tilly H *et al*, 1994). D'autres équipes montrent une corrélation entre complexité du caryotype et grade histologique élevé (Mohamed AN *et al*, 2001 ; Viardot A *et al*, 2002).

Différentes anomalies ponctuelles ont été également rattachées à un moins bon pronostic : des anomalies de la région 1p21-22, 6q23-26 ou du bras court du chromosome 17 (Tilly H *et al*, 1994), une cassure en 6q11-q15 ou 8q24 ou un gain de chromosome 7/7q ou 8/8q (Nanjangud G *et al*, 2007), une perte de matériel en 6q25q27 (Viardot A *et al*, 2002) ou encore la fréquence de la trisomie 5 ou 12, de la délétion du bras long du chromosome 13 ou du gain de chromosome 7, associées à un grade histologique élevé (Mohamed AN *et al*, 2001).

De même, les anomalies cytogénétiques associées à une fréquence accrue de transformation en LBDGC (cf ci-dessus) sont indirectement des facteurs de mauvais pronostic.

5.5- persistance de la maladie après traitement, détectée par diverses méthodes :

. persistance de cellules tumorales détectées par PCR dans le sang circulant et/ou la moelle après traitement : plusieurs études ont montré qu'une réponse moléculaire complète et

durable après chimiothérapie avec ou sans rituximab était un facteur pronostique favorable corrélant avec une meilleure survie sans événement (Lopez-Guillermo A *et al*, 1998 ; Lopez-Guillermo A *et al*, 2000; Rambaldi A *et al*, 2002; Czuczman MS *et al*, 2004 ; Belada D *et al*, 2007). La PCR a pour but de détecter la « maladie résiduelle minimale » sous la forme de cellules possédant le réarrangement *bcl2* ou un réarrangement clonal des gènes IgH si la t(14 ;18) est absente.

. persistance d'une positivité au PET-scan après traitement d'induction : des études ont montré que dans les lymphomes en général et dans les LF en particulier, un PET-scan positif après traitement d'induction prédisait une rechute plus rapide (Zinzani PL *et al*, 2004 ; Zinzani PL *et al*, 2007 ; Bishu S *et al*, 2007).

5.6- Le micro-environnement :

Plusieurs travaux ont également montré l'importance du micro-environnement, c'est-à-dire des cellules non lymphomateuses faisant partie du « stroma », dans le pronostic des LF. Ils se basent sur des études de profil d'expression génique ayant montré que des gènes connus pour avoir une importance pronostique dans les LF (gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la synthèse de l'ADN et le métabolisme) sont exprimés par les cellules du micro-environnement (Dave SS *et al*, 2004 ; Glas AM *et al*, 2005). Une étude a montré en particulier qu'un grand nombre de macrophages est associé à un pronostic plus péjoratif (Farinha P *et al*, 2005), d'autres équipes ne confirmant pas ces résultats (Alvaro T *et al*, 2006 ; Glas AM *et al*, 200 ; Klapper W *et al*, 2007). Certains auteurs ont étudié le rôle des lymphocytes T du stroma et ont montré que, plus que leur nombre, leur sous-type semble influencer le pronostic. Ainsi, un nombre important de lymphocytes T régulateurs FOXP-3 a-t-il été associé à une meilleure survie globale (Carreras J *et al*, 2006), de même qu'un taux important de lymphocytes T CD8+ (Wahlin BE *et al*, 2007) ou CD4+ (Lee AM *et al*, 2006). Une autre étude a montré que, plus que la quantité de lymphocytes T CD4+, c'est leur distribution topographique qui semble jouer un rôle dans la vitesse de transformation en LBDGC. Cette dernière serait d'autant plus rapide que les LT CD4+ sont prédominants au sein des follicules néoplasiques (Glas AM *et al*, 2007). De même, la qualité de réponse au rituximab semble être liée à la qualité du micro-environnement (Bohen SP *et al*, 2003).

5.7- index pronostiques :

Des équipes ont tenté de définir des index pronostiques en combinant certains de ces facteurs pronostiques (Leonard RCF *et al*, 1991; Romaguera JE *et al*, 1991 ; Decaudin D *et al*, 1999; Federico M *et al*, 2000). Le Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires a par exemple défini un schéma selon lequel les patients possédant une des caractéristiques suivantes sont considérés comme ayant un forte masse tumorale : des symptômes systémiques, un taux de LDH sérique élevé, une lésion tumorale de plus de 7 cm, l'atteinte d'au moins 3 sites ganglionnaires selon la classification d'Ann Arbor, la présence de cellules lymphomateuses circulantes, une cytopénie, une splénomégalie (Brice P *et al*, 1997 ; Solal-Céligny P *et al*, 1998). L'IPI (International Prognostic Index), utilisé comme index pronostique des LBDGC ([2], 1993) a également été utilisé pour stratifier les patients atteints de FL en groupes pronostiques (Bastion Y *et al*, 1994 ; Lopez-Guillermo A *et al*, 1994) mais, classant la grande majorité de ces FL dans le groupe à bas risque, ce système est apparu peu applicable.

Devant le manque d'index pronostique spécifiquement dédié aux LF, deux scores pronostiques ont été développés à partir de larges séries de patients traités durant ces 15 dernières années (essentiellement avant l'ère rituximab) : l'Italian Lymphoma Intergroup Index (ILI) (Federico M *et al*, 2000) et plus récemment, le Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) (Solal-Céligny P *et al*, 2004). Six variables ont été utilisées pour construire l'ILI : l'âge, l'atteinte extra-ganglionnaire, le taux de LDH, la présence de symptômes B, le sexe et la vitesse de sédimentation érythrocytaire. Les patients sont classés dans des groupes à bas risque, risque intermédiaire et haut risque, chacun d'eux ayant une survie globale à 5 et 10 ans significativement différente : 90 et 65% pour les patients « à bas risque », 75 et 54 % pour ceux « à risque intermédiaire » et 38 et 11% pour ceux « à risque élevé ». En ce qui concerne le FLIPI, cinq critères sont pris en compte : l'âge (moins de 60 ans versus 60 ans ou plus), le stade de Ann Arbor (stades I-II versus III-IV), le taux d'hémoglobine (120 g/dl ou plus versus moins de 120 g/dl), le nombre de sites ganglionnaires atteints (4 ou moins versus plus de 4) et le taux de LDH sérique (normal ou inférieur à la normale versus supérieur à la normale). Zéro ou 1 point est attribué par item pour réaliser un score entre 0 et 5, les scores de 0 et 1 correspondant au « groupe de faible risque », le score 3 au « groupe à risque intermédiaire » et les scores 4 et 5 au « groupe à risque élevé ». Les taux de survie globale à 5 et 10 ans sont là aussi significativement différents selon les groupes : 90,6 et 70,7% pour le groupe de faible risque, 77,6 et 50,9% pour celui de risque

intermédiaire et 52,2 et 35,5% pour celui de risque élevé. Plusieurs études ont montré que l'IPI, l'ILI et le FLIPI permettaient une bonne stratification des patients atteints de LF (Perea G *et al*, 2005 ; Radojkovic M *et al*, 2006) et il est recommandé d'utiliser l'un de ces scores spécifiques pour classer les LF.

6- Anatomie pathologique :

6.1- Morphologie

Un ganglion lymphatique siège d'un lymphome folliculaire présente une destruction de son parenchyme par une prolifération lymphomateuse d'architecture nodulaire. Les nodules sont répartis le plus souvent sur toute la surface ganglionnaire, dans les zones corticale et médullaire. La taille des nodules est variable, souvent petite, relativement constante d'un nodule à l'autre. Une étude française rapporte une taille significativement supérieure des follicules lymphoïdes dans un groupe de 15 LF sans translocation t(14 ;18) et avec réarrangement *bcl6* (1 mm de diamètre en moyenne) par rapport à un groupe de 165 LF avec translocation t(14 ;18) et sans réarrangement *bcl6* (0,66 mm de diamètre en moyenne) (Jardin F *et al*, 2002 (a)). Ces nodules sont le plus souvent ronds, plus rarement de forme irrégulière ou peuvent présenter une folliculolyse. Ils sont adossés les uns aux autres, mal limités du fait d'une zone du manteau mal visible voire absente car détruite. On peut observer une coalescence de nodules. Les zones inter-nodulaires sont comprimées et l'architecture folliculaire est soulignée par l'accentuation du réseau de réticuline en périphérie des nodules (coloration de Gordon Sweet) et parfois, notamment dans les localisations rétro-péritonéales, par une fibrose inter-folliculaire. L'envahissement de la capsule ganglionnaire voire le dépassement de cette capsule avec présence de nodules lymphomateux dans la graisse péri-ganglionnaire ne sont pas rares.

Les nodules lymphomateux sont constitués par un mélange en proportions variables de deux populations cellulaires : les petites cellules clivées ou « centrocytes » et les grandes cellules, non clivées ou « centroblastes » (noms attribués par la classification de Kiel). Les centrocytes mesurent 6 à 12 µm de diamètre, possèdent un noyau allongé, à contours

irréguliers, clivé, encoché ou indenté. Sa chromatine est dense, le plus souvent sans nucléole visible. Le cytoplasme est peu abondant (Lennert K *et al*, 1978). Certains centrocytes sont de plus grande taille (les « grands centrocytes » de la classification de Kiel). Ils ont un noyau irrégulier, indenté ou clivé à chromatine fine sans nucléole. Il s'agit habituellement d'un contingent minoritaire. Les centroblastes mesurent plus de 20 μm de diamètre et possèdent un noyau non clivé, ovoïde, le plus souvent régulier à membrane fine. La chromatine est dispersée avec 2 ou 3 nucléoles de petite taille souvent appendus à la membrane nucléaire. Le cytoplasme est modérément abondant, basophile. Certains centroblastes sont multilobés.

Les différents sous-types de LF sont définis par la proportion de chacune de ces populations cellulaires selon le grading de Mann et Berard (Mann RB, Berard CW, 1983). Ce grading est basé sur le nombre moyen de centroblastes sur 10 champs représentatifs non sélectionnés pour leur richesse en grandes cellules. Ce compte est réalisé au microscope optique à un objectif à fort grossissement ayant une surface de 0,159 mm^2 , ce qui correspond à un oculaire de 18 mm^2 à grossissement x 400 (des facteurs de correction appropriés doivent être appliqués si des oculaires différents sont utilisés). Les LF ayant 0 à 5 centroblastes par champ à fort grossissement sont classés en grade 1 ; ceux ayant 6 à 15 centroblastes par champ à fort grossissement sont classés en grade 2 et ceux ayant plus de 15 centroblastes par champ à fort grossissement sont classés en grade 3. Depuis 2001, la classification OMS recommande de subdiviser les LF de grade 3 en 3a si des centrocytes persistent au sein des follicules néoplasiques et en 3b si les cellules lymphomateuses ne sont représentées que par des centroblastes (Jaffe Es *et al*, 2001). La classification REAL relaye toutefois le manque de reproductibilité du grading des LF tel qu'il est proposé par Mann et Berard (Metter GE *et al*, 1985). Mais, si ce grading fait en effet appel à une part de subjectivité (difficulté parfois de différencier centrocytes et centroblastes), il est le premier à être basé sur un compte et non plus sur une estimation de la population cellulaire prédominante comme dans les classifications de Rappaport, Kiel, Lukes-Collins ou de la Working Formulation. Plusieurs études ont d'ailleurs comparé ces différentes méthodes de subdiviser les LF en fonction de leur valeur prédictive sur la survie. Celle de Mann et Berard paraît être la plus appropriée pour réaliser le grading des LF (Nathwani BN *et al*, 1986 ; Martin AR *et al*, 1995).

Au sein des follicules lymphomateux, on peut également observer un nombre variable de lymphocytes T réactionnels, parfois activés. Leur noyau est rond ou très légèrement irrégulier. Des cellules folliculaires dendritiques peuvent également être présentes au sein de

ces nodules. Mieux mises en évidence par les techniques d'immunohistochimie, elles peuvent toutefois être reconnues en histologie par leur noyau rond ou ovale, clair, centré par un petit nucléole. Leurs limites cytoplasmiques sont indistinctes. Ces cellules sont parfois binucléées. Les nodules lymphomateux contiennent rarement des plasmocytes. L'absence de macrophages à corps tingibles des nodules est un autre argument diagnostique en faveur d'un LF. Ces macrophages peuvent cependant se rencontrer dans des LF à prédominance de grandes cellules dans lesquels le taux de prolifération et d'apoptose est plus important. La présence, au sein des follicules néoplasiques, d'histiocytes épithélioïdes a également été décrite (Kim H *et al*, 1974).

Des cellules lymphomateuses sont le plus souvent également observées entre les follicules. Lorsque ces cellules sont regroupées sous forme de larges plages compactes, on parle de l'existence de « plages diffuses ». Lorsque ces plages diffuses sont constituées de plus de 15 centroblastes par champ à fort grossissement, on parle d'une composante de LBDGC (Jaffe ES *et al*, 2001). Dans les cas où l'architecture est purement diffuse, l'OMS (Jaffe ES *et al*, 2001) reconnaît une variante appelée « lymphome centro-folliculaire diffus », composée d'une majorité de centrocytes et de plus rares centroblastes mais ne formant pas de nodule et ne pouvant donc être appelée « lymphome folliculaire ».

De nombreuses variantes morphologiques des LF ont été décrites, caractérisées par :

- une sclérose, avec de larges trousseaux de collagène subdivisant le ganglion lymphomateux en nodules irréguliers ou «entrappant» les cellules lymphomateuses (Bennett MH *et al*, 1969). Cette fibrose est principalement observée dans les ganglions de localisation retro-péritonéale (Waldron JA Jr *et al*, 1983).
- des dépôts de matériel extra cellulaire amorphe PAS+ : il s'agit d'un précipité «protéïnacé» éosinophile retrouvé plus ou moins abondamment au sein de ganglions sièges d'un LF (Rosas-Uribe A *et al*, 1973). Ce matériel est constitué essentiellement de structures membranaires et son incidence sur le pronostic est difficile à évaluer du fait de sa rareté (Chittal SM *et al*, 1987).
- une réaction épithélioïde et gigantocellulaire comparable à celle observée dans la maladie d'Hodgkin, au sein de ganglions sièges d'un LF (Kojima M *et al*, 1996). Cette variante de LF survient le plus souvent chez des patients âgés, à un stade de transformation en lymphome B diffus à grandes cellules (Kojima M *et al*, 2002).
- un infarcissement total du ganglion : le LF fait partie des lymphomes pouvant engendrer un infarcissement ganglionnaire (Mauer R *et al*, 1986).

- des cellules en « bague à chaton » : ces cellules correspondent à des centrocytes présentant une vacuole intracytoplasmique qui comprime leur noyau, le refoulant à un pôle de la cellule (Kim H *et al*, 1978). Cette vacuole peut apparaître claire, correspondant alors à une accumulation d'IgG, ou éosinophile (de type « corps de Russell »), correspondant alors à une accumulation d'IgM (van den Tweel JG *et al*, 1978).
- des cellules au noyau multilobé, principalement dans les LF riches en grandes cellules. Ces lymphocytes correspondraient à une forme intermédiaire entre centrocyte et centroblaste dont le noyau serait exagérément lobulé (Chan JK *et al*, 1986).
- des lymphocytes néoplasiques au noyau cérébriforme, morphologiquement semblable au noyau des lymphocytes dans le mycosis fongoïde (Nathwani BN *et al*, 1985).
- une différenciation plasmocytaire : des plasmocytes, parfois nombreux, peuvent être observés, principalement dans les zones inter-folliculaires. Ces plasmocytes sont parfois monotypiques et peuvent alors être interprétés comme une composante différenciée du LF. (Schmid U *et al*, 1985, Keith TA *et al*, 1985). Deux études allemandes menées par Ott et Katzenberger retrouvent une différenciation plasmocytoïde significativement plus fréquente dans les LF3b par rapport aux LF de grade respectivement 1 + 2 + 3a ou 3a seul (Ott G *et al*, 2002 ; Katzenberger T *et al*, 2004).
- des « rosettes » : des lymphocytes néoplasiques peuvent s'agencer en rosettes ressemblant aux formations observées dans les neuroblastomes. Le centre de ces rosettes est occupé par un dépôt fibrillaire éosinophile correspondant, à l'échelle ultra structurale, à un matériel cytoplasmique issu des lymphocytes tumoraux (Frizzera G *et al*, 1985).
- une architecture « florale » : les follicules néoplasiques sont entièrement entourés par la zone du manteau qui les pénètre et les disloque, leur donnant un aspect irrégulier, « floral » (Goates JJ *et al*, 1994). Le risque est de confondre cette variante de LF avec un « ganglion en transformation progressive » au sein duquel on observe classiquement ces mêmes lésions.
- des follicules « hyalins-vasculaires » : certains follicules néoplasiques peuvent être constitués de lymphocytes arrangés de façon concentrique et pénétrés par des veinules à paroi hyalinisée, mimant une maladie de Castelman de type hyaline vasculaire (Warnke RA *et al*, 1994).
- des follicules néoplasiques « inversés » : contrairement aux follicules habituels, relativement pâles, entourés d'une bordure plus sombre correspondant à la zone du manteau, ces follicules ont un centre foncé dû à la grande quantité de centrocytes et une périphérie plus claire, due à la présence de nombreux centroblastes (Chan JK *et al*, 1986). Un diagnostic différentiel peut alors

se poser avec un lymphome du manteau, un lymphome de la zone marginale ou une maladie de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire.

- une différenciation B-monocytoïde : des cellules B-monocytoïdes, au noyau de taille moyenne entouré d'un cytoplasme pâle modérément abondant, peuvent être observées autour des follicules néoplasiques dans 10% des cas. Ces cellules, dont la morphologie rappelle celle des lymphocytes de la zone marginale, dérivent du même clone que les lymphocytes tumoraux folliculaires (Mollejo M *et al*, 1994). L'aspect morphologique peut alors mimer celui des follicules « inversés ».

- une forme rare de LF est le LF « in situ ». Quelques follicules néoplasiques sont alors identifiés au sein d'un ganglion par ailleurs normal, par leur caractère plus monomorphe mais surtout par leur positivité avec le bcl2 en immunohistochimie. Des études suggèrent que ces cas correspondent à des LF débutants (Cong P *et al*, 2002).

- certains auteurs ont également décrit des variantes de LF dont les follicules sont constitués par de grandes cellules immunoblastiques ou plasmablastiques (Chan JK *et al*, 1990) ou par de petits lymphocytes d'aspects identiques à ceux des lymphomes lymphocytiques (« follicular small lymphocytic lymphoma ») (Chang KL *et al*, 1994). Ces cas sont cependant trop rares pour que des conclusions soient tirées sur le comportement de ces LF particuliers.

- enfin, des lymphomes « composites », correspondant à la présence de 2 types de lymphome différents au niveau d'un même site ganglionnaire, peuvent associer un LF et un autre lymphome, Hodgkinien ou non (Kim H *et al*, 1977; Thirumala S *et al*, 2000).

6.2- Immunohistochimie

Les lymphocytes néoplasiques des LF ont un phénotype en général uniforme, très proche de celui des lymphocytes B des centres germinatifs normaux :

6.2.1- marqueurs des cellules B :

Ces lymphocytes tumoraux expriment des antigènes de surface associés aux cellules B (Jaffe ES *et al*, 1974 ; Levy R *et al*, 1977) : CD19, CD20 (L26), CD22, CD24, CD79a, ainsi que HLA-DR, CDw75(LN1), CD74(LN2), CD35 (C3b). Ces lymphocytes expriment également des immunoglobulines de surface ou cytoplasmiques avec restriction de la chaîne légère et dont la chaîne lourde est le plus souvent de type IgM. On peut parfois observer un second isotype, IgD, IgG ou plus rarement IgA (Warnke R *et al*, 1978). Dans 10% des cas (principalement dans les formes riches en grandes cellules), aucune expression d'immunoglobuline n'est détectable (Ngan B *et al*, 1989).

6.2.2- marqueurs des centres germinatifs :

Les lymphocytes néoplasiques expriment également des marqueurs des centres germinatifs :

-**CD10** (CALLA) dans 29 à 100% des cas (Arber DA *et al*, 1997; Almasri NM *et al*, 1998; Dogan A *et al*, 2000 ; Chang CC *et al*, 2002). Le CD10 est une glycoprotéine membranaire monomérique de 90 à 110 kd qui apparaît au cours de la différenciation lymphocytaire sur les cellules pro-B puis est perdue durant la maturation vers le lymphocyte B naïf (LeBien TW *et al*, 1989). Il réapparaît à la surface lymphocytaire au cours de la maturation antigène-dépendante des centres germinatifs. L'expression du CD10 peut être détectée dans des centres germinatifs réactionnels, dans des LF, mais aussi dans des leucémies aiguës lymphoblastiques, des lymphomes de Burkitt et une certaine proportion de LBDGC (Arber DA *et al*, 1997; Uherova P *et al*, 2001, Eshoa C *et al*, 2001).

Plusieurs études montrent une expression de CD10 d'autant moins fréquente que le grade histologique des LF est haut. Cette différence est constatée en cytométrie en flux dans une étude de 90 LF montrant un marquage significativement moins fréquent des LF de grade 3 par rapport aux LF de grades 1 + 2 (Ray S *et al*, 2005). Elle est également observée en immunohistochimie dans plusieurs études : une étude américaine menée par Eshoa sur 26 LF de grades 1 à 3 rapporte une fréquence et une intensité de marquage CD10 significativement plus importante dans les LF de grade 1 (20% de cas négatifs ou faiblement positifs) par rapport aux LF de grade 3 (83% de cas négatifs ou faiblement positifs) (Eshoa C *et al*, 2001). Deux études asiatiques, l'une coréenne menée par Lee sur 61 LF (Lee D *et al*, 2008) et l'autre japonaise menée par Guo sur 147 LF (Guo Y *et al*, 2005) rapportent des résultats comparables avec des LF de grade 3 (3a + 3b) CD10+ dans respectivement 34% et 51% des cas contre respectivement 86% et 90,7% des LF de grades 1 + 2 ($p < 0,001$ dans les 2 études). Il n'est par contre pas observé de différence significative entre les grades 3a et 3b dans l'étude de Guo *et al* (comparaison non faite dans l'étude de Lee). Deux études européennes, l'une menée par Ott sur 89 LF de grades 1 à 3b (Ott G *et al*, 2002) et l'autre menée par Katzenberger sur 188 LF également de tous grades (Katzenberger T *et al*, 2004) rapportent un marquage CD10+ significativement moins fréquent dans des LF3b (respectivement 50% et 34%) par rapport à un groupe de LF de grades 1 + 2 + 3a (respectivement 98,6% et 97,8%). Dans ces 2 études, cette différence reste significative lorsque les LF3a et les LF3b sont comparés (respectivement 100% vs 50% et 96% vs 37%).

En plus de cette association entre une moindre expression de CD10 et un grade histologique élevé, certaines études rapportent une corrélation positive entre l'absence de ce marqueur et l'absence de translocation t(14;18) (Jardin F *et al*, 2002 (a) ; Guo Y *et al*, 2005). Une étude française rapporte une fréquence moindre du marquage CD10 dans 15 LF sans translocation t(14 ;18) et avec réarrangement *bcl6* par rapport à un groupe de 165 LF avec translocation t(14 ;18) et sans réarrangement *bcl6* (Jardin F *et al*, 2002 (a)).

-bcl-6 dans 94 à 100% des cas (Onizuka T *et al*, 1995). Le gène *bcl6* code pour une phosphoprotéine nucléaire de 95 kD présentant un domaine C-terminal POZ/ZINC en doigt de zinc qui agit comme facteur de répression transcriptionnelle (Kerckaert JP *et al*, 1993; Ye BH *et al*, 1993 ; Seyfert VL *et al* 1996; Chang CC *et al*, 1996). La protéine *bcl6* est impliquée dans le contrôle de la formation des centres germinatifs en réponse à la stimulation antigénique, la maturation lymphocytaire B et T, l'apoptose et le contrôle du cycle et de la sénescence

cellulaire. Dans les tissus lymphoïdes, cette protéine est exprimée dans les cellules B des centres germinatifs des follicules lymphoïdes secondaires, tant au niveau de la « zone sombre », riche en centrocytes, que de la « zone claire », riche en centroblastes mais pas dans les cellules B immatures ou post-folliculaires (Cattoretti G *et al*, 1995; Flenghi L *et al*, 1995; Flenghi L *et al*, 1996; Ye BH *et al*, 1997). Une forte expression de *bcl6* est le plus souvent observée dans les LF (Flenghi L *et al*, 1995; Onizuka T *et al*, 1995 ; Kupperts R *et al*, 1999). *Bcl6* est également détectable dans quelques cellules T CD4+ au sein du centre germinatif, du manteau et dans les zones paracorticales, ainsi que dans de rares cellules IgD+ dans le manteau et la zone marginale. On peut également trouver cette protéine dans des grandes cellules périfolliculaires CD30+ (Cattoretti G *et al*, 1995). Dans les LF, son expression est indépendante d'un éventuel réarrangement du gène *bcl6* (Jardin F *et al*, 2002 (a) ; Jardin F *et al*, 2002 (b) ; Guo Y *et al*, 2005 ; Ruminy P *et al*, 2006). Une expression de *bcl6* peut également être retrouvée dans les LBDGC et les lymphomes de Burkitt avec la même absence de corrélation entre le réarrangement du gène et l'expression de sa protéine (Bastard C *et al*, 1994; Offit K *et al*, 1994; Offit K *et al*, 1995; Flenghi L *et al*, 1995 ; Flenghi L *et al*, 1996).

Dans les LF, des études montrent une diminution d'expression de *bcl6* avec l'augmentation du grade histologique. Katzenberger *et al* rapportent : grades 1 + 2 : 100% de marquage, grade 3a : 86% de marquage et grade 3b : 44,5% de marquage avec une différence significative entre LF de grades 1 + 2 + 3a versus 3b et des LF de grade 3a versus 3b (Katzenberger T *et al*, 2004). De même, une étude de Lee *et al* rapporte une positivité de ce marqueur dans : grade 1 : 72,2%, grade 2 : 62,5%, grade 3a : 62,5% et grade 3b : 18,2% avec une différence significative entre les LF de grades 3a et 3b (Lee D *et al*, 2008). Au contraire, une étude japonaise de Guo *et al* ne met pas en évidence de marquage significativement différent entre les grades histologiques de 147 LF (Guo Y *et al*, 2005).

6.2.3- *bcl2*

La plupart des LF présentent également une expression de *bcl-2* (« B-Cell Leukemia/sLymphoma 2 »), une protéine de 239 acides aminés et 24 kD localisée au niveau de la membrane mitochondriale interne et possédant une action anti-apoptotique (Chen-Levy Z *et al*, 1989; Hockenbery D *et al*, 1990). Dans un centre germinatif normal, cette protéine n'est pas surexprimée et les cellules ne sont pas marquées par *bcl2*. Au contraire, 85% des LF en moyenne expriment *bcl2*, répartis, dans une étude de Gaulard *et al*, en 100% dans les LF

uniquement à petites cellules, 86% dans les LF à petites et grandes cellules et 76% dans les LF à grandes cellules (Gaulard P *et al*, 1992).

Cette plus rare expression de *bcl2* dans les LF de haut grade histologique est confirmée par d'autres auteurs (Gelb AB *et al*, 1994 ; Lai R *et al*, 1998) notamment dans un travail mené par Ott. Dans cette étude, le groupe des LF de grades 1 + 2 exprime significativement plus souvent *bcl2* que les LF de grade 3a (respectivement 100% et 73%, $p=0,0001$). De même, *bcl2* est significativement moins souvent exprimé dans les LF de grade 3b (69%) que dans le groupe rassemblant les LF de grades 1, 2 et 3a ($p<0,001$) (Ott G *et al*, 2002). Une étude de Katzenberger *et al* retrouve également une décroissance du nombre de LF *bcl2*+ avec l'augmentation du grade histologique, mais cette différence n'est pas significative (100% pour les grades 1 + 2 regroupés; 96% pour les grades 3a et 81.5% pour les grades 3b) (Katzenberger T *et al*, 2004). Une étude menée par Guo rapporte également une fréquence de marquage *bcl2* significativement supérieure dans les LF de grades 1 + 2 versus les LF de grade 3 (3a + 3b) (respectivement 96% et 77%, $p<0,001$). Ce travail ne retrouve par contre pas de différence significative entre les LF3a (80%) versus LF3b (71%) (Guo Y *et al*, 2005). Au contraire, aucune corrélation significative entre le marquage *bcl2* et le grade histologique n'est retrouvée par l'équipe de Lee (Lee D *et al*, 2008). Aucune de ces équipes ne retrouve par contre de différence d'expression significative de *bcl2* entre les LF3a et les LF3b.

Dans les LF possédant la translocation $t(14 ;18)$, l'immunomarquage *bcl2* est observé dans 89 à 99% des cas (Skinnider BF *et al*, 1999 ; Guo Y *et al*, 2005). Plusieurs études constatent une tendance à la perte d'expression de *bcl2* dans les LF ne présentant pas cette translocation (Sekiguchi N *et al*, 2005). C'est le cas notamment de Horsman *et al*, qui, dans une étude de 50 LF sans translocation $t(14 ;18)$, ne rapportent que 16 cas *bcl2*+ (Horsman DE *et al*, 2003). Une expression immunohistochimique de *bcl2* peut cependant être mise en évidence dans 25 à 60% des LF dépourvus de cette translocation, prouvant ainsi que cette protéine peut être surexprimée par d'autres mécanismes que la translocation $t(14 ;18)$ (Pezzella *et al*, 1990). Ces mécanismes sont connus depuis longtemps (Aster JC *et al*, 2002). La dérégulation de *bcl2* peut alors être secondaire à une $t(2 ;18)(p11 ;p21)$ ou une $t(18 ;22)(p21 ;p11)$ (Leroux D *et al*, 1990; Adachi M *et al*, 1989) ou encore à une duplication du chromosome 18 (Horsman DE *et al*, 2003). Des amplifications du gène *bcl2* consécutives à des infections virales, à l'effet de cytokines ou de régulateurs du cycle cellulaire ont également été décrites (Seite P *et al*, 1993 ; Skinnider BF *et al*, 1999 ; Papakonstantinou G *et al*, 2001; Aster JC *et al*, 2002 ; Horsman DE *et al*, 2003 ; Guo Y *et al*, 2005). L'observation de cellules B *bcl2*+ en immunohistochimie ne peut donc pas être considérée

comme un marqueur de la présence de la translocation t(14 ;18) dans ces cellules. De même, l'absence de détection immunohistochimique de bcl2 dans une prolifération lymphoïde d'architecture folliculaire ne peut garantir son absence de malignité.

Une étude de Jardin *et al* montre un marquage bcl2 significativement moins fréquent dans un groupe de 15 LF sans translocation t(14 ;18) et avec un réarrangement *bcl6* par rapport à un groupe de 165 LF avec translocation t(14 ;18) et sans réarrangement *bcl6* (Jardin F *et al*, 2002 (a)).

L'expression de bcl-2 en immunohistochimie est corrélée à une importante synthèse d'ARNm du gène *bcl-2*. Dans le tissu lymphoïde non lymphomateux, au contraire, a été décrite une dissociation entre la distribution de la protéine bcl-2 et de son ARNm. Cette discordance suggère l'existence de mécanismes de régulation post-transcriptionnels importants qui disparaissent dans les tissus lymphomateux (Chleq-Deschamps CM *et al*, 1993).

6.2.4- autres marqueurs

. Ki67 : Cet antigène est observé sur une protéine nucléaire présente dans les cellules prolifératives en phase G1, S, G2 et M. L'immunomarquage avec l'anticorps MiB1 dirigé contre l'antigène Ki67 évalue donc l'index de prolifération. Si l'utilisation de ce marqueur n'est pas une recommandation faite par l'OMS pour aider au grading des LF, de nombreuses équipes ont cependant montré un immunomarquage croissant avec le grade histologique des LF (Tominaga K *et al*, 1992 ; Swerdlow SH *et al*, 1993 ; Martin AR *et al*, 1995 ; Llanos M *et al*, 2001). Une étude de Wang *et al* rapporte par exemple un index de prolifération de 39% pour les LF de grade 3 contre 21% pour les LF de grade 2 ($p < 0,0001$) et 15% pour les LF de grade 1 ($p < 0,0001$) (Wang SA *et al*, 2005). Ces résultats sont corroborés par ceux d'une équipe milanaise rapportant un index de prolifération de, respectivement, 22%, 38% et 57% pour les LF de grades 1, 2 et 3 (Pruneri G *et al*, 2004). Ott *et al* rapportent également un index de prolifération de 20% dans les grades 1, 40% dans les grades 2, 70% dans les grades 3a et 80% dans les grades 3b. Les différences sont significatives entre les grades 1 + 2 et 3a et 1 + 2 + 3a ($p < 0,0001$) et 3b ($p < 0,0001$). La différence entre les grades 3a et 3b n'est pas significative (Ott G *et al*, 2002). Si index de prolifération et grade histologique semblent croître proportionnellement, l'équipe de Wang a cependant isolé un sous-groupe de LF de bas grade (1 et 2) ayant de manière discordante un index de prolifération élevé et un pronostic proche de celui des LF de grade 3 (Wang SA *et al*, 2005).

