

Figure 1. Schéma simplifié de la technique du PARR. Les "boîtes V, J et C" alignées schématisent l'alignement génique dans le génome des lymphocytes ; V1-3, J1-3, C1-3 : gènes codant pour les différentes régions des récepteurs TCR et IGH ; CDR3 : *Complementary Determining Region 3* ; PCR : *Polymerase Chain Reaction* ; les diagrammes schématisent les résultats des électrophorèses obtenus sur les amplifiats PCR.

Le test de clonalité : le PARR⁽¹⁾

L. COURAUD, DV, DESV
anatomie pathologique,
DEA Biologie moléculaire de la
cellule et du développement,
LAPVSO
129 route de Blagnac
31200 Toulouse

OBJECTIFS PÉDAGOGIQUES

Être capable de comprendre l'intérêt diagnostique d'un test de clonalité afin d'optimiser son utilisation en tant qu'examen complémentaire lors de suspicion de lymphome.

(1) Polymerase Chain Reaction (PCR) to assess Antigen Receptor gene Rearrangements

(2) récepteur des cellules T (T cell receptor)

(3) Locus IGH (gènes des chaînes lourdes (Immunoglobulin heavy locus))

Le test de clonalité aide l'anatomopathologiste à discriminer inflammation chronique/lymphome, en identifiant une prolifération monoclonale lymphoïde.

Lors de troubles chroniques, une maladie inflammatoire chronique et un lymphome de bas grade partagent souvent une présentation clinique similaire, ce qui constitue un défi diagnostique.

La réalisation d'une analyse histologique ou cytologique ciblant l'organe atteint (tube digestif, peau, muqueuses respiratoires, lymphocentres,...) est souvent considérée comme la solution par le clinicien. Il faut cependant garder à l'esprit que les images histologiques peuvent également être trompeuses, et nécessitent parfois le recours à des examens complémentaires immunohistochimiques (immunophénotypage) et moléculaires (test de clonalité ou PARR⁽¹⁾) capables d'orienter le diagnostic.

Cet article va préciser les modalités et l'utilisation du test de clonalité dans le diagnostic du lymphome. □

La définition du PARR⁽¹⁾

(FIGURE 1)

Il s'agit de l'amplification d'une région génomique spécifique des lymphocytes, codant pour les récepteurs aux antigènes : TCR⁽²⁾ pour les lymphocytes T et IGH⁽³⁾ pour les lymphocytes B.

La taille de cette région (CDR3 pour *Complementary Determining Region 3*) est variable après réarrangement des locus et spécifique d'une lignée lymphocytaire : un lymphocyte est caractérisé par une taille unique de CDR3. Lors de réaction inflammatoire chronique, de multiples clones de lymphocytes sont présents. Cette diversité est exclue

CRÉDITS DE FORMATION CONTINUE

La lecture de cet article ouvre droit à 0,05 CFC. La déclaration de lecture, individuelle et volontaire, est à effectuer auprès du CFCV (cf. sommaire).

