

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, AGROALIMENTAIRE
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS

2014

**Validation d'un test de clonalité pour le diagnostic des
lymphomes canins par analyse moléculaire des
réarrangements du récepteur à l'antigène (PARR)**

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 9 juillet 2014
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Anaïs Thérèse Germaine Marie GAUTIER

Née le 4 novembre 1989 à Ploërmel (56)

JURY

Président : Monsieur Steven LE GOUILL
Professeur à la faculté de médecine de Nantes

Rapporteur: Madame Catherine IBISCH
Maître de conférences à ONIRIS

Assesseur: Monsieur Jérôme ABADIE
Maître de conférences à ONIRIS

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE, AGROALIMENTAIRE
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS

2014

**Validation d'un test de clonalité pour le diagnostic des
lymphomes canins par analyse moléculaire des
réarrangements du récepteur à l'antigène (PARR)**

THESE
pour le
diplôme d'Etat
de
DOCTEUR VETERINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 9 juillet 2014
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Anaïs Thérèse Germaine Marie GAUTIER

Née le 4 novembre 1989 à Ploërmel (56)

JURY

Président : Monsieur Steven LE GOUILL
Professeur à la faculté de médecine de Nantes

Rapporteur: Madame Catherine IBISCH
Maître de conférences à ONIRIS

Assesseur: Monsieur Jérôme ABADIE
Maître de conférences à ONIRIS

La reproduction d'extraits est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée comme suit:

GAUTIER A.: 2014, Validation d'un test de clonalité pour le diagnostic des lymphomes canins par analyse moléculaire des réarrangements du récepteur à l'antigène (PARR). Thèse de doctorat vétérinaire, Ecole vétérinaire Oniris, Nantes.

Le défaut de citation est considéré comme du plagiat. Ce dernier est puni par la loi française et passible de sanction allant jusqu'à 3 ans d'emprisonnement et 300 000 euros d'amende.

ENSEIGNANTS-CHERCHEURS DE ONIRIS

Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes
Atlantique

Directeur Général : Pierre SAI (Pr)

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE, PATHOLOGIE ET SCIENCES DE L'ALIMENT

NUTRITION et ENDOCRINOLOGIE	Patrick NGUYEN (Pr) Henri DUMON (Pr)	Brigitte SILIART (Pr) Lucile MARTIN (Pr)
PHARMACOLOGIE et TOXICOLOGIE	Yassine MALLEM (MCC) Martine KAMMERER (Pr) Jean-Dominique PUYT (Pr)	Hervé POULIQUEN (Pr) Jean-Claude DESFONTIS (Pr)
PHYSIOLOGIE FONCTIONNELLE, CELLULAIRE et MOLECULAIRE	Lionel MARTIGNAT (MC) Jean-Marie BACH (Pr)	Julie HERVE (MC)
HISTOLOGIE ET ANATOMIE PATHOLOGIQUE	Jérôme ABADIE (MC) Frédérique NGUYEN (MC)	Marie-Anne COLLE (Pr)
PATHOLOGIE GENERALE, MICROBIOLOGIE et IMMUNOLOGIE	Jean-Marc PERSON (Pr) Jean-Louis PELLERIN (Pr)	Hervé SEBBAG (MC) Emmanuelle MOREAU (MC)
BIOCHIMIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Laurent LE THUAUT (MC) Thierry SEROT (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Carole PROST (Pr) Florence TEXIER (MC) Mathilde MOSSER (MCC)
MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE INDUSTRIELLE	Xavier DOUSSET (Pr) Bénédicte SORIN (Chef de travaux) Bernard ONNO (MC)	Hervé PREVOST (Pr) Emmanuel JAFFRES (MC) Nabila Haddad (MC)

DEPARTEMENT DE SANTE DES ANIMAUX D'ELEVAGE ET SANTE PUBLIQUE

HYGIENE ET QUALITE DES ALIMENTS	Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS-RESCH (Pr)	Eric DROMIGNY (MC) Marie-France PILET (MC) Jean-Michel CAPPELIER (MC)
MEDECINE DES ANIMAUX D'ELEVAGE	Arlette LAVAL (Pr émérite) Catherine BELLOC (MC) Isabelle BREYTON (MC) Christophe CHARTIER (Pr)	Alain DOUART (MC) Sébastien ASSIE (MC) Raphaël GUATTEO (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MCC)
PARASITOLOGIE GENERALE, PARASITOLOGIE DES ANIMAUX DE RENTE, FAUNE SAUVAGE et PATHOLOGIE AQUACOLE	Monique L'HOSTIS (Pr) Alain CHAUVIN (Pr) Albert AGOULON (MC))	Guillaume BLANC (MC) Ségolène CALVEZ (MC)
MALADIE REGLEMENTEE, ZOONOSES et REGLEMENTATION SANITAIRE	Jean-Pierre GANIERE (Pr émérite) Suzanne BASTIAN-ORANGE (MC)	Nathalie RUVOEN-CLOUET (MC) Carole PEREZ (MC)
ZOOTECNIE, ECONOMIE	Aurélien MADOUASSE (MCC) Xavier MALHER (Pr) François BEAUDEAU (Pr)	Christine FOURICHON (MC) Nathalie BAREILLE (Pr)