. MUM1 : Certains auteurs ont montré l'expression de l'antigène MUM1 dans des cas de LF. (Falini B *et al*, 2000, Natkunam Y *et al*, 2001). Cet antigène (Multiple Myeloma oncogen 1) est habituellement exprimé par les plasmocytes et un petit nombre de cellules des centres germinatifs. Dans une cellule B normale, les expressions de MUM1 et de bcl6 apparaissent mutuellement exclusives (Falini B *et al*, 2000). Des études récentes ont comparé des LF MUM1+ à des LF MUM1-, isolant ainsi des particularités clinico-biologiques concernant ce premier groupe. Les LF MUM1+ seraient plus fréquemment retrouvés chez des patients âgés et seraient histologiquement de grades élevés, le plus souvent 3 (surtout 3b), avec fréquemment un contingent diffus. Les auteurs retrouvent également dans ce groupe une fréquence moindre de la t(14;18) et des anomalies du gène *bcl6* (réarrangement ou amplification) plus nombreuses. Ces LF auraient une expression faible de bcl6 (Naresh KN, 2007 ; Karube K *et al*, 2007).

. p53 : Cette phosphoprotéine nucléaire est impliquée dans de nombreux processus comme l'apoptose, l'inhibition de la croissance cellulaire ou le maintien de la stabilité et de l'intégrité du génome (Levine AJ, 1997). Lorsqu'elle est mutée, elle bénéficie d'une demi-vie plus longue et s'accumule dans le noyau des cellules où elle est alors détectable en immunohistochimie. Deux anciennes études suggéraient que p53 n'était détectable que dans une petite proportion de LF et que sa présence était associée à leur transformation histologique (Lo coco F *et al*, 1993 ; Sander CA *et al*, 1993). Des travaux plus récents rapportent un immunomarquage avec la p53 plus ubiquitaire, observé au sein de LF non transformés, ce marquage étant d'autant plus fréquent que le grade histologique est élevé (Nguyen PL *et al*, 1996). Ces données sont corroborées par les résultats des études de Ott *et al* et Katzenberger *et al*, indiquant un marquage p53+ significativement plus fréquent dans les LF de grade 3b par rapport aux LF de grades 1 + 2 + 3a (Ott G *et al*, 2002 ; Katzenberger T *et al*, 2004).

La relation entre p53 et bcl2 a fait l'objet de nombreuses publications avec des résultats discordants. Certaines études ont montré que bcl2 était régulé par p53 (Miyashita T *et al*, 1994 ; Haldar S *et al*, 1994), d'autres suggèrent une relation inverse de ces deux protéines dans plusieurs cancers (Pezzella F *et al*, 1993 ; Joensuu H *et al*, 1994 ; Sinicrope FA *et al*, 1995) dont les LF (Nguyen PL *et al*, 1996). Une étude récente de Guo *et al* montre une expression forte de p53 présente uniquement dans un groupe de LF sans expression de bcl2 (n=14) et absente d'un groupe de LF exprimant bcl2 (n=14). Dans cette même étude, les auteurs observent une corrélation inverse significative entre les marquages p53 et bcl6 dans les LF sans expression de bcl2 (cette constatation est également faite dans les LF bcl2+, mais non significative) (Guo

Y *et al*, 2007). Ces résultats sont en accord avec des données récentes indiquant que *bcl6* réprimerait la transcription de TP53 (Phan RT *et al*, 2004).

. CD43 : Les cellules néoplasiques sont en règle CD43- malgré d'occasionnels cas de LF de grade 3 CD43+ (Lai R *et al*, 1999).

. CD23 : Les cellules lymphomateuses sont également le plus souvent CD23- (Lennert K *et al*, 1992).

. CD30 : En périphérie des nodules néoplasiques, des grandes cellules CD30+ et de phénotype B ont été décrites dans certains cas, sans que leur appartenance ou non au contingent malin ne puisse être précisée (Piris M *et al*, 1991).

. Mise en évidence du réseau de cellules folliculaires dendritiques : L'application des anticorps anti-CD21, CD23, CD35, KIM4 ou R/23 permet de mettre en évidence ce réseau qui persiste principalement au sein des nodules néoplasiques. Ce réseau diffère cependant de celui observé dans les nodules lymphoïdes non néoplasiques, il est plus lâche, souvent élargi et disloqué voire absent. Dans les zones diffuses, il manque parfois ou est peu présent (Zukerberg LR *et al*, 1993).

. Marquage des cellules T : Les cellules T réactionnelles, sont mises en évidence par leur phénotype CD3+ et CD5+. Elles sont observées principalement dans les territoires interfolliculaires avec une majorité de lymphocytes T CD4+ en périphérie des follicules, et en plus petit nombre à l'intérieur de ces follicules. Le CD5 met également en évidence la zone du manteau lorsqu'elle persiste. Les lymphocytes néoplasiques sont en règle générale CD5- même si quelques cas de LF CD5+ ont été décrits (Barry TS *et al*, 2002) notamment dans sa variante de type « floral » (Tiesinga JJ *et al*, 2002). Des cellules B non tumorales polyclonales, résiduelles ou réactionnelles peuvent également être observées : elles expriment les marqueurs B mais sont CD10-, *bcl6*- et *bcl2*-.

. En routine : la « batterie » d'anticorps utilisés est la suivante : CD20, CD5/CD3, CD10, *bcl2*, *bcl6*, CD21/CD23 auxquels est ajouté le Mib1 permettant une corrélation avec le grade histologique.

6.3- Diagnostics différentiels :

Les principaux diagnostics différentiels des LF sont l'hyperplasie lymphoïde folliculaire, le lymphome du manteau dans sa forme nodulaire et un lymphome de la zone marginale colonisant des centres germinatifs.

6.3.1- L'hyperplasie lymphoïde folliculaire

Elle peut être idiopathique ou associée à une pathologie infectieuse (virale, bactérienne, parasitaire), liée à une hypersensibilité ou dysimmunitaire (polyarthrite rhumatoïde, maladie de Castleman, maladie de Kimura,...). L'hyperplasie lymphoïde folliculaire présente, tout comme le LF, une architecture nettement nodulaire. Cependant, certains critères sont plus en faveur du diagnostic de LF (Nathwani BN *et al*, 1981) :

- . la disposition uniforme dos à dos des follicules sur toute la surface ganglionnaire,
- . la disparition de la zone du manteau,
- . au sein des nodules : la disparition des macrophages à corps tingibles, la monotonie cellulaire, l'absence de polarisation cellulaire, la présence de cellules atypiques (cellules en bague à chaton,...)
- . la présence de follicules dans le tissu péri-ganglionnaire.

L'étude immunohistochimique permet de résoudre la majorité des cas ambigus en mettant en évidence l'expression de la protéine bcl2 par les follicules lymphoïdes néoplasiques (Gaulard P *et al*, 1992) et la présence de cellules CD10+ dans les zones inter-folliculaires.

6.3.2- Le lymphome du manteau dans sa forme nodulaire

Ce lymphome peut également simuler un LF (Rodriguez J *et al*, 1996). Les lymphocytes néoplasiques se disposent alors sous forme d'un épais manteau autour de centres germinatifs

non tumoraux qui peuvent être hypotrophiques, hypertrophiques ou absents. La mise en évidence de ce centre germinatif est d'ailleurs un bon critère diagnostique contre le LF. Les nodules ainsi formés sont le plus souvent plus volumineux que ceux des LF. Les cellules tumorales sont également différentes, de taille moyenne à noyaux irréguliers (Solal-Céligny P *et al*, 1997), sans centroblaste. Elles expriment le CD5 et le CD43 contrairement (en général) aux cellules des LF. Elles sont également bcl6-, bcl1+ et bcl2+, les centres germinatifs résiduels n'étant pas marqués par ce dernier anticorps ce qui constitue une autre différence avec le LF (Banks PM *et al*, 1992).

6.3.3- Le lymphome de la zone marginale colonisant des centres germinatifs

Ce lymphome peut être un véritable piège diagnostique. La morphologie peut alors être parfois prise à défaut et une étude immunohistochimique sera nécessaire. Celle-ci montrera des nodules lymphomateux CD10- avec persistance de cellules centro-folliculaires CD10+ non tumorales. Le CD21/CD23 mettra en évidence une destruction du réseau de cellules folliculaires dendritiques (Isaacson PG *et al*, 1991 ; Kojima M *et al*, 2005).

6.3.4- Autres diagnostics différentiels

Des diagnostics différentiels plus rares des LF sont des lymphomes lymphocytiques comportant des pseudo-follicules proéminents correspondant à des centres prolifératifs (Ben-Ezra J *et al*, 1989) et des lymphomes lymphoblastiques ayant une architecture lobulée (Ioachim HL *et al*, 1980). Dans tous ces cas, les clés du diagnostic sont morphologiques et immunohistochimiques.

7- Cytogénétique

La majorité des LF présente des anomalies cytogénétiques.

7.1- Translocation t(14 ;18) :

La translocation t(14;18) est une des caractéristiques du LF. En 1977, une aberration chromosomique spécifique des LF était décrite pour la première fois, il s'agissait du chromosome 14q+ (Catovsky D *et al*, 1977). Peu de temps après, en 1978, la translocation t(14 ;18) a été pour la première fois décrite par Fukuhara *et al* et Rowley *et al* (Fukuhara S *et al*, 1978) puis précisée par Yunis et collaborateurs qui ont montré la localisation des points de cassure (Yunis JJ *et al*, 1982). D'un point de vue moléculaire, elle juxtapose le gène *bcl2* situé sur le bras long du chromosome 18 (en 18q21) et des séquences régulatrices du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) situé sur le bras long du chromosome 14 (en 14q32). Il existe ainsi une surexpression de l'ARNm du gène *bcl2* de l'allèle transloqué sous l'action du promoteur E(μ) d'IgH. Le gène *bcl2* de l'allèle non transloqué est silencieux (Cleary ML *et al*, 1986 (b) ; Graninger WB *et al*, 1987). Ceci a pour conséquence la surexpression permanente du produit du gène antiapoptotique *bcl2*, conduisant à l'accumulation de cellules devenues résistantes à l'apoptose. Ce mécanisme oncogénétique caractérisé par la perte de la mort cellulaire et non la promotion de la prolifération cellulaire explique le caractère indolent des LF. Dans un centre germinatif non lymphomateux, la synthèse de la protéine *bcl2* est éteinte, permettant le « turn over » cellulaire. Des cas avérés de LF présentant une surexpression de *bcl2* sans translocation t(14 ;18) ont été décrits (cf chapitre « Morphologie », p. 27).

Dans la translocation t(14;18), le point de cassure sur le chromosome 14 se situe le plus souvent au sein des segments J ou D du gène IgH (Stamatopoulos K *et al*, 1997 ; Vaandrager JW *et al*, 2000 (b)) et plus rarement au niveau des séquences S (switch) de ce gène. Récemment, des preuves de l'implication directe de la machinerie de la recombinaison V(D)J dans la translocation t(14 ;18) ont été apportées par l'équipe de Raghavan qui a montré que le complexe enzymatique RAG (qui permet normalement le clivage de l'ADN au niveau des segments V, D et J) pouvait cliver le gène *bcl2* au niveau de son principal point de cassure (MBR) (Raghavan SC *et al*, 2004). Sur le chromosome 18, les points de cassure sont de localisation plus variable, situés principalement au niveau de 2 régions : (Tsujiimoto Y *et al*, 1985; Cleary ML *et al*, 1986 (a) ; Ngan BY *et al*, 1989; Johnson PWM *et al*, 1994 ; Johnson PW *et al*, 1999; Lopez-Guillermo A *et al*, 1999) (figure 1) :

. MBR (Major Break point Region), une région non codante de 150 bp située à l'extrémité 3' de l'exon 3 du gène *bcl2*. C'est le cas de figure le plus fréquent, rencontré dans 40 à 70% des cas.

. mcr (minor cluster region), une région de 20 kb située également en aval de MBR, dans 10 à 15% des cas.

D'autres points de cassure ont été décrits ces dernières années et sont impliqués dans une moindre proportion de translocations (Willis TG *et al*, 1997 ; Akasaka T *et al*, 1998 ; Buchonnet G *et al*, 2002 ; Albinger-Hegyí A *et al*, 2002 ; Weinberg OK *et al*, 2007) :

. 3' *bcl2* (ou «3' MBR»), une région de 3,8 kb située 4,3 kb en aval de la région MBR.

. icr (intermediate cluster region), située plus en aval, à 14,6 kb de 3' *bcl2*.

. 5' mcr, une région de 10 kb située 1,4 kb en aval de la région mcr.

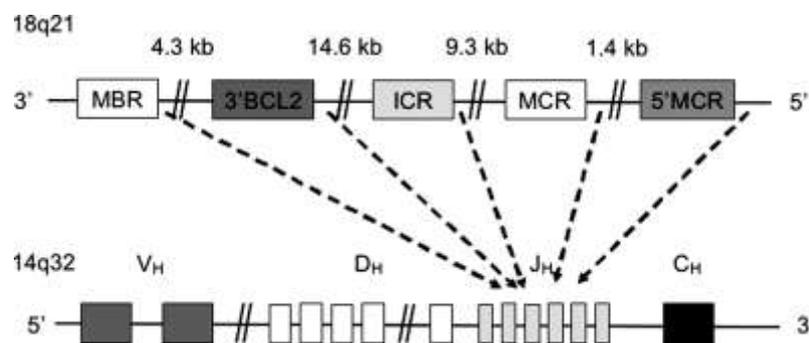


Figure 1 : Schéma des points de cassure en relation avec la t(14;18).

Deux études ont montré l'absence de corrélation entre la localisation du point de cassure sur le chromosome 18 et la survie globale (Buchonnet G *et al*, 2002 ; Weinberg OK *et al*, 2007).

Tous types histologiques de lymphomes confondus, la translocation t(14;18) est l'anomalie structurale la plus fréquemment rencontrée, étant observée dans 25% des cas. Elle

a été décrite dans tous les types de lymphomes, Hodgkiniens ou non et notamment dans 30% des LBDGC (Yunis JJ *et al*, 1982 ; Weiss LM *et al*, 1987 ; Offit K *et al*, 1989). D'importantes variations inter-études quant à la fréquence de la translocation t(14 ;18) dans les LF en Occident sont constatées, tous grades histologiques confondus, avec des résultats allant de 70 à 100% (Horsman DE *et al*, 1995 ; Roxley JD *et al*, 1988 ; Godon A *et al*, 2003). Pour certains auteurs, ces résultats traduisent sans doute plus des variations techniques dans la façon de détecter cette anomalie plutôt que de réelles variations géographiques (Aster JC *et al*, 2002). L'utilisation de techniques de détection plus sensibles (voir plus bas) ont notamment permis de gommer les différences d'incidence de cette translocation observées entre les Etats Unis et l'Europe (cette dernière ayant révélé longtemps des taux plus bas) (Albinger-Hegy A *et al*, 1982 ; Vaadranger JW *et al*, 2000 (a)). Cette translocation semble cependant moins souvent retrouvée dans les LF des pays asiatiques : dans environ 55% des cas en Chine (Chen PM *et al*, 1993 ; Loke SL *et al*, 1990), 30% à Taïwan (Chuang SS *et al*, 2006) et au Japon (Amakawa R *et al*, 1989 ; Mitani S *et al*, 1993). Cette fréquence moindre de la t(14 ;18) suggère une possible différence dans la pathogénie des LF en Asie (Biagi JJ, Seymour JF, Blood 2002).

De nombreuses équipes ont discuté de l'impact d'un réarrangement *bcl2* sur le pronostic des LF. Dans une étude sur 247 LF, Lopez-Guillermo *et al* observent que les LF sans translocation t(14 ;18) ont des particularités cliniques se traduisant par un comportement plus agressif (stade plus élevé, taux de β_2 microglobuline supérieur, taux de réponse au traitement plus faible et taux de survie sans évènement à 3 ans significativement inférieur) (Lopez-Guillermo A *et al*, 1999). Les résultats d'une étude de Horsman et collaborateurs vont dans ce sens puisqu'ils mettent en évidence une plus grande proportion de grades 3 histologiques dans un groupe de 50 LF sans translocation t(14 ;18) (18%) en comparaison avec un groupe de 165 LF avec cette translocation (3%) (Horsman DE *et al*, 2003). Ces résultats sont corroborés par ceux d'autres équipes, également à propos de LF Européens ou Nord américains (Gaulard P *et al*, 1992 ; Pezzella F *et al*, 1992 ; Nguyen PL *et al*, 1996) ou coréens (Lee D *et al*, 2008) associant une absence de réarrangement *bcl2* à un grade histologique plus élevé et notamment des grades 3b (Katzenberger T *et al*, 2004). Cependant, d'autres études ne montrent pas ces différences cliniques et pronostiques en fonction de la présence ou non du réarrangement *bcl2* (Tilly H *et al*, 1994 ; Biagi JJ *et al*, 2002; Matsumoto Y *et al*, 2004).

Il a été démontré que la seule présence de la translocation t(14 ;18) ne suffisait pas à rendre les lymphocytes B malins (Limpens J *et al*, 1995). Cette translocation est acquise dans la moelle à l'occasion d'une anomalie dans le réarrangement du gène des immunoglobulines. Ces cellules t(14 ;18)+ seraient présentes chez les sujets sains sans conséquence jusqu'à ce qu'elles acquièrent des anomalies génétiques secondaires lors de leur rencontre avec l'antigène dans le centre germinatif. Ces cellules auraient alors un avantage de survie sur les autres lymphocytes B et l'accumulation d'anomalies génétiques génèrerait finalement le LF (Bende RJ *et al*, 2007). Cette nuance a été démontrée dans des modèles de souris transgéniques (McDonnell TJ *et al*, 1991) dans lesquels des altérations génétiques additionnelles comme l'introduction d'un oncogène activé (c-MYC) semblaient être nécessaires au développement d'une néoplasie (Strasser A *et al*, 1990; Fanidi A *et al*, 1992). D'ailleurs, des cellules t(14 ;18)+ peuvent être observées dans des cellules B non transformées, chez des sujets sains (Liu Y *et al*, 1994 ; Dolken G *et al*, 1996 ; Janz S *et al*, 2003). Certains auteurs qualifient ces cas de «faux-positifs» du fait de techniques de détection de cette translocation trop sensibles, alors que d'autres considèrent ces cellules comme étant pré-lymphomateuses et n'ayant pas encore subi d'anomalies génétiques secondaires. Ce concept est évoqué par l'équipe de Roulland qui suggère que ces cellules seraient atypiques, issues de centres germinatifs ayant les caractères phénotypiques et génotypiques des LF et qui pourraient constituer une « niche » potentielle pour le développement d'un LF (Roulland S *et al*, 2006).

Plusieurs auteurs ont montré également que des hypermutations somatiques dans la région variable (VH) du gène des immunoglobulines pouvaient survenir dans les LF au même titre que dans les centres germinatifs « physiologiques », permettant d'observer au moins 2 clones différents dans un même LF (McCann K *et al*, 1985 ; Levy R *et al*, 1987 ; Ngan B *et al*, 1989).

7.2- Anomalies du gène *bcl6* :

Le proto-oncogène *bcl6* a été identifié du fait de son implication dans la translocation affectant la région 3q27 dans les LBDGC (Ye BH *et al*, 1993 ; Baron BW *et al*, 1993; Kerckaert J-P *et al*, Deweindt C *et al*, 1993). Dans les centres germinatifs réactionnels, la fonction de répresseur transcriptionnel de *bcl6* s'exerce via son interaction avec Blimp-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein 1), un répresseur transcriptionnel de c-MYC provoquant l'arrêt de la prolifération cellulaire et la différenciation plasmocytaire terminale ou l'apoptose (Shaffer AL *et al*, 2001 ; Shaffer AL *et al*, 2002). La répression de Blimp1 par dérégulation de *bcl6* joue donc un rôle important dans la lymphomagenèse, permettant la poursuite de la prolifération cellulaire. Dans les lymphomes en général et les LF en particulier, cette dérégulation est la conséquence soit d'une translocation soit d'une mutation du gène (Shen HM *et al*, 1998 ; Pasqualucci L *et al*, 1998 ; Peng HZ *et al*, 1999 ; Rosenwald A *et al*, 2002) :

- mutations somatiques de la région non codante 5' du gène (Migliazza A *et al*, 1995; Capello D *et al*, 2000). Ces mutations sont multiples dans une même tumeur, peuvent être bialléliques et surviennent au cours du transit des lymphocytes B à travers le centre germinatif, indépendamment d'une éventuelle translocation affectant la région 3q27. Elles prédominent donc dans les lymphomes impliquant les centres germinatifs ou les cellules post-centres germinatifs (Migliazza A *et al*, 1995; Pasqualucci L *et al*, 1998; Peng H-Z *et al*, 1999). Ces mutations somatiques sont notamment observées dans les LBDGC avec une fréquence de 48% et dans les LF avec une fréquence de 60% (Capello D *et al*, 2000).

- translocation affectant la région 3q27 (Ye BH *et al*, 1993; Baron BW *et al*, 1993; Kerckaert J-P 1993; Ye BH *et al*, 1995). Plus de 20 loci et 15 gènes partenaires ont été identifiés au cours de cette translocation (Akasaka H *et al*, 1995). Certaines études suggèrent que l'identité du partenaire influence le phénotype du lymphome (Akasaka T *et al*, 2000). Ce partenaire peut être le locus IgH en 14q32. La translocation t(3;14) (q27;q32) survient alors pendant le processus de switch isotypique dans le centre germinatif. Un réarrangement du gène *bcl6* peut être observé dans différents types de lymphomes : jusqu'à 48% dans des maladies de Hodgkin nodulaires à prédominance lymphocytaire (Wlodarska I *et al*, 2003; Wlodarska I *et al*, 2004), dans 20 à 30% des LBDGC (Jaffe ES *et al*, 2001), dans une petite proportion de lymphomes du MALT (Ye H *et al*, 2008), mais également dans 10 à 20% des LF (Lo Coco F *et al*, 1994 ; Otsuki T *et al*, 1995 ; Papakonstantinou G *et al*, 2001 ; Ott G *et al*, 2002 ; Jardin F *et al*, 2003 ; Bosga-Bouwer AG *et al*, 2003 ; Guo Y *et al*, 2005). La 1^{ère} description d'un réarrangement de *bcl6* dans les LF date de 1992 (Bastard C *et al*, 1992). Plusieurs études montrent que dans les LF, le réarrangement de *bcl6* est plus

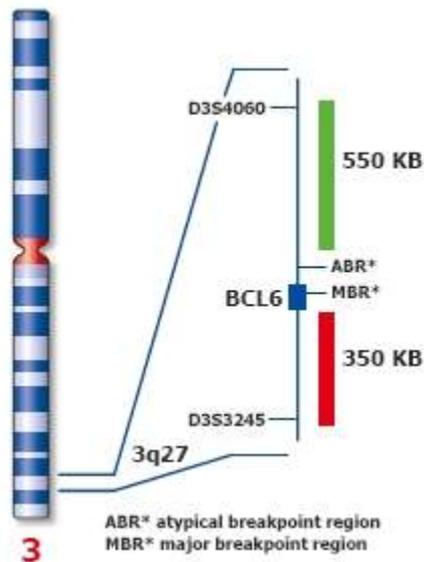
fréquent en l'absence de translocation t(14 ;18) (Jardin F *et al*, 2002 (a) ; Horsman DE *et al*, 2003 ; Guo Y *et al*, 2005 ; Lee D *et al*, 2008), cette association n'étant pas retrouvée dans une étude japonaise sur 47 LF (Sekiguchi N *et al*, 2005). Guo *et al* observent que ce réarrangement *bcl6* est plus fréquent dans un groupe de 14 LF n'exprimant pas la protéine bcl2 (mais la différence n'est pas significative) (Guo T *et al*, 2007).

Au cours de ce réarrangement, deux points de cassure sont connus au sein de *bcl6* (figure 2) :

-MBR (Major Break Region), une région non codante de 4 kb située en 5' de *bcl6* et incluant le promoteur et le 1^{er} intron de ce gène (Ye BH *et al*, 1993).

-ABR (Alternative Break point Region) située entre 245 et 285 kb en 5' de *bcl6* (Butler MP *et al*, 2002 ; Chen W *et al*, 1998).

Chacun de ces points de cassure met le gène *bcl6* sous le contrôle d'un promoteur différent. Cinquante à 60% des lymphomes présentant un réarrangement de ce gène (tous types histologiques confondus) ont un point de cassure au niveau de la région MBR (Bastard C *et al*, 1994 ; Chen W *et al*, 1998) et 10% au niveau de la région ABR, sans que la localisation de ce point de cassure n'implique forcément de partenaire différent (Butler MP *et al*, 2002 ; Bosga-Bouwer AG *et al*, 2005). Alors que les LBDGC présenteraient surtout des points de cassure au niveau de la région MBR, les points de cassure dans les LF seraient préférentiellement observés dans la région ABR (Butler MP *et al*, 2002).



Ces résultats sont confirmés par ceux de Bosga-Bouwer *et al*, dans une étude sur 10 LBDGC et 9 LF de grade 3b, qui retrouve une prépondérance de points de cassure dans la région ABR pour les LF3b et dans la région MBR pour les LBDGC (Bosga-Bouwer AG *et al*, 2005).

Dans une étude concernant 20 LBDGC et 14 LF présentant la translocation t(3;14), Ruminy et collaborateurs différencient également les LF et les LBDGC quant aux points de cassure. Les auteurs montrent que 2 sous-groupes peuvent être individualisés, différant par leur histologie et la localisation du point de cassure cette fois sur le locus IgH (Ruminy P *et al*, 2006) : d'un côté les LF de grades 2 et 3a (cette étude ne comportait pas de grade 1) dont le point de cassure était localisé préférentiellement au niveau de la région S γ et de l'autre les LF3b et les LBDGC avec un point de cassure essentiellement en S μ (p<0,001).

Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels des altérations génétiques de *bcl6* entraînent la lymphomagenèse restent mal connus (Dent AL *et al*, 2002). Certains auteurs suggèrent que le réarrangement de ce gène pourrait prolonger la durée d'exposition des cellules B des centres germinatifs à un environnement mutagène, permettant ainsi l'accumulation d'anomalies génétiques secondaires (Iida S *et al*, 1999). Un rôle lymphomagène a été attribué au réarrangement *bc6*/IgH dans un modèle murin (Cattoretti G *et al*, 2005) mais, tout comme le réarrangement *bcl2*, certains auteurs ont rapporté la présence d'un réarrangement

bcl6 dans le tissu lymphoïde normal humain, suggérant la nécessité d'évènements additionnels pour l'acquisition d'un phénotype néoplasique (Yang X *et al*, 2006).

La valeur pronostique du réarrangement *bcl6* dans les lymphomes reste également controversée. Dans les LBDGC, sa présence a été aussi bien associée à une évolution favorable (Offit K *et al*, 1994 ; Jerkeman M *et al*, 2002) qu'à un signe d'agressivité (Bastard C *et al*, 1994), d'autres études ne montrant pas de modification du pronostic selon la présence ou non d'un réarrangement *bcl6* (Kramer MH *et al*, 1998). Très peu d'éléments sur l'importance du réarrangement *bcl6* sur le pronostic des LF sont disponibles dans la littérature. Une étude de Gascoyne *et al* (Gascoyne RD *et al*, 1997) et des données préliminaires de l'équipe de Bosga-Bouwer *et al* (Bosga-Bouwer AG *et al*, 2003) semblent indiquer un meilleur pronostic des LF présentant cette anomalie, alors que dans une étude récente, aucune différence n'est observée dans l'évolution de 158 LF selon la présence ou non de ce réarrangement (Diaz-Alderete A *et al*, 2008).

7.3- Altérations génétiques additionnelles

Ces 10 dernières années, de larges séries d'analyses cytogénétiques de LF ont été publiées. Elles montrent qu'environ 90% des altérations sont des anomalies numériques, c'est-à-dire des gains ou des pertes de matériel génomique, le plus souvent associées à un grade histologique élevé et un pronostic péjoratif (Viardot A *et al*, 2003).

7.3.1- Gains chromosomiques les plus fréquents :

. gain en 1q, observé dans 5 à 15% des LF. Plusieurs gènes candidats sont localisés dans cette région tels que FCGR2 (Callanan MB *et al*, 2000; Chen W *et al*, 2001) IRTA1/IRTA2 (Hatzivassiliou G *et al*, 2001; Miller I *et al*, 2002) et *bcl9* (Willis TG *et al*, 1998). Une dérégulation de tous ces gènes a déjà été décrite dans des cellules B malignes. Un impact pronostique péjoratif des aberrations de la région 1q a été rapporté dans les LBDGC (Offit K *et al*, 1991; Schlegelberger B *et al*, 1999) mais pas dans les LF.

. gain en 2p, observé dans environ 10% des cas. Dans cette région se trouve le protooncogène REL (Goff LK *et al*, 2000; Viardot A *et al*, 2002). Ce gène fait partie de la voie de signalisation NF-kappa B qui est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'inflammation et l'apoptose. Dans les LBDGC, une association entre une amplification de REL et la localisation extra-ganglionnaire du lymphome a été établie (Houldsworth J *et al*, 1996).

. gain sur le chromosome 7, correspondant au gain chromosomique le plus fréquemment observé, détecté dans 20 à 30% des LF (Whang-Peng J *et al*, 1996; Viardot A *et al*, 2002). Dans certaines études, une association entre une trisomie 7 et des caractéristiques histologiques d'agressivité (Whang-Peng J *et al*, 1996; Bernell P *et al*, 1998) ou une transformation ont été décrits (Mohamed AN *et al*, 2001). Cependant, l'incidence de cette anomalie dans les cas de LF sans ces caractéristiques d'agressivité est également élevée (Johansson B *et al*, 1995). Du fait de la large taille du matériel génomique gagné dans la majorité des cas, aucun gène candidat n'a été identifié pour l'instant pour ce chromosome (Viardot A *et al*, 2003).

. gain en 8q, observé dans 5 à 10% des cas. Cette région contient l'oncogène c-MYC. (Werner CA *et al*, 1997 ; Viardot A *et al*, 2002). Dans des modèles de souris transgéniques, une coopération entre les gènes *bcl2* et c-MYC a été démontrée dans la pathogénie des LF (Strasser A *et al*, 1990; Fanidi A *et al*, 1992). D'autres études ont associé le gain en 8q et la présence de caractéristiques histologiques agressives (Mohamed AN *et al*, 2001; Yano T *et al*, Jaffe ES, 1992).

. gain en 12q, observé dans 12 à 19% des cas voire même dans 33% des LF dans une série utilisant la FISH pour détecter cette anomalie (Younes A *et al*, 1994 (a)). De nombreuses études associent ce gain chromosomique à des caractéristiques pronostiques péjoratives comme un grade histologique élevé (Yunis JJ *et al*, 1987 ; Mohamed AN *et al*, 2001), un risque accru de transformation (Younes A *et al*, 1994 (a) ; Whang-Peng J *et al*, 1996; Hough RE *et al*, 2001 ; Martinez-Climent JA *et al*, 2002) ou un caryotype complexe (Viardot A *et al*, 2002; Yunis JJ *et al*, 1987). Plusieurs gènes candidats sont localisés dans cette région comme MDM2, CDK4 et GLI. Des amplifications de ces 3 gènes ont déjà été décrites dans les lymphomes non Hodgkiniens (Werner CA *et al*, 1997; Rao PH *et al*, 1998).

. gain en 18q, observés dans 10 à 31% des cas (Younes A *et al*, 1994 (b) ; Johansson B *et al*, 1995; Viardot A *et al*, 2002). Contrairement aux LBDGC dans lesquels la t(14;18)(q32;q21) et

l'amplification de 18q sont des anomalies mutuellement exclusives conduisant à la surexpression de bcl2 (Monni O *et al*, 1997), le gain en 18q survient indépendamment de cette translocation dans les LF (Viardot A *et al*, 2002). Le gain en 18q survient préférentiellement chez les patients jeunes et chez les hommes (Viardot A *et al*, 2002). Les lymphomes présentant cette altération génétique sont également associés à des caractéristiques histologiques péjoratives (Yunis JJ *et al*, 1987 ; Johansson B *et al*, 1995 ; Whang-Peng J *et al*, 1996) et à un pronostic plus défavorable (Ott G *et al*, 2002).

. gain en X. Il s'agit le plus souvent d'un gain du chromosome complet. Malgré son incidence élevée dans les LMNH en général et les LF en particulier (Viardot A *et al*, 2003), le rôle de cette aberration reste mal connu, en particulier sur l'influence que cette anomalie génétique peut avoir sur le pronostic.