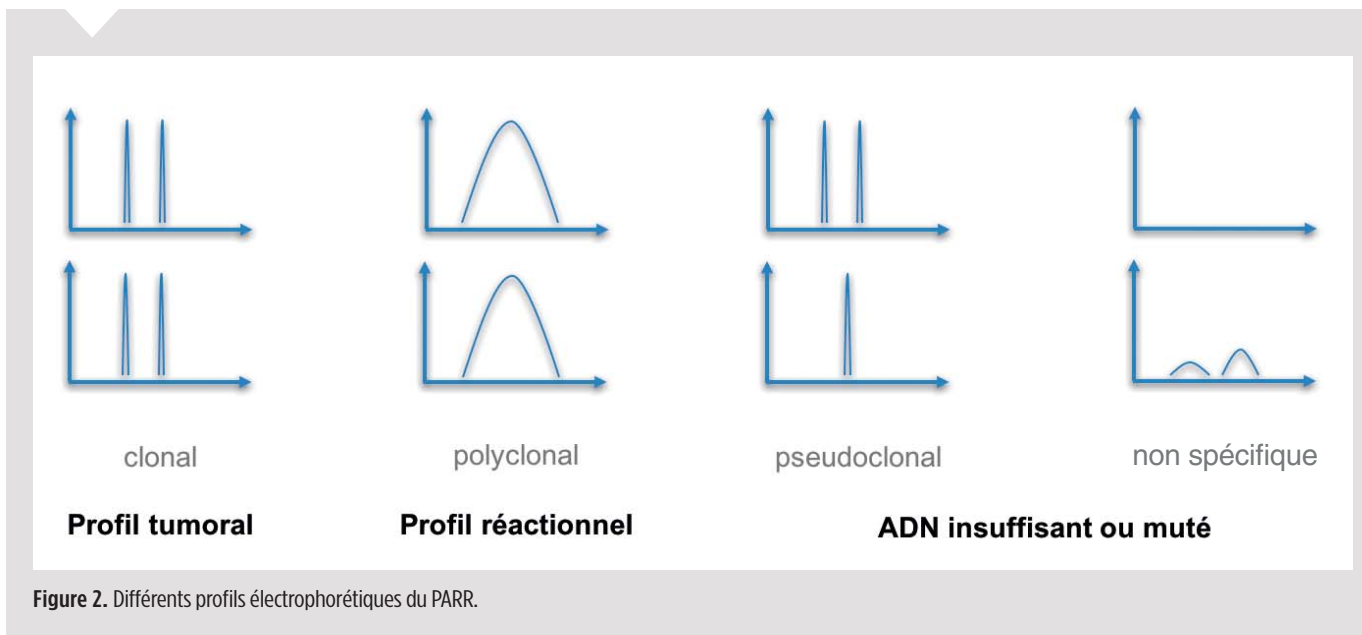


Figure 2. Différents profils électrophorétiques du PARR.

lors de processus lymphomateux, où il s'agit de la prolifération d'un seul clone [1].

Mise en œuvre

L'examen est réalisé sur les prélèvements ayant servi à l'analyse histo- ou cytopathologique (biopsies, produit d'épanchement, cytoponctions) et conservés par votre laboratoire. Ils doivent permettre une extraction suffisante d'ADN de bonne qualité (100 ng/50 µL). Une conservation trop longue dans le formol

ou l'autolyse sont des limites importantes dans la réalisation du PARR.

L'amplification utilise un ensemble de sondes génomiques synthétisées, afin de s'hybrider de part et d'autre de la région CDR3. Ces sondes existent pour les espèces canine, féline et équine.

La visualisation des produits d'amplification de la PCR est donnée sous la forme de courbes gaussiennes ou de pics, suite à une électrophorèse capillaire.

L'interprétation des résultats du test de clonalité (FIGURE 2)

Cette technique permet la mise en évidence d'une population clonale, donc tumorale, de cellules lymphoïdes, mais ne permet pas le phénotypage de cette population. Seul l'examen d'un marquage immunohistochimique CD3/CD20/CD79a est capable de typer un lymphome B ou T.

Cette limite est liée à la possibilité de réarrangements génomiques interlignées B et T, rendant possible l'amplification d'une séquence IGH (récepteur B) lors de lymphome T [2]

Profil clonal

Il s'agit de la mise en évidence d'un ou deux pics distincts sur chaque PCR. Il correspond le plus souvent à un profil lymphomateux.

Il faut cependant prendre en compte des situations non tumorales (clones bénins) : une hyperstimulation antigénique lors de réaction inflammatoire à forte médiation immune, ou une population lymphoïde clonale lors de régression d'histiocytome par exemple.