DEPARTEMENT DE SCIENCES CLINIQUES

ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES	Patrick COSTIOU (Pr) Eric BETTI (MC)	Claire DOUART (MC) Claude GUINTARD (MC)
PATHOLOGIE CHIRURGICALE et ANESTHÉSIOLOGIE	Olivier GAUTHIER (Pr) Béatrice LIJOUR (MC) Eric AGUADO (MC) Caroline TESSIER (MCC)	Gwenola TOUZOT-JOURDE (MCC) Olivier GEFFROY (Pr) Eric GOYENVALLE (MC)
DERMATOLOGIE, PARASITOLOGIE DES CARNIVORES ET DES EQUIDES, MYCOLOGIE	Patrick BOURDEAU (Pr)	Vincent BRUET (MCC)
MEDECINE INTERNE, IMAGERIE MÉDICALE et LEGISLATION PROFESSIONNELLE VÉTÉRINAIRE	Yves LEGEAY (Pr) Dominique FANUEL (Pr) Anne COUROUCE-MALBLANC (MC) Catherine IBISCH (MC) Nicolas CHOUIN (MC)	Marion FUSELLIER (MC) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Odile SENECAAT (MC) Françoise ROUX (MC)
BIOTECHNOLOGIES et PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION	Daniel TAINURIER (Pr) Francis FIENI (Pr) Jean-François BRUYAS (Pr)	Lamia BRIAND (MC) Djemil BENCHARIF (MC)

DEPARTEMENT DE GENIE DES PROCEDES ALIMENTAIRES

Lionel BOILLEREAUX (Pr)
Dominique COLIN (MC)
Sébastien CURET PLOQUIN (MC)
Marie DE LAMBALLERIE (Pr)
Dominique DELLA VALLE (MC)
Francine FAYOLLE (Pr)
Michel HAVET (Pr)
Laurence POTTIER (MC)

Vanessa JURY (MC)
Alain LEBAIL (Pr)
Catherine LOISEL (MC)
Jean-Yves MONTEAU (MC)
Denis PONCELET (Pr)
Olivier ROUAUD (MC)
Hélène SIMONIN (MC)

DEPARTEMENT DE MANAGEMENT, STATISTIQUE ET COMMUNICATION

SENSOMÉTRIE - CHIMIOMÉTRIE

Véronique CARIOU (MC)
Philippe COURCOUX (MC)
El Mostafa QANNARI (Pr)

Michel SEMENOU (MC)
Chantal THORIN (PCEA)
Evelyne VIGNEAU (Pr)

ECONOMIE – GESTION - COMMUNICATION

Pascal BARILLOT (MC)
Yvan DUFEU (MC)
Marie-Josée LORRAIN (MC)
Florence BEAUGRAND (MC)

Jean-Marc FERRANDI (Pr)
Samia ROUSSELIÈRE (MC)
Vincent HOVLAQUE (Pr)

LANGUES

Franck INSIGNARES (PCEA)
Linda MORRIS (PCEA)

Marc BRIDOU (PCEA)
Fabiola ASECIO (PCEA)

Pr : Professeur

Pr A : Professeur Associé

Pr I : Professeur Invité

MC : Maître de Conférences

MCC : Maître de Conférences Contractuel

AERC : Assistant d'enseignement et de recherches

PLEA : Professeur Lycée Enseignement Agricole

PCEA : Professeur certifié enseignement agricole

REMERCIEMENTS

A Monsieur Steven LEGOUILL

Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,
Sincères remerciements.

A Madame Catherine IBISCH

Maître de conférence à Oniris

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et encadrée dans ce projet
Pour votre gentillesse, votre disponibilité et vos conseils,
Sincères remerciements.

A Monsieur Jérôme ABADIE

Maître de conférence à Oniris

Pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse,
Pour avoir rendu possible ma participation aux programmes d'échanges internationaux
Erasmus et Brafagri,
Sincères remerciements.