7.3.2- Pertes chromosomiques les plus fréquentes :

. perte en 1p, observée dans 5 à 10% des cas. La région perdue comporte plusieurs gènes candidats : CDC2L1 (Lahti JM *et al*, 1994), TNFR2 (White PS *et al*, 1993), ID3, (Ellmeier W *et al*, 1992), PAX7 (Shapiro DN *et al*, 1993), DAN (Enomoto H *et al*, 1994) et p73 (Kaghad M *et al*, 1997) qui ont été bien étudiés dans le neuroblastome. Cette perte chromosomique est également associée à un pronostic défavorable (Tilly H *et al*, 1994; Horsman DE *et al*, 2001).

. perte en 6q, qui est parmi les altérations génétiques les plus fréquentes dans les LF, de même que dans les autres LMNH, les leucémies et les tumeurs solides. Quatre principales régions peuvent être perdues : 6q21 (la plus fréquemment perdue), 6q13-q14, 6q23 et 6q25-q27 (Gaidano G *et al*, 1992; Offit K *et al*, 1993 ; Whang-Peng J *et al*, 1996; Callanan MB *et al*, 2000; Viardot A *et al*, 2002). Ces délétions ont été rattachées à un pronostic défavorable dans des études leur associant soit un grade histologique élevé (pour les régions 6q25-27 et 6q21) (Hauptschein RS *et al*, 1998), soit un caryotype complexe et une progression vers un lymphome de haut grade plus rapide (Viardot A *et al*, 2002). La présence en 6q25-26 d'un gène suppresseur de tumeur, p34 (Wang M *et al*, 2007), pourrait en partie expliquer cette association (Tilly H *et al*, 1994).

. perte en 10q, observée dans environ 10% des cas. La région touchée contient le gène suppresseur de tumeur PTEN (Siebert R *et al*, 1998; Sakai A *et al*, 1998). Une inactivation de l'allèle

PTEN restante a été démontrée dans des lignées cellulaires, suggérant un rôle pathogénique de ce gène dans les LF (Siebert R *et al*, 1998). Cette délétion est également associée à un pronostic péjoratif (Viardot A *et al*, 2002).

. perte en 13q, observée dans 5 à 10% des cas. Une étude rapporte son association à un grade histologique élevé (Mohamed AN *et al*, 2001).

. perte en 17p. Un pronostic défavorable est rattaché à cette altération génique, dans tous les lymphomes non Hodgkiniens dont le LF (Tilly H *et al*, 1994) avec notamment une association à un grade histologique élevé (Ott G *et al*, 2002). De plus, le gène suppresseur de tumeur *TP53* est situé dans la région délétée et son rôle dans la transformation des LF a été plusieurs fois établi (Lo Coco F *et al*, 1993; Sander CA *et al*, 1993).

On peut également observer des anomalies de nombre de chromosomes. Une hyperdiploïdie, avec un nombre de chromosomes habituellement entre 47 et 50, est relativement fréquente et les tétraploïdies ne sont pas rares (Bloomfield CD *et al*, 1983 ; Kristoffersson U *et al*, 1986 ; Scouten HC *et al*, 1990). Une hypodiploïdie est moins habituelle, retrouvée dans 5 à 10% des LF (Solal-CélignyP *et al*, 1997).

On peut également observer des anomalies chromosomiques structurales telles que des isochromosomes : iso(6p) et iso(17q) principalement (Kuntsen T, 1998).

Une translocation t(8;14) ou ses variantes (t(2;8) ou t(8;22)), intéressant le gène c-MYC, ont déjà été rapportées dans des LF avec ou sans translocation t(14 ;18) (Karsan A *et al*, 1993). Les LF possédant le double réarrangement *bcl2/c-MYC* semblent être particulièrement agressifs (Christie L *et al*, 2008). Dans la plupart des cas, le réarrangement de c-MYC est acquis au moment de la progression des LF vers des LBDGC (Yano T *et al*, 1992), ces lymphomes ayant également un pronostic particulièrement sombre (Macpherson N *et al*, 1999 ; Kanungo A *et al*, 2006 ; Le Gouill S *et al*, 2007) (cf « Discussion » page 85).

8- Détection de la translocation t(14 ;18) et du réarrangement *bcl6* :

La détection de ces 2 anomalies génétiques est possible par étude cytogénétique conventionnelle, ou classique (caryotype), Southern Blot, PCR (Polymerase Chain Reaction) (Horsman DE *et al*, 1995) ou FISH (Fluorescent In Situ Hybridization). Chaque technique possède ses avantages et ses limites.

8.1- La cytogénétique conventionnelle :

La cytogénétique conventionnelle est considérée comme la technique «gold standart» car elle est la seule à permettre une vue d'ensemble des anomalies chromosomiques. Elle permet d'objectiver la translocation t(14 ;18) dans environ 85% des LF (Macintyre E *et al*, 2000; Mitelman F *et al*, 2000). Cette technique est par contre moins sensible pour la détection d'un réarrangement *bcl6* du fait de la localisation de ce gène dans la partie toute terminale du bras long du chromosome 3 et de la variabilité des mécanismes de translocation l'impliquant. De plus, une translocation impliquant 3q27 peut ne pas concerner le gène *bcl6* (Sanchez-Izquierdo D *et al*, 2001). Par ailleurs, il s'agit d'une technique longue, nécessitant du tissu frais et parfois limitée par le faible nombre de métaphases. La cytogénétique classique n'est de ce fait pas toujours utilisée en routine (Cook JR *et al*, 2004 (b)).

8.2- Le Southern Blot :

La technique de Southern Blot a été la première technique de détection moléculaire de la translocation t(14 ;18). Elle utilise des sondes homologues aux séquences MBR et mcr (Beishuizen A *et al*, 1993; Aster JC *et al*, 2002). Une étude a montré une translocation t(14;18) dans 89% de LF de grades 1 à 3 avec cette technique (Cleary ML *et al*, 1986 (b)). Dans le cadre de la détection d'un réarrangement *bcl6*, la présence fréquente de délétions et mutations au sein de la région MBR de ce gène met en difficulté cette technique (Sanchez-Izquierdo D *et al*, 2001). Actuellement, la technique de Southern Blot est très peu utilisée en routine car laborieuse, chronophage, exigeant d'importantes quantités d'ADN de grande qualité (ne permettant pas

d'exploiter du tissu fixé en formol et inclus en paraffine) et nécessitant la manipulation de radioisotopes. Sa sensibilité est de plus limitée (van Dongen JJM *et al*, 1991).

8.3- La Polymerase Chain Reaction (PCR) :

La PCR a remplacé le Southern Blot car plus rapide, nécessitant de moins grandes quantités d'un ADN de moins grande qualité et possédant une meilleure sensibilité. Cette technique peut être réalisée sur des biopsies de petite taille, éventuellement fixées en formol et incluses en paraffine. Avec l'utilisation des primers MBR et mcr, cette technique détecte un réarrangement *bcl2* dans 50 à 70% des LF. Seuls les réarrangements impliquant des points de cassure survenant dans ces régions peuvent alors être mis en évidence (Horsman DE *et al*, 1995; Macintyre E *et al*, 2000). Initialement, l'absence de standardisation de cette technique entraînait une importante variabilité inter-laboratoires des résultats et c'est pour y pallier que le réseau Européen BIOMED-2 a établi un protocole standardisé de PCR multiplex utilisant un mix de primers pour MBR, 3'*bcl2*, mcr et 5'mcr. Dans 2 études évaluant ce protocole, le taux de détection de la translocation t(14 ;18) dans les LF a été de 88% (van Dongen JJ *et al*, 2003) et 60% (Evans PA *et al*, 2007).

Pour la détection d'un réarrangement *bcl6*, la PCR est également utilisable mais seul un set complexe de primers pour chacune des translocations possible impliquant ce gène peut permettre de détecter tous ses réarrangements (Akasaka H *et al*, 2000). Actuellement, la seule technique possible pour le screening de la plupart des réarrangements *bcl6* est la PCR inverse longue distance (Sanchez-Izquierdo D *et al*, 2001). Cependant, un des inconvénients de la PCR est lié à la qualité de l'ADN étudié, limitant son emploi dans les études rétrospectives qui nécessitent l'exploitation de tissus préalablement fixés et paraffinés. Dans ces conditions, la mauvaise qualité de l'ADN réduit le taux de détection de ces anomalies génétiques (Miettinen M *et al*, 1997).

8.4- L'hybridation in situ fluorescente (FISH) :

La technique d'hybridation in situ fluorescente ou FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) a été développée dans les années 80 (Bauman JG *et al*, 1980) et appliquée à la détection de translocations dans des hémopathies à partir des années 90 (Rowley JD *et al*, 1990 ;

Kearney L *et al*, 1991 ; Gao J *et al*, 1991; Kearney L *et al*, 1991 ; Lengauer C *et al*, 1992; Kearney L *et al*, 1992), notamment à la détection de la t(14;18) (Taniwaki M *et al*, 1994 ; Taniwaki M *et al*, 1995 ; Dirks W *et al*, 1996 ; Poetsch M *et al*, 1996). Cette technique est réalisable à partir de tissu frais ou congelé sur noyaux isolés interphasiques ou métaphasiques mais également à partir de coupes de tissu fixé et inclus en paraffine (Remstein ED *et al*, 2000) permettant ainsi son utilisation dans des études rétrospectives. Chaque technique possède ses avantages et ses inconvénients. L'étalement de noyaux observé dans la FISH sur noyaux isolés facilite la lecture en permettant de s'affranchir des superpositions nucléaires mais entraîne une perte d'information quant à la localisation topographique des cellules étudiées. Au contraire, la FISH sur coupe tissulaire entraîne des superpositions nucléaires pouvant gêner la lecture, tronque certains noyaux, mais conserve la topographie tissulaire, permettant une corrélation avec les données morphologiques. Dans le cadre de cette FISH sur coupe tissulaire, plusieurs publications, dans le passé, ont suggéré l'avantage de réaliser des coupes plus épaisses que celles faites en histologie pour minimiser le nombre de noyaux tronqués (Aubele M *et al*, 1997 ; D'Alessandro I *et al*, 1997 ; Taji S *et al*, 2005). Cependant, la majoration des superpositions nucléaires et la difficulté de lecture dans différents plans focaux sont alors des inconvénients majeurs. De ce fait, la coupe d'épaisseur standard (4 à 6 µm) est habituellement préférée par les auteurs, n'étant dommageable que lors de la recherche de délétions ou d'amplifications et non lors de la recherche de translocations (Ventura RA *et al*, 2006). Pour tenter de pallier à la difficulté de lecture due aux troncations et superpositions nucléaires, des équipes ont récemment développé des systèmes d'acquisition et de lecture automatisés de lames de FISH. Les premiers résultats indiquent une efficacité qu'il faudra cependant confirmer sur de plus larges séries (Reichard KK *et al*, 2006; Alpar D *et al*, 2008).

Dans le cas d'utilisation de tissu fixé, les paramètres de fixation influencent le résultat de la FISH. Le délai de fixation doit tout d'abord être le plus court possible pour éviter la dégradation trop importante des acides nucléiques et l'apoptose cellulaire (Srinivasan M *et al*, 2002). Le choix du type de fixateur est ensuite crucial, résultant d'un compromis entre la nécessité de conserver la morphologie tissulaire, d'empêcher la diffusion des molécules d'acides nucléiques cibles hors des tissus lors de l'hybridation, et de permettre en même temps la diffusion des sondes marquées dans les tissus. Le fixateur généralement utilisé pour la fixation de routine, le formol tamponné à 10% (formaldéhyde), est efficace pour retenir les molécules des acides nucléiques endogènes pendant l'hybridation. C'est le fixateur donnant les meilleurs résultats de FISH même s'il limite légèrement la diffusion de la sonde à l'intérieur du tissu. Idéalement, la fixation pendant 3 à 6 heures à 4°C permet la meilleure

conservation des acides nucléiques (Srinivasan M *et al*, 2002). Certaines études décrivent de moins bons résultats lors de l'utilisation de tissu formolé et inclus en paraffine pour des cas vieux de plus de 10 ans (Barrans SL *et al*, 2003; Shaminie J *et al*, 2003 ; Einerson RR *et al*, 2005). La fixation par le liquide de Bouin (formol + acide picrique + acide acétique) est peu recommandée car responsable de cassures des brins d'acides nucléiques et n'empêche pas la diffusion de petites molécules d'acides nucléiques hors du tissu lors de l'hybridation (Polak JM *et al*, 1990).

Pour la recherche d'une translocation, 2 types de sondes sont utilisables, différant par l'information qu'elles procurent, leur sensibilité et leur facilité d'interprétation:

- Sondes « dual-fusion » : il s'agit de paires de sondes couplées à des fluorochromes distincts, chaque sonde étant complémentaire d'un gène différent. Ce type de sonde est fait pour couvrir la région des points de cassure au niveau des 2 gènes impliqués dans la translocation réciproque. Dans le LF, pour la recherche de la translocation t(14 ;18), des sondes de couleurs différentes se lient au gène *bcl2* (sonde rouge) et IgH (sonde verte). Dans une cellule normale, 2 signaux verts et 2 signaux rouges (correspondant aux 2 chromosomes) sont visibles. Dans le cas d'une translocation t(14 ;18), on observera 2 signaux de fusion rouge/vert (apparaissant habituellement jaune) ainsi qu'un signal vert et un signal rouge correspondant aux 2 allèles non impliqués dans la translocation. Ce profil de signaux implique bien sûr l'absence de délétion ou de gain chromosomique concomitants concernant les chromosomes marqués. Il faut noter qu'en fonction du modèle de la sonde (par exemple la distance entre les régions reconnues) et l'état de la structure secondaire de l'ADN au moment de la fixation, un signal de fusion peut apparaître comme un signal unique jaune ou une juxtaposition de 2 signaux vert et rouge.

- Sondes « break-apart » : il s'agit également de 2 paires de sondes de couleurs différentes, chacune étant complémentaire d'une séquence flanquant le point de cassure connu dans un locus ou un gène d'intérêt. Dans une cellule diploïde, on peut observer 2 signaux de fusion correspondant aux 2 allèles. Dans une cellule dont un des allèles est impliqué dans une translocation, 2 signaux séparés rouge et vert sont visibles ainsi qu'un signal de fusion (allèle normal) (figure 3).

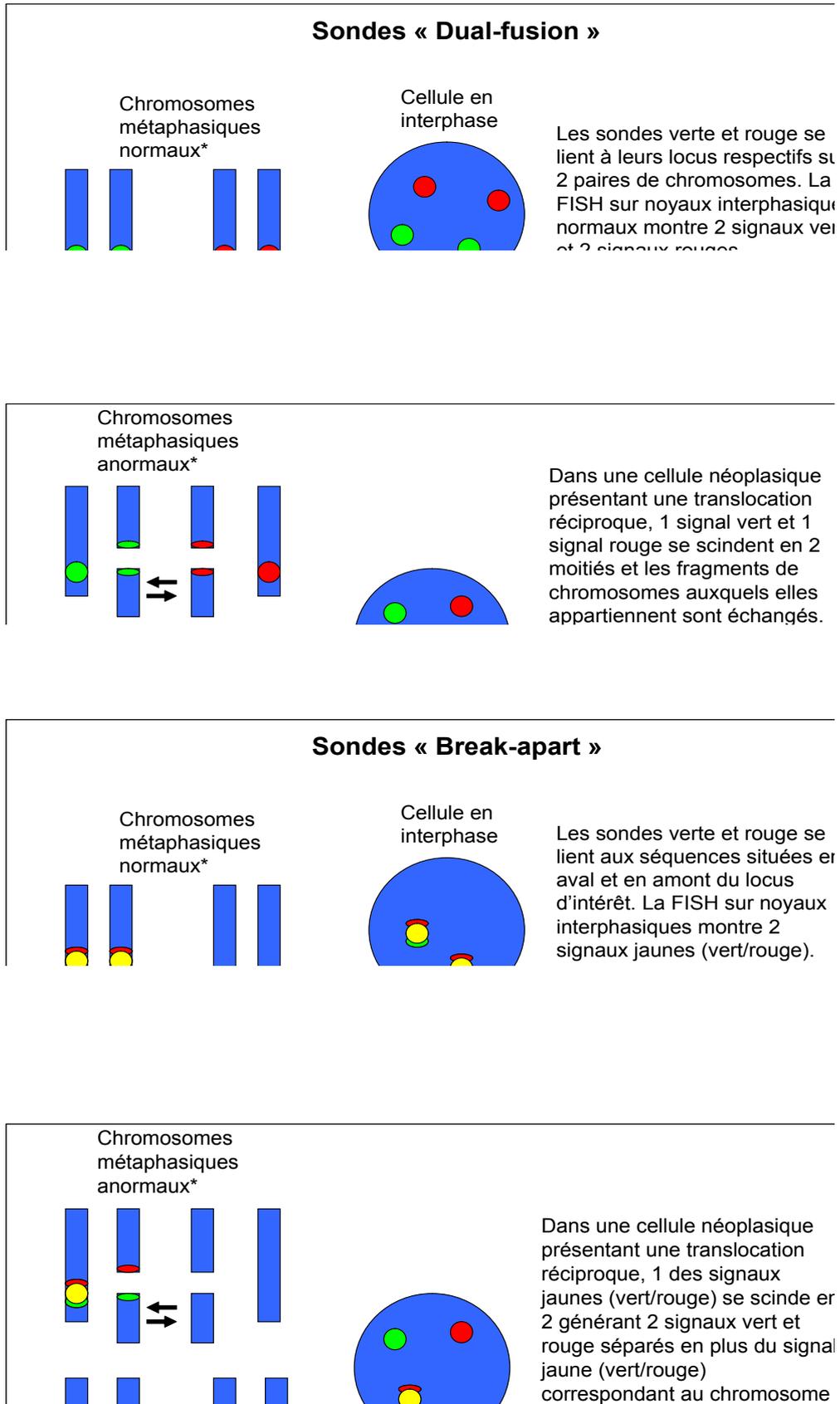


Figure 3 : Représentation schématique des caractéristiques des sondes “dual-fusion” et “break-apart”.

- Quel type de sonde utiliser ?

Si la stratégie « break apart » peut révéler une translocation, elle ne permet pas de préciser la nature de l'autre gène impliqué et est de ce fait moins informative que la stratégie « dual-fusion ». Elle permet par contre de détecter des translocations variantes, c'est-à-dire avec différents partenaires. De plus, la lecture de ce type de sonde est plus aisée (Martin-Subero JI *et al*, 2003 ; Cook JR, 2004 (a)). Cependant, comme nous l'avons déjà dit, des signaux normaux peuvent apparaître légèrement séparés en fonction de la structure secondaire de l'ADN, pouvant générer des faux positifs.

Dans la stratégie « dual-fusion », un résultat positif nécessite l'obtention de 2 signaux de fusion, un événement qui a peu de risque de se produire par hasard. Cette stratégie est donc plus spécifique que la précédente avec un taux de faux positifs quasiment nul (Li JY *et al*, 1999, Remstein ED *et al*, 2000).

De nombreuses études montrent que la FISH à partir de tissu congelé, frais ou fixé est plus sensible et plus spécifique que la PCR dans la détection de la t(14 ;18) dans les LF (Barrans SL *et al*, 2003; Einerson RR *et al*, 2005; Deghiedi H *et al*, 2007) et ceci même lorsque la PCR suit le protocole BIOMED (Belaud-Rotureau MA *et al*, 2007). Les stratégies de « break-apart » (Vaandrager JW *et al*, 2000 (a) ; Haralambieva E *et al*, 2002) ou de « dual-fusion » (Shaminie J *et al*, 2003; Hirose Y *et al*, 2003 ; Zhang X *et al*, 2004; Matsumoto Y *et al*, 2004; Matsumoto Y *et al*, 2004) peuvent être utilisées pour la recherche de la t(14 ;18) avec des taux de détection de 56 à 100% dans les LF (Godon A *et al*, 2003). L'équipe de Belaud-Rotureau a montré une concordance des résultats obtenus avec ces deux stratégies (Belaud-Rotureau MA *et al*, 2007).

La diversité des partenaires du chromosome 3 dans le réarrangement *bcl6* rend la stratégie « break apart » seule utilisable dans la détection systématique de cette anomalie génétique (Sanchez-Izquierdo D *et al*, 2001).

Au laboratoire de Cytogénétique Hématologique du CHU de Nantes, les anomalies génétiques des LF sont recherchées en cytogénétique conventionnelle et en FISH à l'aide de sondes « dual-fusion » pour la détection de la translocation t(14 ;18) et de sondes « break apart » pour la détection d'un réarrangement *bcl6*. Les résultats de la FISH sont lus sur 100 noyaux interphasiques, un LF étant considéré réarrangé pour les gènes *bcl2* et/ou *bcl6* à partir

de 10% de cellules réarrangées pour chacun de ces 2 gènes. Dans le cas d'un réarrangement *bcl6*, les résultats de la FISH sont également examinés sur mitoses pour permettre l'identification du chromosome partenaire.

9- Translocation t(14 ;18), réarrangement *bcl6* et grades histologiques.

Différents travaux ont montré que la fréquence de la translocation t(14 ;18) et/ou du réarrangement *bcl6* dans les LF varie avec le grade histologique.

9.1- Translocation t(14 ;18) et grade histologique :

Plusieurs études européennes ou asiatiques montrent que la translocation t(14 ;18) dans les LF est d'autant moins fréquente que le grade histologique est élevé. Une étude néerlandaise menée par Vaandrager sur 40 LF de tous grades montre une association entre l'absence de translocation t(14 ;18) et un grade histologique 2 ou 3, mais cette différence n'est pas significative (Vaandrager JW *et al*, 2000 (a)). Horsman *et al*, dans une étude canadienne et européenne comparant 54 LF sans translocation t(14 ;18) et 165 LF avec cette translocation (déterminée par FISH et cytogénétique conventionnelle) rapportent une proportion de grades élevés supérieurs dans le groupe sans translocation. Cette dernière est observée dans respectivement : grade 1 : 42% vs 64% ; grade 2 : 40% vs 33% ; grade 3 : 18% vs 3% (Horsman DE *et al*, 2003). Les résultats d'une étude japonaise de Sekiguchi *et al*, à propos de 47 LF de tous grades étudiés par FISH, vont dans le même sens : la fréquence de la translocation t(14 ;18) est significativement plus importante dans les LF de grade 1 (83,3%) que dans les LF de grade 2 (52,9%) ($p=0,0096$) ou que dans les LF de grade 3a (0%) ($p=0,018$) (Sekiguchi N *et al*, 2005). Deux autres études asiatiques, menée par Guo (Japon) et Lee (Corée), concernant respectivement 147 et 61 LF de tous grades étudiés par FISH, séparent les LF de bas grade (1 + 2) des LF de haut grade (3a + 3b) quant à la fréquence de la translocation t(14 ;18). Cette dernière est significativement plus répandue dans le groupe rassemblant les grades 1

(respectivement 100% et 80%) et 2 (92% et 50%) que dans le groupe rassemblant les grades 3a (44% et 34,8%) et 3b (43% et 9,1%) ($p < 0,001$ dans les 2 études) (Guo Y *et al*, 2005 ; Lee D *et al*, 2008). Seule l'étude française de Jardin et collaborateurs comparant 15 LF sans translocation t(14 ;18) et 88 LF possédant cette translocation ne retrouve pas de différence de répartition des grades histologiques entre les 2 groupes (Jardin F *et al*, 2002 (a)). Deux études allemandes sur des LF de tous grades menée par Ott (89 LF, cytogénétique conventionnelle) (Ott G *et al*, 2002) et Katzenberger (188 LF, FISH et cytogénétique conventionnelle) (Katzenberger T *et al*, 2004) rapportent également une fréquence moindre de la translocation t(14 ;18) dans les LF de grade 3 par rapport aux LF de grades 1 + 2 mais surtout opposent les LF de grade 3a et 3b sur ce point. Ott *et al* montrent en effet que la fréquence de cette translocation est significativement moins importante dans les LF de grade 3b (13%) que dans le groupe rassemblant les grades 1 (86%) + 2 (85%) + 3a (73%) ($p < 0,0001$). Katzenberger *et al* observent cette même différence. Ott *et al* montrent également une prépondérance significative de la translocation t(14 ;18) dans les LF3a par rapport aux LF3b ($p < 0,01$) et Katzenberger *et al* dans les LF3a (64%) par rapport aux LF3b avec composante de LBDGC (5%) ($p < 0,001$). Lee *et al* rapportent également une fréquence inférieure de la translocation t(14 ;18) dans les LF3b (9,1%) par rapport aux LF3a (34,8%) mais cette différence n'est pas significative (cette étude ne précise pas l'existence d'éventuelles composantes de LBDGC) (Lee D *et al*, 2008). Au contraire, l'étude de Guo *et al* ne montre pas de différence dans la fréquence du réarrangement *bcl2* entre les grades 3a (44%) et 3b (43%) (Guo Y *et al*, 2005).

-Réarrangement *bcl6* et grade histologique :

La plupart des travaux sus-cités ont également étudié la fréquence du réarrangement *bcl6* selon le grade histologique des LF. L'étude de Lee *et al* montre que ce réarrangement est plus fréquent dans les LF3a (19%) et 3b (27,3%) que dans les LF de grades 1 (11%) et 2 (0%) mais cette différence n'est pas significative. La prépondérance de ce réarrangement dans les LF3b par rapport aux LF3a n'est pas non plus significative (Lee D *et al*, 2008). Guo *et al* rapportent des résultats similaires avec une fréquence de réarrangement *bcl6* significativement supérieure dans le groupe des LF de grade 3 (3a (32%) + 3b (36%)) par rapport au groupe des grades 1 (0%) + 2 (3%) ($p < 0,001$), sans différence significative entre les grades 3a et 3b (Guo Y *et al*, 2005). Un travail espagnol récent mené par Diaz-Alderete sur 182 LF de tous grades étudiés par FISH montre également un réarrangement *bcl6* significativement plus fréquent

dans les LF de grade 3 que dans les LF de grades 1 et 2 (Diaz-Alderete A *et al*, 2008). Ces résultats sont corroborés par ceux des équipes allemandes d'Ott *et al* et Katzenberger *et al*. Ces derniers n'observent aucun réarrangement *bcl6* dans les LF de grades 1 + 2 (n=24) contre respectivement 17% et 55% dans les LF3a (n=23) et LF3b avec composante de LBDGC (n=22). La différence entre ces 2 derniers sous-groupes est de plus significative (p<0,001). Dans cette étude, les LF3b avec réarrangement *bcl6* possèdent tous une composante de LBDGC (Katzenberger T *et al*, 2004). Ott *et al* montrent également une proportion de réarrangement *bcl6* significativement supérieure dans les LF3b (44%) par rapport aux LF de grades 1 (3%) + 2 (3%) + 3a (18%) (p<0,0001). Comme dans l'étude de Katzenberger *et al*, les auteurs observent que parmi les LF3b, les réarrangements *bcl6* sont observés seulement dans les lymphomes avec composante de LBDGC (Ott G *et al*, 2002). Dans les études menées par Lee, Guo et Diaz-Alderete, il n'est pas fait mention de la présence éventuelle d'une composante de LBDGC dans les lymphomes étudiés. Contrairement à toutes ces études, Sekiguchi *et al*, dans leur article sur 47 LF étudiés par FISH, ne retrouvent pas plus de réarrangements *bcl6* dans les LF de grade 3 (Sekiguchi N *et al*, 2005).

Une étude canadienne et hollandaise menée par Bosga-Bouwer montre que les LF3b peuvent être eux-même subdivisés en plusieurs sous-groupes selon la présence ou non d'une translocation t(14 ;18) (« BCL2 ») et/ou d'un réarrangement *bcl6* (« BCL6 »). Ce travail, portant sur 32 LF3b étudiés par FISH, PCR, Southern Blot et cytogénétique conventionnelle, rapporte la distribution suivante : BCL2+/BCL6- : 40,5% ; BCL2-/BCL6+ : 22% ; BCL2-/BCL6- : 37,5% ; BCL2+/BCL6+ : 0%. Les auteurs soulignent ainsi l'exclusivité mutuelle de ces 2 anomalies cytogénétiques dans leur série (Bosga-Bouwer AG *et al*, 2003). Dans l'étude de Diaz-Alderete *et al*, la translocation t(14;18) et le réarrangement *bcl6* sont également mutuellement exclusifs dans le groupe des LF3b (n=8) (Diaz-Alderete A *et al*, 2008). Ces résultats font écho à ceux de Lee *et al* qui observent une prépondérance des réarrangements *bcl6* dans les lymphomes (de tous grades) sans translocation t(14 ;18) (25,9% vs 7,7%) (différence non significative) (Lee D *et al*, 2008).

La plupart des équipes paraît donc unanime sur l'existence de différences biologiques entre les LF de bas grade (1 + 2) et haut grade (3a + 3b). Ces derniers semblent exprimer moins fréquemment les protéines CD10, *bcl2* et *bcl6*, présenter moins souvent une translocation t(14 ;18), posséder un index de prolifération supérieur et un réarrangement *bcl6* plus fréquent. Cependant, moins de données sont disponibles sur d'éventuelles différences entre les LF3a et LF3b. De plus, les résultats dont nous disposons sur ce point sont parfois

contradictoires comme le montrent les travaux d'Ott *et al*, Katzenberger *et al*, Sekiguchi *et al*, Lee *et al* et Guo *et al*. Pourtant, des caractères cliniques particuliers aux LF3b ont déjà été rapportés (Chau I *et al*, 2003). Cette hétérogénéité des LF de grade 3 explique des divergences dans les recommandations thérapeutiques (Bartlett NL *et al*, 1994 ; Wendum D *et al*, 1997) et le fait que certains centres français prennent en charge les LF3b comme des LBDGC alors que les LF3a sont traités comme des LF de grades 1 et 2. Notre étude a donc tenté de savoir si les différences morphologiques et de prise en charge entre ces 2 sous-groupes étaient accompagnées de différences biologiques. Pour cela, nous avons comparé l'expression de CD10, bcl2, bcl6, Ki67 et les fréquences de la translocation t(14 ;18) et du réarrangement *bcl6* entre un groupe de LF3a et un groupe de LF3b.

Matériels et méthodes

1- Matériels :

Cinquante quatre cas de biopsies chirurgicales de LF de grade 3 diagnostiqués entre 1993 et 2007 ont été inclus dans cette étude rétrospective. Ces cas proviennent de 11 centres de la région Grand Ouest :

- CHU, 44000 Nantes : 47 cas dont 28 correspondent à des cas adressés pour avis et relecture dans le cadre du Staff Lymphomes, provenant des laboratoires suivants : Institut d'Histo Pathologie, 44000 Nantes : 7 cas ; Cabinet d'Anatomie et Cytologie pathologiques, Centre Parc Pompidou, 56000 Vannes : 7 cas ; CHR, 85000 La Roche sur Yon : 5 cas ; Cabinet d'Anatomie et Cytologie pathologiques, 35000 Rennes: 3 cas ; Cabinet d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, 44000 Nantes : 2 cas ; CHR Bretagne Atlantique, 56000 Vannes : 2 cas ; Cabinet d'Anatomie et Cytologie pathologiques, 85000 La Roche sur Yon : 1 cas ; CHR, 72000 Le Mans : 1 cas.

- Institut Bergonié, Centre Anti-Cancéreux, 33000 Bordeaux : 5 cas fournis par le Docteur I. Soubeyran.

- CHU, 49000 Angers : 2 cas fournis par le Professeur M.C. Rousselet.

Ces 54 patients se répartissent en 26 femmes et 28 hommes dont l'âge au diagnostic varie de 39 à 93 ans (moyenne : 62 ,1 ans ; médiane : 60,5 ans).

L'accès à d'éventuels antécédents de lymphome a été disponible pour 45 patients.

2- Localisations tumorales:

Les sites d'atteinte par les LF sont connus pour 52 cas et se répartissent en :

. 47 adénopathies :

- 19 de siège cervical (5 sus-claviculaires, 3 sous-maxillaires, 3 jugulo-carotidiens, 1 pré-tragien et 7 non précisés)
- 14 de siège inguino-crural
- 8 de siège axillaire
- 2 de siège abdominal (1 épigastrique et 1 méésentérique)
- 4 non précisés

. 4 masses extra-ganglionnaires : une située au niveau de la face interne du bras et 3 de siège méésentérique.

3- Classification et grading histologique :

Pour chaque cas, une ou plusieurs lames histologiques colorées à l'hémalum-éosine-safran étaient disponibles ainsi que des colorations de la réticuline (Gordon Sweet) dans certains cas. Tous les LF ont été revus séparément par 2 pathologistes (Docteurs Anne Moreau et Fanny Gaillard) et classés et gradés selon la classification OMS 2001 (Jaffe ES *et al*, 2001) en LF3a ou LF3b (cf méthode de comptage dans chapitre « Morphologie » page 21). Une architecture folliculaire a été exigée sur au moins 25% de la surface tumorale. Les cas pour lesquels a existé une discordance de grading à l'issue de la double relecture ont été relus de nouveau au microscope multi-têtes.

