

## Intérêt de l'étude de la clonalité dans les hémopathies lymphoïdes

C. DERRIEUX<sup>1</sup>, A. TRINQUAND<sup>2</sup>, E. MACINTYRE<sup>2</sup>

### RÉSUMÉ

Les hémopathies lymphoïdes matures sont caractérisées par l'accumulation d'un clone lymphocytaire pathologique dans les organes lymphoïdes secondaires, avec ou sans infiltration sanguine et médullaire. La mise en évidence de réarrangements clonaux par *Polymerase Chain Reaction* (PCR) fait partie du diagnostic multidisciplinaire des lymphomes. Son intérêt est multiple : discrimination entre une infiltration lymphocytaire réactionnelle et un lymphome dans les cas de diagnostic difficile, parenté clonale entre deux hémopathies, bilan d'extension d'un lymphome, détermination de l'origine B ou T de la lymphoprolifération, diagnostic des hémopathies T. Le développement de protocoles de PCR adaptés aux fragments d'ADN < 200 paires de bases (pb) permet d'étendre son champ d'application aux tissus inclus en paraffine. Dans les hémopathies lymphoïdes immatures, l'intérêt essentiel de la clonalité lymphoïde est de rechercher des cibles potentielles pour le suivi de la maladie résiduelle. Enfin, le développement récent du séquençage nucléotidique à haut débit ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude de la clonalité lymphoïde.

**MOTS-CLÉS** : clonalité, PCR, réarrangement clonal, immunoglobuline, récepteur T à l'antigène, lymphome, leucémie.

### I. - INTRODUCTION

Les hémopathies lymphoïdes malignes correspondent à l'expansion et à l'accumulation d'une population lymphoïde clonale ayant acquis un avantage prolifératif et de survie, avec ou sans blocage de maturation (hémopathies lymphoïdes aiguës ou chroniques respectivement). Le caractère monoclonal de la lymphoprolifération permet de différencier une population clonale, potentiellement maligne, de populations polyclonales ou oligoclonales réactionnelles. L'évaluation de la clonalité lymphoïde est donc un élément clef du diagnostic multidisciplinaire (clinique, radiologique, anatomopathologique, cytologique, immunologique, et cytogénétique) des hémopathies lymphoïdes. Cependant, son intérêt dépend fortement du caractère aigu ou chronique de la lymphoprolifération.

### II. - LA DÉTERMINATION DE LA CLONALITÉ LYMPHOÏDE : UN OUTIL DIAGNOSTIQUE

Le diagnostic des hémopathies lymphoïdes chroniques est établi après un examen histologique et immunohistochimique à partir d'une biopsie d'un organe infiltré (ganglion, rate, ...). Des analyses complémentaires (cytogénétiques, immunophénotypiques et moléculaires telles que la recherche d'une sur-expression de la cycline D1 ou de la juxtaposition *IGH-BCL2*) permettront de préciser ce diagnostic. Lors d'une infiltration sanguine et/ou médullaire, le diagnostic peut être évoqué à partir de sang et/ou de moelle osseuse, notamment lorsque les patients ne pré-

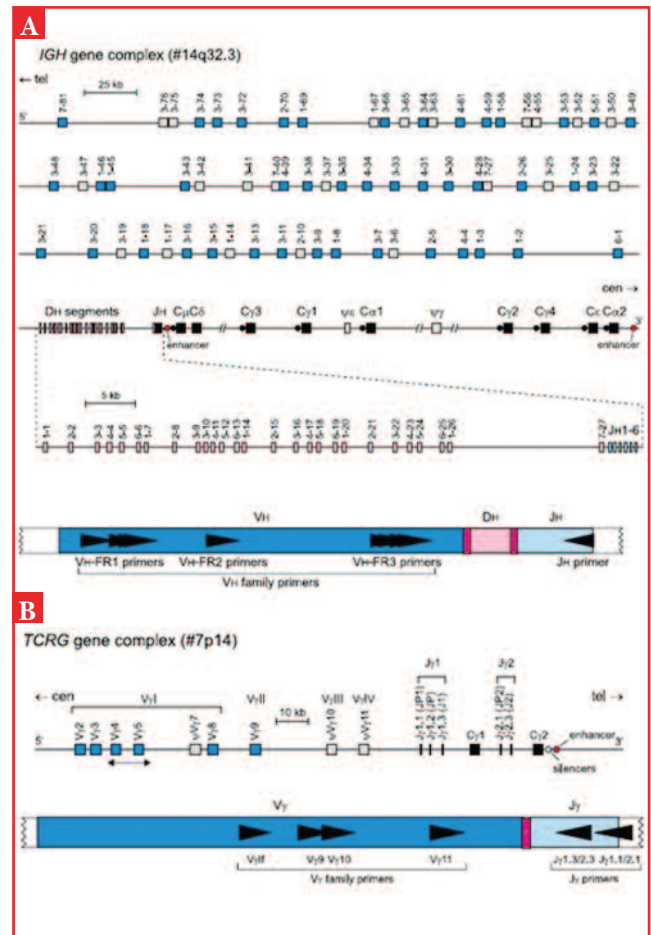
<sup>1</sup> Pôle de Biologie, CHU Pontchaillou, 35000 Rennes.

sentent pas d'organomégalie ou lorsque les adénopathies sont profondes et non biopsiables. En pratique, lorsque les arguments immunohistologiques, cytomorphologiques, phénotypiques et cytogénétiques sont suffisants pour poser un diagnostic de certitude, la mise en évidence de réarrangement(s) clonal(aux) des gènes codant pour les récepteurs à l'antigène, Immunoglobuline (Ig) ou récepteur T à l'antigène (TCR) n'a pas d'intérêt pour confirmer le diagnostic. Dans certains cas, les preuves clinico-biologiques ne sont pas assez fortes pour conclure à une lymphoprolifération maligne et la démonstration du caractère clonal de la population cellulaire est alors nécessaire.