**A Madame Sonia BECAVIN,
Technicienne de laboratoire à Oniris**

A Nicolas SAILLIET

Stagiaire en BTS Biotechnologies

Pour avoir réalisé les manipulations expérimentales,

Pour avoir eu la gentillesse et la patience de m'initier aux techniques de biologie moléculaire,

Sincères remerciements.

**Au Centre National de la Recherche Scientifique de Rennes, représenté par
Monsieur Benoît HEDAN,**

Docteur vétérinaire

Pour avoir fourni une partie des échantillons analysés par PARR,

Sincères remerciements.

A mes proches

Qui m'apportent leur amour et leur soutien incommensurables et indispensables à la réalisation de mes projets

A ma maman et mon papa pour être des parents formidables

A Pierre et à Elise, avec qui je partage tellement de bons moments et de souvenirs

Que cette complicité demeure intacte entre nous

Je vous aime.

Aux membres de ma famille

Qu'elle continue de s'agrandir dans l'harmonie et que les réunions Gautier et Pacheu perdurent

A mes colocs Baghdadis

Marie, Axelle, VDB, RomPi, Parach pour ces quatre années absolument formidables (coeur coeur love love for ever) ainsi qu'aux **colocs intermittents**, Tchouk, Lulu, Tifenn, Tiphaine, Landon, Sté, Lucile, Natalia, Mathias, Ania, Silvia, Edu et Anne.

A mes amis Erasmus et Brafagri

Pour avoir fait de ces deux semestres des expériences incroyablement enrichissantes et festives, pour avoir partagé leur culture, leur diversité et l'envie de voyager. Merci à VDB, Lorna, Parach et Bourgui, companheiros loucos de Mochila Tour.

Aux parrains et poulots du Clan

Dont Marie, Axelle, VDB, Chloé, Juliette, Anna, Marie, Tchouk, Béré, Clem, Raphoux, RomPi, Parach, Dodo, Housty, Seb, Damas, Godet, Bourgui, Sexy, Thomas, Gary

Certainement un peu fous, ce pourquoi on s'est si bien entendus pour traumatiser les poulots et hors poulottage

Honi soit qui peu y boit.

Aux fiiiilles du groupe clinique de 4A

Pour un semestre en canine extra avec vous! Et vivent les pouffes équines (Tchouk incluse).

A Anaïs et Nico (VDB, tu es déjà trop souvent concernée par les autres remerciements)

Pour cette année de 5A passée avec vous.

Aux amis d'Oniris

Pour avoir marqué ces années, j'espère que vous vous reconnaîtrez et que nous aurons l'occasion de nous revoir hors de ce contexte.

A la Team B

Pour les concours, les soirées, les chorés, les fous-rires, le partage de cette même passion, leur soutien et très certainement une partie de la motivation nécessaire pour commencer ces études.

Aux amis de prépa

Et tout particulièrement à la BioSup3 et à ma Cocotout pour avoir rendu ces deux années de prépa fort sympatiques (oui oui).

SOMMAIRE

Liste des figures.....	23
Liste des tableaux.....	27
Liste des abréviations.....	29
Introduction.....	31

PREMIERE PARTIE: Etude bibliographique

I. Le lymphome canin.....	34
I.1. Rappels physio-pathologiques.....	34
I.1.1. Rappels physiologiques concernant les lymphocytes.....	34
I.1.1.1. Les lymphocytes, acteurs du système immunitaire adaptatif.....	34
I.1.1.1.1. Le système immunitaire.....	34
I.1.1.1.2. Les lymphocytes.....	35
I.1.1.1.2.1. Description morphologique.....	36
I.1.1.1.2.2. Fonction des lymphocytes.....	39
I.1.1.2. Ontogénie des lymphocytes.....	39
I.1.1.2.1. Lymphocytes immatures.....	39
I.1.1.2.2. Lymphocytes naïfs.....	39
I.1.1.2.3. Lymphocytes matures.....	40
I.1.1.3. Acquisition d'un récepteur spécifique.....	41
I.1.1.3.1. Les immunoglobulines.....	42
I.1.1.3.2. Les récepteurs des cellules T.....	44
I.1.1.3.3. Réarrangement des gènes codant les récepteurs.....	45
I.1.2. Rappels physio-pathologiques concernant le lymphome.....	47
I.2. Epidémiologie.....	49
I.3. Etiologie.....	50
I.3.1. Facteurs génétiques et moléculaires.....	50
I.3.2. Facteurs immunologiques.....	50
I.3.3. Facteurs infectieux.....	51
I.3.4. Facteurs environnementaux.....	52
I.4. Classifications.....	52
I.4.1. Classification anatomique.....	52
I.4.2. Classification histologique.....	53
I.4.2.1. Classification WF.....	54
I.4.2.2. Classification de Kiel actualisée.....	55
I.4.2.3. Classification WHO.....	55
I.5. Signes cliniques.....	58
I.5.1. Forme nodale.....	58
I.5.1.1. Forme multicentrique.....	58
I.5.1.2. Forme alimentaire.....	58
I.5.1.3. Forme médiastinale.....	58