4- Immunohistochimie :

Une étude immunohistochimique sur coupes déparaffinées avec les anticorps anti-CD10, bcl2 et Ki67 a été réalisée sur tous les cas de LF. Un marquage avec l'anticorps anti-bcl6 a été réalisé dans 22 cas (patients 2, 9, 13, 14, 15, 19, 23, 26, 31, 33, 36, 38, 39, 41, 42,

43, 45, 46, 48, 50, 51 et 53). Pour 35 LF (24 de grade 3a et 11 de grade 3b), ces marquages proviennent au moins en partie des centres ayant fourni les cas et ont été relus rétrospectivement. Pour 38 LF, ces marquages ont été réalisés ou complétés dans le service d'Anatomie Pathologique du CHU de Nantes. Il s'agit des marquages avec les anticorps anti :

- CD10 (Ac monoclonal de souris, 1/40, Novocastra NCL-CD10-270, démasquage à l'EDTA, temps d'incubation 60 min) : patients 3, 4, 5, 6, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 26, 27, 30, 31, 33, 35, 36, 38, 42, 43, 46, 48, 49, 50, 53 et 54.

- bcl2 (Ac monoclonal de souris, 1/40, Dako M0887, démasquage au tampon citrate, temps d'incubation 30 min) : patients 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 15, 16, 19, 20, 23, 26, 27, 30, 31, 35, 36, 38, 40, 42, 43, 46, 48, 50, 51, 52 et 54.

- bcl6 (Ac monoclonal de souris, 1/20, Dako M7211, démasquage au TRS-H, temps d'incubation 30 min) : patients 13, 14, 15, 19, 23, 26, 31, 33, 36, 38, 41, 42, 43, 46, 48, 50, 51 et 53.

- Ki67 (Ac monoclonal de souris, 1/50, Dako 7240, démasquage au tampon citrate, temps d'incubation 30 min) : patients 4, 5, 6, 8, 10, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 23, 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35, 38, 41, 42, 43, 48, 49, 50, 51, 52 et 54.

Toutes les réactions immunohistochimiques ont utilisé la méthode de détection peroxydase / anti-péroxydase avec le kit Dako K5001 pour les Ac anti-bcl2 et anti-bcl6 et avec le kit EnVision pour les Ac anti-CD10 et anti-Ki67. Ces marquages ont été réalisés sur l'automate Immunostainer (Dako).

Lorsque le CD10 était négatif, un marquage avec l'anticorps anti-bcl6 a toujours été réalisé.

Du fait des diverses provenances des lames d'immunohistochimie et donc de la variabilité des protocoles de fixation et d'immunohistochimie, il existait une hétérogénéité dans la qualité des immunomarquages. Cette variabilité n'a pas permis de réaliser une évaluation semi-quantitative de ces derniers ni donc de déterminer un seuil de positivité. Les marquages ont donc été qualifiés de « + » ou « - » pour les anticorps anti-bcl2, CD10 et bcl6.

Index de prolifération : il a été estimé par le % moyen de cellules marquées par l'anticorps MiB1 détectant l'antigène Ki67, dans les zones les plus proliférantes.

5- FISH :

Pour 51 cas (tous les LF sauf patients 38, 48 et 54), une analyse des réarrangements *bcl2* et *bcl6* a été réalisée par technique de FISH à partir de coupes de tissu préalablement fixé en formol et paraffiné.

. Préparation des lames :

Des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées. Si coexistaient sur la lame des territoires de LF et de LBDGC, ce dernier contingent était supprimé par grattage au bistouri après repérage, de sorte que seul le contingent folliculaire soit hybridé. Les lames ont été ensuite déparaffinées dans 3 bains successifs de xylène de 10 minutes à température ambiante. Après réhydratation par des bains successifs d'alcool de degré décroissant puis lavage 30 minutes dans un bain de 2SSC / 0,1% de triton toujours à température ambiante, les lames ont été plongées dans une solution de thiocyanate de sodium (NaSCN) (Sigma-Aldrich 251410-100G), faite à partir de 2g de NaSCN pour 100ml d'H₂O₂, pendant 30 minutes à 80°C. Après un rinçage (5 minutes dans de l'eau distillée à température ambiante), les lames ont été traitées dans une solution de pepsine (Sigma-Aldrich P7000-25G, 036K0089) 0,015% / 0,01 N HCL à 37°C pendant 10 minutes. Après un rinçage par 2 bains de PBS 1X de 5 minutes à température ambiante, les échantillons ont été fixés avec une solution de formol 1% / PBS 1X 95% / MgCl₂ 2M 4% pendant 10 minutes à température ambiante. Les lames ont été ensuite rincées par un bain de PBS 1X de 5 minutes (température ambiante) et déshydratées dans des bains successifs d'alcool de degré croissant avant de sécher à l'air libre.

. Préparation des sondes :

Toutes les sondes utilisées sont d'origine commerciale (Abbott-Vysis, Rungis, France).

Pour détecter la translocation t(14 ;18), nous avons utilisé la sonde LSI IgH / *bcl2* dual color (figure 4). Il s'agit d'une sonde « dual fusion » qui est un mélange de LSI IgH (spectrum vert) couvrant tout le locus IgH sur le chromosome 14 et s'étendant environ 300 kb au-delà en 3' et de LSI *bcl2* (spectrum rouge) sur le chromosome 18 qui couvre tout le locus *bcl2* et s'étend environ 250 kb de part et d'autre de ce gène.

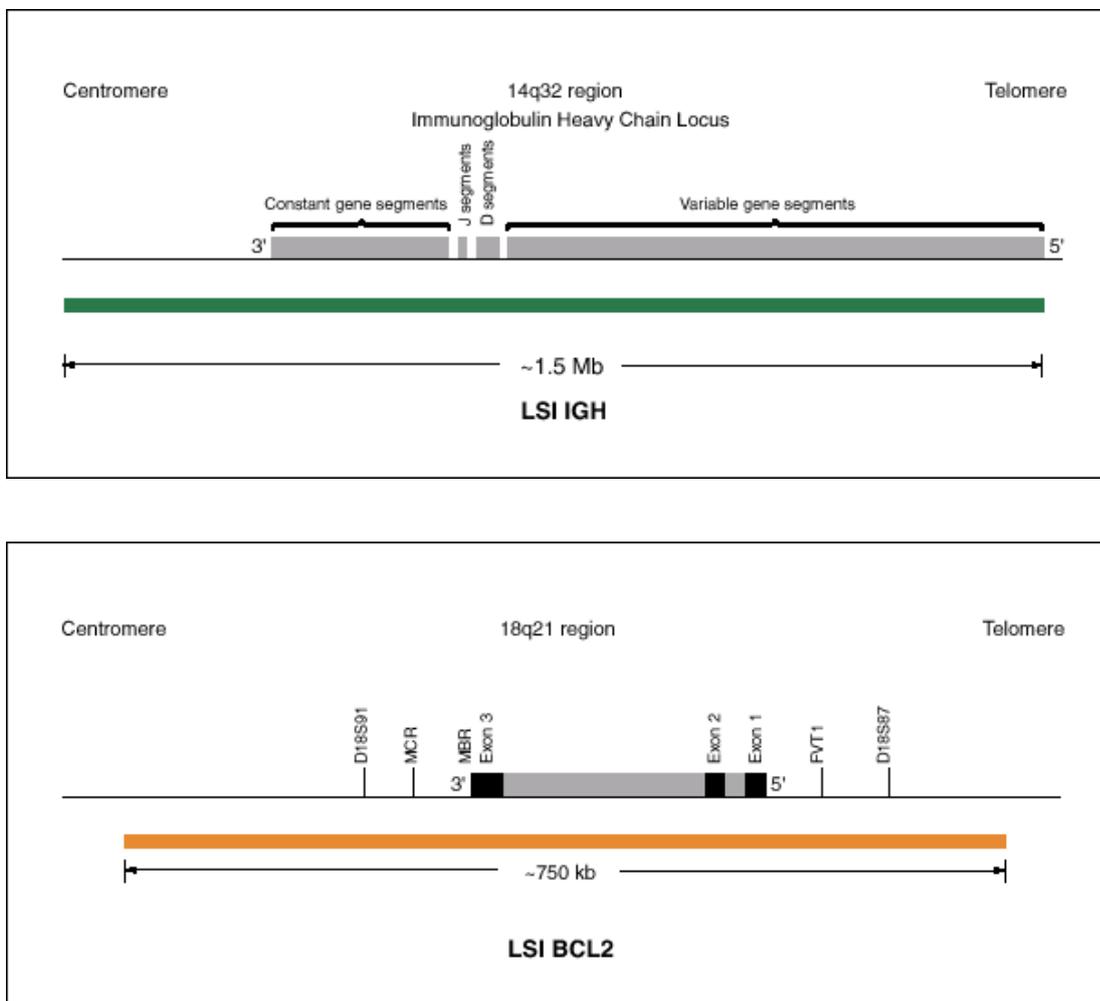


Figure 4 : schéma des sondes LSI IgH (A) et LSI *bcl2* (B).

Pour détecter le réarrangement *bcl6*, nous avons utilisé la sonde LSI *bcl6* dual color (figure 5). Il s'agit d'une sonde « break apart » qui contient un mélange de séquences homologues à la région située en 5' de *bcl6*, sur environ 300 kb (spectrum rouge) et de

séquences homologues à la région située en 3' de ce gène, sur environ 600 kb (spectrum vert). Ces deux séquences sont séparées par 42 kb correspondant à la totalité du gène *bcl6*, incluant ainsi les différents points de cassure.

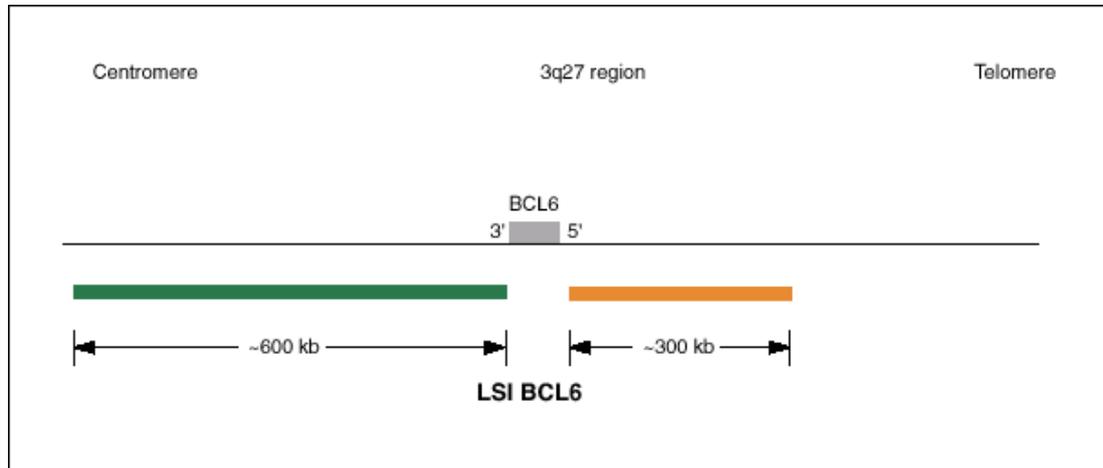


Figure 5 : schéma de la sonde LSI *bcl6*.

Chaque sonde a été mélangée avec du tampon d'hybridation (Vysis, Buffer LSI / WCP), le tout étant dilué avec de l'eau distillée. Les quantités pour une lame ont été : 0,5 µl de sonde + 3,5 µl de tampon d'hybridation + 1 µl d'eau distillée. Ce mélange a été ensuite dénaturé dans un bain-marie à 75°C pendant 10 minutes.

. Hybridation des lymphomes :

Les lames ont été dénaturées dans une solution de formamide 70% / 20 SSC pendant 5 minutes au bain marie à 73°C puis cette dénaturation a été arrêtée par 3 bains successifs d'alcool froid de degré croissant (2 minutes à chaque fois). Cinq µl de mix sonde / tampon d'hybridation / eau distillée ont été déposés sur chaque lame posée sur une table chauffante. Une fois lutées de façon hermétique, les lames ont été placées en étuve humide à 60°C pendant environ 12 heures. Les échantillons ont été ensuite rincés dans une solution de 2SSC / 0,3% NP40 à température ambiante jusqu'à ce que les lamelles tombent, puis dans cette même solution pendant 2 minutes à 75°C afin de supprimer le maximum de bruit de fond. Après séchage à l'air libre, 10 µl de DAPI ont été déposés sur chaque lame.

. Lecture des lames de FISH

Chaque lame a été lue à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss / Axioplan 2).

Avec la sonde LSI IGH / *bcl2*, un noyau de cellule normale présente 2 signaux verts et 2 signaux rouges ; un noyau de cellule transloquée présente 2 signaux de fusion (superposition rouge / vert ou jaune), un signal vert et un signal rouge.

Avec la sonde LSI *bcl6*, un noyau de cellule normale présente 2 signaux de fusion ; un noyau de cellule réarrangée présente 2 signaux rouges et 2 signaux verts.

Du fait des superpositions ou troncations nucléaires, une lecture quantitative ou semi-quantitative n'a pas été possible et les lymphomes ont été classés « réarrangés » pour *bcl2* et / ou *bcl6* si un nombre significatif de cellules présentaient le profil réarrangé.

Pour 11 cas (patients 4, 5, 15, 26, 27, 38, 42, 43, 45, 48 et 54), une analyse des réarrangements *bcl2* et *bcl6* a été réalisée par technique de FISH à partir d'une suspension de cellules fraîches au moment du diagnostic. Dix de ces cas provenaient du laboratoire de Cytogénétique Hématologique du CHU de Nantes (Docteur P. Talmant et Pr H. Avet-Loiseau) et un cas du Centre Anti-Cancéreux de Bordeaux.

Pour 1 cas (patient 29), les résultats d'une PCR à la recherche d'une translocation t(14 ;18) étaient connus (cas provenant du Centre Anti-Cancéreux de Bordeaux).

6- Cytogénétique conventionnelle :

Les résultats de la cytogénétique conventionnelle étaient disponibles pour 8 patients (4 LF3a et 4 LF3b). Ils avaient été réalisés au laboratoire de Cytogénétique Hématologique du CHU de Nantes (Docteur P. Talmant et Pr H. Avet-Loiseau). Les formules étaient retranscrites selon l'ISCN 2005.

7- Analyses statistiques :

Les comparaisons entre les âges moyens des patients d'une part et les index moyens de prolifération d'autre part ont été effectuées par le test de Student. Les autres analyses statistiques des données collectées dans cette étude ont été réalisées avec le test exact de Fisher.

Une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

L'ensemble des résultats est colligé dans les tableaux 1 et 2.

1- Patients

1.1- Ages : Les âges moyens des patients atteints de LF3a et de LF3b sont respectivement de 62,1 ans et 62,2 ans. Cette différence n'est pas significative.

1.2- Antécédents de lymphome folliculaire : Parmi les 45 patients pour lesquels nous disposons de notion d'antécédents, 33 (24 LF3a et 9 LF3b), présentent un LF de grade 3 *de novo*. Deux patients avec des LF3a possèdent des antécédents de LF de même grade, 6 ans auparavant (patient 4) et 9 ans auparavant (patient 9). Un patient atteint d'un LF3b présente des notions de LF de classe D, 6 ans auparavant (patient 46). Quatre patients porteurs d'un LF3a (patient 29) ou d'un LF3b (patients 39, 47 et 53) ont des antécédents de LBDGC respectivement 6, 8 et 9 ans auparavant pour les trois premiers (date non connue pour le patient 53). Cinq patients ont des antécédents de LF de moindre grade : trois atteints d'un LF3a et possédant des antécédents de LF de grade 1 ou 2 diagnostiqué 4 ans (patient 7) ou 1 an (patient 8) auparavant (sans précision de date pour le troisième, patient 23) ; deux atteints d'un LF3b et possédant des antécédents de LF de grade 3a diagnostiqué 3 ans auparavant (patient 38) et de LF de grade 2/3a diagnostiqué 1 an auparavant (patient 54).

2- Histologie

Les figures 6 et 7 illustrent respectivement un exemple de LF3a et de LF3b sur le plan morphologique et immunohistochimique.

2.1- Grades histologiques : La relecture des lames par 2 pathologistes a confirmé le diagnostic de LF de grade 3 dans tous les cas. Sur la base de la quantification du nombre de

centroblastes dans 10 champs au grossissement x 400 selon les recommandations de l’OMS, 37 LF ont été classés en grade 3a et 17 en grade 3b. Une composante de LBDGC, n’excédant jamais plus de 25% de la surface ganglionnaire, a été observée dans 6 LF3a (16,2%) et dans 3 LF3b (17,6%). Cette différence n’est pas significative.

2.2- Immunohistochimie :

Dans tous les LF, les cellules lymphomateuses sont CD20+.

- bcl2 :

Une expression de bcl2 est observée dans 43 des 54 LF (79,6%).

Vingt huit des 37 LF 3a (75,6%) et 15 des 17 LF 3b (88%) sont bcl2+. Cette différence n’est pas significative (p=0,46) (tableau 3).

- CD10 :

Une expression de CD10 est observée dans 42 des 54 LF (77,7%). Les 12 LF n’exprimant pas CD10 expriment la protéine bcl6.

Trente-et-un des 37 LF3a (83,8%) et 11 des 17 LF3b (64,7%) sont CD10+. Cette différence n’est pas significative (p=0,16) (tableau 3).

Tableau 3. Expression de bcl2 et CD10 en fonction du grade histologique.

Grade	bcl2		CD10	
	+	-	+	-
LF3a (n=37)	28 (75,6%)	9 (24,3%)	31 (83,8%)	6 (16,2%)
LF3B (n=17)	15 (88%)	2 (12%)	11 (64,7%)	6 (35,3%)
LF3a vs LF3b	ns		ns	

- Ki67 :

L'index de prolifération estimé par le pourcentage moyen de cellules marquées par l'anticorps anti-Ki67 dans les zones les plus proliférantes est significativement plus élevé dans le groupe des LF3b que dans le groupe des LF3a (tableau 4):

- LF3b : 50% à 90% (moyenne : 65% ± 3,8)

- LF3a : 20% à 90% (moyenne : 53,2% ± 3,6) (p=0,036)

Au sein des LF3a, l'index de prolifération moyen est de 64% ± 14,7 dans le sous-groupe avec composante de LBDGC contre 51% ± 11,5 dans le sous-groupe sans cette composante. Au sein des LF3b, l'index de prolifération moyen est de 63,3% ± 18,6 dans le sous-groupe avec composante de LBDGC contre 65,3% ± 16 dans le sous-groupe sans cette composante. Ces différences ne sont pas significatives (respectivement p=0,14 et p=0,8).

Tableau 4. Index de prolifération (estimé par le % moyen de cellules marquées par l'anticorps anti-Ki67 dans les zones les plus proliférantes) en fonction du grade histologique.

Grade	Ki67 (%)
LF3a (± LBDGC) (n=37)	53,2 ± 3,6
LF3a avec LBDGC (n=6)	64 ± 14,7
LF3a sans LBDGC (n=31)	51 ± 11 ,5
LF3b (± LBDGC) (n=17)	65 ± 3,8
LF3b avec LBDGC (n=3)	63,3 ± 18,6
LF3b sans LBDGC (n=14)	65,3 ± 16

LF3a (± LBDGC) vs LF3b (± LBDGC): p=0,036

LF3a sans LBDGC vs LF3a avec LBDGC : ns

LF3b sans LBDGC vs LF3b avec LBDGC : ns

3- Cytogénétique

3.1- FISH :

Les figures 8 et 9 illustrent respectivement un exemple de LF3a avec translocation t(14 ;18) sans réarrangement *bcl6* et un exemple de LF3b sans translocation t(14 ;18) et avec réarrangement *bcl6*.

- Translocation t(14 ;18) :

Une translocation t(14 ;18) est détectée dans 37 des 54 LF (68,5%) (tableau 5).

Vingt six des 37 LF3a (70,2%) et 11 des 17 LF3b (64,7%) présentent la translocation t(14 ;18). Cette différence n'est pas significative (p=0,75).

Au sein des LF3a, la translocation t(14 ;18) est retrouvée dans 3 des 6 LF3a avec composante de LBDGC (50%) et 23 des 31 LF3a sans composante de LBDGC (74,2%). Au sein des LF3b, la translocation t(14 ;18) est retrouvée dans 2 des 3 LF3b avec composante de LBDGC (66,6%) et 9 des 14 LF3b sans composante de LBDGC (64,3%). La présence d'une composante de LBDGC n'influence pas la fréquence du réarrangement *bcl2* (p= 0,33 et p=1, respectivement).

- Réarrangement du gène *bcl6* :

Un réarrangement *bcl6* est retrouvé dans 17 des 54 LF (31,5%) (tableau 5).

Ce réarrangement est observé significativement plus fréquemment dans les LF3b (11/17 soit 64,7%) que dans les LF3a (6/37 soit 16,2%) (p=0,001).

Au sein des LF3a, ce réarrangement *bcl6* n'est retrouvé dans aucun des 6 LF3a avec composante de LBDGC et dans 6 des 31 LF3a sans composante de LBDGC (19,3%). Au sein des LF3b, ce réarrangement est retrouvé dans chacun des 3 LF3b avec composante de LBDGC (100%) et dans 8 des 14 LF3b sans composante de LBDGC (57%). Ces différences ne sont pas significatives (respectivement p=0,56 et p=0,51).

Tableau 5. Translocation t(14;18) et réarrangement *bcl6* en fonction du grade histologique.

Grade	t(14;18)		réarrangement <i>bcl6</i>	
	+	-	+	-
LF3a (± LBDGC) (n=37)	26 (70,2%)	11 (29,7%)	6 (16,2%)	31 (83,8%)
LF3a avec LBDGC (n=6)	3 (50%)	3 (50%)	0 (0%)	6 (100%)
LF3a sans LBDGC (n=31)	23 (74,2%)	8 (25,8%)	6 (19,3%)	25 (80,6%)
LF3b (± LBDGC) (n=17)	11 (64,7%)	6 (35,3%)	11 (64,7%)	6 (35,3%)
LF3b avec LBDGC (n=3)	2 (66,6%)	1 (33,3%)	3 (100%)	0 (0%)
LF3b sans LBDGC (n=14)	9 (64,3%)	5 (35,7%)	8 (57%)	6 (43%)
LF3a (± LBDGC) vs LF3b (± LBDGC)	ns		p=0,001	
LF3a sans LBDGC vs LF3a avec LBDGC	ns		ns	
LF3b sans LBDGC vs LF3b avec LBDGC	ns		ns	

Si nous établissons 4 sous-groupes de LF en fonction de la présence ou non de la translocation t(14 ;18) associée ou non à un réarrangement du gène *bcl6*, nous obtenons la répartition suivante :

-LF3a (n=37):

- . t(14 ;18)+ / réarr *bcl6*- : 23 cas (62%)
- . t(14 ;18)+ / réarr *bcl6*+ : 3 cas (8%)
- . t(14 ;18)- / réarr *bcl6*+ : 3 cas (8%)
- . t(14 ;18)- / réarr *bcl6*- : 8 cas (21,6%)

-LF3b (n=17):

- . t(14 ;18)+ / réarr *bcl6*- : 6 cas (35,3%)
- . t(14 ;18)+ / réarr *bcl6*+ : 5 cas (29,4%)
- . t(14 ;18)- / réarr *bcl6*+ : 6 cas (35,3%)
- . t(14 ;18)- / réarr *bcl6*- : 0 cas (0%)

La majorité des LF3a se trouve donc dans le groupe avec translocation t(14 ;18) mais sans réarrangement *bcl6* alors que les LF3b se répartissent presque équitablement dans les groupes avec translocation t(14 ;18) / sans réarrangement *bcl6*, avec translocation t(14 ;18) / avec réarrangement *bcl6* et sans translocation t(14 ;18) / avec réarrangement *bcl6*. Aucun LF3b n'est « double négatifs ».

Pour 8 cas, les résultats des recherches de la translocation t(14 ;18) et du réarrangement *bcl6* étaient disponibles en FISH réalisée à la fois à partir de coupe déparaffinées et sur suspension cellulaire à partir de tissu frais (patients 4, 5, 15, 26, 27, 42, 43 et 45). Les résultats de ces 2 techniques sont concordants dans tous les cas. De même, pour un patient (29), les résultats de la recherche d'une translocation t(14 ;18) étaient disponibles à la fois en FISH sur coupes déparaffinées et en PCR. Ces 2 résultats sont également concordants.

- Relation entre expression de *bcl2* et présence ou non d'une translocation t(14 ;18):

Trente quatre des 37 LF possédant la translocation t(14 ;18) (92%) sont *bcl2*+ contre 9 des 17 LF sans translocation t(14 ;18) (53%). Il existe une corrélation positive entre la présence d'une translocation t(14 ;18) et l'expression de *bcl2* ($p=0,01$) (tableau 6). Cette corrélation persiste au sein du groupe des LF3a : 24 des 26 LF3a t(14 ;18)+ (92,3%) sont *bcl2*+ contre 4 des 11 LF3a sans translocation t(14 ;18) (36,3%) ($p<0,001$). Au contraire, cette corrélation disparaît au sein du groupe des LF3b : 10 des 11 LF3b t(14 ;18)+ (91%) sont *bcl2*+ contre 5 des 6 LF3b sans translocation t(14 ;18) (83,3%) ($p=1$).

- Relation entre expression de CD10 et présence ou non d'une translocation t(14 ;18):

Trente cinq des 37 LF possédant la translocation t(14 ;18) (94,6%) sont CD10+ contre 7 des 17 LF sans translocation t(14 ;18) (41%). Il existe une corrélation positive entre la présence d'une translocation t(14 ;18) et l'expression de CD10 ($p<0,0001$) (tableau 6). Cette corrélation persiste au sein des groupes des LF3a et des LF3b : respectivement 25 des 26

LF3a t(14 ;18)+ (96%) sont CD10+ contre 6 des 11 LF3a sans cette translocation (54,5%) (p=0,05) et 10 des 11 LF3b t(14 ;18)+ (91%) sont CD10+ contre 1 des 6 LF3b sans translocation t(14 ;18) (16,6%) (p=0,05).

Tableau 6 : Expression de CD10 et bcl2 en fonction de la présence ou non d'une translocation t(14 ;18) dans l'ensemble des LF de grade 3.

LF3a + LF3b (n=54)		t(14;18)		
		+	-	
bcl2	+	34 (92%)	9 (53%)	p=0,01
	-	3 (8%)	8 (47%)	
CD10	+	35 (94,6%)	7 (41%)	p<0,0001
	-	2 (5,4%)	10 (59%)	

3.2- Cytogénétique conventionnelle :

Les résultats de la cytogénétique conventionnelle montrent dans tous les cas (4 LF3a et 4 LF3b) des anomalies chromosomiques le plus souvent complexes (tableau 7). Ces anomalies sont pour la plupart celles habituellement décrites dans les LF (cf chapitre « Altérations génétiques additionnelles » p. 41). Les groupes des LF3a et LF3b sont trop petits pour une comparaison.

Un réarrangement de c-MYC est observé dans 3 cas : 1 LF3a (patient 5) possédant la translocation t(14 ;18) sans réarrangement *bcl6* et 2 LF3b (patients 38 et 48) possédant à la fois les réarrangements *bcl2* et *bcl6*.

Tableau 7 : Résultats de la cytogénétique conventionnelle et de la FISH réalisées au laboratoire de Cytologie Hématologique du CHU de Nantes (Docteur P. Talmant et Professeur H. Avet-Loiseau).

patients	Cytogénétique conventionnelle	FISH		
		t(14;18)	réar <i>bcl6</i>	réar c-MYC
4	51, XY, +5, iso(6p), +7, t(14 ;18)(q32 ;q21), +der(18)t(14 ;18), mar1 ?der(12)t(12 ;?)(q15;?),+mar2[10]	+	+	-
5	47, XY, del(6)(q12q16), der(7)?del(7)(q11q21), +8, t(14;18)(q32;q21) [10] / 47, XY, del(6q)(q12q16), der(7)?del(7)(q11q21), add(8)(p23), +add(8)(p23), t(14;18)(q32;q21) [5]	+	-	+
15	46, XX, add(11)(q2 ?1), add(X)(q2 ?5)[14] / 46, XX [6]	-	NF	NF
27	95, XXYY, t(14;18)(q32;q21), inc [10] / 46, XY [3]	+	-	-
38	46, X, ? -Y, del (1)(p32p34), del(6)(p21), -11, t(14;18)(q32;q21), der(14)t(14;?)(q32 ;?), add(15)(q25), add(17p), +mar [10] / 46, XY [5]	+	+	+
42	45, X, -Y [26] / 45, idem, del(20)(q12qter) [12]	-	+	-
43	47, XX, ins(2 ;3)(q22 ;q13q27) inv(3)(q22q27), del(7)(q31q34), +del(7)(q31q34), -8, add(14)(q32), -20, +mar1 [?der(8)t(8 ;14)], mar2, inc[15] / 46, XX [3]	-	+	?
48	44-46, XY, i(1)(q10), del(4)(q21), del(6)(q15), +del(7)(q31), t(8;14)(q24;q32), t(14;18)(q32;q21), -15, inc [15]	+	+	+

NF : Non fait

Tableau 1. Données cliniques et grades histologiques.

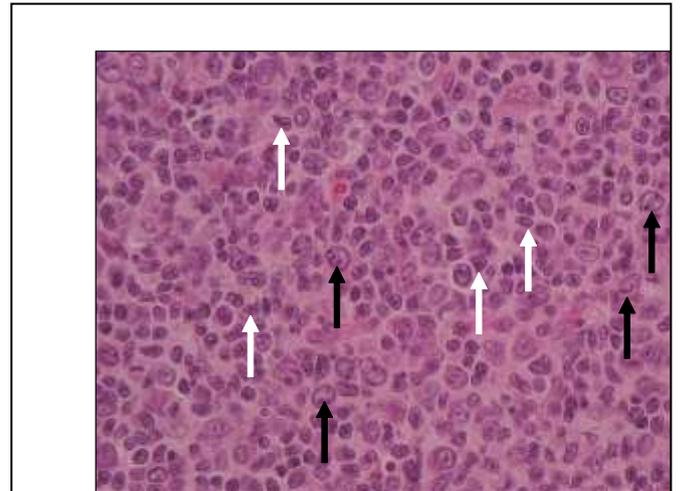
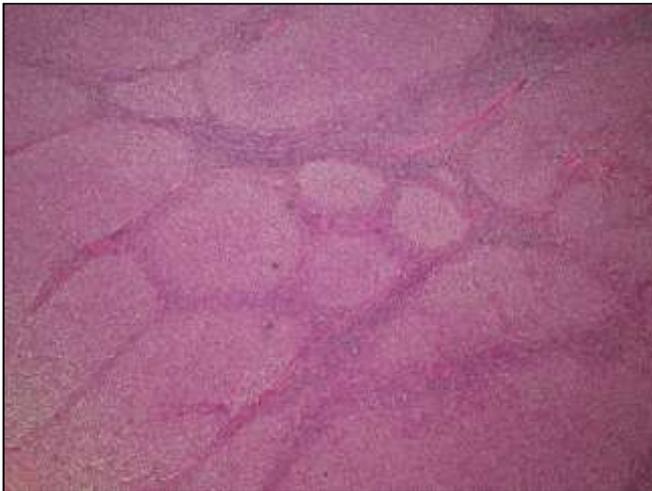
Patient	Sexe	Age au diagnostic (ans)	Localisation du LF	Grade histologique	Antécédents de LF
1	F	87	ganglion sus claviculaire	3a	NC
2	H	63	non précisé	3a	Non
3	F	59	masse mésentérique	3a	Non
4	H	50	ganglion axillaire	3a	LF3a en 1996
5	H	49	ganglion cervical	3a	Non
6	H	62	ganglion inguino-crural	3a	Non
7	F	78	ganglion pré-tragien	3a	LF de faible grade en 1996
8	F	76	ganglion axillaire	3a	LF de faible grade en 2001
9	H	39	ganglion sous maxillaire	3a	LF3a en 1996
10	H	63	masse mésentérique	3a	Non
11	H	65	masse mésentérique	3a	Non
12	F	72	ganglion, localisation non précisée	3a	Non
13	H	71	ganglion inguino-crural	3a	Non
14	F	52	ganglion cervical	3a	NC
15	F	81	ganglion sus-claviculaire	3a	Non
16	F	67	ganglion axillaire	3a	Non
17	F	46	ganglion épigastrique	3a	Non
18	H	69	ganglion inguino-crural	3a	NC
19	H	57	ganglion axillaire	3a	Non
20	F	93	ganglion axillaire	3a	Non
21	F	62	non précisé	3a	Non
22	H	65	non précisé	3a	NC
23	H	55	ganglion inguino-crural	3a	LF de faible grade (année ?)
24	F	79	ganglion sous maxillaire	3a	Non
25	H	64	ganglion mésentérique	3a	Non
26	H	54	ganglion axillaire	3a	Non
27	H	59	ganglion sous maxillaire	3a	Non
28	H	49	ganglion jugulo-carotidien	3a	NC
29	F	71	ganglion, localisation non précisée	3a	LBDGC en 1994
30	H	52	ganglion inguino-crural	3a	Non
31	H	63	ganglion cervical	3a	Non
32	H	46	ganglion inguino-crural	3a	NC
33	F	52	ganglion cervical	3a	Non
34	H	44	masse face interne bras	3a	Non
35	F	67	ganglion inguino-crural	3a	Non
36	H	74	ganglion sus-claviculaire	3a	NC
37	H	43	ganglion cervical	3a	Non
38	H	55	ganglion axillaire	3b	LF3a en 2001
39	H	55	ganglion cervical	3b	LBDGC en 1997
40	H	57	ganglion inguino-crural	3b	Non
41	F	47	ganglion cervical	3b	Non
42	H	87	ganglion inguino-crural	3b	Non
43	F	64	ganglion sus-claviculaire	3b	Non
44	F	87	ganglion inguino-crural	3b	NC
45	H	48	ganglion, localisation non précisée	3b	Non
46	F	49	ganglion jugulo-carotidien	3b	LF de classe D en 1995
47	F	56	ganglion axillaire	3b	LBDGC en 1991
48	H	52	ganglion inguino-crural	3b	Non
49	F	51	ganglion sus-claviculaire	3b	Non
50	F	79	ganglion inguino-crural	3b	Non
51	F	80	ganglion inguino-crural	3b	Non
52	F	59	ganglion cervical	3b	NC
53	H	74	ganglion, localisation non précisée	3b	LBDGC (année ?)
54	F	58	ganglion inguino-crural	3b	LF de grade 2/3a en 2006

NC : Non connu.