### A) Lymphopoïèse B et étude de la clonalité dans les lymphoproliférations B matures

L'évaluation de la clonalité dans les hémopathies lymphoïdes B matures repose essentiellement sur l'étude des réarrangements du locus *IGH* (situé en 14q32.3). Le gène *IGH* est constitué des segments V (46-52 fonctionnels), D (27 fonctionnels) et J (6 fonctionnels) (1). Lors de la lymphopoïèse primitive « antigène-indépendante », la recombinaison VDJ associe d'abord un segment DH à un segment JH pour combiner ensuite un segment VH au segment DH-JH préalablement formé. Le segment DH et les deux jonctions VH-DH et DH-JH constituent la *complementary-determining region 3* (CDR3), la région la plus variable du réarrangement VDJ (Figure 1). Lorsque le réarrangement VDJ est fonctionnel, la cellule B va produire une chaîne lourde  $\mu$ , puis réarranger ses gènes (V et J) codant pour les chaînes légères (*IGK* situé en 2p11.2, puis *IGL* localisé en 22q11.2) pour enfin exprimer une Ig de surface. Le lymphocyte B, ayant effectué un réarrangement VK-JK fonctionnel (sur l'un des deux allèles), exprimera une chaîne légère  $\kappa$  en surface. Lorsque la recombinaison VK-JK n'a pas produit de réarrangement dans le cadre de lecture, la cellule B délète son locus *IGK* en réarrangeant l'élément Kde (VK-Kde ou intron-Kde) pour poursuivre ensuite sur le locus *IGL*. La production d'un réarrangement VL-JL fonctionnel conduira à l'expression de surface d'une Ig $\lambda$ , tandis qu'un réarrangement non productif (sur les deux allèles), entraînera la mort par apoptose du lymphocyte B (2, 3).

Dans les hémopathies lymphoïdes B chroniques, la recherche d'une clonalité repose en premier lieu sur l'étude du locus *IGH* et de l'amplification par PCR multiplex du CDR3 avec un JH consensus et des amorces VH consensus ou spécifiques des familles qui reconnaissent les régions *Framework* (FR) ou charpente (3 PCR multiplex FR1, FR2 et FR3 d'après BIOMED-2/Groupe *EuroClonality*) (4). Ces PCR ont été mises en place par le groupe *EuroClonality*, consortium européen qui développe de nouveaux systèmes de PCR permettant la détection des réarrangements des gènes des Ig/TCR pour le diagnostic des hémopathies lymphoïdes. Concernant la PCR *IGH*, deux techniques peuvent être utilisées : Heteroduplex (HD) et GeneScan (GS). L'analyse HD consiste en la dénaturation des produits de PCR suivie d'une lente reaturation à basse température et d'une migration électrophorétique de l'ADN



**Fig. 1 - Représentations schématiques des loci humains *IGH* (A) et *TCRG* (B)** (d'après IMGT, the international ImMunoGeneTics information system [www.imgt.org](http://www.imgt.org) et *EuroClonality* (4, 34, 35)).

dans un gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes. La technique GS est une analyse à haute résolution par électrophorèse capillaire. La migration des produits de PCR fluorescents se déroule en conditions dénaturantes dans un séquenceur (5, 6). Les réarrangements polyclonaux ainsi obtenus ont une distribution gaussienne avec des tailles de produits de PCR variables selon l'amorce FR utilisée (310-360 pb pour la PCR FR1, 250-295 pb pour la PCR FR2 et 100-170 pb pour la PCR FR3) (4). Pour la technique GS, la sensibilité de détection d'un réarrangement clonal *IGH* au sein des lymphocytes polyclonaux est d'environ 1 % (*versus* 1-5 % pour la technique HD) (Figure 2). Dans les lymphoproliférations B ayant une origine pré-centre germinatif (CG) (lymphome du manteau, leucémie lymphoïde chronique), un réarrangement clonal du gène *IGH* est décelé dans 100 % des cas. Le passage par le centre germinatif des organes lymphoïdes secondaires est associé à la survenue de mutations somatiques. Ces hypermutations somatiques ont lieu essentiellement dans les parties variables (CDRs) mais peuvent toucher également les régions charpentes (FRs), conduisant à une absence de détection de réarrangement clonal en *IGH* par non fixation des amorces aux FRs (faux négatif

tifs). Ainsi, dans le lymphome folliculaire (origine CG), le lymphome diffus à grandes cellules B (origine CG) et le lymphome de la zone marginale (origine post-CG), la détection d'une population clonale par étude du gène *IGH* est observée respectivement dans 84 %, 79 % et 88 % des cas (7). Les cas non informatifs en *IGH* soulignent donc l'intérêt d'associer la PCR *IGK* à l'étude du locus *IGH* dans les lymphoproliférations B matures. En effet, quelle que soit la chaîne légère exprimée à sa surface, la cellule B gardera la marque génétique de la recombinaison de son locus *IGK*, faisant du gène *IGK* une cible d'étude préférentielle par rapport au gène *IgL*. Ainsi, le groupe européen *EuroClonality* recommande de combiner l'étude des loci *IGH* et *IGK* devant une suspicion de lymphoprolifération B mature, permettant de détecter une population clonale B dans 100 % des cas de lymphome folliculaire, 96 % des cas de lymphome diffus à grandes cellules B et 97 % des cas de lymphome de la zone marginale (7, 8). Devant une suspicion de lymphoprolifération mature, une stratégie simplifiée d'étude de la clonalité adaptée du consortium *EuroClonality* (7), est proposée dans la figure 3.