I.5.2. Forme extra-nodale.....	58
I.5.2.1. Forme cutanée.....	58
I.5.2.2. Autres formes extra-nodales.....	59
I.6. Diagnostic.....	59
I.6.1. Examen clinique.....	59
I.6.2. Diagnostic différentiel.....	60
I.6.3. Examens complémentaires.....	61
I.6.3.1. Analyse hématologique.....	61
I.6.3.2. Analyse biochimique.....	62
I.6.3.3. Analyse urinaire.....	62
I.6.3.4. Imagerie.....	63
I.6.3.5. Histologie.....	63
I.6.3.6. Cytologie.....	65
I.6.3.7. Immunohistochimie.....	67
I.6.3.7.1. Rappel sur l'immunophénotypage.....	67
I.6.3.7.2. Principe de l'immunohistochimie.....	67
I.6.3.8. Immunocytochimie.....	69
I.6.3.9. Cytométrie en flux.....	69
I.6.3.10. Southern blot.....	72
I.6.4. Bilan d'extension et stade clinique.....	74
I.7. Pronostic.....	75
I.8. Traitement.....	77
I.8.1. Chimiothérapie.....	77
I.8.1.1. Monochimiothérapie.....	77
I.8.1.2. Polychimiothérapie.....	78
I.8.1.3. Chimiothérapie de réinduction.....	80
I.8.1.4. Cas particulier des lymphomes T.....	82
I.8.2. Chirurgie.....	83
I.8.3. Radiothérapie.....	83
I.8.4. Immunothérapie.....	84
II. La PARR en médecine humaine et vétérinaire.....	85
II.1. Principe de la PARR.....	85
II.1.1. Prélèvements.....	85
II.1.1.1. Nature des prélèvements.....	85
II.1.1.2. Conservation des prélèvements.....	86
II.1.1.3. Conditions de transport des prélèvements.....	87
II.1.2. Extraction de l'ADN des prélèvements.....	87
II.1.3. Principe de la PCR.....	88
II.1.4. Adaptation du protocole de PCR à la PARR.....	92
II.1.4.1. Particularités de la PARR.....	92
II.1.4.2. Mise au point d'amorces adaptées à l'étude des lymphomes canins	94
II.1.4.3. Mise au point d'amorces spécifiques des tumeurs.....	96
II.1.4.4. Intérêt de l'association de plusieurs couples d'amorces.....	96
II.1.5. Révélation des produits d'amplification de la PARR.....	98

II.1.5.1. Electrophorèse sur gel.....	98
II.1.5.2. Electrophorèse capillaire.....	105
II.1.5.3. Puces à ADN.....	106
II.1.6. Analyse des produits d'amplification de la PARR.....	107
II.1.6.1. Lecture d'un gel d'électrophorèse.....	107
II.1.6.2. Lecture d'un électrophorégramme.....	110
II.1.6.3. Intreprétation des résultats.....	111
II.1.6.3.1. Interprétation de la monoclonalité.....	111
II.1.6.3.2. Interprétation de la biclonalité.....	112
II.1.6.3.3. Erreurs d'interprétation.....	114
II.2. Sensibilité et spécificité de la PARR en médecine vétérinaire.....	115
II.2.1. Variabilité des sensibilité et spécificité de la PARR.....	115
II.2.2. Facteurs de variabilité.....	117
II.2.2.1. Amorces.....	117
II.2.2.2. Nature du lymphome.....	118
II.2.2.3. Nature du prélèvement.....	118
II.2.2.4. Mode conservation des prélèvements.....	119
II.2.2.5. Chimiothérapie en cours.....	119
II.2.2.6. Paramètres des cycles de PCR.....	119
II.2.2.7. Technique de séparation des produits de PCR.....	120
II.2.2.8. Laboratoire.....	121
II.3. Intérêts et applications de la PARR.....	121
II.3.1. Diagnostic différentiel Hyperplasie inflammatoire/ Lymphome.....	121
II.3.2. Immunophénotypage.....	122
II.3.3. Haute sensibilité sur une faible quantité de matériel en provenance de tissus de nature variée.....	123
II.3.3.1. Localisation du lymphome.....	124
II.3.3.2. Stade du lymphome.....	124
II.3.3.3. Nature et qualité du prélèvement.....	124
II.3.4. Dépistage précoce chez des individus cliniquement sains à risque.....	125
II.3.5. Détection de la maladie résiduelle minimale et suivi thérapeutique.....	125
II.3.5.1. Reprise anticipée de la chimiothérapie et prévention de la rechute clinique.....	126
II.3.5.2. Comparaison avec des signes cliniques évocateurs de rechute clinique.....	126
II.3.5.3. Etude de l'efficacité des traitements.....	128
II.3.5.4. Développement de chimiothérapie MRD-guidée.....	128
II.3.5.5. Facteur pronostique.....	128
II.3.5.6. Evaluation du matériel de transplantation.....	128
II.3.5.7. Compréhension de la cinétique de propagation et de régression tumorales.....	128
II.3.6. Evolution d'un lymphome et mise en relation de lymphomes successifs	129
II.3.7. Intérêt pronostique.....	129
II.3.7.1. Détection du lymphome.....	129