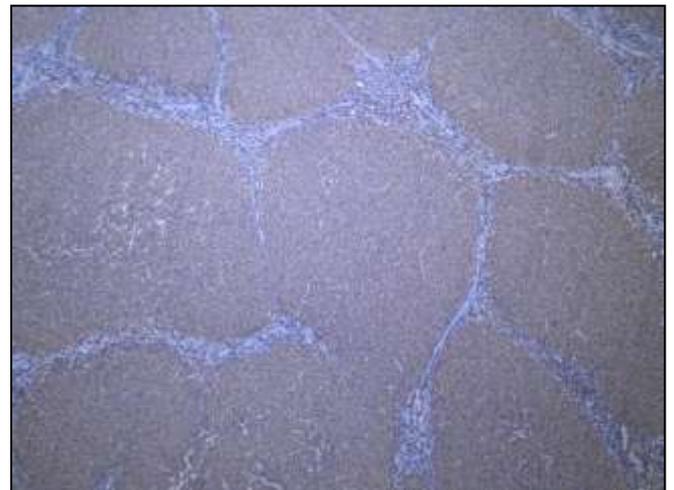
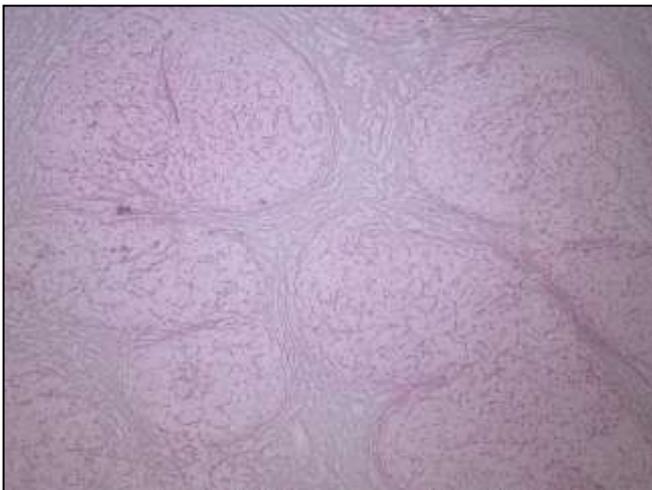
Tableau 2. Données histologiques, de la FISH et de l'immunohistochimie.

Patient	Grade histologique	Composante de LBDGC	FISH		immunohistochimie			
			t(14;18)	réarrangement <i>bcl6</i>	<i>bcl2</i>	<i>bcl6</i>	CD10	Ki67 (%)
1	3a	NON	+	-	+		+	30
2	3a	NON	-	+	+	+	-	20
3	3a	NON	+	+	+		+	70
4	3a	NON	+	+	+		+	50
5	3a	NON	+	-	+		+	50
6	3a	NON	+	-	+		+	50
7	3a	NON	+	+	+		+	80
8	3a	OUI	-	-	+		+	40
9	3a	NON	-	-	-	+	+	40
10	3a	OUI	+	-	+		+	80
11	3a	NON	+	-	+		+	40
12	3a	OUI	+	-	-		+	75
13	3a	NON	-	-	-	+	-	75
14	3a	OUI	-	-	-	+	-	70
15	3a	NON	-	-	-	+	-	70
16	3a	NON	+	-	+		+	40
17	3a	NON	+	-	+		+	50
18	3a	NON	+	-	+		+	40
19	3a	NON	+	-	+	+	+	60
20	3a	NON	-	+	+		+	60
21	3a	NON	+	-	+		+	30
22	3a	NON	+	-	+		+	30
23	3a	NON	-	+	+	+	+	70
24	3a	NON	+	-	+		+	50
25	3a	NON	+	-	+		+	40
26	3a	NON	-	-	-	+	+	70
27	3a	OUI	+	-	+		+	80
28	3a	NON	+	-	+		+	50
29	3a	NON	+	+	+		+	30
30	3a	NON	+	-	+		+	20
31	3a	OUI	-	-	-	+	+	40
32	3a	NON	+	-	-		+	80
33	3a	NON	-	-	+	+	-	20
34	3a	NON	+	-	+		+	50
35	3a	NON	+	-	+		+	80
36	3a	NON	+	-	+	+	-	50
37	3a	NON	+	-	+		+	90
38	3b	OUI	+	+	+	+	+	70
39	3b	NON	+	-	-	+	+	75
40	3b	NON	+	+	+		+	50
41	3b	NON	+	-	+	+	+	80
42	3b	NON	-	+	+	+	-	80
43	3b	NON	-	+	+	+	-	50
44	3b	NON	+	-	+		+	70
45	3b	NON	-	+	+	+	-	50
46	3b	OUI	-	+	+	+	-	50
47	3b	NON	+	-	+		+	70
48	3b	NON	+	+	+	+	+	80
49	3b	OUI	+	+	+		+	70
50	3b	NON	+	-	+	+	-	40
51	3b	NON	+	-	+	+	+	40
52	3b	NON	-	+	-		+	80
53	3b	NON	-	+	+	+	-	90
54	3b	NON	+	+	+		+	60

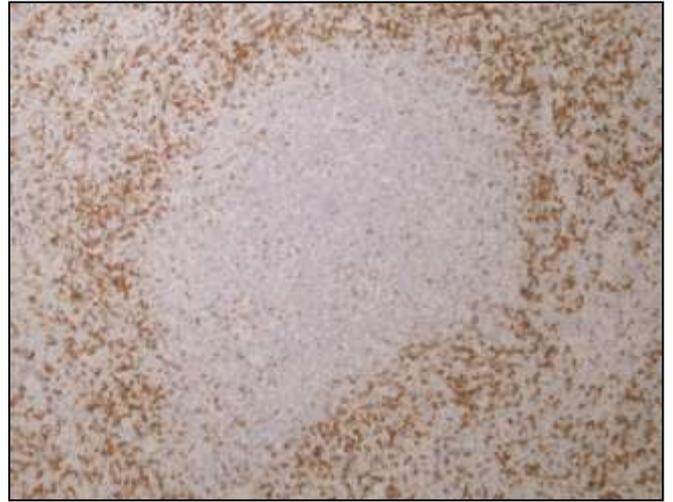
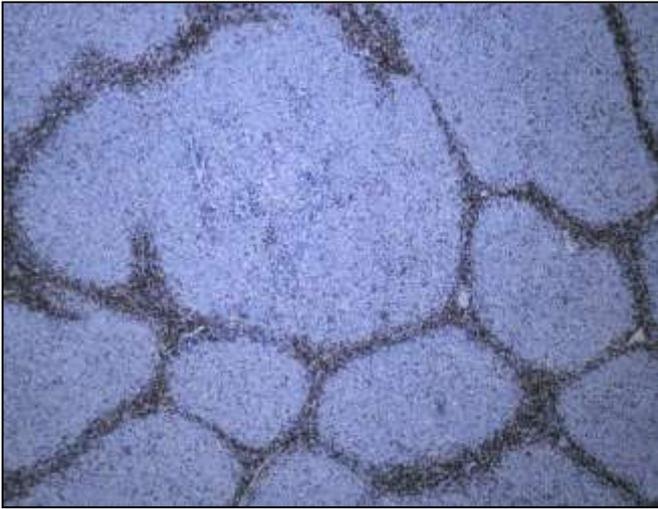
Figure 6 : LF3a sans composante de LBDGC (patient 20).



B : coloration d'Hémalun-Eosine-Safran (x400) d'un follicule néoplasique : présence de nombreux centroblastes (cellules de grande taille au noyau à chromatine dispersée avec 2 ou 3 nucléoles secondaires) et de cellules à nucléoles persistants (cellules de plus petite taille).



D : marquage immunohistochimique avec l'Ac anti-CD20 (x100). Marquage cytoplasmique des cellules tumorales des follicules néoplasiques.



H : marquage immunohistochimique avec l'A anti-CD10 (x200) Absence de marquage de

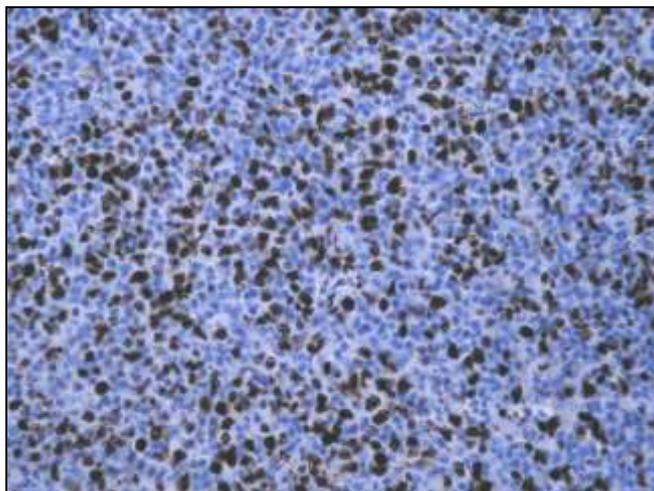
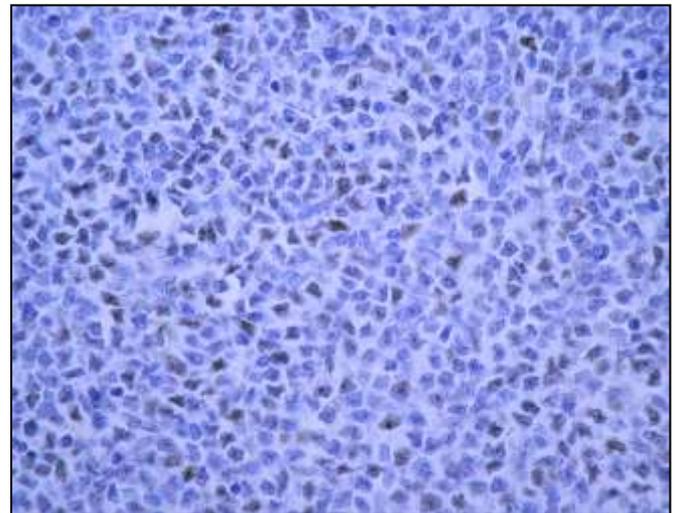
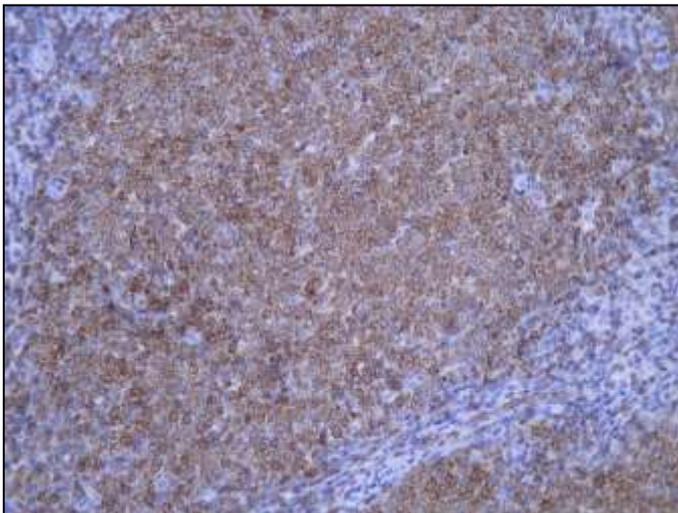
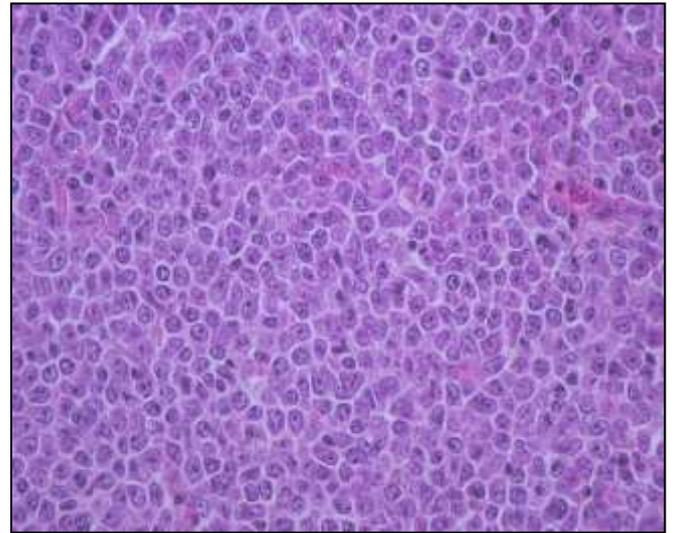
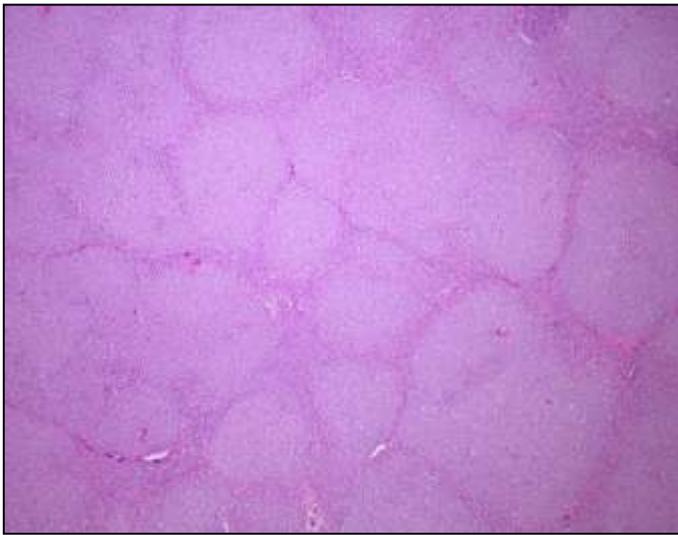
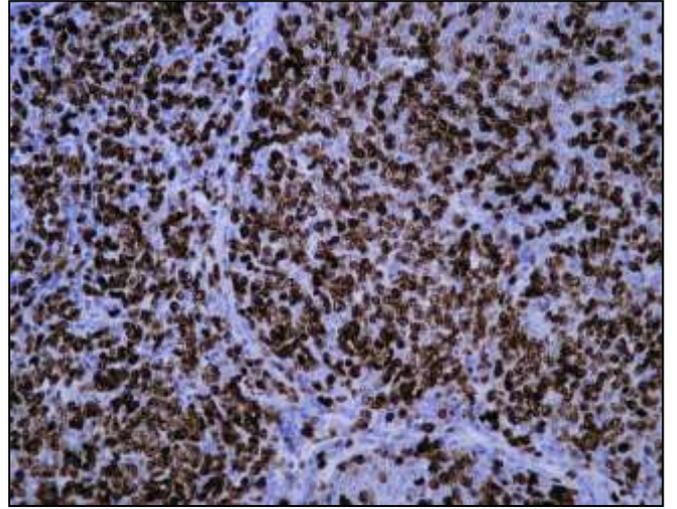
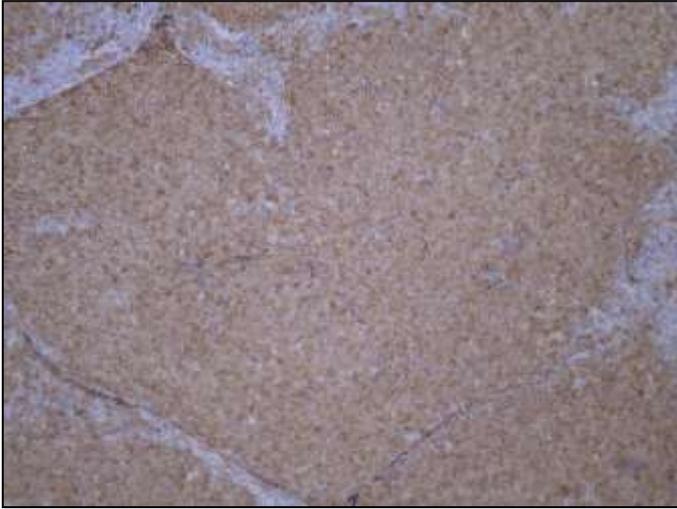


Figure 7 : LF3b sans composante de LBDGC (patient 48).



D : marquage immunohistochimique :
l'Ac anti-hcl6 (x400) au niveau d'un



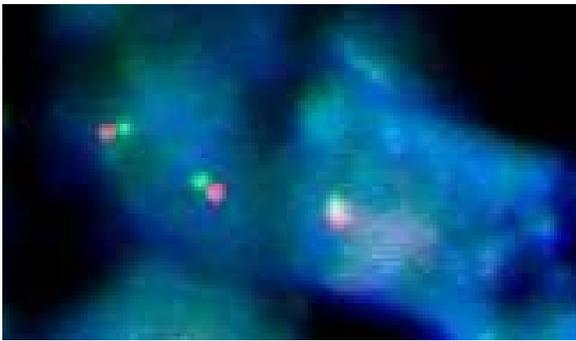


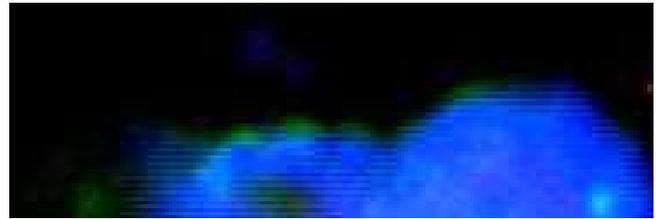
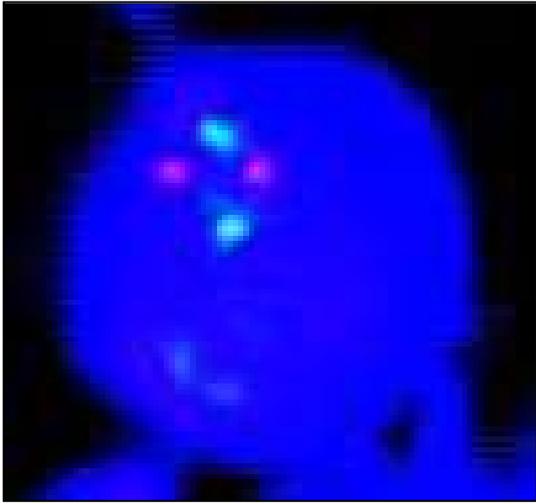
Figure 8 : patient 1, LF3a avec translocation t(14;18) sans réarrangement *bcl6*.

A et B: sonde LSI IgH / *bcl2* dual color, dual fusion.

A : Une cellule présentant 2 signaux de fusion (*flèches noires*), 1 spot vert et 1 spot rouge (respectivement allèles des chromosomes 14 et 18 non impliqués dans la translocation).

B : 1 signal de fusion (*flèche blanche*), 1 spot vert et 1 spot rouge. Le second signal de fusion est dans un autre plan focal.

C : sonde LSI *bcl6* dual color, break apart. Deux cellules accolées non réarrangées (non fusionnées).



Discussion

Dans cette étude, nous avons tenté de savoir si la subdivision des LF de grade 3 en LF3a et LF3b, sur des critères morphologiques, se justifiait également sur le plan biologique. Pour cela, nous avons comparé les fréquences des réarrangements des gènes *bcl2* et *bcl6*, l'expression du produit de ces gènes (*bcl2* et *bcl6*), du CD10 ainsi que l'index de prolifération entre un groupe de 37 LF3a (dont 6 avec composante de LBDGC) et 17 LF3b (dont 3 avec composante de LBDGC).

Nous avons observé une **expression de *bcl2*** dans 79,6% des 54 LF de grades 3a et 3b confondus, cette fréquence se répartissant en 75,6% des LF3a et 88% des LF3b. Ces proportions sont en accord avec celles rapportées dans la littérature (tableau 8). Nous n'avons pas observé de différence significative d'expression de *bcl2* entre les grades 3a et 3b ce qui est également analogue aux résultats habituellement rapportés.

Tableau 8 : Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature concernant l'expression de *bcl2*.

Etude	technique	expression de <i>bcl2</i>			
		LF de grade 3	LF3a	LF3b	3a vs 3b
Notre série	FISH	79,6% (n=54)	75,6% (n=37)	88% (n=17)	ns
Ott, 2002	CC	70,3% (n=26)	73% (n=11)	69% (n=15)	ns
Katzenberger, 2004	FISH, CC	84% (n=50)	87% (n=23)	81,5% (n=27)	ns
Guo, 2005	FISH	77% (n=39)	80% (n=25)	71% (n=14)	ns
Lee, 2007	FISH	94,3% (n=35)	91,7% (n=24)	100% (n=11)	ns

CC : Cytogénétique conventionnelle
ns : non significatif.

Une **expression de CD10** a été constatée dans 77,7% de l'ensemble des LF de notre série, se répartissant en 83,8% et 64,7% des LF de grades 3a et 3b. Les fréquences d'expression de CD10 rapportées dans la littérature sont généralement plus faibles pour les

LF de grade 3 (tableau 9). Cette différence est essentiellement liée à un taux d'expression de CD10 légèrement plus élevé dans notre groupe de LF3b. La supériorité de proportion de LF3a CD10+ par rapport aux LF3b n'est pas significative dans notre étude. Cette supériorité est également rapportée par Ott *et al* (Ott G *et al*, 2002) et Katzenberger *et al* (Katzenberger T *et al*, 2004), avec une significativité, ou par Lee *et al* (Lee D *et al*, 2008) (sans mention de significativité). Guo *et al*, au contraire, observent des taux de LF3a et LF3b CD10+ proches (Guo Y *et al*, 2005).

Tableau 9 : Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature concernant l'expression de CD10.

Etude	technique	expression de CD10			
		LF de grade 3	LF3a	LF3b	3a vs 3b
Notre série	FISH	77,7% (n=54)	83,8% (n=37)	64,7% (n=17)	ns
Ott, 2002	CC	70,3% (n=26)	100% (n=11)	50% (n=15)	p<0,05
Katzenberger, 2004	FISH, CC	64% (n=50)	96% (n=23)	37% (n=27)	p<0,05
Guo, 2005	FISH	51,3% (n=39)	48% (n=25)	57% (n=14)	ns
Lee, 2007	FISH	34,3% (n=35)	45,8% (n=24)	9,1% (n=11)	non précisé

CC : Cytogénétique conventionnelle
 ns : non significatif.

Nous avons observé un index de prolifération significativement supérieur dans les LF3b ($65\% \pm 3,8$) par rapport aux LF3a ($53,2\% \pm 3,6$) ($p=0,036$). S'il est admis que l'importance de la prolifération cellulaire croît avec le grade histologique (Tominaga K *et al*, 1992 ; Swerdlow SH *et al*, 1993 ; Martin AR *et al*, 1995 ; Llanos M *et al*, 2001 ; Pruneri G *et al*, 2004 ; Wang SA *et al*, 2005), seule l'étude menée par Ott (Ott G *et al*, 2002) a comparé cet index de prolifération entre les LF3a et LF3b. Tout comme nous, cet auteur rapporte un index de prolifération supérieur dans les LF3b (80%) par rapport aux LF3a (70%) mais, cette fois, sans significativité. Dans notre étude, la présence ou non d'une composante de LBDGC dans les LF3a ou LF3b n'influence pas cet index de prolifération.

Pour détecter la translocation t(14 ;18) et le réarrangement *bcl6*, nous avons utilisé la technique de FISH sur coupes déparaffinées. Cette technique a l'avantage de nous permettre

une large étude rétrospective. Sa fiabilité a été vérifiée par la comparaison de 17 résultats obtenus avec cette technique avec les résultats obtenus par FISH ou PCR à partir d'une suspension de cellules fraîches au moment du diagnostic (gold standard). Ces 17 résultats sont superposables (translocation t(14 ;18) et réarrangement *bcl6* pour 8 patients en FISH sur suspension cellulaire ; translocation t(14 ;18) par PCR pour un patient).

Nous avons montré la **présence d'une translocation t(14 ;18)** dans 68,5% des 54 LF de grade 3. Cette fréquence est supérieure à celle habituellement rapportée dans les LF de grade 3 (tableau 10). Dans notre série, un peu plus de 70% des LF3a et 64,7% des LF3b possèdent cette translocation. Pour le groupe des LF3a, les études allemandes menées par Ott (Ott G *et al*, 2002) et Katzenberger (Katzenberger *et al*, 2004) rapportent des fréquences similaires alors que les études asiatiques menée par Guo (Guo Y *et al*, 2005) et Lee (Lee D *et al*, 2008) retrouvent des taux moins importants de réarrangement *bcl2*. Une explication possible à ces divergences est la fréquence moindre des translocations t(14 ;18) dans les LF diagnostiqués dans les pays asiatiques par rapport à ceux diagnostiqués dans les pays occidentaux (Amakawa R *et al*, 1989 ; Loke SL *et al*, 1990 ; Chen PM *et al*, 1993 ; Mitani S *et al*, 1993 ; Chuang SS *et al*, 2006). Le taux inhabituellement élevé de translocation t(14 ;18) dans nos LF de grade 3 s'explique essentiellement par une fréquence élevée de cette anomalie cytogénétique dans le groupe des LF3b. Cette différence ne peut être mise sur le compte d'une meilleure sensibilité de notre technique puisque les études auxquelles nous comparons nos résultats ont également utilisé la FISH, à l'exception de celle menée par Ott (Ott G *et al*, 2002). Nous n'avons pas observé de différence significative de fréquence de translocation t(14 ;18) entre LF3a et LF3b. Cette constatation est en accord avec celles rapportées par les équipes de Guo *et al* (Guo Y *et al*, 2005) et Lee *et al* (Lee D *et al*, 2008), cette dernière observant cependant une tendance au réarrangement *bcl2* plus fréquent dans les LF3a mais sans significativité. Au contraire, Ott *et al* (Ott G *et al*, 2002) montrent un taux significativement supérieur de cette anomalie cytogénétique dans les LF3a par rapport aux LF3b. Katzenberger *et al* (Katzenberger T *et al*, 2004) observent la même significativité en comparant les LF3a et les LF3b comportant une composante de LBDGC, résultat que notre étude ne confirme pas, peut être par un nombre trop faible de LF3b avec composante de LBDGC. Dans notre série, l'absence de différence significative dans la fréquence d'un réarrangement *bcl2* entre LF3a et LF3b est à mettre sur le compte du taux inhabituellement élevé de cette anomalie dans ce dernier groupe. La présence ou non d'une composante de LBDGC n'influence pas la fréquence de la translocation t(14 ;18) dans les LF3a et LF3b.

Tableau 10 : Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature concernant la translocation t(14 ;18).

Etude	technique	translocation t(14;18)			
		LF de grade 3	LF3a	LF3b	3a vs 3b
Notre série	FISH	68,5% (n=54)	70,2% (n=37)	64,7% (n=17)	ns
Ott, 2002	CC	37% (n=26)	73% (n=26)	13% (n=15)	p<0,01
Guo, 2005	FISH	43,6% (n=39)	44% (n=25)	43% (n=14)	ns
Lee, 2007	FISH	26,5% (n=35)	34,8% (n=24)	9,1% (n=11)	ns

Etude	technique	LF de grade 3	LF3a	LF3b + LBDGC	3a vs 3b+
					LBDGC
Notre série	FISH	68,5% (n=54)	70,2% (n=37)	66,6% (n=3)	ns
Katzenberger, 2004	FISH, CC	30% (n=50)	64% (n=23)	5% (n=22)	p<0,001

CC : Cytogénétique conventionnelle
 ns : non significatif.

La présence d'une translocation t(14 ;18) corrèle significativement avec l'expression de bcl2 et/ou de CD10 dans l'ensemble de nos LF de grades 3a + 3b. Un immunomarquage bcl2+ est en effet observé dans 92% des LF de grade 3 avec translocation t(14 ;18) et seulement 53% des LF de grade 3 sans cette translocation (p=0,01). De même, une expression de CD10 est présente dans 94,6% et seulement 41% des LF de grade 3 respectivement avec et sans translocation t(14 ;18) (p<0,0001). Ces associations significatives entre réarrangement *bcl2* et expression de bcl2 et/ou CD10 persistent au sein des groupes LF3a et LF3b envisagés indépendamment, à l'exception de l'expression de bcl2 dans les LF3b. Dans la littérature, la corrélation entre cette anomalie cytogénétique et ces expressions protéiques est largement plus documentée pour bcl2 que pour CD10. Plusieurs études rapportent une corrélation entre réarrangement *bcl2* et expression de bcl2. C'est le cas des études menées par Skinnider (Skinnider BF *et al*, 1999) et Diaz-Alderete (Diaz-Alderete A *et al*, 2008) qui ne détaillent cependant pas la répartition selon le grade histologique. L'étude de Guo *et al* (Guo Y *et al*, 2005) montre la même corrélation lorsque tous les grades histologiques sont confondus, mais cette association disparaît lorsque seuls les LF de grade 3 sont envisagés (52% des LF3a et 60% des LF3b possédant la translocation t(14 ;18) expriment bcl2).

D'autres études ne montrent au contraire aucune corrélation entre translocation t(14 ;18) et marquage bcl2+, quel que soit le grade histologique (Bosga-Bouwer AG *et al*, 2003 ; Katzenberger T *et al*, 2004 ; Lee D *et al*, 2008). Tout comme notre étude, celle de Lee *et al* (Lee D *et al*, 2008) montre une association significative entre la présence d'une translocation t(14 ;18) et l'expression de CD10, mais le détail de cette association par grade histologique n'est pas mentionné. Fang *et al* rapportent la même corrélation dans une étude sur des LBDGC (Fang JM *et al*, 1999). Jardin *et al* et Guo *et al* rapportent quant à eux une corrélation positive entre absence d'expression de CD10 et absence de translocation t(14 ;18) dans des LF de tous grades (Jardin F *et al*, 2002 (a) ; Guo Y *et al*, 2005). Notre étude est donc à notre connaissance la seule à montrer une relation significative entre translocation t(14 ;18) et expression de bcl2 et/ou de CD10 dans les LF de grade 3. Un immunomarquage bcl2+ CD10+ prédit donc la présence d'une translocation t(14 ;18) dans notre série, tout comme dans celles de Godon *et al* (Godon A *et al*, 2003) et Sekiguchi *et al* (Sekiguchi N *et al*, 2005) dans des études sur des LF de tous grades. De plus, la corrélation entre translocation t(14;18) et marquage CD10+ permet d'expliquer les fréquences conjointement élevées de ces 2 évènements dans notre groupe de LF3b. Nous avons observé également la présence de 10 cas sans translocation t(14 ;18) et cependant bcl2+ en immunohistochimie. Un tel marquage en l'absence de réarrangement du gène n'est pas surprenant puisque des mécanismes de surexpression de *bcl2* autres que la translocation t(14 ;18) ont été décrits (cf chapitre « Immunohistochimie », p28).

Un réarrangement *bcl6* a été observé dans 31,5% de nos 54 lymphomes. Cette fréquence est en accord avec celles rapportées dans la littérature pour les LF de grade 3 (tableau 11). Notre groupe de LF3a présente ce réarrangement dans 16,2% des cas, ce qui est très légèrement inférieur aux fréquences habituellement rapportées. Cette anomalie cytogénétique est observée dans 64,7% de notre groupe de LF3b, un taux plus élevé que celui habituellement rencontré dans les études déjà publiées. Comme nous le faisons remarquer pour la fréquence de la translocation t(14 ;18), cet écart ne peut être expliqué par des différences techniques, ces études ayant également quasiment toutes utilisé la FISH. Le taux de réarrangement *bcl6* significativement supérieur dans notre groupe de LF3b par rapport à notre groupe de LF3a (p=0,001) constitue un des résultats essentiels de notre étude. Cette différence est également constatée par Ott *et al* (Ott G *et al*, 2002) (44% vs 18%), mais sans significativité. Dans cette étude allemande, tous les LF3b présentant un réarrangement *bcl6* possèdent une composante de LBDGC. Il en est de même dans l'étude menée par Katzenberger (Katzenberger T *et al*, 2004), dans laquelle une différence significative est observée

seulement si les groupes comparés étaient les LF3a et les LF3b avec composante de LBDGC. Cette différence est également significative dans notre série où l'on notera d'ailleurs que tous les LF3b avec composante de LBDGC présentent un réarrangement *bcl6* mais qu'à la différence de ces 2 dernières études, les LF3b réarrangés en *bcl6* ne présentent pas tous de composante de LBDGC. Au contraire, les études de Guo *et al* (Guo Y *et al*, 2005) et Lee *et al* (Lee D *et al*, 2008) montrent des fréquences de réarrangement *bcl6* très proches dans les LF3a et LF3b. Notre étude est donc la seule, à notre connaissance, à montrer une association significative entre LF3b avec ou sans composante de LBDGC et réarrangement *bcl6*. La présence ou non d'une composante de LBDGC n'influence d'ailleurs pas la fréquence de ce réarrangement dans chacun des groupes LF3a et LF3b.