### B) Lymphopoïèse T et étude de la clonalité dans les lymphoproliférations T matures

Dans la lymphopoïèse T, les réarrangements des gènes du *TCR* aboutissant à l'expression d'un TCR de surface (*TCRαβ* ou *TCRγδ*) sont ordonnés. Le locus  $\delta$  (*TCRD* en 14q11) est le premier réarrangé, puis les loci  $\gamma$  (*TCRG* en 7p14 (Figure 1)),  $\beta$  (*TCRB* en 7q34) et enfin  $\alpha$  (*TCRA* en 14q11) (9). La particularité du locus  $\delta$  est qu'il est enchâssé dans le locus  $\alpha$ . La recombinaison  $\alpha$  entraîne donc la délétion du locus  $\delta$  (10). Ainsi, un lymphocyte T exprimant un *TCRαβ* sur sa membrane aura des gènes  $\gamma$ ,  $\beta$  et  $\alpha$  réarrangés et son locus  $\delta$  délété (au moins un allèle). En revanche, une cellule T ayant à sa surface un *TCRγδ* aura des gènes  $\gamma$  et  $\delta$  réarrangés. Ainsi, même si le lymphocyte T exprime un *TCRαβ* membranaire, celui-ci aura conservé les réarrangements  $\gamma$  dans son génome. De plus, les populations lymphoïdes T malignes maintiennent cette séquence ordonnée des réarrangements, faisant du gène  $\gamma$ , le plus accessible à l'étude de la clonalité T dans les lymphoproliférations T matures.

D'après BIOMED-2, l'étude du locus *TCRG* implique la réalisation de deux PCR multiplex pour couvrir l'ensemble des segments V (14 segments, mais seulement 10 impliqués dans des réarrangements, dont la famille *Vγ1f* contenant 6 V et les segments uniques *Vγ9*,  $\psi$ *Vγ10*,  $\psi$ *Vγ11*) et J (5 segments, mais 4 explorés dans les PCR) (4) (Figure 1). La proportion de cas ayant un gène *TCRG* réarrangé dépend du type de lymphoprolifération T. Dans les leucémies prolymphocytaires T, les leucémies à grands lymphocytes à grains T, les lymphomes T périphériques non spécifiés et les lymphomes T angio-immunoblastiques, la détection d'une population clonale du locus *TCRG* est observée respectivement dans 94 %, 96 %, 94 % et 92 % des cas et dans seulement 74 % des cas pour les lymphomes anaplasiques (7). Pour augmenter la proportion de cas détectés, le consortium *EuroClonality* recommande

de combiner l'étude des gènes *TCRB* et *TCRG*. Cette stratégie permet de détecter 100 % des cas de leucémies prolymphocytaires T, de leucémies à grands lymphocytes à grains T et de lymphomes T angio-immunoblastiques, 95 % des cas de lymphomes T périphériques non spécifiés et 79 % des cas de lymphomes anaplasiques (7, 11). Par ailleurs, dans le cadre des hémopathies lymphoïdes T matures, l'étude des réarrangements du gène *TCRD* doit être limitée aux proliférations de lymphocytes T exprimant un *TCRγδ* à leur surface. En effet, l'absence de distribution gaussienne des réarrangements polyclonaux et la délétion fréquente du locus *TCRD* peuvent conduire à des difficultés d'interprétation et à un risque de faux positifs en dehors des cas *TCRγδ*<sup>+</sup> (4).

### C) Intérêt de l'étude de la clonalité dans les hémopathies lymphoïdes B matures

L'une des principales applications de la clonalité lymphoïde B est d'apporter un argument pour le diagnostic de lymphome non-hodgkinien sur un prélèvement tissulaire. Dans certains cas, les arguments anatomopathologiques ne sont pas suffisants pour l'affirmer (diagnostic différentiel entre expansion réactionnelle de la zone marginale et lymphome de la zone marginale, par exemple). La mise en évidence d'une population clonale de forte intensité en *IGH* et/ou *IGK* sur tissu congelé constitue donc un argument en faveur du diagnostic de lymphome (lorsque les arguments cliniques, radiologiques et immunohistochimiques sont également en accord avec ce diagnostic) (12, 13).

Un autre intérêt de l'étude de la clonalité B, dans les hémopathies lymphoïdes B matures, est de pouvoir établir la parenté entre deux hémopathies. La distinction entre transformation en lymphome diffus à grandes cellules B d'un lymphome de bas grade (lymphome folliculaire, leucémie lymphoïde chronique, lymphome de la zone marginale, ...) et lymphome diffus à grandes cellules B *de novo* chez un patient présentant un antécédent de lymphome indolent peut être importante au plan pronostique, bien qu'elle n'en modifie pas en général le traitement. Cette question peut être également pertinente chez un patient

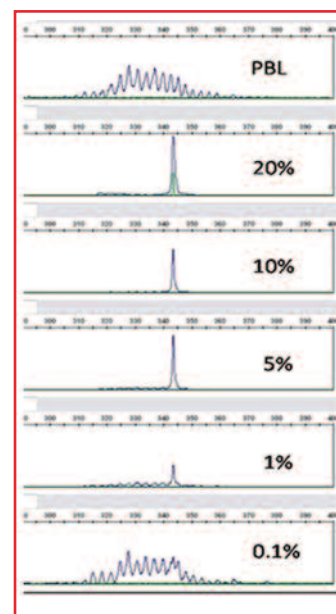
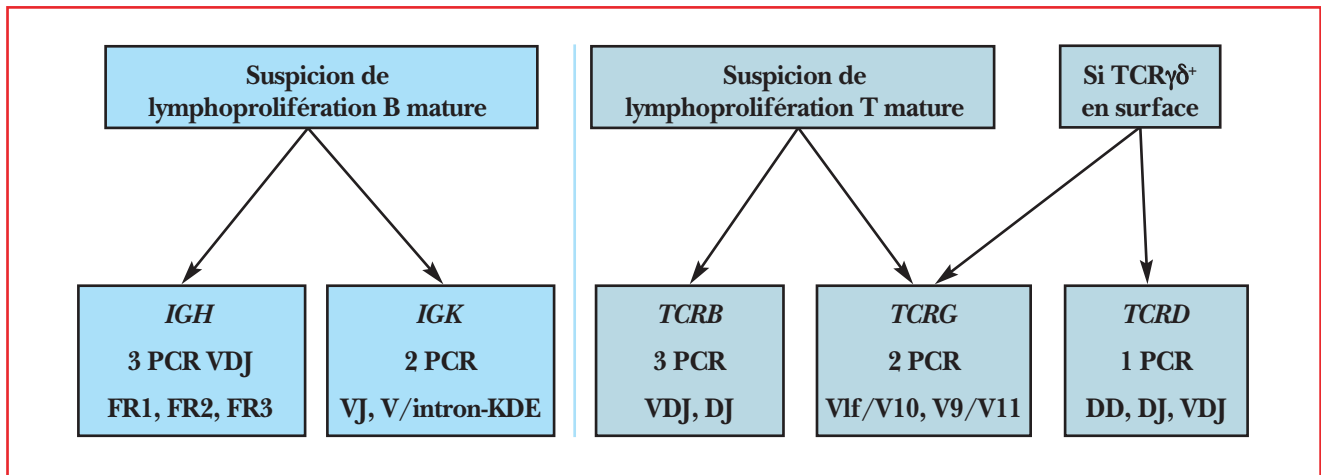