Profil polyclonal

Il s'agit de la visualisation d'une population panachée de lymphocytes sous la forme d'une courbe gaussienne. Cela

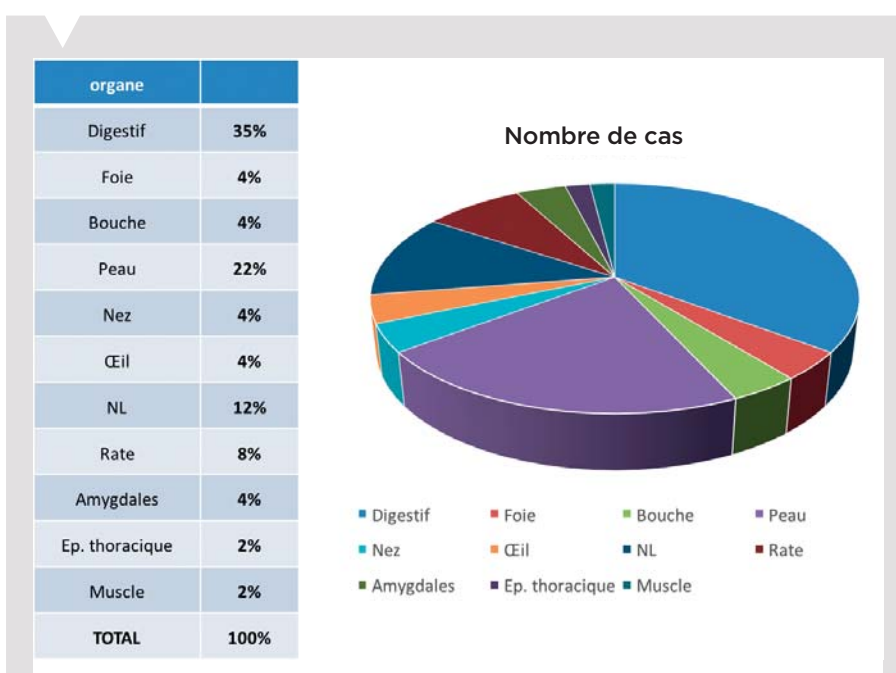


Figure 3. Répartition organique des analyses PARR au sein du LAPVSO lors de la période 2015-2016.

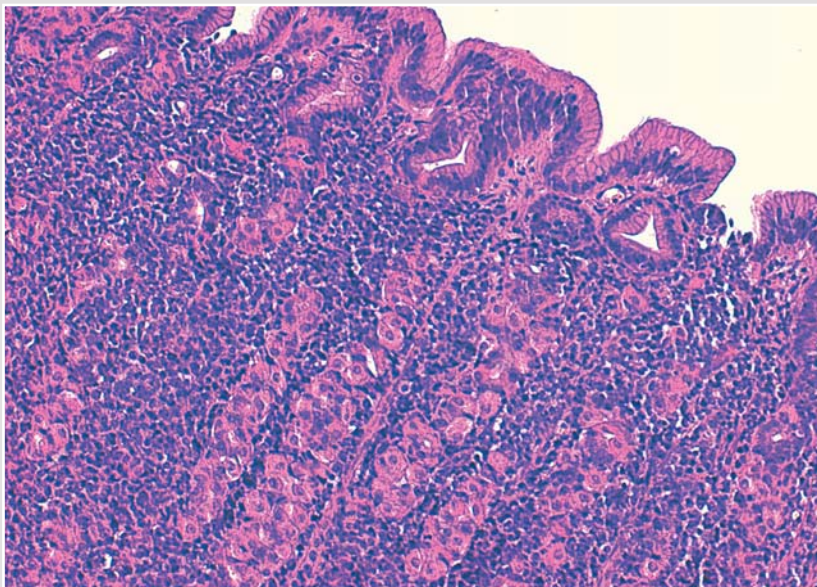


Photo 1. Gastrite lymphocytaire douteuse vs Lymphome de bas grade (Estomac, Chat), (HE, x 200).

correspond généralement à un processus inflammatoire.