II.3.7.2. Quantité de cellules néoplasiques circulantes.....	130
II.3.7.3. Stade clinique du lymphome.....	131
II.3.7.4. Immunophénotypage.....	133
II.3.8. Outil de recherche.....	133
II.4. Limites de la PARR.....	134
II.4.1. Information.....	134
II.4.2. Sensibilité.....	134
II.4.4. Temps.....	135
II.5. Conclusion.....	135

DEUXIEME PARTIE: Etude expérimentale

I. Objectifs de l'étude.....	139
II. Matériels et outils.....	139
II.1. Echantillons analysés.....	139
II.2. Extraction de l'ADN.....	140
II.3. PCR.....	142
II.4. Electrophorèse.....	146
III. Mise au point d'un protocole optimisé de PARR.....	146
III.1. Premier essai inspiré du protocole de Burnett et al. (2003)	146
III.2. Dilution des échantillons	148
III.3. Gradient de température.....	149
III.3.1. IgH major.....	149
III.3.2. IgH minor.....	150
III.3.3. TCR γ	151
III.3.4. C μ	152
III.3.5. Conclusion.....	153
III.4. Taq polymérase.....	153
III.4.1. HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen.....	153
III.4.2. TaKaRa Z-Taq™ DNA Polymerase.....	155
III.5. Durée des cycles.....	157
III.5.1. Cycle long.....	157
III.5.2. Cycle court.....	158
III.6. Second gradient de température.....	161
III.7. Fluorochrome.....	162
III.7.1. SafeView dans une cuve de 400 mL.....	162
III.7.2. SafeView dans une cuve de 200 mL.....	163
III.8. Amorces.....	164
IV. Validation du protocole mis en place.....	168
IV.1. Protocole.....	168
IV.2. Echantillons FFPE.....	169
IV.2.1. Résultats de la PARR.....	169
IV.2.2. Analyse statistique des résultats.....	174

IV.3. Echantillons non FFPE.....	176
IV.3.1. Résultats de la PARR.....	176
IV.3.2. Analyse statistique des résultats.....	181
IV.4. Analyse statistique globale.....	182
Discussion.....	184
Conclusion.....	189

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les systèmes cellulaires impliqués dans l'immunité.....	35
Figure 2. Structure d'un petit lymphocyte et d'un grand lymphocyte granuleux.....	36
Figure 3. Cytologie de noeud lymphatique d'un chien sain colorée au May-Grünwald Giemsa	36
Figure 4. Principales molécules de surface des lymphocytes B, leur ligand et leur fonction.....	38
Figure 5. Principales molécules de surface des lymphocytes T, leur ligand et leur fonction.	38
Figure 6. Activation d'un lymphocyte B dans un centre germinatif d'un noeud lymphatique	41
Figure 7. Structure des immunoglobulines et BCR.....	43
Figure 8. Structure tertiaire d'une chaîne lourde d'immunoglobuline.	43
Figure 9. Structure du complexe TCR.....	44
Figure 10. Réarrangements des gènes codant la chaîne lourde d'une immunoglobuline.	46
Figure 11. Réarrangements successifs des allèles codant les chaînes légères κ puis des allèles codant les chaînes légères λ jusqu'à la production d'un réarrangement fonctionnel et l'exclusion allélique	47
Figure 12. Cancérogenèse.	48
Figure 13. Coupes histologiques d'un noeud lymphatique néoplasique folliculaire et d'un noeud lymphatique hyperplasique, colorée au Wright-Giemsa.	64
Figure 14. Coupe histologique d'un noeud lymphatique néoplasique diffus, colorée au Wright-Giemsa.	64
Figure 15. Intensité estimée de l'infiltration cellulaire de la muqueuse intestinale de 14 lames histologiques de nature différente par 5 pathologistes.	65
Figure 16. Cytologie à partir de lymphomes canins avec coloration au Wright-Giemsa	66
Figure 17. Immunohistochimie à partir d'un lymphome B splénique canin avec coloration au Wright-Giemsa.	68
Figure 18. Algorithme de Hans.....	68
Figure 19. Principe simplifié d'un cytomètre en flux.	70
Figure 20. Cytogramme et immunophénotypage des lymphocytes à partir de noeuds lymphatiques de chien par cytométrie en flux	70