Fig. 2 - Sensibilité de détection d'un réarrangement clonal par la PCR *IGH FR1* de BIOMED-2. L'ADN clonal (lignée REH) est dilué dans l'ADN de lymphocytes polyclonaux (PBL) et les produits d'amplification fluorescents sont séparés par électrophorèse capillaire (technique GeneScan). La sensibilité est d'environ 1 %.





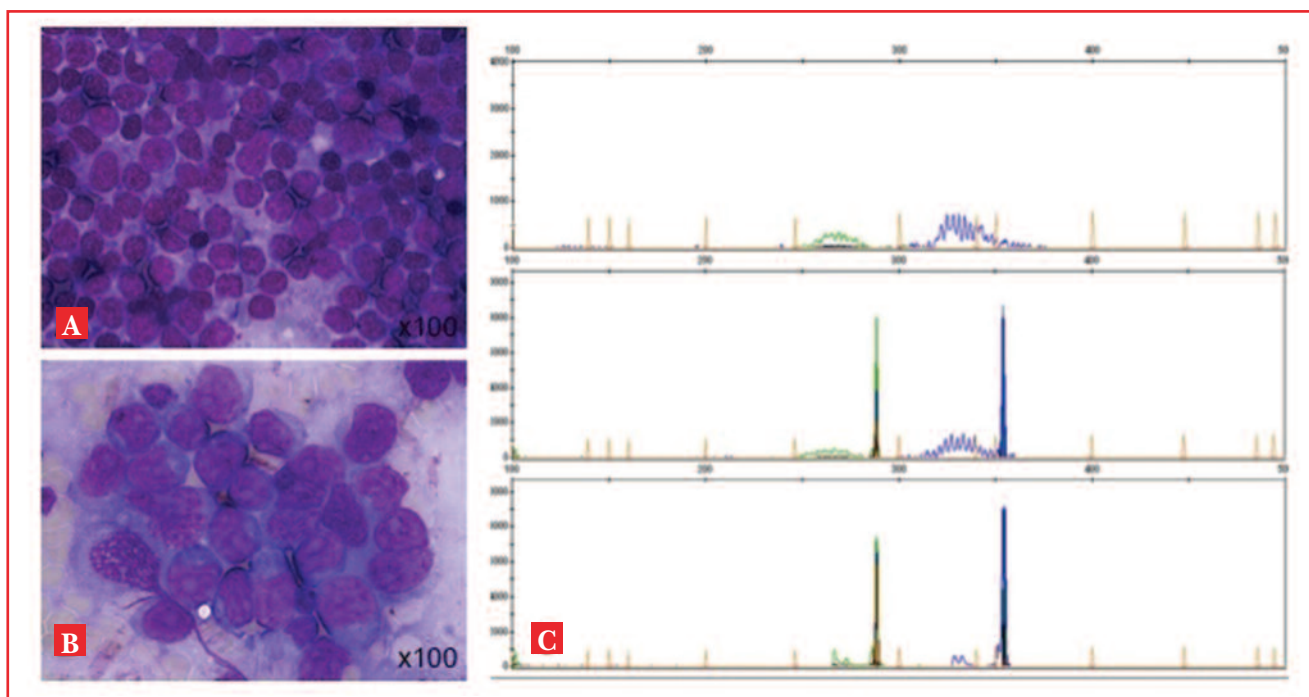
**Fig. 3** - Stratégie simplifiée d'étude, par PCR, de la clonalité devant une suspicion de lymphoprolifération B ou T mature (adaptée du consortium EuroClonality).

ayant des antécédents de lymphome folliculaire et pour lequel est évoqué, devant un aspect de lymphome agressif, le diagnostic de lymphome de Burkitt ou celui de lymphome « double hit » (*c-myc* réarrangé et FISH *IGH-BCL2* non réalisable ou ininterprétable). En effet, la prise en charge thérapeutique d'une transformation d'un lymphome folliculaire en lymphome à grandes cellules « double hit » n'est pas la même que celle d'un lymphome de Burkitt. Pour établir la parenté clonale entre les deux hémopathies, il est nécessaire de disposer d'ADN tumoral correspondant au lymphome de bas grade et d'ADN tumoral correspondant au lymphome agressif actuel pour pouvoir comparer les profils des réarrangements clonaux entre les deux pathologies (*IGH* et/ou *IGK* selon l'informativité des PCR). Un alignement des profils de clonalité obtenus à partir des deux ADN est donc nécessaire. La parenté clonale est probable lorsque les profils sont superposables avec une taille identique (pb) des réarrangements clonaux observés entre les deux hémopathies. Cependant, seul le séquençage des réarrangements permettra de répondre de façon définitive à cette question. Un exemple de transformation en lymphome diffus à grandes cellules B d'une leucémie lymphoïde chronique, avec mise en évidence de la parenté clonale entre les deux hémopathies, est présenté dans la [figure 4](#).