Les faux-négatifs sont observés lors de manque d'affinité des sondes d'amplification. Il s'agit de situations lymphomateuses où l'ADN est muté ou aberrant. Il peut également s'agir d'un fond lymphoïde polyclonal diluant une population lymphomateuse masquée.

Profil pseudoclonal et profil non-spécifique

Ces profils correspondent soit à une quantité, soit à une qualité insuffisante de l'ADN après extraction. Ils peuvent également correspondre à un manque d'affinité de la sonde d'amplification (cf. supra).

Quelle utilisation pour le clinicien

L'analyse des données traitées par le LAPVSO révèle une forte prédominance des demandes de PARR pour les biopsies digestives (35 %), les prélèvements cutanés (22 %), et les nœuds lymphatiques (12 %) (FIGURE 3).

Il faut également savoir que cette technique doit être décidée sur la base d'un examen morphologique histopathologique ou cytopathologique douteux, dans un contexte d'infiltration lymphoïde

marquée, commune aux états réactionnels et lymphomateux (grave maladie inflammatoire chronique intestinale/ digestive ou MICI* *versus* lymphome digestif de bas grade, lymphome cutané épithéliotrope ou non *versus* lymphocytose cutanée réactionnelle, lymphadénite réactionnelle *versus* lymphome nodal à petites cellules).

En aucun cas, un PARR ne doit être réalisé sans examen morphologique, voire immunohistologique, préalable [3].

En ce qui concerne les examens liés aux biopsies endoscopiques digestives réalisées lors de MICI, l'incorporation du PARR dans le processus diagnostique apporte un gain de 12 % de sensibilité (par rapport à une analyse histologique seule) dans la détection des lymphomes digestifs des animaux atteints de maladie intestinale (PHOTO 1) [4].

En termes de perspectives pour le clinicien, cet examen moléculaire pourrait être prochainement proposé dans le cadre de la surveillance de la rémission en cours de chimiothérapie, afin de détecter des clones circulants (leucémie lymphoïde primaire ou secondaire), ou afin de contrôler une contamination médullaire [5].

* = Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Conclusion

Le test de clonalité est couramment proposé au vétérinaire par son laboratoire de diagnostic, afin d'augmenter la sensibilité dans la détection des lymphomes de bas grade ou débutants.

A l'instar de son utilisation en médecine humaine, il devrait également être exploité dans le cadre du bilan d'extension ou de suivi d'une maladie lymphomateuse chez les animaux en cours de traitement. □

MÉMO

- Le PARR est une PCR sur une population lymphocytaire pour en établir la clonalité, pas pour la typer B ou T (immunophénotypage).
- C'est un complément diagnostique discriminant infiltration lymphoïde réactionnelle et lymphome.
- C'est un examen réalisable sur prélèvements destinés aux analyses cytologiques ou histologiques, même formolés.
- L'association diagnostique histocytopathologie, immunophénotypage et PARR apporte une sensibilité maximale dans la recherche des lymphomes de bas grade ou précoces.

>> À LIRE...

1. Keller SM et coll. Clonality Testing in Veterinary Medicine : A Review With Diagnostic Guidelines. *Vet Pathol.* 2016 ; 53 : 711-25.
2. Andrews C et coll. Cross Lineage Rearrangement in Feline Enteropathy-Associated T-cell Lymphoma. *Vet Pathol.* 2016 ; 53 : 559-62.
3. Moore PF et coll. Feline Gastrointestinal Lymphoma: Mucosal architecture, Immunophenotype, and Molecular Clonality. *Vet Pathol.* 2012 ; 49 : 658-68.
4. Kiupel M et coll. Diagnostic Algorithm to Differentiate Lymphoma From Inflammation in Feline Intestinal Biopsy Sample. *Vet Pathol.* 2011 ; 48 : 212-22.
5. Avery CA. Molecular Diagnostics of Hematologic Malignancies in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012 ; 42 : 97-110.

Déclaration publique d'intérêts sous la responsabilité du ou des auteurs : néant.