Figure 21. Southern blot mettant en évidence la clonalité des réarrangements des gènes codant une chaîne β d'un récepteur de lymphocyte T néoplasiques lors d'un lymphome T épithéliotrope	73
Figure 22. Courbe de survie de chiens sous chimiothérapie avec un protocole dérivé du CHOP.....	79
Figure 23. Couple d'amorces encadrant une séquence cible	89
Figure 24. Cycle de température d'une PCR	91
Figure 25. Réaction polymérase par la polymérase	92
Figure 26. Réarrangements des gènes codant les immunoglobulines au cours de la différenciation des lymphocytes	93
Figure 27. Analyse des séquences nucléotidiques des 4 segments V et des 6 segments J du gène TCR γ et mise au point des amorces V γ a, V γ b, J γ a et J γ b.....	95
Figure 28. Principe de l'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins	101
Figure 29. Comparaison des résultats d'une PARR conventionnelle et d'une PARR-SSCP réalisées dans les mêmes conditions expérimentales	102
Figure 30. PARR conventionnelle et CSGE à partir de prélèvements tissulaires duodénaux non tumoraux	103
Figure 31. PARR conventionnelle et CSGE à partir de prélèvements ganglionnaires lymphomateux avec les amorces IgH-major ciblant les gènes codant les immunoglobulines des lymphocytes B.....	103
Figure 32. Schéma du système d'électrophorèse capillaire	105
Figure 33. Comparaison d'une électrophorèse capillaire et d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide réalisées sur le même échantillon.....	106
Figure 34. PARR et révélation des produits de PCR sur des puces à ADN.....	107
Figure 35. PARR réalisée avec les couples d'amorces IgH major, IgH minor, TCR γ et C μ pour le contrôle positif, à partir d'un témoin négatif (eau stérile) et de 15 échantillons de nature différente.....	108
Figure 36. Interprétation de l'analyse électrophorétique capillaire des réarrangements des gènes amplifiés par PARR codant les récepteurs des lymphocytes	111
Figure 37. Courbe de survie des chiens atteints de lymphome B ou de lymphome T.....	122
Figure 38. Etablissement d'un seuil de détection de la PARR à partir d'échantillons dilués.....	123
Figure 39. Suivi de l'évolution du niveau de MRDet du volume des noeuds lymphatiques sur plusieurs semaines chez 7 chiens atteints de lymphome et sous chimiothérapie	127

Figure 40. Courbe de survie des chiens atteints d'une entérite avec des réarrangements clonaux des lymphocytes T ou sans réarrangements clonaux des lymphocytes T	130
Figure 41. Courbe de survie chez les chiens atteints de lymphome T en fonction du nombre de lymphocytes T circulants au moment du diagnostic	131
Figure 42. Courbe de survie des patients atteints de lymphome B selon les résultats histologiques et PARR de la moelle osseuse	132
Figure 43. Proportion de chiens atteints de lymphome de stade 1 à 3 ou de stade 4 et 5 en fonction des examens ayant permis de déterminer ces stades	133
Figure 44. PARR réalisée avec les paramètres du protocole Burnett	147
Figure 45. PARR réalisée avec dilution au 1/5 des échantillons	148
Figure 46. PARR avec un gradient de température et le couple d'amorces IgH minor	150
Figure 47. PARR avec un gradient de température et le couple d'amorces IgH minor.	151
Figure 48. PARR avec un gradient de température de 58,7°C à 52°C et le couple d'amorces TCR γ	152
Figure 49. PARR avec un gradient de température et le couple d'amorces contrôle C μ	152
Figure 50. PARR réalisée avec la HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen.	154
Figure 51. PARR réalisée avec les anciens ou les nouveaux dNTP et avec ou sans la solution Q.....	155
Figure 52. PARR réalisée avec la TaKaRa Z-Taq™ DNA Polymerase.	156
Figure 53. PARR avec des cycles d'amplifications longs.	158
Figure 54. PARR avec des cycles d'amplifications courts.	159
Figure 55. PARR avec des cycles d'amplifications courts (2).	160
Figure 56. PARR avec le SafeView en tant que fluorochrome dans une cuve d'électrophorèse de 400 mL.	162
Figure 57. PARR avec le SafeView en tant que fluorochrome dans une cuve d'électrophorèse de 200 mL.	163
Figure 58. PARR avec le couple d'amorces V γ a-J γ a.....	164
Figure 59. PARR avec le couple d'amorces V γ a-J γ b.	165
Figure 60. PARR avec le couple d'amorces V γ b-J γ a.	165
Figure 61. PARR avec le couple d'amorces V γ b-J γ b.....	166
Figure 62. PARR avec le couple d'amorces IgH Tamura.	167
Figure 63. PARR avec le couple d'amorces contrôle C-kit.	167
Figure 64. PARR réalisée à partir des échantillons FFPE.....	171
Figure 65. PARR réalisée à partir des échantillons conservés dans le <i>RNAlater</i> ®.....	178