Par ailleurs, la survenue d'une deuxième hémopathie lymphoïde B mature de bas grade chez un patient présentant des antécédents de lymphome B indolent doit faire éliminer une rechute de la première hémopathie, et les arguments anatomopathologiques, immunophénotipiques et cytogénétiques peuvent suffire. Dans certains cas (par exemple, diagnostic différentiel entre lymphome de la zone marginale CD5<sup>+</sup> et lymphome du manteau), la comparaison des réarrangements clonaux peut être nécessaire pour en établir la parenté clonale à la condition que de l'ADN de la première hémopathie soit disponible.

#### D) Intérêt de l'étude de la clonalité dans les hémopathies lymphoïdes T matures

L'étude de la clonalité T est un élément important du diagnostic des hémopathies lymphoïdes T matures. Devant une suspicion de lymphome épidermotrope (mycosis fongoïde, notamment), l'analyse des réarrangements des loci du *TCR* à partir d'une biopsie cutanée fait partie intégrante du diagnostic de certitude (distinction entre mycosis fongoïde et lésion T réactionnelle) (14). Dans le cadre de l'exploration d'une hyperéosinophilie dont l'étiologie est indéterminée, même si la cytométrie en flux n'a pas identifié de population lymphoïde T de phénotype pathologique, il est nécessaire de dépister une population clonale T. En effet, la mise en évidence d'un réarrangement clonal majoritaire doit faire rechercher un lymphome T ou faire évoquer un syndrome hyperéosinophilique lymphoïde en l'absence d'arguments forts en faveur d'un lymphome (15, 16). Par ailleurs, devant une lymphocytose T persistante, sans expression de marqueurs aberrants, sans trou ou modulation phénotypique, une étude moléculaire permettra de préciser son caractère clonal ou polyclonal/oligoclonal. La clonalité lymphoïde T avec étude du locus *TCRG* est également un élément clé du diagnostic de certaines pathologies lymphoïdes T rares, telles que les sprues réfractaires et lymphomes T digestifs associés aux entéropathies. Une maladie coeliaque devient une sprue réfractaire lorsque les symptômes de malabsorption et l'atrophie villositaire persistent plus de 6 à 12 mois malgré un régime sans gluten respecté. La sprue réfractaire de type I est caractérisée par une expansion de lymphocytes intra-épithéliaux ayant un phénotype normal et l'absence de réarrangement clonal T détectable dans une biopsie de l'intestin grêle. À l'inverse, dans la sprue réfractaire de type II, les lymphocytes intra-épithéliaux ont un phénotype anormal et une population clonale T est observée (17, 18).



**Fig. 4 - Transformation d'une leucémie lymphoïde chronique en lymphome diffus à grandes cellules B, avec mise en évidence de la parenté clonale entre les deux hémopathies.**

**A.** Leucémie lymphoïde chronique. Petits lymphocytes matures, monomorphes, dont la chromatine nucléaire est mottée, observés dans un ganglion cervical. **B.** Transformation en lymphome diffus à grandes cellules B. Nappe dense de cellules lymphoïdes de grande taille, nucléolées et au cytoplasme basophile, observées dans un ganglion jugulo-carotidien. **C.** Parenté clonale entre les deux hémopathies malignes. Profils de migration électrophorétique de produits de PCR *IGHVDJ* FR1 et FR2 fluorescents générés à partir de l'ADN extrait de lymphocytes témoins polyclonaux (haut), du ganglion cervical (milieu) et du ganglion jugulo-carotidien (bas). Les profils obtenus à partir des deux ADN tumoraux sont identiques, avec des réarrangements clonaux de taille similaire.

De plus, comme pour les hémopathies lymphoïdes B matures, l'étude de clonalité T permet d'établir la parenté clonale entre deux hémopathies ou éventuellement l'origine T ou B de la population pathologique lorsqu'il est impossible de la définir par immunohistochimie. Parfois, il est également difficile de préciser histologiquement l'existence d'une atteinte à distance, d'un lymphome déjà bien caractérisé dans un autre site. Ainsi, la mise en évidence de réarrangements clonaux au sein du locus *TCRG* dans un lymphome T et leur dépistage (même profil de PCR et même taille (pb) des réarrangements clonaux observés) dans différents sites potentiellement atteints permet d'en faire le bilan d'extension (sang, moelle, peau, poumon, ...).

Cependant, il est capital de préciser qu'une population peut être clonale sans être pour autant maligne. En effet, une expansion clonale T réactionnelle peut être observée durant une mononucléose infectieuse ou lors d'une lymphocytose à grands lymphocytes à grains d'origine virale. Des résultats faussement positifs de la PCR *TCRG* peuvent également être constatés. En effet, la diversité jonctionnelle du locus *TCRG* est limitée en raison de l'absence de segments D et de la faible addition de nucléotides (4). De plus, l'identification d'une population T clonale minoritaire n'est pas rare chez les individus âgés (répertoire restreint), surtout chez les femmes, et dans les lymphocytes

T CD8<sup>+</sup>. Enfin, la présence de lymphocytes TCRγδ<sup>+</sup> présentant des réarrangements canoniques (classiquement Vγ9/Vδ2) peut conduire à la description erronée de populations clonales minoritaires (19). Ainsi, le risque de faux résultats positifs de la PCR *TCRG* justifie l'addition de l'analyse du locus *TCRB* en routine ou devant des résultats inattendus (Figure 3, d'après les recommandations de BIOMED-2) (7, 11). Il convient de souligner qu'un résultat de clonalité positive doit être interprété avec circonspection en fonction du contexte clinico-biologique. À l'inverse, l'absence de détection d'un réarrangement clonal (faux négatifs ou problèmes d'informativité de la PCR) n'exclut pas un diagnostic de lymphome ou de lymphoprolifération nécessitant une prise en charge thérapeutique.