Tableau 11 : Comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature concernant le réarrangement *bcl6*.

Etude	technique	réarrangement <i>bcl6</i>			
		LF de grade 3	LF3a	LF3b	3a vs 3b
Notre série	FISH	31,5% (n=54)	16,2% (n=37)	64,7% (n=17)	p=0,001
Ott, 2002	CC	33,3% (n=26)	18% (n=26)	44% (n=15)	ns
Guo, 2005	FISH	52% (n=39)	32% (n=25)	36% (n=14)	ns
Lee, 2007	FISH	21,8% (n=35)	19% (n=24)	27,3% (n=11)	ns

Etude	technique	LF de grade 3	LF3a	LF3b + LBDGC	3a vs 3b+ LBDGC
Notre série	FISH	31,5% (n=54)	16,2% (n=37)	100% (p=3)	p=0,008
Katzenberger, 2004	FISH, CC	31% (n=50)	17% (n=23)	55% (n=22)	p<0,001

CC : Cytogénétique conventionnelle
 ns : non significatif.

Deux équipes (Bosga-Bouwer *AG et al*, 2003 ; Diaz-Alderete A *et al*, 2008) montrent que dans les LF3b (respectivement 32 et 8 cas), la translocation t(14 ;18) et le réarrangement *bcl6* sont mutuellement exclusifs. Nos résultats ne confirment pas ces données puisque 29,4% de nos LF3b possèdent ce double réarrangement. Les autres LF3b se répartissent équitablement dans les groupes avec réarrangement *bcl2* / sans réarrangement *bcl6* et sans réarrangement *bcl2*/

avec réarrangement *bcl6*. Au moins l'une de ces anomalies cytogénétiques est donc toujours présente dans nos LF3b, contrairement à ceux des études de Lee *et al* (Lee D *et al*, 2008) et Diaz-Alderete *et al* (Diaz-Alderete A *et al*, 2008) dont respectivement 37,5 et 50% ne présentent ni translocation t(14 ;18), ni réarrangement *bcl6*. Tout comme notre étude, celle menée par Lee (Lee D *et al*, 2008) rapporte des cas de LF possédant le double réarrangement *bcl2/bcl6* (sans précision de grade histologique) mais observe tout de même que les réarrangements *bcl6* sont plus fréquents dans les cas sans translocation t(14 ;18) (25,9% vs 7,7%, différence non significative).

Dans notre série, 3 cas possèdent **à la fois une translocation t(14 ;18) et un réarrangement de c-MYC**. Il s'agit de 2 LF3b ayant également un réarrangement *bcl6* et 1 LF3a sans réarrangement *bcl6*. Plusieurs études ont montré que l'association des réarrangements *bcl2* et c-MYC est de très mauvais pronostic. Une étude de Le Gouill *et al* à propos de 16 LBDGC possédant ce double réarrangement rapporte la présence de caractéristiques d'agressivité (ECOG performance status et LDH élevés, fréquents symptômes B, stades IV et score d'IPI 3) ainsi qu'une survie sans progression et une survie globale respectivement de 4 et 5 mois malgré un traitement par chimiothérapie intensive. Dans cette série, 1 patient a des antécédents de LF et 1 autre présente à la fois 1 LBDGC et 1 LF. Quatre lymphomes possèdent également un réarrangement *bcl6* (Le Gouill *et al*, 2007). Une étude de Macpherson *et al* à propos de 13 LBDGC rapporte des résultats similaires. Dans cette étude, 6 cas sont des LF transformés (Macpherson N *et al*, 1999). Kanungo *et al* montrent eux aussi le mauvais pronostic de lymphomes possédant le double réarrangement *bcl2* / c-MYC sur une série de 14 cas sans LF ou antécédents de LF (Kanungo A *et al*, 2006). Récemment, Christie *et al* ont rapporté 3 cas de LF possédant ce double réarrangement et identifiés par les auteurs comme appartenant à un sous-groupe particulièrement agressif de LF (Christie L *et al*, 2008). Le caractère agressif de ces lymphomes s'explique par le double mécanisme de lymphomagenèse que représente le réarrangement de *bcl2* qui augmente la durée de vie des cellules et le réarrangement de c-MYC qui stimule la prolifération cellulaire.

En conclusion, nos résultats tendent donc à montrer une différence biologique entre les LF3a et les LF3b, cette différence étant essentiellement basée sur une fréquence de réarrangement *bcl6* significativement plus importante dans ce dernier groupe. L'anomalie cytogénétique prépondérante dans nos LF3a est la translocation t(14 ;18) (70% des cas contre seulement 16,2% de réarrangements *bcl6*), cette constatation étant également celle de toutes

les études déjà publiées. Au contraire, le réarrangement *bcl2* n'est pas l'anomalie génétique la plus fréquente dans notre groupe de LF3b puisque sa fréquence est la même que celle du réarrangement *bcl6* (64,7%). Cette différence entre nos 2 sous-groupes de LF suggère l'existence de 2 voies d'oncogenèse au sein des LF de grade 3 : l'une concernerait les LF3a et serait basée, comme pour les LF de grades 1 et 2, sur le réarrangement *bcl2* ; l'autre concernerait les LF3b et impliquerait au moins en partie le réarrangement *bcl6*. La fréquence de ce dernier réarrangement dans les LBDGC (20 à 30%) a conduit certains auteurs à suggérer que l'oncogenèse d'une large proportion de LF3b était très proche de celle des LBDGC (Bosga-Bouwer AG *et al*, 2003) voire même que les LF3b n'étaient pas *stricto sensu* des LF mais plutôt une variante nodulaire de LBDGC (Ott G *et al*, 2002). Nos résultats nuancent cependant ces hypothèses. En effet, alors que la plupart des études montrent que le réarrangement *bcl6* est l'anomalie cytogénétique prépondérante dans les LF3b (Ott G *et al*, 2002 ; Katzenberger T *et al*, 2004 ; Lee D *et al*, 2007 ; Diaz-Alderete A *et al*, 2008), nous observons, dans ce groupe, un taux de translocation t(14 ;18) identique à celui du réarrangement *bcl6*, soit plus élevé que celui habituellement rapporté. Ces résultats suggèrent que les LF3b partageraient au moins en partie la même voie d'oncogenèse que le reste des LF, tout en possédant le plus souvent une anomalie cytogénétique supplémentaire : le réarrangement *bcl6*. Une étude récente de Piccaluga *et al* appuie cette hypothèse que les LF3b sont finalement plus proches des autres LF que des LBDGC. Cette étude compare les profils d'expression génique (354 gènes étudiés) d'un groupe de 37 LF de tous grades (dont 4 LF3b sans composante de LBDGC) et d'autres lymphomes, dont 16 LBDGC. Les résultats de ce travail montrent que le profil d'expression génique des LF3b est plus proche de celui des LF de grades 1, 2 et 3a que de celui des LBDGC. Piccaluga *et al* montrent également que le profil d'expression génique des LF3a est plus proche de celui des LF de grades 1 et 2 que de celui des LF3b, isolant ce dernier groupe sur le plan génétique (Piccaluga PP *et al*, 2008). Ces résultats font écho aux différences biologiques constatées entre les LF3a et les LF3b dans notre étude. Depuis la classification REAL et encore actuellement dans celle de l'OMS, la génétique est partie prenante de la nosologie des lymphomes. Selon ces critères, les LF de grade 3 apparaissent donc comme une entité hétérogène.

Si l'on considère que le réarrangement *bcl6* est un évènement supplémentaire dans les LF3b par rapport aux autres LF, il serait intéressant de savoir si, dans des cas de progression de LF de bas grade vers un LF3b, cette anomalie cytogénétique apparaît avec le grade 3b ou si elle existe dès le LF de moindre grade. Pour tenter de répondre à cette question, la détermination du profil cytogénétique de LF de grade inférieur antérieurement diagnostiqués

chez certains de nos patients serait utile. Il s'agit des patients suivants: patient 7 : actuel LF3a avec double réarrangement *bcl2/bcl6* et antécédent de LF de bas grade en 1996 ; patient 23 : actuel LF3a sans réarrangement *bcl2* / avec réarrangement *bcl6* et antécédent de LF de bas grade ; patient 38 : actuel LF3b avec double réarrangement *bcl2/bcl6* et antécédent de LF3a ; patient 54 : actuel LF3b avec double réarrangement *bcl2/bcl6* et antécédent de LF de grade 2/3a. Ces travaux sont en cours.

Annexe :

Classification OMS 2001 des néoplasies dérivant des lymphocytes B.
--

A partir des précurseurs des cellules B

- Leucémie / lymphome des cellules précurseurs B

A partir des cellules B matures

- Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire
- Leucémie à prolymphocytes B
- Lymphome lymphoplasmocytaire
- Lymphome splénique de la zone marginale
- Leucémie à tricholeucocytes
- Myélome
- Plasmocytome solitaire des os
- Plasmocytome extra-osseux
- Lymphome du MALT
- Lymphome ganglionnaire de la zone marginale
- Lymphome folliculaire**
- Lymphome du manteau
- Lymphome B diffus à grandes cellules
- Lymphome B diffus à grandes cellules du médiastin
- Lymphome B à grandes cellules intravasculaire
- Lymphome des séreuses
- Lymphome de Burkitt

Abréviations

LF : Lymphomes folliculaires

LF3a : Lymphomes folliculaires de grade 3a

LF3b : Lymphomes folliculaires de grade 3b

LBDGC : Lymphomes B diffus à grandes cellules

LMNH : Lymphomes malins non Hodgkiniens

IP : Index de prolifération

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization

PCR : Polymerase Chain Reaction

Ac : Anticorps

ns : Non significatif

Références bibliographiques

[1] A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's lymphoma Classification Project. *Blood* 1997; 89 : 3909-3917.

[2] A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329 : 987-994.

[3] National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer*. 1982 ; 10 :2112-35.

[4] The world health organization classification of malignant lymphomas in japan: incidence of recently recognized entities. Lymphoma Study Group of Japanese Pathologists. *Pathol Int*. 2000; 9 : 696-702.

Adachi M, Cossman J, Longo D, Croce CM, Tsujimoto Y. Variant translocation of the bcl-2 gene to immunoglobulin lambda light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 2771-4.

Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N, Ohno H, Yamabe H, Fukuhara S, Okuma M. Refinement of the BCL2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. *Genes Chromosom Cancer* 1998; 21:17-29.

Akasaka T, Ueda C, Kurata M, Akasaka H, Yamabe H, Uchiyama T, Ohno H. Nonimmunoglobulin (non-Ig)/BCL6 gene fusion in diffuse large B-cell lymphoma results in worse prognosis than Ig/BCL6. *Blood* 2000; 8 : 2907-9.

Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood* 2003; 4 : 1443-1448.

Akasaka H, Akasaka T, Kurata M, Ueda C, Shimizu A, Uchiyama T, Ohno H. Molecular anatomy of BCL-6 translocations revealed by long-distance polymerase chain reaction-based assay. *Cancer Res* 2000; 60: 2335-2341.

Akerman M, Brandt L, Johnson A, Olsson H. Mitotic activity in non-Hodgkin's lymphoma. Relation to the Kiel classification and to prognosis. *Br J Cancer*. 1987 ; Feb; 2 : 219-23.

Albinger -Hegy A, Hochreutener B, Abdou MT, Hegyi I, Dours-Zimmermann MT, Kurrer MO, Heitz PU, Zimmerman DR. High frequency of t(14;18) translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas. *Am J Pathol* 2002; 160 : 823-832.

Almasri NM, Iturraspe JA, Braylan RC. CD10 expression in follicular lymphoma and large cell lymphoma is different from that of reactive lymph node follicles. *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122 : 539-544.

Alpár D, Hermes J, Póto L, László R, Kereskai L, Jáksó P, Pajor G, Pajor L, Kajtár B. Automated FISH analysis using dual-fusion and break-apart probes on paraffin-embedded tissue sections. *Cytometry A.* 2008; 7 : 651-7.

Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, Lopez C, Jaén J, Bosch R, Pons LE. Immunohistochemical patterns of reactive microenvironment are associated with clinicobiologic behavior in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol.* 2006; 34 : 5350-7.

Amakawa R, Fukuhara S, Ohno H, Doi S, Oguma S, Tanabe S, Yamabe H, Edamura S, Tomono N, Nasu K, et al. Involvement of bcl-2 gene in Japanese follicular lymphoma. *Blood.* 1989; 3 : 787-91.

Anderson JR, Vose JM, Bierman PJ, Weisenberger DD, Sanger WG, Pierson J, Bast M, Armitage JO. Clinical features and prognosis of follicular large-cell lymphoma: a report from the Nebraska Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol.* 1993 ; 2 : 218-24.

Arber DA, Weiss LM. CD10: a review. *Appl Immunohistochem.* 1997; 5:125-140.

Armitage JO, Sanger WG, Weisenburger DD et al. Correlation of secondary cytogenetic abnormalities with histologic appearance in non-Hodgkin's lymphomas bearing t(14; 18) (q32; q21). *J Natl Cancer Inst* 1988; 8 : 576–580.

Aster JC, Longtine JA. Detection of BCL2 rearrangements in follicular lymphoma. *Am J Pathol.* 2002; 3 : 759-63.

Aubele M, Zitzelsberger H, Szucs S, Werner M, Braselmann H, Hutzler P, Rodenacker K, Lehmann L, Minkus G, Hofler H: Comparative FISH analysis of numerical chromosome 7 abnormalities in 5-micron and 15-micron paraffin-embedded tissue sections from prostatic carcinoma. *Histochem Cell Biol* 1997; 107:121–126.

Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES, et al. Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am J Surg Pathol.* 1992; 7 : 637-40.

Baron BW, Nucifora G, McCabe N, Espinosa R III, Le Beau MM, McKeithan TW. Identification of the gene associated with the recurring chromosomal translocations t(3;14)(q27;q32) and t(3;22)(q27;q11) in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90 : 5262.

Barrans SL, Evans PA, O'Connor SJ, Owen RG, Morgan GJ, Jack AS. The detection of t(14;18) in archival lymph nodes: development of a fluorescence in situ hybridization (FISH)-based method and evaluation by comparison with polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2003; 5 : 168 - 75.

Bartlett NL, Rizeq M, Dorfman RF, Halpern J, Horning SJ. Follicular large-cell lymphoma: intermediate or low grade? *J Clin Oncol.* 1994;12 :1349-1357.

Barry TS, Jaffe ES, Kingma DW, Martin AW, Sorbara L, Raffeld M, Pittaluga S. CD5+ follicular lymphoma: a clinicopathologic study of three cases. *Am J Clin Pathol.* 2002; 4 : 589-98.

Bastard C, Tilly H, Lenormand B, Bigorgne C, Boulet D, Kunlin A, Monconduit M, Piguët H. Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1992 ; 10 : 2527-31.

Bastard C, Deweindt C, Kerckaert JP, Lenormand B, Rossi A, Pezzella F, Fruchart C, Duval C, Monconduit M, Tilly H. LAZ3 rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with histology, immunophenotype, karyotype, and clinical outcome in 217 patients. *Blood* 1994; 83: 2423-2427.

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.* 1991 ; Suppl 2:123-9.

Bastion Y, Coiffier B. Is the the international pronostic index for aggressive lymphoma patients usefull for follicular lymphoma patients ? *J Clin Oncol* 1994 ; 12 : 1340-2.

Bastion Y, Sebban C, Berger F, Felman P, Salles G, Dumontet C, Bryon PA, Coiffier B. Incidence, predictive factors, and outcome of lymphoma transformation in follicular lymphoma patients. *J Clin Oncol.* 1997; 4 : 1587-94.

Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res.* 1980; 2 : 485-90.

Becker E. Ein beitrage zur lehre von den lymphomen. *Deutsche Medizinische Wchnschrift* 1917; 27: 726–728.

Beishuizen A, Verhoeven MA, Mol EJ, Breit TM, Wolvers-Tettero ILM, van Dongen JJM. Detection of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Southern blot analysis: recommendations for optimal results. *Leukemia* 1993; 7: 2045–2053.

Belada D, Smolej L, Stepánková P, Beránek M, Dvoráková D, Bukac J, Malý J. [Achieving Bcl-2/IgH negativity in peripheral blood/bone marrow after therapy implies better prognosis for patients with follicular lymphoma] *Vnitr Lek.* 2007; 10 : 1057-63.

Belaud-Rotureau MA, Parrens M, Carrere N, Turmo M, Ferrer J, de Mascarel A, Dubus P, Merlio JP. Interphase fluorescence in situ hybridization is more sensitive than BIOMED-2 polymerase chain reaction protocol in detecting IGH-BCL2 rearrangement in both fixed and frozen lymph node with follicular lymphoma. *Hum Pathol.* 2007; 2 : 365-72.

Ben-Ezra J, Burke JS, Swartz WG, Brownell MD, Brynes RK, Hill LR, Nathwani BN, Oken MM, Wolf BC, Woodruff R, et al. Small lymphocytic lymphoma: a clinicopathologic analysis of 268 cases. *Blood.* 1989; 2 : 579-87.

Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ. Molecular pathways in follicular lymphoma. *Leukemia.* 2007; 1 : 18-29.

Bennett MH, Millett YL. Nodular sclerotic lymphosarcoma: a possible new clinico-pathological entity. *Clin Radiol.* 1969; 3 : 339-43.

Bernell P, Jacobsson B, Liliemark J, Hjalmar V, Arvidsson I, Hast R. Gain of chromosome 7 marks the progression from indolent to aggressive follicle centre lymphoma and is a common finding in patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by FISH. *Br J Haematol* 1998;101 : 487-91.

Biagi JJ, Seymour JF. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood.* 2002; Jun 15; 12 : 4265-75.

Bilalovic N, Blystad AK, Golouh R, Nesland JM, Selak I, Trinh D, Torlakovic E. Expression of bcl-6 and CD10 protein is associated with longer overall survival and time to treatment failure in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2004; 1 : 34-42.

Bishu S, Quigley JM, Bishu SR, Olsasky SM, Stem RA, Shostrom VK, Holdeman KP, Paknikar S, Armitage JO, Hankins JH. Predictive value and diagnostic accuracy of F-18-fluoro-deoxy-glucose positron emission tomography treated grade 1 and 2 follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2007; 8 : 1548-55.

Brill NE, Baehr G & Rosenthal N. Generalised giant lymph follicle hyperplasia of lymph nodes and spleen. A hitherto undescribed type. *Journal of American Medical Association* 1925; 2: 668-671.

Bloomfield CD, Arthur DC, Frizzera G, Levine EG, Peterson BA, Gajl-Peczalska KJ. Nonrandom chromosome abnormalities in lymphoma. *Cancer Res.* 1983; 6 : 2975-84.

Bohen SP, Troyanskaya OG, Alter O, Warnke R, Botstein D, Brown PO, Levy R. Variation in gene expression patterns in follicular lymphoma and the response to rituximab. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 ; 4 : 1926-30.

Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, van der Veen A, Haralambieva E, van den Berg A, de Jong B, Krause V, Palmer MC, Coupland R, Kluin PM, van den Berg E, Poppema S. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. *Blood.* 2003 ; 3 : 1149-54.

Bosga-Bouwer AG, Haralambieva E, Booman M, Boonstra R, van den Berg A, Schuurin E, van den Berg E, Kluin P, Poppema S. BCL6 alternative translocation breakpoint cluster region associated with follicular lymphoma grade 3B. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005; 3 : 301-4.

Brice P, Bastion Y, Lepage E, Brousse N, Haioun C, Moreau P, Straetmans N, Tilly H, Tabah I, Solal-Céligny P. 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 ; 3 : 1110-7.

Buchonnet G, Jardin F, Jean N, Bertrand P, Parmentier F, Tison S, Lepretre S, Contentin N, Lenain P, Stamatoullas-Bastard A, Tilly H, Bastard C. Distribution of BCL2 breakpoints in

follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease? *Leukemia*. 2002; 9 : 1852-6.

Butler MP, Iida S, Capello D, Rossi D, Rao PH, Nallasivam P, Louie DC, Chaganti S, Au T, Gascoyne RD, Gaidano G, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Alternative translocation breakpoint cluster region 5' to BCL-6 in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*. 2002; 14 : 4089-94.

Callanan MB, Le Baccon P, Mossuz P, Duley S, Bastard C, Hamoudi R, Dyer MJ, Klobeck G, Rimokh R, Sotto JJ, Leroux D. The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 1 : 309-14.

Cameron DA, Leonard RC, Mao JH, Prescott RJ. Identification of prognostic groups in follicular lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Leuk Lymphoma*. 1993 ; 10: 89-99.

Capello D, Vitolo U, Pasqualucci L, Quattrone S, Migliaretti G, Fassone L, Ariatti C, Vivenza D, Gloghini A, Pastore C, Lanza C, Nomdedeu J, Botto B, Freilone R, Buonaiuto D, Zagonel V, Gallo E, Palestro G, Saglio G, Dalla-Favera R, Carbone A, Gaidano G. Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia. *Blood*. 2000; 2 : 651-9.

Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood*. 2006 ; 9 : 2957-64.

Castellani R, Bonadonna G, Spinelli P, Bajetta E, Galante E, Rike F. Sequential pathologic staging of untreated non-Hodgkin's lymphomas by laparoscopy and laparotomy combined with marrow biopsy. *Cancer*. 1977; 5 : 2322-8.

Catovsky D, Pittman S, Lewis D, Pearse E. Marker chromosome 14q+ in follicular lymphoma in transformation. *Lancet* 1977; 29:934.

Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood*. 1995; 1 : 45-53.

Cattoretti G, Pasqualucci L, Ballon G, Tam W, Nandula SV, Shen Q, Mo T, Murty VV, Dalla-Favera R. Deregulated BCL6 expression recapitulates the pathogenesis of human diffuse large B cell lymphomas in mice. *Cancer Cell*. 2005 ; 5 : 445-55.

Chabner BA, Johnson RE, Young RC, Canellos GP, Hubbard SP, Johnson SK, DeVita VT. Sequential nonsurgical and surgical staging of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer*. 1978; 42(2 Suppl):922-5.

Chan JK, Ng CS, Tung S. Multilobated B-cell lymphoma, a variant of centroblastic lymphoma. Report of four cases. *Histopathology*. 1986; 6 : 601-12.

Chan JK, Ng CS, Hui PK. An unusual morphological variant of follicular lymphoma. Report of two cases. *Histopathology*. 1988; 6 : 649-58.

Chan JK, Ng CS, Hui PK. Follicular immunoblastic lymphoma: neoplastic counterpart of the intrafollicular immunoblast? *Pathology*. 1990; 2 :103-5.

Chang CC, Cleveland RP, Perkins SL. CD10 expression and survival. *Am J Surg Pathol*. 2002;117: 660-664.

Chang CC, Ye BH, Chaganti RS, Dalla-Favera R. BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 14 : 6947-52.

Chang KL, Arber DA, Shibata D, Rappaport H, Weiss LM. Follicular small lymphocytic lymphoma. *Am J Surg Pathol*. 1994; 10 : 999-1009.

Chau I, Jones R, Cunningham D, Wotherspoon A, Maisey N, Norman AR, Jain P, Bishop L, Horwich A, Catovsky D. Outcome of follicular lymphoma grade 3: is anthracycline necessary as front-line therapy? *Br J Cancer*. 2003; 1 : 36-42.

Chen PM, Lin SH, Seto M, Chao SC, Chiou TJ, Hsieh RK, Lin CZ, Fan S, Tzeng CH, Ueda R, et al. Rearrangement of bcl-2 genes in malignant lymphomas in Chinese patients. *Cancer*. 1993; 12 : 3701-6.

Chen W, Butler M, Rao PH, Chaganti SR, Louie DC, Dalla-Favera R, Chaganti RS. The t(2;3)(q21;q27) translocation in non-Hodgkin's lymphoma displays BCL6 mutations in the 5' regulatory region and chromosomal breakpoints distant from the gene. *Oncogene*. 1998; 13 : 1717-22.

Chen W, Palanisamy N, Schmidt H, Teruya-Feldstein J, Jhanwar SC, Zelenetz AD, Houldsworth J, Chaganti RS. Deregulation of FCGR2B expression by 1q21 rearrangements in follicular lymphomas. *Oncogene*. 2001 ; 52 : 7686-93.

Chen-Levy Z, Nourse J, Cleary ML. The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Mol Cell Biol*. 1989 2 : 701-10.

Chittal SM, Caverivière P, Voigt JJ, Dumont J, Benévent B, Fauré P, Bordessoule GD, Delsol G. Follicular lymphoma with abundant PAS-positive extracellular material. Immunohistochemical and ultrastructural observations. *Am J Surg Pathol*. 1987; 8 : 618-24.

Chleq-Deschamps CM, LeBrun DP, Huie P, Besnier DP, Warnke RA, Sibley RK, Cleary ML. Topographical dissociation of BCL-2 messenger RNA and protein expression in human lymphoid tissues. *Blood*. 1993; 2 : 293-8.

Christie L, Kernohan N, Levison D, Sales M, Cunningham J, Gillespie K, Batstone P, Meiklejohn D, Goodlad J. C-MYC translocation in t(14;18) positive follicular lymphoma at presentation: An adverse prognostic indicator? *Leuk Lymphoma*. 2008; 3 : 470-6.

Chuang SS, Hsieh PP, Lu CL, Wang YH, Fu TY, Tseng HH. A clinicopathologic and molecular study of follicular lymphoma in Taiwan. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2006; 4 : 314-8.

Cleary ML, Galili N, Sklar J. Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphomas. *J Exp Med* 1986 (a); 164: 315-320.

Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell*. 1986 (b); 1 :19-28.

Coller BS, Chabner BA, Gralnick HR. Frequencies and patterns of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma : observations of bilateral biopsies. *Am J Hematol* 1977; 3 : 105-19

Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*. 2002; 9 : 3376-82.

Cook JR. Paraffin section interphase fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and classification of non-Hodgkin lymphomas. *Diagn Mol Pathol* 2004 (a); 13:197–206.

Cook JR, Shekhter-Levin S, Swerdlow SH. Utility of routine classical cytogenetic studies in the evaluation of suspected lymphomas: results of 279 consecutive lymph node/extranodal tissue biopsies. *Am J Clin Pathol* 2004 (b);121: 826- 35.

Cullen MH, Lister TA, Brearley RL, Shand WS, Stansfeld AG: Histologic transformation of non-Hodgkin's lymphoma. A prospective study. *Cancer* 1979; 44: 645.

Czuczman MS, Weaver R, Alkuzweny B, Berlfein J, Grillo-López AJ. Prolonged clinical and molecular remission in patients with low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma treated with rituximab plus CHOP chemotherapy: 9-year follow-up. *J Clin Oncol*. 2004; 23 : 4711-6.

D'Alessandro I, Zitzelsberger H, Hutzler P, Lehmann L, Braselmann H, Chimenti S, Hofler H. Numerical aberrations of chromosome 7 detected in 15 microns paraffin-embedded tissue sections of primary cutaneous melanomas by fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *J Cutan Pathol* 1997; 24:70–75.

Dabski K, Banks PM, Winkelmann RK. Clinicopathologic spectrum of cutaneous manifestations in systemic follicular lymphoma. A study of 11 patients. *Cancer*. 1989; 7 : 1480-5.

Damaj G, Verkarre V, Delmer A, Solal-Celigny P, Yakoub-Agha I, Cellier C, Maurschhauser F, Bouabdallah R, Leblond V, Lefrère F, Bouscary D, Audouin J, Coiffier B, Varet B, Molina T, Brousse N, Hermine O. Primary follicular lymphoma of the gastrointestinal tract: a study of 25 cases and a literature review. *Ann Oncol*. 2003; 4 : 623-9.

Davies AJ, Lee AM, Taylor C, Clear AJ, Goff LK, Iqbal S, Cuthbert-Heavens D, Calaminici M, Norton AJ, Lister TA, Fitzgibbon J. A limited role for TP53 mutation in the

transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2005; 8 : 1459-65.

Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, Fisher RI, Braziel RM, Rimsza LM, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Greiner TC, Weisenburger DD, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Smeland EB, Kvaloy S, Holte H, Delabie J, Connors JM, Lansdorp PM, Ouyang Q, Lister TA, Davies AJ, Norton AJ, Muller-Hermelink HK, Ott G, Campo E, Montserrat E, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Yang L, Powell J, Zhao H, Goldschmidt N, Chiorazzi M, Staudt LM. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004; 21 : 2159-69.

De Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM. Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N Engl J Med* 1988; 318 :1373–8.

Decaudin D, Lepage E, Brousse N, Brice P, Harousseau JL, Belhadj K, Tilly H, Michaux L, Chèze S, Coiffier B, Solal-Céligny P. Low-grade stage III-IV follicular lymphoma: multivariate analysis of prognostic factors in 484 patients--a study of the groupe d'Etude des lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol*. 1999; 8 : 2499-505.

Deghiedy H, Fouda M, Shahin D, Shamaa S, El-Bedewy A, Abd El-Ghaffar H. Diagnostic and prognostic utility of t(14;18) in follicular lymphoma. *Acta Haematol*. 2007; 4 : 231-6.

Dent AL, Vasanwala FH, Toney LM. Regulation of gene expression by the proto-oncogene bcl-6. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002; 41:1-9.

Díaz-Alderete A, Doval A, Camacho F, Verde L, Sabin P, Arranz-Sáez R, Bellas C, Corbacho C, Gil J, Perez-Martín M, Ruiz-Marcellán M, Gonzalez L, Montalbán C, Piris M, Menarguez J. Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: relation with histological and clinical features. *Leuk Lymphoma*. 2008 ; 1 : 95-101.

Dirks W, Nolte M, Werner M, Jager K, Koch C, Drexler HG. Preservation of functional and regulatory domains of expressed bcl-2 genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1996; 10 : 150-158.

Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2000; 6 : 846-52.

Dolken G, Illerhaus G, Hirt C, Mertelsmann R. BCL-2/JH rearrangements in circulating B cells of healthy blood donors and patients with nonmalignant diseases. *J. Clin. Oncol*. 1996; 14:1333–1344.

Einerson RR, Kurtin PJ, Dayharsh GA, Kimlinger TK, Remstein ED. FISH is superior to PCR in detecting t(14;18)(q32;q21)-IgH/bcl-2 in follicular lymphoma using paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 421- 9.

Elenitoba-Johnson KS, Gascoyne RD, Lim MS, Chhanabai M, Jaffe ES, Raffeld M. Homozygous deletions at chromosome 9p21 involving p16 and p15 are associated with histologic progression in follicle center lymphoma. *Blood*. 1998 ; 12 : 4677-85.

Ellmeier W, Aguzzi A, Kleiner E, Kurzbauer R, Weith A. Mutually exclusive expression of a helix-loop-helix gene and N-myc in human neuroblastomas and in normal development. *EMBO J* 1992;11:2563–71.

Enomoto H, Ozaki T, Takahashi E, Nomura N, Tabata S, Takahashi H, et al. Identification of human DAN gene, mapping to the putative neuroblastoma tumor suppressor locus. *Oncogene* 1994;9:2785–91.

Ersbøll J, Schultz HB, Pedersen-Bjergaard J, Nissen NI. Follicular low-grade non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome with or without tumor progression. *Eur J Haematol.* 1989; 2:155-63.

Eshoa C, Perkins S, Kampalath B, et al. Decreased CD10 expression in grade III and in interfollicular infiltrates of follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 2001;115:862-867.

Evans PA, Pott Ch, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, Garcia JF, van Krieken JH, Pals S, Kluin P, Schuurin E, Spaargaren M, Boone E, González D, Martinez B, Villuendas R, Gameiro P, Diss TC, Mills K, Morgan GJ, Carter GI, Milner BJ, Pearson D, Hummel M, Jung W, Ott M, Canioni D, Beldjord K, Bastard C, Delfau-Larue MH, van Dongen JJ, Molina TJ, Cabeçadas J. Significantly improved PCR-based clonality testing in B-cell malignancies by use of multiple immunoglobulin gene targets. Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia.* 2007; 2:207-14.

Ezdinli EZ, Costello WG, Kucuk O, Berard CW. Effect of the degree of nodularity on the survival of patients with nodular lymphomas. *J Clin Oncol.* 1987; 3:413-8.