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification WF établie par le NCI (National Cancer Institute) et répartition des lymphomes canins	54
Tableau 2. Classifications de Kiel actualisée et de WHO et correspondances:.....	56
Tableau 3. Diagnostic différentiel du lymphome canin	61
Tableau 4. Exemples de marqueurs utilisés pour l'immunophénotypage des lymphomes canins	71
Tableau 5. Stades cliniques du lymphome définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO)	74
Tableau 6. Facteurs pronostiques	75
Tableau 7. Protocoles de mono- et polychimiothérapie les plus couramment utilisés en médecine vétérinaire	78
Tableau 8. Protocole COPLA	79
Tableau 9. Réponse à différents protocoles de seconde intention	82
Tableau 10. Couples d'amorces utilisés en médecine vétérinaire pour amplifier les séquences codant les récepteurs des cellules lymphocytaires B (IgH) et T (TCR).	97
Tableau 11. Pouvoir de séparation de l'ADN en fonction de la concentration en agarose du gel d'électrophorèse	99
Tableau 12. Pouvoir de séparation de l'ADN en fonction de la concentration en agarose du gel d'électrophorèse	99
Tableau 13. Sensibilité de la PARR pour la détection de la clonalité des lymphomes, des lymphomes B et des lymphomes T du chien selon les études vétérinaires.	116
Tableau 14. Sensibilité de la PARR pour la détection de la clonalité des lymphomes B canins en fonction du couple d'amorces utilisé.	117
Tableau 15. Paramètres et cycles de la PARR adaptés au couples d'amorces	120
Tableau 16. Sensibilités comparées entre l'immunohistochimie (gold standard), la cytométrie en flux et la PARR.....	134
Tableau 17. Choix du test diagnostique du lymphome en fonction des anomalies détectées et des résultats histologiques et cytologiques	136
Tableau 18. Dosage de l'ADN des échantillons analysés dans l'étude expérimentale	141
Tableau 19. Caractéristiques des amorces utilisées dans l'étude expérimentale	144
Tableau 20. Résultats de la PARR à partir des échantillons FFPE avec le protocole "PARR AMaROC"	172

Tableau 21. Tableaux de contingence des résultats de PARR à partir des échantillons FFPE.....	175
Tableau 22. Sensibilité et spécificité de la PARR à partir d'échantillons FFPE	176
Tableau 23. Résultats de la PARR à partir des échantillons non FFPE avec le protocole "PARR AMaROC"	179
Tableau 24. Tableaux de contingence des résultats de PARR à partir des échantillons non FFPE.....	181
Tableau 25. Sensibilité et spécificité de la PARR à partir d'échantillons de cytoponction	182
Tableau 26. Tableaux de contingence des résultats de la PARR (protocole "PARR AMaROC".....	182
Tableau 27. Sensibilité et spécificité de la PARR (protocole "PARR AMaROC").....	183