#### E) Stratégie d'étude de la clonalité pour les tissus inclus en paraffine

L'étude de la clonalité lymphoïde à partir d'un prélèvement tissulaire congelé (quand il est disponible) fait partie de la pratique courante du diagnostic des lymphomes, avec des interactions étroites entre anatomopathologistes et moléculaires (preuve de clonalité dans les cas de diagnostic difficile, parenté clonale entre deux hémopathies, bilan d'extension d'un lymphome, ...). Des avancées techniques permettent d'adapter l'étude de clonalité aux

prélèvements inclus en paraffine (*Formalin Fixed Paraffin Embedded*, FFPE) pour lesquels l'ADN est soumis à une fragmentation, variable selon le type de fixateur et la technique d'extraction utilisée. L'ADN extrait peut être « dégradé » avec des fragments amplifiés ne dépassant pas 200 pb. Le challenge est donc d'utiliser des systèmes de PCR qui amplifient des fragments d'ADN de petite taille (< 200 pb). Pour l'étude de clonalité B, il est donc nécessaire d'associer systématiquement une PCR *IGH* avec une amorce FR3 (produits de PCR de 100 à 170 pb) aux PCR *IGHFR1* et *FR2* et d'étudier le locus *IGK* (20). Pour le versant T, les deux PCR *TCRG* de BIOMED-2 ne sont pas adaptées à la FFPE car la taille des produits de PCR est > 200 pb pour les réarrangements  $V\gamma 1f$  (195-255 pb) et  $V\gamma 9$  (160-220 pb) (4). Le développement de PCR multiplex du *TCRG* avec des amorces permettant d'obtenir des produits de PCR < 200 pb a permis d'augmenter l'informativité de la clonalité T à partir de prélèvements inclus en paraffine. Par ailleurs, l'amplification préférentielle des produits de PCR de petite taille à partir de FFPE (fragmentation de l'ADN, inhibiteurs de PCR) peut être source de résultats faussement positifs. Il est donc recommandé de réaliser les PCR en double afin d'éliminer une pseudo-clonalité (pics non reproductibles).

### III. - PLACE DE LA CLONALITÉ LYMPHOÏDE POUR L'ÉTUDE DE LA MALADIE RÉSIDUELLE

Dans les hémopathies lymphoïdes aiguës (leucémies aiguës lymphoblastiques et lymphomes lymphoblastiques), l'intérêt majeur de la clonalité lymphoïde est d'identifier des cibles pour l'étude de la maladie résiduelle. Malgré les avancées de la cytométrie en flux, en termes de sensibilité (au moins  $10E-4$ ), le « gold standard » pour le suivi de la maladie résiduelle demeure la biologie moléculaire. Cela nécessite d'évaluer au diagnostic les loci *Ig/TCR* afin de détecter des réarrangements clonaux à l'aide des différents protocoles de PCR. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques de la lignée B, les loci *IGH* et *IGK* constituent les principales cibles de la maladie résiduelle avec au moins 90 % et 40-60 % des cas comportant respectivement un réarrangement clonal complet VH-DH-JH et un réarrangement clonal *IGK*. Les réarrangements incomplets du locus *IGH* (DH-JH) sont également une cible potentielle et doivent être étudiés au diagnostic (PCR ne détectant que les réarrangements incomplets avec une amorce intronique). Enfin, des réarrangements clonaux illégitimes de lignée (*TCRD* et *TCRG*) peuvent survenir dans une leucémie aiguë lymphoblastique affiliée à la lignée B et sont donc à rechercher lors du bilan initial. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T, les réarrangements clonaux des loci du *TCR* seront fonction du stade d'arrêt de maturation. Les réarrangements clonaux des loci du *TCR* sont observés dans plus de 90 % des cas pour le gène  $\gamma$  et 80-95 % des cas pour le gène  $\beta$ . Le locus  $\delta$  est, quant à lui, réarrangé (sur au moins un allèle) dans 80 % des leucémies aiguës lymphoblastiques TCD3<sup>+</sup>, 100 % des leucémies aiguës lymphoblastiques T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> et 35 % des leucémies aiguës lym-

phoblastiques T TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>. Des réarrangements clonaux illégitimes peuvent se produire également dans les leucémies aiguës lymphoblastiques T (réarrangement de type incomplet DH-JH du gène *IGH*) (4). Dans tous les cas, après identification des réarrangements clonaux présents initialement, le séquençage des cibles potentielles par la méthode de Sanger permettra ensuite de construire des amorces spécifiques du CDR3 de la population clonale blastique. Après vérification de la sensibilité et de la spécificité de ces amorces clono-spécifiques, la quantification de la maladie résiduelle pourra être réalisée par PCR quantitative par une approche Taqman dans les prélèvements de post-induction, de mi-consolidation, de pré-intensification, ou encore après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. L'ADN extrait à partir des blastes du diagnostic servira pour construire la gamme de dilution nécessaire à la quantification des maladies résiduelles (21, 22). La quantification de la maladie résiduelle précoce, avec une sensibilité requise d'au moins  $10E-4$ , est d'importance compte tenu de son impact décisionnel sur la stratification thérapeutique dans les protocoles de traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques (23-26). Il est donc essentiel de réaliser un bilan de clonalité lors du diagnostic d'une leucémie aiguë lymphoblastique afin d'identifier des cibles pour le suivi de la maladie résiduelle.