Falini B, Fizzotti M, Pucciarini A, Bigerna B, Marafioti T, Gambacorta M, Pacini R, Alunni C, Natali-Tanci L, Ugolini B, Sebastiani C, Cattoretti G, Pileri S, Dalla-Favera R, Stein H. A monoclonal antibody (MUM1p) detects expression of the MUM1/IRF4 protein in a subset of germinal center B cells, plasma cells, and activated T cells. *Blood.* 2000; 6:2084-92.

Fang JM, Finn WG, Hussong JW, Goolsby CL, Cubbon AR, Variakojis D. CD10 antigen expression correlates with the t(14;18)(q32;q21) major breakpoint region in diffuse large B-cell lymphoma. *Mod Pathol.* 1999 ; 3:295-300.

Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* 1992;359:554–6.

Farinha P, Masoudi H, Skinnider BF, 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; 106:2169-2174.

Fisher RI, LeBlanc M, Press OW, Maloney DG, Unger JM, Miller TP. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2005;23:8447-8452.

Flenghi L, Ye BH, Fizzotti M, Bigerna B, Cattoretti G, Venturi S, Pacini R, Pileri S, Lo Coco F, Pescarmona E, et al. A specific monoclonal antibody (PG-B6) detects expression of the BCL-6 protein in germinal center B cells. *Am J Pathol.* 1995; 2:405-11.

Flenghi L, Bigerna B, Fizzotti M, Venturi S, Pasqualucci L, Pileri S, Ye BH, Gambacorta M, Pacini R, Baroni CD, Pescarmona E, Anagnostopoulos I, Stein H, Asdrubali G, Martelli MF, Pelicci PG, Dalla-Favera R, Falini B. Monoclonal antibodies PG-B6a and PG-B6p recognize, respectively, a highly conserved and a formol-resistant epitope on the human BCL-6 protein amino-terminal region. *Am J Pathol.* 1996 ; 5:1543-55.

Freedman AS. Biology and management of histologic transformation of indolent lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2005;314-20.

Frizzera G, Gajl-Peczalska K, Sibley RK, Rosai J, Cherwitz D, Hurd DD. Rosette formation in malignant lymphoma. *Am J Pathol.* 1985; 3:351-6.

Fukuhara S, Rowley JD. Chromosome 14 translocations in non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer.* 1978; 1:14-21.

Gaidano G, Hauptschein RS, Parsa NZ, Offit K, Rao PH, Lenoir G, Knowles DM, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Deletions involving two distinct regions of 6q in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 1992 ; 7:1781-7.

Gall EA, Mallory TB. Malignant lymphoma: a clinicopathological survey of 618 cases. *American Journal of Pathology* 1942; 18: 381–415.

Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE, Stansfeld AG, Richards MA, Dhaliwal HS, Malpas JS, Lister TA. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol.* 1986; 10:1470-80.

Ganti AK, Weisenburger DD, Smith LM, Hans CP, Bociek RG, Bierman PJ, Vose JM, Armitage JO. Patients with grade 3 follicular lymphoma have prolonged relapse-free survival following anthracycline-based chemotherapy: the Nebraska Lymphoma Study Group Experience. *Ann Oncol.* 2006; 6:920-7.

Gao J, Erickson P, Gardiner K, Le Beau MM, Diaz MO, Patterson D, Rowley JD, Drabkin HA: Isolation of yeast artificial chromosome spanning the 8;21 translocation breakpoint t(8;21)(q22;q22.3) in acute myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:4882.

Garvin AJ, Simon RM, Osborne CK, Merrill J, Young RC, Berard CW: An autopsy study of histologic progression in non- Hodgkin's lymphomas: 192 cases from the National Cancer Institute. *Cancer* 1983; 52:393.

Gascoyne RD, Argatoff L, James G, Klasa R, Wilson K, Connors JM et Horsman DE. The prognostic significance of cytogenetic abnormalities in follicular lymphomas (FL). *Modern Pathology* 1997; 10, 126a.

Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, Brousse N, Gisselbrecht C, Solal-Celigny P, Diebold J, Mason DY. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *Am J Pathol.* 1992; 5:1089-95.

Gauwerky CE, Haluska FG, Tsujimoto Y, Nowell PC, Croce CM. Evolution of B-cell malignancy: pre-B-cell leukemia resulting from MYC activation in a B-cell neoplasm with a rearranged BCL2 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:8548–52.

Gelb AB, Rouse RV, Dorfman RF, Warnke RA. Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B-lineage non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 1994 6:825-34.

Gerard-Marchant R, Hamelin I, Lennert K et coll, Classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 1974; 406-408.

Gine E, Montoto S, Bosch F, Arenillas L, Mercadal S, Villamor N, Martinez A, Colomo L, Campo E, Montserrat E & Lopez-Guillermo A. The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) and the histological subtype are the most important factors to predict histological transformation in follicular lymphoma *Annals of Oncology* 2006; 17: 1539–1545.

Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, Witteveen AT, Kibbelaar RE, Velds A, Wessels LF, Joosten P, Kerkhoven RM, Bernards R, van Krieken JH, Kluin PM, van't Veer LJ, de Jong D. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood.* 2005 ; 1:301-7.

Glas AM, Knoops L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, Wessels LA, van Laar R, van Krieken JH, Baars JW, Raemaekers J, Kluin PM, van't Veer LJ, de Jong D. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 2007 ; 4:390-8.

Glass AG, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer.* 1997 ; 12:2311-20.

Glick JH, McFadden E, Costello W, Ezdinli E, Berard CW, Bennett JM. Nodular histiocytic lymphoma: factors influencing prognosis and implications for aggressive chemotherapy. *Cancer.* 1982;49:840-845.

Goates JJ, Kamel OW, LeBrun DP, Benharroch D, Dorfman RF. Floral variant of follicular lymphoma. Immunological and molecular studies support a neoplastic process. *Am J Surg Pathol.* 1994 ; 1:37-47.

Godon A, Moreau A, Talmant P, Baranger-Papot L, Geneviève F, Milpied N, Zandecki M, Avet-Loiseau H. Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients. *Leukemia.* 2003 ; 1:255-9.

Goff LK, Neat MJ, Crawley CR, Jones L, Jones E, Lister TA, Gupta RK. The use of real-time quantitative polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization to identify amplification of the REL gene in follicular lymphoma. *Br J Haematol.* 2000 ; 2:618-25.

Goffinet DR, Warnke R, Dunnick NR, Castellino R, Glatstein E, Nelsen TS, Dorfman RF, Rosenberg SA, Kaplan HS. Clinical and surgical (laparotomy) evaluation of patients with non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treat Rep.* 1977; 6:981-92.

Gospodarowicz MK, Bush RS, Brown TC, Chua T. Prognostic factors in nodular lymphomas: a multivariate analysis based on the Princess Margaret Hospital experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1984; 4:489-97.

Graninger WB, Seto M, Boutain B, Goldman P, Korsmeyer SJ. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest.* 1987; 5:1512-5.

Guo Y, Karube K, Kawano R, Yamaguchi T, Suzumiya J, Huang GS, Ohshima K. Low-grade follicular lymphoma with t(14;18) presents a homogeneous disease entity otherwise the rest comprises minor groups of heterogeneous disease entities with Bcl2 amplification, Bcl6 translocation or other gene aberrances. *Leukemia.* 2005; 6:1058-63.

Guo Y, Karube K, Kawano R, Suzumiya J, Takeshita M, Kikuchi M, Huang GS, Li Q, Ohshima K. Bcl2-negative follicular lymphomas frequently have Bcl6 translocation and/or Bcl6 or p53 expression. *Pathol Int.* 2007 ; 3:148-52.

Hans CP, Weisenburger DD, Vose JM, Hock LM, Lynch JC, Aoun P, Greiner TC, Chan WC, Bociek RG, Bierman PJ, Armitage JO. A significant diffuse component predicts for inferior survival in grade 3 follicular lymphoma, but cytologic subtypes do not predict survival. *Blood.* 2003; 6:2363-7.

Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 1994; 8:2095-7.

Hall PA, Richards MA, Gregory WM, d'Ardenne AJ, Lister TA, Stansfeld AG. The prognostic value of Ki67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *J Pathol.* 1988; 3:223-35.

Haralambieva E, Kleiverda K, Mason DY, Schuurin E, Kluin PM: Detection of three common translocation breakpoints in non-Hodgkin's lymphomas by fluorescence in situ hybridization on routine paraffin-embedded tissue sections. *J Pathol* 2002; 198:163–170.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994; 5:1361-92.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the haematopoietic and lymphoid tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Histopathology.* 2000 1:69-86

Hatzivassiliou G, Miller I, Takizawa J, Palanisamy N, Rao PH, Iida S, Tagawa S, Taniwaki M, Russo J, Neri A, Cattoretti G, Clynes R, Mendelsohn C, Chaganti RS, Dalla-Favera R. IRTA1 and IRTA2, novel immunoglobulin superfamily receptors expressed in B cells and involved in chromosome 1q21 abnormalities in B cell malignancy. *Immunity.* 2001; 3:277-89.

Hauptschein RS, Gaidano G, Rao PH, Scotto L, Edwards YH, Chaganti RS, Dalla-Favera R. An apparent interlocus gene conversion-like event at a putative tumor suppressor gene locus on human chromosome 6q27 in a Burkitt's lymphoma cell line. *DNA Res.* 2000 ; 4:261-72.

Herrinton LJ, Friedman GD. Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin's lymphoma subtypes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 1:25-8.

Hirose Y, Masaki Y, Ozaki M: Fluorescence in situ hybridization detection of chromosome IGH/BCL2 translocations from paraffinembedded tissue: evaluation in follicular lymphoma. *Int J Hematol* 2003; 78:154–159

Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*. 1990; 6299:334-6.

Holte H, de Lange Davies C, Beiske K, Stokke T, Marton PF, Smeland EB, Høie J, Kvaløy S. Ki67 and 4F2 antigen expression as well as DNA synthesis predict survival at relapse/tumour progression in low-grade B-cell lymphoma. *Int J Cancer*. 1989; 6:975-80.

Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984;311:1471-5.

Horning SJ, Weiss LM, Nevitt JB, Warnke RA. Clinical and pathologic features of follicular large cell (nodular histiocytic) lymphoma. *Cancer*. 1987;59:1470-1474

Horning SJ. Natural history of and therapy for the indolent non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol*. 1993;20:75-88.

Horning SJ. Follicular lymphoma: Have we made any progress? *Ann Oncol* 2000; 11:23-27.

Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14; 18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol*. 1995; 4:472-8.

Horsman DE, Connors JM, Pantzar T, Gascoyne RD. Analysis of secondary chromosomal alterations in 165 cases of follicular lymphoma with t(14;18). *Genes Chromosom Cancer* 2001;30:375– 82.

Horsman DE, Okamoto I, Ludkovski O, Le N, Harder L, Gesk S, Siebert R, Chhanabhai M, Sehn L, Connors JM, Gascoyne RD. Follicular lymphoma lacking the t(14;18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol*. 2003; 3:424-33.

Hough RE, Goepel JR, Alcock HE, Hancock BW, Lorigan PC, Hammond DW. Copy number gain at 12q12-14 may be important in the transformation from follicular lymphoma to diffuse large B cell lymphoma. *Br J Cancer*. 2001 ; 4:499-503.

Houldsworth J, Mathew S, Rao PH, Dyomina K, Louie DC, Parsa N, Offit K, Chaganti RS. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood*. 1996 ; 1:25-9.

Ida S, Rao PH, Ueda R, Chaganti RS, Dalla- Favera R. Chromosomal rearrangement of the PAX-5 locus in lymphoplasmacytic lymphoma with t(9;14) (p13;q32). *Leuk Lymphoma* 1999;34:25-33.

Intragumtornchai T, Wannakraij P, Chaimongkol B, Bhoopat L, Lekhakula A, Thamprasit T, Suwanwela N, Suthipinthawong C, Prayoonwiwat W, Meekungwal P, Sirijerachai C,

Pairojkul C. Non-Hodgkin's lymphomas in Thailand. A retrospective pathologic and clinical analysis of 1391 cases. *Cancer*. 1996; 8:1813-9.

Joachim HL, Finbeiner JA. Pseudonodular pattern of T-cell lymphoma. *Cancer*. 1980 ; 6:1370-8.

Isaacson PG, Wotherspoon AC, Diss T, Pan LX. Follicular colonization in B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *Am J Surg Pathol*. 1991; 9:819-28.

Jaffe ES, Shevach EM, Frank MM, Berard CW, Green I. Nodular lymphoma--evidence for origin from follicular B lymphocytes. *N Engl J Med*. 1974; 15:813-9.

Jaffe ES, Shevach EM, Frank MM, Berard CW, Green I. Nodular lymphoma--evidence for origin from follicular B lymphocytes. *N Engl J Med*. 1974; 15:813-9.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman J, eds. *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; World Health Organization Classification of Tumours; vol 3, 2001.

Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36:211–223.

Jardin F, Gaulard P, Buchonnet G, Contentin N, Leprêtre S, Lenain P, Stamatoullas A, Picquenot JM, Duval C, Parmentier F, Tilly H, Bastard C. Follicular lymphoma without t(14;18) and with BCL-6 rearrangement: a lymphoma subtype with distinct pathological, molecular and clinical characteristics. *Leukemia*. 2002 (a) ; 11:2309-17.

Jardin F, Buchonnet G, Parmentier F, Contentin N, Leprêtre S, Lenain P, Picquenot JM, Laberge S, Bertrand P, Stamatoullas A, D'Anjou J, Tilly H, Bastard C. Follicle center lymphoma is associated with significantly elevated levels of BCL-6 expression among lymphoma subtypes, independent of chromosome 3q27 rearrangements. *Leukemia*. 2002 (b) ; 11:2318-25.

Jardin F, Bastard C, Contentin N, Parmentier F, Picquenot JM, Tilly H, Stevenson FK, Sahota SS. Intronic BCL-6 mutations are preferentially targeted to the translocated allele in t(3;14)(q27;q32) non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Blood*. 2003; 5:1872-6.

Jerkeman M, Aman P, Cavallin-Stahl E, Torlakovic E, Akerman M, Mitelman F, Fioretos T. Prognostic implications of BCL6 rearrangement in uniformly treated patients with diffuse large B-cell lymphoma – a Nordic Lymphoma Group study. *Int J Oncol* 2002; 20: 161-165.

Joensuu H, Pykkänen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol*. 1994; 5:1191-8.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Cytogenetic evolution patterns in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1995;86:3905–14.

Johnson PW, Price CG, Smith T, Cotter FE, Meerabux J, Rohatiner AZ, Young BD, Lister TA. Detection of cells bearing the t(14;18) translocation following myeloablative treatment

and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J Clin Oncol.* 1994 ; 4:798-805.

Johnson PW, Swinbank K, MacLennan S, et al. Variability of polymerase chain reaction detection of the bcl-2-IgH translocation in an international multicentre study. *Ann Oncol* 1999;10:1349-54.

Jones SE, Fuks Z, Bull M et al. Non-Hodgkin's lymphomas. IV. Clinicopathologic correlation in 405 cases. *Cancer* 1973; 31: 806–823

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell.* 1997 ; 4:809-19.

Kantarjian HM, McLaughlin P, Fuller LM, Dixon DO, Osborne BM, Cabanillas FF. Follicular large cell lymphoma: analysis and prognostic factors in 62 patients. *J Clin Oncol.* 1984;2:811-819

Kanungo A, Medeiros LJ, Abruzzo LV, Lin P. Lymphoid neoplasms associated with concurrent t(14;18) and 8q24/c-MYC translocation generally have a poor prognosis. *Mod Pathol.* 2006; 1:25-33.

Karsan A, Gascoyne RD, Coupland RW, Shepherd JD, Phillips GL, Horsman DE. Combination of t(14;18) and a Burkitt's type translocation in B-cell malignancies. *Leuk Lymphoma.* 1993; 6:433-41.

Karube K, Guo Y, Suzumiya J, Sugita Y, Nomura Y, Yamamoto K, Shimizu K, Yoshida S, Komatani H, Takeshita M, Kikuchi M, Nakamura N, Takasu O, Arakawa F, Tagawa H, Seto M, Ohshima K. CD10-MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. *Blood.* 2007; 7:3076-9.

Katzenberger T, Ott G, Klein T, Kalla J, Müller-Hermelink HK, Ott MM. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. *Am J Pathol.* 2004; 2:481-90.

Kearney L, Watkins PC, Young BD, Sacchi N: DNA sequences of chromosome 21-specific YAC detect the t(8;21) breakpoint of acute myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;57: 109.

Kearney L, Bower M, Gibbons B, Das S, Chaplin T, Nacheva E, Chessells JM, Reeves B, Riley JH, Lister TA. Chromosome 1 lq23 translocations in both infant and adult acute leukemias are detected by in situ hybridization with a yeast artificial chromosome. *Blood* 1992 ; 80: 1659-1665.

Keith TA, Cousar JB, Glick AD, Vogler LB, Collins RD. Plasmacytic differentiation in follicular center cell (FCC) lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 1985 ; 3:283-90.

Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, Quief S, Lecocq G, Bastard C. LAZ3, a novel zinc-finger encoding gene, is disrupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nat Genet.* 1993 ; 1:66-70.

Kim H, Dorfman RF. Morphological studies of 84 untreated patients subjected to laparotomy for the staging of non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer.* 1974; 3:657-74.

Kim H, Dorfman RF, Rosenberg SA. Pathology of malignant lymphomas in the liver : application in staging. In : Popper H, Schaffner H, eds. *Progress in liver diseases* New York : Grune and Stratton, 1976.

Kim H, Hendrickson R, Dorfman RF. Composite lymphoma. *Cancer.* 1977; 3:959-76.

Kim H, Dorfman RF, Rappaport H. Signet ring cell lymphoma. A rare morphologic and functional expression of nodular (follicular) lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 1978; 2:119-32.

Klapper W, Hoster E, Rölver L, Schrader C, Janssen D, Tiemann M, Bernd HW, Determann O, Hansmann ML, Möller P, Feller A, Stein H, Wacker HH, Dreyling M, Unterhalt M, Hiddemann W, Ott G; German Low Grade Lymphoma Study Group. Tumor sclerosis but not cell proliferation or malignancy grade is a prognostic marker in advanced-stage follicular lymphoma: the German Low Grade Lymphoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2007; Aug 22:3330-6.

Knutsen T. Cytogenetic changes in the progression of lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 1998; 1-2:1-19.

Kojima M, Nakamura S, Motoori T, Kurabayashi Y, Hosomura Y, Itoh H, Yoshida K, Suzuki R, Seto M, Koshikawa T, Suchi T, Joshita T. Centroblastic and centroblastic-centrocytic lymphomas associated with prominent epithelioid granulomatous response without plasma cell differentiation: a clinicopathologic study of 12 cases. *Hum Pathol.* 1996; 7:660-7.

Kojima M, Nakamura S, Ichimura K, Suzuki R, Kagami Y, Kondo E, Motoori T, Hosomura Y, Oyama T, Itoh H, Ban S, Yoshida K, Ohno Y, Shimizu K, Masawa N, Sugihara S. Centroblastic and centroblastic/centrocytic lymphoma associated with a prominent epithelioid granulomatous response: a clinicopathologic study of 50 cases. *Mod Pathol.* 2002; 7:750-8.

Kojima M, Nakamura S, Murase T, Motoori T, Murayama K, Iijima M, Itoh H, Sakata N, Masawa N. Follicular colonization of nodal marginal-zone B-cell lymphoma resembling follicular lymphoma: report of 6 cases. *Int J Surg Pathol.* 2005; 1:73-8.

Koster A, Tromp HA, Raemaekers JM, Borm GF, Hebeda K, Mackenzie MA, van Krieken JH. The prognostic significance of the intra-follicular tumor cell proliferative rate in follicular lymphoma. *Haematologica.* 2007; 2:184-90.

Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, de Jong D, Maartense E, Schuurin E, Kluin PM. Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1998; 92: 3152-3162.

Krishnadasan R, Bifulco C, Kim J, Rodov S, Zieske AW, Vanasse GJ. Overexpression of SOCS3 is associated with decreased survival in a cohort of patients with de novo follicular lymphoma. *Br J Haematol.* 2006; 1:72-5.

Kristoffersson U, Heim S, Olsson H, Akerman M, Mitelman F. Cytogenetic studies in non-Hodgkin lymphomas--results from surgical biopsies. *Hereditas.* 1986; 1:1-13.

Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 1999; 20:1520-9.

Lahti JM, Valentine M, Xiang J, Jones B, Amann J, Grenet J, Richmond G, Look AT, Kidd VJ. Alterations in the PITSLRE protein kinase gene complex on chromosome 1p36 in childhood neuroblastoma. *Nat Genet.* 1994 ; 3:370-5.

Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM. Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. *Mod Pathol.* 1998 ; 9:864-9.

Lai R, Weiss LM, Chang KL, Arber DA. Frequency of CD43 expression in non-Hodgkin lymphoma. A survey of 742 cases and further characterization of rare CD43+ follicular lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 1999 ; 4:488-94.

Le Guill S, Talmant P, Touzeau C, Moreau A, Garand R, Juge-Morineau N, Gaillard F, Gastinne T, Milpied N, Moreau P, Harousseau JL, Avet-Loiseau H. The clinical presentation and prognosis of diffuse large B-cell lymphoma with t(14;18) and 8q24/c-MYC rearrangement. *Haematologica.* 2007; 10:1335-42.

LeBien TW, McCormack RT. The common acute lymphoblastic leukaemia antigen (CD10): emancipation from functional enigma. *Blood.* 1989;73:625-635.

Lee AM, Clear AJ, Calaminici M, Davies AJ, Jordan S, MacDougall F, Matthews J, Norton AJ, Gribben JG, Lister TA, Goff LK. Number of CD4+ cells and location of forkhead box protein P3-positive cells in diagnostic follicular lymphoma tissue microarrays correlates with outcome. *J Clin Oncol.* 2006 ; 31:5052-9.

Lee D, Seo J, Oh Y, Kim J, Ko Y. Analysis of follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch.* 2008; 1:75-81.

Lengauer C, Riethman HC, Speicher MR, Taniwaki M, Konecki D, Green ED, Becher R, Olson MV, Cremer T. Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2. *Cancer Res* 1992;52:2590.

Lennert K, Morhi N, Kaiserling E et coll, Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Berlin, Heidelberg; Springer-Verlag, 1978.

Lennert K, Feller AC. Histopathology of non-Hodgkin's lymphoma. (Based on the updated Kiel classification). 2nd ed. Berlin; Springer-Verlag, 1992.

Leonard RC, Hayward RL, Prescott RJ, Wang JX. The identification of discrete prognostic groups in low grade non-Hodgkin's lymphoma. The Scotland and Newcastle Lymphoma Group Therapy Working Party. *Ann Oncol.* 1991; 9:655-62.

Leroux D, Monteil M, Sotto JJ, Jacob MC, Le Marc'Hadour F, Bonnefoi H, Jalbert P. Variant t(2;18) translocation in a follicular lymphoma. *Br J Haematol.* 1990 ; 2:290-2.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997; 3:323-31.

Levy R, Warnke R, Dorfman RF, Haimovich J. The monoclonality of human B-cell lymphomas. *J Exp Med.* 1977; 4:1014-28.

Levy R, Levy S, Cleary ML, Carroll W, Kon S, Bird J, Sklar J. Somatic mutation in human B-cell tumors. *Immunol Rev.* 1987; 96:43-58.

Li JY, Gaillard F, Moreau A, Harousseau JL, Laboisie C, Milpied N, Bataille R, Avet-Loiseau H. Detection of translocation t(11;14)(q13; q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* 1999; 154:1449–1452.

Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, Schuurin E, Kluin PM. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood.* 1995; 9:2528-36.

Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8910–8914.

Liu Q, Fayad L, Cabanillas F, Hagemester FB, Ayers GD, Hess M, Romaguera J, Rodriguez MA, Tsimberidou AM, Verstovsek S, Younes A, Pro B, Lee MS, Ayala A, McLaughlin P. Improvement of overall and failure-free survival in stage IV follicular lymphoma: 25 years of treatment experience at The University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. *J Clin Oncol.* 2006 ; 10:1582-9.

Llanos M, Alvarez-Argüelles H, Alemán R, Oramas J, Diaz-Flores L, Batista N. Prognostic significance of Ki-67 nuclear proliferative antigen, bcl-2 protein, and p53 expression in follicular and diffuse large B-cell lymphoma. *Med Oncol.* 2001; 1:15-22.

Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1994; 83:1757–1759.

Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. *Blood* 1993;82:2289–95.

Loke SL, Pittaluga S, Srivastava G, Raffeld M, Ho FC. Translocation of bcl-2 gene in non-Hodgkin's lymphomas in Hong Kong Chinese. *Br J Haematol.* 1990; 1:65-9.

Longo DL. What's the deal with follicular lymphomas? *J Clin Oncol* 1993; 11: 202–208.

López-Guillermo A, Montserrat E, Bosch F, Terol MJ, Campo E, Rozman C. Applicability of the International Index for aggressive lymphomas to patients with low-grade lymphoma. *J Clin Oncol*. 1994; 7:1343-8.

López-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, Smith T, Hagemester F, Rodríguez MA, Romaguera JE, Younes A, Sarris AH, Preti HA, Pugh W, Lee MS. The clinical significance of molecular response in indolent follicular lymphomas. *Blood*. 1998; 8:2955-60.

López-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, McLaughlin P, Smith T, Pugh W, Hagemester F, Rodríguez MA, Romaguera JE, Younes A, Sarris AH, Preti HA, Lee MS. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood*. 1999 ; 9:3081-7.

López-Guillermo A, Cabanillas F, McLaughlin P, Smith T, Hagemester F, Rodríguez MA, Romaguera JE, Younes A, Sarris AH, Preti HA, Pugh W, Lee MS. Molecular response assessed by PCR is the most important factor predicting failure-free survival in indolent follicular lymphoma: update of the MDACC series. *Ann Oncol*. 2000;11 Suppl 1:137-40.

Lossos IS, Levy R. Higher grade transformation of follicular lymphoma: phenotypic tumor progression associated with diverse genetic lesions. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 191–202.

Lossos IS. Higher-grade transformation of follicular lymphoma - a continuous enigma. *Leukemia*. 2005; 8:1331-3.

Lukes RJ, Collins RD. Lukes-Collins classification and its significance. *Cancer Treat Rep* 1977;61 : 971-9.

McCann K, Sahota SS, Stevenson FK, Ottensmeier CH. Idiotypic gene rescue in follicular lymphoma. *Methods Mol Med*. 2005;115:145-71.

McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature* 1991;349:254–6.

Macintyre E, Willerford D, Morris SW. Non-Hodgkin's Lymphoma: molecular features of B Cell Lymphoma. Education Program Book of the American Society of Hematology, American Society of Hematology: San Francisco, 2000.

Macpherson N, Lesack D, Klasa R, Horsman D, Connors JM, Barnett M, Gascoyne RD. Small noncleaved, non-Burkitt's (Burkitt-Like) lymphoma: cytogenetics predict outcome and reflect clinical presentation. *J Clin Oncol*. 1999; 5:1558-67.

Mann RB, Berard CW. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematol Oncol*. 1983 ; 2:187-92

Martin AR, Weisenburger DD, Chan WC, Ruby EI, Anderson JR, Vose JM, Bierman PJ, Bast MA, Daley DT, Armitage JO. Prognostic value of cellular proliferation and histologic grade in follicular lymphoma. *Blood*. 1995; 12:3671-8.

Martin-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res* 2003; 23:1139–1148.

Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Seagraves R, Blesa D, Rubio-Moscardo F, Albertson DG, Garcia-Conde J, Dyer MJ, Levy R, Pinkel D, Lossos IS. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood*. 2003 ; 8:3109-17.

Matsumoto Y, Nomura K, Matsumoto S, Ueda K, Nakao M, Nishida K, Sakabe H, Yokota S, Horiike S, Nakamine H, Nakamura S, Taniwaki M. Detection of t(14;18) in follicular lymphoma by dual-color fluorescence in situ hybridization on paraffin-embedded tissue sections. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004; 1:22-6.

Maurer R, Schmid U, Davies JD, Mahy NJ, Stansfeld AG, Lukes RJ. Lymph-node infarction and malignant lymphoma: a multicentre survey of European, English and American cases. *Histopathology*. 1986; 6:571-88.

Metter GE, Nathwani BN, Burke JS, Winberg CD, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Whitcomb CC, Dixon DO, Miller TP, et al. Morphological subclassification of follicular lymphoma: variability of diagnoses among hematopathologists, a collaborative study between the Repository Center and Pathology Panel for Lymphoma Clinical Studies. *J Clin Oncol*. 1985 ; 1:25-38.

Miettinen M, Lasota J: Polymerase chain reaction-based gene rearrangement studies in the diagnosis of follicular lymphoma: performance in formaldehyde-fixed tissue and application in clinical problem cases. *Pathol Res Pract* 1997; 193:9-19.

Migliazza A, Martinotti S, Chen W, et al. Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL-6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:12,520.

Miller TP, Grogan TM, Dahlberg S, Spier CM, Brazier RM, Banks PM, Foucar K, Kjeldsberg CR, Levy N, Nathwani BN, et al. Prognostic significance of the Ki-67-associated proliferative antigen in aggressive non-Hodgkin's lymphomas: a prospective Southwest Oncology Group trial. *Blood*. 1994; 6:1460-6.

Miller TP, LeBlanc M, Grogan TM et al. Follicular lymphomas: do histologic subtypes predict outcome? *Hematol Oncol Clin North Am* 1997; 11: 893–900.

Miller I, Hatzivassiliou G, Cattoretti G, Mendelsohn C, Dalla-Favera R. IRTAs: a new family of immunoglobulinlike receptors differentially expressed in B cells. *Blood* 2002;99:2662–9.

Mitani S, Aoki N, Mizutani S, Fujiwara M, Kitagawa T, Uehara T, Mori S. bcl-2 gene rearrangement analysis of Japanese follicular lymphomas by polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *Jpn J Cancer Res*. 1993; 1:37-41.

Mitelman F, Johansson B, Mertens S. Mitelman database of catalogue of chromosome aberrations in cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>, 2000.

Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994; 6:1799-805.

Miyazato H, Nakatsuka S, Miyanaga I, Hanamoto H, Tatsumi Y, Matsuda M, Maeda Y, Kanamaru A, Aozasa K. Follicular lymphoma in Osaka, Japan: histological features and chronological change. *Int J Hematol* 2002; 76:333–337.

Mohamed AN, Palutke M, Eisenberg L, Al-Katib A. Chromosomal analyses of 52 cases of follicular lymphoma with t(14;18), including blastic/blastoid variant. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001; 1:45-51.

Mollejo M, Menárguez J, Cristóbal E, Algara P, Sánchez-Díaz E, Fraga M, Piris MA. Monocytoid B cells. A comparative clinical pathological study of their distribution in different types of low-grade lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 1994; 11:1131-9.

Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 1997;90:1168–74.

Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, Vinnicombe S, Waters R, Rohatiner AZ, Lister TA. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2007; 17:2426-33.

Mukhopadhyay S, Readling J, Cotter PD, Shrimpton AE, Sidhu JS. Transformation of follicular lymphoma to Burkitt-like lymphoma within a single lymph node. *Hum Pathol*. 2005; 5:571-5.

Müller AM, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol*. 2005; 1:1-12.

Nanjangud G, Rao PH, Teruya-Feldstein J, Donnelly G, Qin J, Mehra S, Jhanwar SC, Zelenetz AD, Chaganti RS. Molecular cytogenetic analysis of follicular lymphoma (FL) provides detailed characterization of chromosomal instability associated with the t(14;18)(q32;q21) positive and negative subsets and histologic progression. *Cytogenet Genome Res*. 2007; 2-4:337-44.

Nathwani BN, Winberg CD, Diamond LW, Bearman RM, Kim H. Morphologic criteria for the differentiation of follicular lymphoma from florid reactive follicular hyperplasia: a study of 80 cases. *Cancer*. 1981; 8:1794-806.

Nathwani BN, Sheibani K, Winberg CD, Burke JS, Rappaport H. Neoplastic B cells with cerebriform nuclei in follicular lymphomas. *Hum Pathol*. 1985; 2:173-80.

Nathwani BN, Metter GE, Miller TP, Burke JS, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Dixon DO, Winberg CD, Whitcomb CC. What should be the morphologic criteria for the subdivision of follicular lymphomas? *Blood*. 1986; 4:837-45.

Nathwani BN, Anderson JR, Armitage JO, Cavalli F, Diebold J, Drachenberg MR, Harris NL, MacLennan KA, Müller-Hermelink HK, Ullrich FA, Weisenburger DD. Clinical

significance of follicular lymphoma with monocytoid B cells. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Hum Pathol.* 1999 ; 3:263-8.

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.* 2001; 7:686-94.

Naresh KN. MUM1 expression dichotomises follicular lymphoma into predominantly, MUM1-negative low-grade and MUM1-positive high-grade subtypes. *Haematologica.* 2007; 2:267-8.

Ngan B, Warnke A, Cleary ML. Variability of immunoglobulin expression in follicular lymphoma. An immunohistologic and molecular genetic study. *Am J Pathol.* 1989 ; 6:1139-44.