Cette stratégie est également applicable à certaines hémopathies lymphoïdes matures pour lesquelles une évaluation moléculaire quantitative de la maladie résiduelle est requise, notamment pour les lymphomes associés fréquemment à une infiltration sanguine et/ou médullaire. À titre d'exemple, dans le cadre du lymphome du manteau, le protocole européen Eu-MCL a prévu, chez les patients sous traitement, l'évaluation moléculaire quantitative de la maladie résiduelle (27, 28). La stratégie est la même que pour les leucémies aiguës lymphoblastiques à la différence près que les infiltrations sanguines et médullaires (présentes dans la majorité des cas au diagnostic) peuvent être très faibles (< 1 %). L'idéal serait de pouvoir utiliser de l'ADN tumoral tissulaire mais du matériel tissulaire congelé n'est pas toujours disponible. À l'avenir, il serait important de comparer l'informativité et la sensibilité du suivi de la maladie résiduelle par cytométrie en flux par rapport à la PCR clono-spécifique, bien qu'une récente étude rétrospective ait montré que la PCR est plus sensible que la cytométrie en flux (29). Hors situation protocolaire, le suivi de la maladie résiduelle des hémopathies lymphoïdes matures traitées se fait essentiellement par cytométrie en flux. Le suivi par PCR qualitative, afin de rechercher la persistance des réarrangements clonaux identifiés au diagnostic, n'a plus sa place actuellement en raison de sa sensibilité insuffisante (aux alentours de  $10E-2$ , voire  $10E-3$  en fonction des systèmes de PCR). Lorsque la cytométrie en flux est mise à défaut, en particulier dans les lymphoproliférations T matures (absence de trou phénotypique ou de marqueurs aberrants suffisamment forts) et qu'une intensification thérapeutique est envisagée, un suivi de la maladie résiduelle par PCR quantitative peut être réalisé.



#### IV. - CONCLUSION

L'étude de la clonalité lymphoïde constitue un élément important du diagnostic multidisciplinaire des hémopathies lymphoïdes matures. Cependant, son intérêt est limité à certaines situations. Dans la lignée B, il s'agit essentiellement de préciser le caractère clonal ou non lorsqu'il existe un doute entre processus réactionnel et lymphome ou d'établir la parenté clonale entre deux hémopathies. Dans le versant T, la cytométrie en flux étant moins sensible que pour les hémopathies B, il est plus fréquent d'avoir recours à la biologie moléculaire et fournir ainsi un argument supplémentaire en faveur du diagnostic de lymphome T lorsqu'une population clonale est détectée. Concernant la standardisation des pratiques, le groupe *EuroClonality* a émis des recommandations relatives à la stratégie d'étude de la clonalité dans les hémopathies lymphoïdes matures et propose de combiner les études des loci *IGH* et *IGK* pour le versant B mature et *TCRG* et *TCRB* pour le versant T mature (7, 8, 11). Dans tous les cas, il est important d'interpréter les résultats de clonalité en fonction du contexte clinico-biologique. En effet, un résultat clonal n'est pas synonyme de tumoral. De plus, il est nécessaire de savoir discriminer les faibles clones du locus *TCRG* dans le cadre de répertoire restreint du sujet âgé, de déficit immunitaire ou de dysimmunité, des clones de forte intensité potentiellement associés à un lymphome. À l'inverse, il existe des faux négatifs et des problèmes d'informativité des PCR, notam-

ment en présence de mutations somatiques dans le locus *IGH*, contournés en grande partie par l'addition de l'analyse du locus *IGK*.

Dans les hémopathies lymphoïdes immatures, l'intérêt majeur de la clonalité lymphoïde est d'identifier des cibles moléculaires pour le suivi de la maladie résiduelle par PCR quantitative. Ceci s'étend aux hémopathies matures dans le cadre de protocoles ou si les marqueurs phénotypiques associés à la leucémie ne sont pas assez puissants pour le suivi par cytométrie en flux et qu'une intensification thérapeutique est envisagée.

Ces dernières années, de nouvelles approches de séquençage nucléotidique à haut débit se développent, notamment dans le domaine de la clonalité lymphoïde. La profondeur de lecture permet de caractériser l'hétérogénéité intra-clonale des hémopathies lymphoïdes avec la mise en évidence de sous-clones non visibles par PCR qualitatives conventionnelles. Son application pour l'étude de la clonalité et de la maladie résiduelle dans les hémopathies lymphoïdes reste à préciser dans les années à venir (30-33).

**Conflit d'intérêt :** le laboratoire d'onco-hématologie de l'hôpital Necker Enfants-Malades (Pr Macintyre) est membre du groupe *EuroClonality*.

#### Références Bibliographiques

- (1) Matsuda F, Ishii K, Bourvagnet P, Kuma Ki, Hayashida H, Miyata T, *et al.* The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus. *J Exp Med* 1998 ; **188** : 2151-62.
- (2) Siminovitch KA, Bakshi A, Goldman P, Korsmeyer SJ. A uniform deleting element mediates the loss of genes in human B cells. *Nature* 1985 ; **316** : 260-2.
- (3) van der Burg M, Tümkaya T, Boerma M, de Bruin-Versteeg S, Langerak AW, van Dongen JJ. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the *IGK* locus but seems less strict at the *IGL* locus. *Blood* 2001 ; **97** : 1001-8.
- (4) van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, *et al.* 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 ; **17** : 2257-317.
- (5) Beaubier NT, Hart AP, Bartolo C, Willman CL, Viswanatha DS. Comparison of capillary electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis for the evaluation of T and B cell clonality by polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 2000 ; **9** : 121-31.
- (6) Luo V, Lessin SR, Wilson RB, Rennert H, Tozer C, Benoit B, *et al.* Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements using fluorescent-based PCR and automated high-resolution capillary electrophoresis. *Mol Diagn* 2001 ; **6** : 169-79.
- (7) van Krieken JH, Langerak AW, Macintyre EA, Kneba M, Hodges E, Sanz RG, *et al.* Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukemia* 2007 ; **21** : 201-6.
- (8) Evans PA, Pott C, Groenen PJ, Salles G, Davi F, Berger F, *et al.* 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 ; **21** : 207-14.
- (9) Blom B, Verschuren MC, Heemskerk MH, Bakker AQ, van Gastel-Mol EJ, Wolvers-Tettero IL, *et al.* TCR gene rearrangements and expression of the pre-T cell receptor complex during human T-cell differentiation. *Blood* 1999 ; **93** : 3033-43.
- (10) Verschuren MC, Wolvers-Tettero IL, Breit TM, van Dongen JJ. T-cell receptor V $\delta$ J $\alpha$  rearrangements in human thymocytes: the role of V $\delta$ J $\alpha$  rearrangements in T-cell receptor- $\delta$  gene deletion. *Immunology* 1998 ; **93** : 208-12.
- (11) Brüggemann M, White H, Gaulard P, Garcia-Sanz R, Gameiro P, Oeschger S, *et al.* Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia* 2007 ; **21** : 215-21.
- (12) Langerak AW, Molina TJ, Lavender FL, Pearson D, Flohr T, Sambade C, *et al.* Polymerase chain reaction-based clonality testing in tissue samples with reactive lymphoproliferations: usefulness and pitfalls. A report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 2007 ; **21** : 222-9.
- (13) Hummel M, Oeschger S, Barth TFE, Loddenkemper C, Cogliatti SB, Marx A, *et al.* Wotherspoon criteria combined with B cell clonality analysis by advanced polymerase chain reaction technology discriminates covert gastric marginal zone lymphoma from chronic gastritis. *Gut* 2006 ; **55** : 782-7.
- (14) Ponti R, Fierro MT, Quagliano P, Lisa B, Paola F di C, Michela O, *et al.* TCR $\gamma$ -chain gene rearrangement by PCR-based GeneScan: diagnostic accuracy improvement and clonal heterogeneity analysis in multiple cutaneous T-cell lymphoma samples. *J Invest Dermatol* 2008 ; **128** : 1030-8.