Ngan BY, Nourse J, Cleary ML. Detection of chromosomal translocation t(14;18) within the minor cluster region of bcl-2 by polymerase chain reaction and direct genomic sequencing of the enzymatically amplified DNA in follicular lymphomas. *Blood* 1989; 73: 1759-1762.

Nguyen PL, Zukerberg LR, Benedict WF, Harris NL. Immunohistochemical detection of p53, bcl-2, and retinoblastoma proteins in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1996; 5:538-43.

Offit K, Koduru PR, Hollis R, Filippa D, Jhanwar SC, Clarkson BC, Chaganti RS. 18q21 rearrangement in diffuse large cell lymphoma: incidence and clinical significance. *Br J Haematol.* 1989; 2:178-83.

Offit K, Jhanwar SC, Ladanyi M, Filippa DA, Chaganti RS. Cytogenetic analysis of 434 consecutively ascertained specimens of non-Hodgkin's lymphoma: correlations between recurrent aberrations, histology, and exposure to cytotoxic treatment. *Genes Chromosom Cancer* 1991;3:189–201.

Offit K, Parsa NZ, Gaidano G, Filippa DA, Louie D, Pan D, Jhanwar SC, Dalla-Favera R, Chaganti RS. 6q deletions define distinct clinico-pathologic subsets of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 1993 ; 7:2157-62.

Offit K, Lo Coco F, Louie DC, Parsa NZ, Leung D, Portlock C, Ye BH, Lista F, Filippa DA, Rosenbaum A, Ladanyi M, Jhanwar S, Dalla-Favera R, Chaganti RS. Rearrangement of the bcl-6 gene as a prognostic marker in diffuse large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1994; 331: 74-80.

Offit K, Louie DC, Parsa NZ, Roy P, Leung D, Lo Coco F, Zelenetz A, Dalla-Favera R, Chaganti RS. BCL6 gene rearrangement and other cytogenetic abnormalities in diffuse large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1995; 20: 85-89.

Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, Kuroda T, Kazama A, Kanazawa N, Sato K, Kato T, Ota H, Mori S. BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood.* 1995; 1:28-37.

Osborne CK, Norton L, Young RC, Garvin AJ, Simon RM, Berard CW, Hubbard S, DeVita VT Jr. Nodular histiocytic lymphoma: an aggressive nodular lymphoma with potential for prolonged disease-free survival. *Blood*. 1980 ; 1:98-103.

Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES, Raffeld M. Analysis of LAZ3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood*. 1995 ; 10:2877-84.

Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rüdiger T, Wilhelm M, Kalla J, Rosenwald A, Müller JG, Ott MM, Müller-Hermelink HK. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. *Blood*. 2002; 10:3806-12.

Papakonstantinou G, Verbeke C, Hastka J, Bohrer M, Hehlmann R. bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphomas is not associated with bcl-2 gene rearrangements. *Br J Haematol*. 2001;113:383-390.

Pasqualucci L, Migliazza A, Fracchiolla N, William C, Neri A, Baldini L, Chaganti RS, Klein U, Kuppers R, Rajewsky K, Dalla Favera R: BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:11816-11821.

Peh SC, Shaminie J, Tai YC, Tan J, Gan SS. The pattern and frequency of t(14;18) translocation and immunophenotype in Asian follicular lymphoma. *Histopathology* 2004; 45:501-510

Peng HZ, Du MQ, Koulis A, Aiello A, Dogan A, Pan LX, Isaacson PG. Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood*. 1999; 7:2167-72.

Perea G, Altés A, Montoto S, López-Guillermo A, Domingo-Doménech E, Fernández-Sevilla A, Ribera JM, Grau J, Pedro C, Angel Hernández J, Estany C, Briones J, Martino R, Sureda A, Sierra J, Montserrat E. Prognostic indexes in follicular lymphoma: a comparison of different prognostic systems. *Ann Oncol*. 2005; 9:1508-13.

Pezzella F, Gatter KC, Mason DY, Bastard C, Duval C, Krajewski A, Turner GE, Ross FM, Clark H, Jones DB, et al. Bcl-2 protein expression in follicular lymphomas in absence of 14;18 translocation. *Lancet*. 1990; 8729:1510-1.

Pezzella F, Jones M, Ralfkiaer E, Ersbøll J, Gatter KC, Mason DY. Evaluation of bcl-2 protein expression and 14;18 translocation as prognostic markers in follicular lymphoma. *Br J Cancer*. 1992; 1:87-9

Pezzella F, Morrison H, Jones M, Gatter KC, Lane D, Harris AL, Mason DY. Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology*. 1993; 1:39-44.

Piccaluga PP, Califano A, Klein U, Agostinelli C, Bellosillo B, Gimeno E, Serrano S, Solè F, Zang Y, Falini B, Zinzani PL, Pileri SA. Gene expression analysis provides a potential

rationale for revising the histological grading of follicular lymphomas. *Haematologica*. 2008; 7:1033-8.

Pinyol M, Cobo F, Bea S, Jares P, Nayach I, Fernandez PL, Montserrat E, Cardesa A, Campo E. p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*. 1998 ; 8:2977-84.

Phan RT, Dalla-Favera R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*. 2004; 7017:635-9.

Piris M, Gatter KC, Mason DY. CD30 expression in follicular lymphoma. *Histopathology*. 1991; 1:25-9.

Poetsch M, Weber-Matthiesen K, Plendl HJ, Grote W, Schlegelberger B: Detection of the t(14;18) chromosomal translocation by interphase cytogenetics with yeast-artificial-chromosome probes in follicular lymphoma and non-neoplastic lymphoproliferation. *J Clin Oncol* 1996; 14:963-969

Polak JM, McGee JOD. *In situ hybridization*. Oxford: OxfordUniversity Press, 1990.

Pruneri G, Valentini S, Fabris S, Del Curto B, Laszlo D, Bertolini F, Martinelli G, Leocata P, Viale G, Neri A. Cyclin D3 immunoreactivity in follicular lymphoma is independent of the t(6;14)(p21.1;q32.3) translocation or cyclin D3 gene amplification and is correlated with histologic grade and Ki-67 labeling index. *Int J Cancer*. 2004; 1:71-7.

Radojkovic M, Ristic S, Colovic M, Mihaljevic B, Cemerikic-Martinovic V. Predictive value of prognostic indices in patients with follicular lymphomas. *Med Oncol*. 2006; 4:533-42.

Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, Hsieh CL, Lieber MR. A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature*. 2004; 6978:88-93.

Rambaldi A, Lazzari M, Manzoni C, Carlotti E, Arcaini L, Baccarani M, et al. Monitoring of minimal residual disease after CHOP and rituximab in previously untreated patients with follicular lymphoma. *Blood* 2002; 99:856-62.

Rao PH, Houldsworth J, Dyomina K, Parsa NZ, Cigudosa JC, Louie DC, Popplewell L, Offit K, Jhanwar SC, Chaganti RS. Chromosomal and gene amplification in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 1998 ; 1:234-40.

Rappaport H, *Tumors of the hematopoietic system in : Atlas of tumor pathology, section III, fasc.8*. Washington DCUS Armed Institute of Pathlogy, 1966.

Ray S, Craig FE, Swerdlow SH. Abnormal patterns of antigenic expression of follicular lymphoma: a flow cytometric study. *Am J Clin Pathol* 2005; 124:576–583.

Reichard KK, Hall BK, Corn A, Foucar MK, Hozier J. Automated analysis of fluorescence in situ hybridization on fixed, paraffinembedded whole tissue sections in B-cell lymphoma. *Mod Pathol* 2006;19:1027- 33.

Remstein ED, Kurtin PJ, Buno I, Bailey RJ, Proffitt J, Wyatt WA, Hanson CA, Dewald GW. Diagnostic utility of fluorescence in situ hybridization in mantle-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2000; 110:856– 862.

Richardson ME, Chen QG, Filippa DA, Offit K, Hampton A, Koduru PR, Jhanwar SC, Lieberman PH, Clarkson BD, Chaganti RS. Intermediate- to high-grade histology of lymphomas carrying t(14;18) is associated with additional nonrandom chromosome changes. *Blood*. 1987 ; 2:444-7.

Risdall R, Hoppe RT, Warnke R. Non Hodgkin's lymphoma: a study of the evolution of the disease based upon 92 autopsied cases. *Cancer* 1979; 44:529–42.

Rodriguez J, McLaughlin P, Hagemester FB, Fayad L, Rodriguez MA, Santiago M, Hess M, Romaguera J, Cabanillas F. Follicular large cell lymphoma: an aggressive lymphoma that often presents with favorable prognostic features. *Blood*. 1999 ; 7:2202-7.

Rodriguez J, McLaughlin P, Fayad L, Santiago M, Hess M, Rodriguez MA, Romaguera J, Hagemester F, Kantarjian H, Cabanillas F. Follicular large cell lymphoma: long-term follow-up of 62 patients treated between 1973-1981. *Ann Oncol*. 2000 ; 12:1551-6.

Rodriguez MA, Pugh WC. Mantle cell lymphomas. *Cancer Treat Res*. 1996;85:41-50.

Rohatiner AZ, Lister TA. The clinical course of follicular lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2005; 1:1-10.

Romaguera JE, McLaughlin P, North L, Dixon D, Silvermintz KB, Garnsey LA, Velasquez WS, Hagemester FB, Cabanillas F. Multivariate analysis of prognostic factors in stage IV follicular low-grade lymphoma: a risk model. *J Clin Oncol*. 1991 ; 5:762-9.

Rosas-Uribe A, Variakojis D, Rappaport H. Proteinaceous precipitate in nodular (follicular) lymphomas. *Cancer*. 1973; 3:532-42.

Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, Gascoyne RD, Muller-Hermelink HK, Smeland EB, Giltnane JM, Hurt EM, Zhao H, Averett L, Yang L, Wilson WH, Jaffe ES, Simon R, Klausner RD, Powell J, Duffey PL, Longo DL, Greiner TC, Weisenburger DD, Sanger WG, Dave BJ, Lynch JC, Vose J, Armitage JO, Montserrat E, Lopez-Guillermo A, Grogan TM, Miller TP, LeBlanc M, Ott G, Kvaloy S, Delabie J, Holte H, Krajci P, Stokke T, Staudt LM. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002; 346:1937-1947.

Roulland S, Navarro JM, Grenot P, Milili M, Agopian J, Montpellier B, Gauduchon P, Lebailly P, Schiff C, Nadel B. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2006; 11:2425-31.

Rowley JD. Chromosome studies in the non-Hodgkin's lymphomas: the role of the 14;18 translocation. *J Clin Oncol*. 1988; 5:919-25.

Rowley JD, Diaz MO, Espinosa R 111, Patel YD, van Melle E, Ziemin S, Taillon-Miller P, Lichter P, Evans CA, Kersey JH, Ward DC, Domer PH, Le Beau MM. Mapping chromosome band I q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: Identification of I q23

translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9358.

Ruminy P, Jardin F, Picquenot JM, Gaulard P, Parmentier F, Buchonnet G, Maisonneuve C, Tilly H, Bastard C. Two patterns of chromosomal breakpoint locations on the immunoglobulin heavy-chain locus in B-cell lymphomas with t(3;14)(q27;q32): relevance to histology. *Oncogene*. 2006; 35:4947-54.

Sacchi S, Pozzi S, Marcheselli L, Bari A, Luminari S, Angrilli F, Merli F, Vallisa D, Baldini L, Brugiattelli M; Italian Lymphoma Study Group. Introduction of rituximab in front-line and salvage therapies has improved outcome of advanced-stage follicular lymphoma patients. *Cancer*. 2007 ; 10:2077-82.

Said J. Transformation to aggressive B-cell lymphoma: morphology, immunophenotype, and molecular characteristics. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003; 3:199-205.

Saito B, Shiozawa E, Yamochi-Onizuka T, Adachi D, Nakamaki T, Tomoyasu S, Omine M, Mitsuya T, Takimoto M, Ota H. Efficacy of rituximab plus chemotherapy in follicular lymphoma depends on Ki-67 expression. *Pathol Int*. 2004; 9:667-74.

Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A, Jaffe ES, Raffeld M. PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood* 1998;92: 3410–5.

Salles AG. Clinical Features, prognosis and treatment of follicular lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2007; 216-25.

Sanchez-Izquierdo D, Siebert R, Harder L, Marugan I, Gozzetti A, Price HP, Gesk S, Hernandez-Rivas JM, Benet I, Sole F, Sonoki T, Le Beau MM, Schlegelberger B, Dyer MJ, Garcia-Conde J, Martinez-Climent JA. Detection of translocations affecting the BCL6 locus in B cell non-Hodgkin's lymphoma by interphase fluorescence in situ hybridization. *Leukemia* 2001; 15:1475-1484.

Sander CA, Yano T, Clark HM, Harris C, Longo DL, Jaffe ES, Raffeld M. p53 mutation is associated with progression in follicular lymphomas. *Blood*. 1993; 7:1994-2004.

Schlegelberger B, Zwingers T, Harder L, Nowotny H, Siebert R, Vesely M, Bartels H, Sonnen R, Hopfinger G, Nader A, Ott G, Müller-Hermelink K, Feller A, Heinz R. Clinicopathogenetic significance of chromosomal abnormalities in patients with blastic peripheral B-cell lymphoma. Kiel-Wien-Lymphoma Study Group. *Blood*. 1999; 9:3114-20.

Schmid U, Karow J, Lennert K. Follicular malignant non-Hodgkin's lymphoma with pronounced plasmacytic differentiation: a plasmacytoma-like lymphoma. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1985; 4:473-81.

Schouten HC, Sanger WG, Weisenburger DD, Anderson J, Armitage JO. Chromosomal abnormalities in untreated patients with non-Hodgkin's lymphoma: associations with histology, clinical characteristics, and treatment outcome. The Nebraska Lymphoma Study Group. *Blood*. 1990; 9:1841-7.

Seite P, Hillion J, d'Agay MF, Gaulard P, Cazals D, Badoux F, Berger R, Larsen CJ. BCL2 gene activation and protein expression in follicular lymphoma: a report on 64 cases. *Leukemia* 1993; 7:410–417.

Sekiguchi N, Kobayashi Y, Yokota Y, Kusumoto S, Tanimoto K, Watanabe T, Matsuno Y, Tobinai K. Follicular lymphoma subgrouping by fluorescence in situ hybridization analysis. *Cancer Sci.* 2005; 2:77-82.

Seyfert VL, Allman D, He Y, Staudt LM. Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene.* 1996 ; 11:2331-42.

Shaffer AL, Rosenwald A, Hurt EM, Giltnane JM, Lam LT, Pickeral OK, Staudt LM. Signatures of the immune response. *Immunity* 2001; 15:375-385.

Shaffer AL, Lin KI, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, Giltnane JM, Yang L, Zhao H, Calame K, Staudt LM. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* 2002; 17:51-62.

Shaminie J, Peh SC, Tan MJ. Improvement in the detection rate of t(14;18) translocation on paraffin-embedded tissue: a combination approach using PCR and FISH. *Pathology* 2003; 35:414–421.

Shapiro DN, Sublett JE, Li B, Valentine MB, Morris SW, Noll M. The gene for PAX7, a member of the paired-box-containing genes, is localized on human chromosome arm 1p36. *Genomics* 1993;17:767–9.

Shia J, Teruya-Feldstein J, Pan D, Hegde A, Klimstra DS, Chaganti RS, Qin J, Portlock CS, Filippa DA. Primary follicular lymphoma of the gastrointestinal tract: a clinical and pathologic study of 26 cases. *Am J Surg Pathol.* 2002; 2:216-24.

Shen HM, Peters A, Baron B, Zhu X, Storb U. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 1998; 280:1750-1752.

Siebert R, Gesk S, Harder S, Plötz S, Matthiesen P, Grote W, Schlegelberger B, Jandrig B, Grasmow-Wendler UH, Scherneck S, Rosenwald A, Ott G. Deletions in the long arm of chromosome 10 in lymphomas with t(14;18): a pathogenetic role of the tumor suppressor genes PTEN/MMAC1 and MXI1? *Blood.* 1998 ; 11:4487-9.

Sinicropo FA, Ruan SB, Cleary KR, Stephens LC, Lee JJ, Levin B. bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 1995; 2:237-41.

Skinnider BF, Horsman DE, Dupuis B, Gascoyne RD. Bcl-6 and Bcl-2 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma: correlation with 3q27 and 18q21 chromosomal abnormalities. *Hum Pathol.* 1999; 7:803-8.

Solal-Céligny P, Brousse N, Fermé CH, Gisselbrecht CH, Reyes F, Coiffier B. Lymphomes folliculaires dans Lymphomes-Lymphomes non-Hodgkiniens-Maladie de Hodgkin. 3ème édition. Editions Frison Roche, 1997.

Solal-Céligny P, Lepage E, Brousse N, Tendler CL, Brice P, Haïoun C, Gabarre J, Pignon B, Tertian G, Bouabdallah R, Rossi JF, Doyen C, Coiffier B. Doxorubicin-containing regimen with or without interferon alfa-2b for advanced follicular lymphomas: final analysis of survival and toxicity in the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires 86 Trial. *J Clin Oncol*. 1998; 7:2332-8.

Solal-Céligny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, Au WY, Bellei M, Brice P, Caballero D, Coiffier B, Conde-Garcia E, Doyen C, Federico M, Fisher RI, Garcia-Conde JF, Guglielmi C, Hagenbeek A, Haïoun C, LeBlanc M, Lister AT, Lopez-Guillermo A, McLaughlin P, Milpied N, Morel P, Mounier N, Proctor SJ, Rohatiner A, Smith P, Soubeyran P, Tilly H, Vitolo U, Zinzani PL, Zucca E, Montserrat E. Follicular lymphoma international prognostic index. *Blood*. 2004; 5:1258-65.

Soubeyran P, Eghbali H, Bonichon F, Trojani M, Richaud P, Hoerni B. Low-grade follicular lymphomas: analysis of prognosis in a series of 281 patients. *Eur J Cancer*. 1991; 12:1606-13.

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 2002; 161:1961–1971.

Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, Papadaki T, Afendaki S, Anagnostou D, Loukopoulos D. t(14;18) chromosomal translocation in follicular lymphoma: an event occurring with almost equal frequency both at the D to J(H) and at later stages in the rearrangement process of the immunoglobulin heavy chain gene locus. *Br J Haematol*. 1997; 4:866-72.

Stansfeld AG, Diebold J, Kapanci Y, Kelényi G, Lennert K, Mioduszezowska O, Noel H, Rilke F, Sundstrom C, Van Unnik JAM, Wright DH. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet*. 1988; 8580:292-3.

Stewart ML, Felman IE, Nichols PW, Pagnini-Hill A, Lukes RJ, Levine AM. Large noncleaved follicular center cell lymphoma. Clinical features in 53 patients. *Cancer*. 1986; 2:288-97.

Steward WP, Crowther D, McWilliam LJ, Jones JM, Deakin DP, Todd ID, Blackledge G, Wagstaff J, Scarffe JH, Harris M. Maintenance chlorambucil after CVP in the management of advanced stage, low-grade histologic type non-Hodgkin's lymphoma. A randomized prospective study with an assessment of prognostic factors. *Cancer*. 1988; 3:441-7.

Strasser A, Harris AW, Bath ML, Cory S. Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 1990;348:331–3

Swenson WT, Wooldridge JE, Lynch CF, Forman-Hoffman VL, Chrischilles E, Link BK. Improved survival of follicular lymphoma patients in the United States. *J Clin Oncol*. 2005;23:5019-5026.

Swerdlow SH, Westermann CD, Pelstring RJ, Saboorian MH, Williams ME. Growth fraction in centrocytic and follicular center cell lymphomas: assessment in paraffin sections with a proliferating cell nuclear antigen antibody and morphometric correlates. *Hum Pathol*. 1993 ; 5:540-6.

Symmers D. Giant follicular lymphadenopathy with or without splenomegaly. *Archives of Pathology* 1938; 26: 603–647.

Taji S, Nomura K, Matsumoto Y, Sakabe H, Yoshida N, Mitsufuji S, Nishida K, Horiike S, Nakamura S, Morita M, Taniwaki M. Trisomy 3 may predict a poor response of gastric MALT lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2005; 11:89–93.

Taniwaki M, Matsuda F, Jauch A, Nishida K, Takashima T, Tagawa S, Sugiyama H, Misawa S, Abe T, Kashima K. Detection of 14q32 translocations in B-cell malignancies by in situ hybridization with yeast artificial chromosome clones containing the human IgH gene locus. *Blood* 1994; 83:2962-2969.

Taniwaki M, Nishida K, Ueda Y, Misawa S, Nagai M, Tagawa S, Yamagami T, Sugiyama H, Abe M, Fukuhara S. Interphase and metaphase detection of the breakpoint of 14q32 translocations in B-cell malignancies by double-color fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1995; 85:3223-3228.

Thirumala S, Esposito M, Fuchs A. An unusual variant of composite lymphoma: a short case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 9:1376-8.

Tiesinga JJ, Wu CD, Inghirami G. CD5+ follicle center lymphoma. Immunophenotyping detects a unique subset of "floral" follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2000 ; 6:912-21.

Tilly H, Rossi A, Stamatoullas A, Lenormand B, Bigorgne C, Kunlin A, Monconduit M, Bastard C. Prognostic value of chromosomal abnormalities in follicular lymphoma. *Blood.* 1994; 4:1043-9.

Tominaga K, Yamaguchi Y, Nozawa Y, Abe M, Wakasa H. Proliferation in non-Hodgkin's lymphomas as determined by immunohistochemical double staining for Ki-67. *Hematol Oncol.* 1992 ; 3-4:163-9.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-1443.

Uherova P, Ross CW, Schnitzer B, Singleton TP, Finn WG. The clinical significance of CD10 antigen expression in diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2001; 4:582-8.

Vaandrager JW, Schuurin E, Raap T, Philippon K, Kleiverda K, Kluin P. Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 (a) ; 1:85-94.

Vaandrager JW, Schuurin E, Philippon K, Kluin PM. V(D)J recombinase-mediated transposition of the BCL2 gene to the IGH locus in follicular lymphoma. *Blood.* 2000 (b); 5:1947-52.

van den Tweel JG, Taylor CR, Parker JW, Lukes RJ. Immunoglobulin inclusions in non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Clin Pathol.* 1978; 3:306-13.

van Dongen JJM, Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: basic and technical aspects. *Clin Chim Acta* 1991; 198: 1–91.

van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003 ; 12:2257-317.

Ventura RA, Martin-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, Siebert R. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn*. 2006; 2:141-51.

Viardot A, Möller P, Högel J, Werner K, Mechttersheimer G, Ho AD, Ott G, Barth TF, Siebert R, Gesk S, Schlegelberger B, Döhner H, Bentz M. Clinicopathologic correlations of genomic gains and losses in follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2002 ; 23:4523-30.

Viardot A, Barth TF, Möller P, Döhner H, Bentz M. Cytogenetic evolution of follicular lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2003; 3:183-90.

Vitolo FM, U, Zinzani PL, Chisesi T, Clò V, Bellesi G, Magagnoli M, Liberati M, Boccomini C, Niscola P, Pavone V, Cuneo A, Santini G, Brugiattelli M, Baldini L, Rigacci L, Resegotti L. Prognosis of follicular lymphoma: a predictive model based on a retrospective analysis of 987 cases. *Intergruppo Italiano Linfomi. Blood*. 2000; 3:783-9.

Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S. Oncology hematology. Incorporating geriatric oncology. Follicular lymphomas. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008; 3:248-61.

Wahlin BE, Sander B, Christensson B, Kimby E. CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:388-97.

Waldron JA Jr, Newcomer LN, Katz ME, Cadman E. Sclerosing variants of follicular center cell lymphomas presenting in the retroperitoneum. *Cancer*. 1983; 4:712-20.

Wang M, Vikis HG, Wang Y, Jia D, Wang D, Bierut LJ, Bailey-Wilson JE, Amos CI, Pinney SM, Petersen GM, de Andrade M, Yang P, Wiest JS, Fain PR, Schwartz AG, Gazdar A, Minna J, Gaba C, Rothschild H, Mandal D, Kupert E, Seminara D, Liu Y, Viswanathan A, Govindan R, Anderson MW, You M. Identification of a novel tumor suppressor gene p34 on human chromosome 6q25.1. *Cancer Res*. 2007 ; 1:93-9.

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 ; 11:1490-6.

Warnke RA, Kim H, Fuks Z, Dorfman RF. The coexistence of nodular and diffuse patterns in nodular non-Hodgkin's lymphomas: significance and clinicopathologic correlation. *Cancer*. 1977;40:1229-1233.

Warnke R, Levy R. Immunopathology of follicular lymphomas. A model of B-lymphocyte homing. *N Engl J Med.* 1978 ; 9:481-6.

Warnke RA, Weiss LM, Chan JK, Cleary ML, Dorfman RF. Malignant Lymphoma, Follicular (small cleaved, mixed, and large cell; centroblastic-centrocytic and centroblastic) in Atlas of Tumors Pathology. Tumors of the lymph nodes and spleen. Third series, Fasc 14. Washington DC Armed Forces Institute of Pathology, 1994; pp63-111.
Weinberg OK, Ai WZ, Mariappan MR, Shum C, Levy R, Arber DA. "Minor" BCL2 breakpoints in follicular lymphoma: frequency and correlation with grade and disease presentation in 236 cases. *J Mol Diagn.* 2007; 4:530-7.

Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med.* 1987; 19:1185-9.

Wendum D, Sebban C, Gaulard P, Coiffier B, Tilly H, Cazals D, Boehn A, Casasnovas RO, Bouabdallah R, Jaubert J, Ferrant A, Diebold J, de Mascarel A, Gisselbrecht C. Follicular large-cell lymphoma treated with intensive chemotherapy: an analysis of 89 cases included in the LNH87 trial and comparison with the outcome of diffuse large B-cell lymphoma. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 1997 ; 4:1654-63.

Werner CA, Döhner H, Joos S, Trümper LH, Baudis M, Barth TF, Ott G, Möller P, Lichter P, Bentz M. High-level DNA amplifications are common genetic aberrations in B-cell neoplasms. *Am J Pathol.* 1997 ; 2:335-42.

Whang-Peng J, Knutsen T, Jaffe ES, Steinberg SM, Raffeld M, Zhao WP, Duffey P, Condrón K, Yano T, Longo DL. Sequential analysis of 43 patients with non-Hodgkin's lymphoma: clinical correlations with cytogenetic, histologic, immunophenotyping, and molecular studies. *Blood.* 1995 ; 1:203-16.

White PS, Fujimori M, Marshall HN, Kaufman BA, Brodeur GM. Characterization of the region of consistent deletion within 1p36 in neuroblastomas. *Prog Clin Biol Res* 1993;385:3-9.

Willis TG, Jadayel DM, Coignet LJ, Abdul-Rauf M, Treleaven JG, Catovsky D, Dryer MJ. Rapid molecular cloning of rearrangements of the IGHJ locus using long-distance inverse polymerase chain reaction. *Blood* 1997;90:2456-2464.

Willis TG, Zalcborg IR, Coignet LJ, Wlodarska I, Stul M, Jadayel DM, Bastard C, Treleaven JG, Catovsky D, Silva ML, Dyer MJ. Molecular cloning of translocation t(1;14)(q21;q32) defines a novel gene (BCL9) at chromosome 1q21. *Blood.* 1998; 6:1873-81.

Wlodarska I, Mecucci C, Stul M, Michaux L, Pittaluga S, Hernandez JM, Cassiman JJ, De Wolf-Peeters C, Van den Berghe H. Fluorescence in situ hybridization identifies new chromosomal changes involving 3q27 in non-Hodgkin's lymphomas with BCL6/LAZ3 rearrangement. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995 ; 1:1-7.

Wlodarska I, Nooyen P, Maes B, Martin-Subero JJ, Siebert R, Pauwels P, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A. Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 101:706-710.

Wlodarska I, Stul M, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A. Heterogeneity of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2004 ; 8:965-72.

Yang X, Lee K, Said J, Gong X, Zhang K. Association of Ig/BCL6 translocations with germinal center B lymphocytes in human lymphoid tissues: implications for malignant transformation. *Blood*. 2006; 6:2006-12.

Yano T, Jaffe ES, Longo DL, Raffeld M. MYC rearrangements in histologically progressed follicular lymphomas. *Blood* 1992; 3: 758–767.

Ye BH, Lista F, Lo Coco F, Knowles DM, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science*. 1993; 5134:747-50.

Ye BH, Chaganti S, Chang CC, Niu H, Corradini P, Chaganti RS, Dalla-Favera R. Chromosomal translocations cause deregulated BCL6 expression by promoter substitution in B cell lymphoma. *EMBO J*. 1995; 24:6209-17.

Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, Zhang J, Hawe N, de Waard R, Leung C, Nouri-Shirazi M, Orazi A, Chaganti RS, Rothman P, Stall AM, Pandolfi PP, Dalla-Favera R. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2-type inflammation. *Nat Genet*. 1997 ; 2:161-70.

Ye H, Remstein ED, Bacon CM, Nicholson AG, Dogan A, Du MQ. Chromosomal translocations involving BCL6 in MALT lymphoma. *Haematologica*. 2008; 1:145-6.

Younes A, Pugh W, Goodacre A, Katz R, Rodriguez MA, Hill D, Cabanillas F, Andreeff M. Polysomy of chromosome 12 in 60 patients with non-Hodgkin's lymphoma assessed by fluorescence in situ hybridization: differences between follicular and diffuse large cell lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994 (a); 3:161-7.

Younes A, Jendiroba D, Engel H, Escudier S, Katz R, Rodriguez MA, Hill D, Cabanillas F, Andreeff M. High incidence of monosomy 18 in lymphoid malignancies that have bone marrow and peripheral blood involvement. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994 (b); 1:39-44.

Yuen AR, Kamel OW, Halpern J, Horning SJ. Long-term survival after histologic transformation of low-grade follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 1995; 7:1726-33.

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; 20:1231-6.

Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med* 1987;316:79– 84.

Zhang X, Karnan S, Tagawa H, Suzuki R, Tsuzuki S, Hosokawa Y, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Comparison of genetic aberrations in CD10_ diffused large B-cell lymphoma and

follicular lymphoma by comparative genomic hybridization and tissue-fluorescence in situ hybridization. *Cancer Sci* 2004;95:809–814.

Zinzani PL, Fanti S, Battista G, Tani M, Castellucci P, Stefoni V, Alinari L, Farsad M, Musuraca G, Gabriele A, Marchi E, Nanni C, Canini R, Monetti N, Baccarani M. Predictive role of positron emission tomography (PET) in the outcome of lymphoma patients. *Br J Cancer*. 2004; 5:850-4.

Zinzani PL, Musuraca G, Alinari L, Fanti S, Tani M, Stefoni V, Marchi E, Fina M, Pellegrini C, Castellucci P, Farsad M, Baccarani M. Predictive role of positron emission tomography in the outcome of patients with follicular lymphoma. *Clin Lymphoma Myeloma* 2007; 7 : 291-5.

Zukerberg LR, Medeiros LJ, Ferry JA, Harris NL. Diffuse low-grade B-cell lymphomas. Four clinically distinct subtypes defined by a combination of morphologic and immunophenotypic features. *Am J Clin Pathol*. 1993; 4:373-85.

NOM : LECLAIR

PRENOM : François

Titre de la thèse : ETUDE DE LA TRANSLOCATION t(14 ;18) ET DU REARRANGEMENT *bcl6* DANS LES LYMPHOMES FOLLICULAIRES DE GRADES 3a ET 3b, DEUX ENTITES CYTOGENETIQUEMENT DIFFERENTES ?

Résumé :

L'OMS subdivise les lymphomes folliculaires (LF) en grades 1, 2, 3a (LF3a) et 3b (LF3b). Récemment, de nombreuses études ont montré que les LF de grade 3 présentent une fréquence moindre d'expression de CD10 et *bcl2*, possèdent moins souvent une translocation t(14 ;18) et ont un réarrangement *bcl6* plus fréquent par rapport aux LF de grades 1 et 2. Par contre, les données concernant d'éventuelles différences biologiques entre les LF3a et LF3b sont moins nombreuses et plus controversées. Le but de ce travail est donc de comparer le profil d'expression antigénique (CD10, *bcl2*), l'index de prolifération et le profil cytogénétique (translocation t(14 ;18) et réarrangement *bcl6*) de 37 LF3a et 17 LF3b par immunohistochimie et FISH sur coupes déparaffinées. Nous montrons que l'index de prolifération et la fréquence de réarrangement *bcl6* sont significativement supérieurs dans les LF3b par rapport aux LF3a, sans différence de fréquence de translocation t(14 ;18) ou d'expression de CD10 et *bcl2*. Ces résultats suggèrent l'existence de 2 voies de lymphomagenèse au sein des LF de grade 3, justifiant d'un point de vue biologique leur subdivision en LF3a et LF3b.

Mots clés :

Lymphome folliculaire – grading histologique – FISH – réarrangement *bcl6* – translocation t(14 ;18)