- (15) Valent P, Klion AD, Horny HP, Roufosse F, Gotlib J, Weller PF, *et al.* Contemporary consensus proposal on criteria and classification of eosinophilic disorders and related syndromes. *J Allergy Clin Immunol* 2012 ; **130** : 607-12.
- (16) Lefèvre G, Copin MC, Roumier C, Aubert H, Avenel-Audran M, Grardel N, *et al.* CD3-CD4<sup>+</sup> lymphoid variant of hypereosinophilic syndrome: nodal and extranodal histopathological and immunophenotypic features of a peripheral indolent clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Haematologica* 2015 ; **100** : 1086-95.
- (17) Daum S, Weiss D, Hummel M, Ullrich R, Heise W, Stein H, *et al.* Frequency of clonal intraepithelial T lymphocyte proliferations in enteropathy-type intestinal T cell lymphoma, coeliac disease, and refractory sprue. *Gut* 2001 ; **49** : 804-12.
- (18) Cellier C, Delabesse E, Helmer C, Patey N, Matuchansky C, Jabri B, *et al.* Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet* 2000 ; **356** : 203-8.
- (19) Delfau MH, Hance AJ, Lecossier D, Vilmer E, Grandchamp B. Restricted diversity of V $\gamma$  9-JP rearrangements in unstimulated human  $\gamma/\delta$  T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1992 ; **22** : 2437-43.
- (20) Berget E, Helgeland L, Molven A, Vintermyr OK. Detection of clonality in follicular lymphoma using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples and BIOMED-2 immunoglobulin primers. *J Clin Pathol* 2011 ; **64** : 3-41.
- (21) Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, *et al.* Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets: report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999 ; **13** : 110-8.
- (22) van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, *et al.* Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 2007 ; **21** : 604-11.
- (23) Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, *et al.* Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood* 2009 ; **113** : 4153-62.
- (24) Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, *et al.* Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. *Leukemia* 2010 ; **24** : 521-35.
- (25) Gökbuğet N, Kneba M, Raff T, Trautmann H, Bartram CR, Arnold R, *et al.* Adult patients with acute lymphoblastic leukemia and molecular failure display a poor prognosis and are candidates for stem cell transplantation and targeted therapies. *Blood* 2012 ; **120** : 1868-76.
- (26) Beldjord K, Chevret S, Asnafi V, Huguet F, Boulland ML, Leguay T, *et al.* Oncogenetics and minimal residual disease are independent outcome predictors in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2014 ; **123** : 3739-49.
- (27) Pott C, Schrader C, Gesk S, Harder L, Tiemann M, Raff T, *et al.* Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. *Blood* 2006 ; **107** : 2271-8.
- (28) Pott C, Hoster E, Delfau-Larue MH, Beldjord K, Böttcher S, Asnafi V, *et al.* Molecular remission is an independent predictor of clinical outcome in patients with mantle cell lymphoma after combined immunochemotherapy: a European MCL intergroup study. *Blood* 2010 ; **115** : 3215-23.
- (29) Cheminant M, Derrioux C, Touzart A, Schmit S, Grenier A, Trinquand A, *et al.* Minimal residual disease monitoring by 8-color flow cytometry in mantle cell lymphoma: an EU-MCL and LYSA study. *Haematologica* 2016 ; **101** : 336-45.
- (30) Sufficool KE, Lockwood CM, Abel HJ, Hagemann IS, Schumacher JA, Kelley TW, *et al.* T-cell clonality assessment by next-generation sequencing improves detection sensitivity in mycosis fungoides. *J Am Acad Dermatol* 2015 ; **73** : 228-36.
- (31) Schumacher JA, Duncavage EJ, Mosbrugger TL, Szankasi PM, Kelley TW. A comparison of deep sequencing of *TCRG* rearrangements vs traditional capillary electrophoresis for assessment of clonality in T-cell lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 2014 ; **141** : 348-59.
- (32) Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VE, Stow P, Coustan-Smith E, *et al.* Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012 ; **120** : 5173-80.
- (33) Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, *et al.* Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia* 2014 ; **28** : 1299-307.
- (34) Lefranc MP. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res* 2003 ; **31** : 307-10.
- (35) Lefranc MP. IMGT databases, web resources and tools for immunoglobulin and T cell receptor sequence analysis, <http://imgt.cines.fr>. *Leukemia* 2003 ; **17** : 260-6.