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN:	Acide DésoxyriboNucléique
AgNORs:	Argyrophyl Nucleolar Organizer Regions
BCR:	B-Cell Receptor (récepteur des lymphocytes B)
CD:	Cluster of Differentiation (marqueur de différenciation)
CDR:	Complementary Determining Region (région hypervariable des gènes codant les récepteurs des cellules lymphocytaires)
CH:	Constant Heavy chain domain (domaine constant d'une chaîne lourde d'immunoglobuline)
CHOP:	Cyclophosphamide, Hydroxyadriamycine (adriblastine), Oncovin TM (vincristine), Prednisone
CL:	Constant Light chain domain (domaine constant d'une chaîne légère d'immunoglobuline)
CMH:	Complexe d'Histocompatibilité Majeur
CSGE:	Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis (analyse des hétéroduplex)
DDGE:	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant)
DMAC:	Dexaméthasone, Mélphalan, Actinomycine-D, Cytosine arabinoside
dNTP:	désoxy-Nucléotide Tri-Phosphate
dATP:	désoxy-Adénine Tri-Phosphate
dCTP:	désoxy-Cytosine Tri-Phosphate
dGTP:	désoxy-Guanine Tri-Phosphate
dTTP:	désoxy-Thymine Tri-Phosphate
Fab:	antigen binding Fragment (site de liaison à l'antigène du récepteur antigénique)
Fc:	crystallizable Fragment (site d'interaction cellulaire du récepteur antigénique)
FFPE:	Formalin Fixed, Paraffin Embedded (fixé dans le formaldéhyde, inclus en paraffine)
FR:	Framework Region (région charpente des gènes codant les récepteurs des cellules lymphocytaires)
GALT:	Gut-Associated Lymphoid Tissue (formations lymphoïdes digestives)
IgH:	Heavy Immunoglobulin (chaîne lourde d'immunoglobuline)

IgL:	Light Immunoglobulin (chaîne légère d'immunoglobuline)
MALT:	Mucosal-Associated Lymphoid Tissue (tissu lymphoïde associés aux muqueuses)
MOPP:	Méchloréthamine, Oncovin™ (vincristine), Procarbazine, Prednisone
MPP:	Méchloréthamine, Procarbazine, Prednisone
MRD:	Minimal Residual Disease (maladie résiduelle minimale)
NF:	Numération et Formule sanguines
NK cells:	cellules Natural Killer (cellules tueuses naturelles)
pb:	paire de bases
PARR:	Polymerase chain reaction (PCR) for Antigen Receptor Rearrangement (réaction en chaîne par polymérase pour les réarrangements des récepteurs à l'antigène)
PCR:	Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne par polymérase)
RSS:	Recombination Signal Sequence (séquence signal de recombinaison)
SPF:	S-Phase Fraction (pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire)
SSCP:	Single Strand Conformation Polymorphism (analyse du polymorphisme de conformation des simples brins)
TBE:	Tris, Borate, Ethylenediaminetetraacetic acid
Tm :	melting Temperature (température de fusion)
TCR:	T Cells Receptor (récepteur des lymphocytes T)
TGGE:	Temperature Gradient Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel en gradient de température)
VH:	Variable Heavy chain domain (domaine variable d'une chaîne lourde d'immunoglobuline)
VL:	Variable Light chain domain (domaine variable d'une chaîne légère d'immunoglobuline)
WF:	Working Formulation (formulation de travail, classification des lymphomes canins établie par le NCI (National Cancer Institute))
WHO:	World Health Organisation (OMS: Organisation Mondiale de la Santé)

INTRODUCTION

Les lymphomes, définis comme des maladies lymphoprolifératives clonales, sont parmi les néoplasies les plus courantes chez le chien. Ils représentent entre 7% et 24% des néoplasies canines et 83% des néoplasies hématopoïétiques. Leur diagnostic est couramment établi par l'analyse histologique ou cytologique des tissus lymphoïdes, du sang et des épanchements pleuraux ou péritonéaux. Cependant, la distinction morphologique entre une lymphoprolifération maligne et une lymphoprolifération réactive est parfois ambiguë. Le recours à des outils de biologie plus élaborés et sensibles, telles que l'immunohistochimie, l'immunocytochimie et la cytométrie en flux, devient alors nécessaire. Ces techniques présentent l'avantage de fournir des informations supplémentaires sur l'immunophénotype, utiles pour l'établissement d'un pronostic et d'un protocole thérapeutique.

Depuis une vingtaine d'années, de nouvelles techniques de biologie moléculaire destinées à mettre en évidence la clonalité des lymphocytes néoplasiques en cas de lymphome ont été développées en médecine humaine puis adaptées en médecine vétérinaire. Il s'agit du Southern blot et plus récemment de la PARR (PCR for Antigen Receptor Rearrangement). Cette dernière consiste en l'amplification des réarrangements de gènes codant les chaînes des immunoglobulines ou les récepteurs des cellules T. En admettant le fait que les cellules néoplasiques ont une origine clonale, les produits amplifiés seront majoritairement identiques.

La PARR demeure une méthode diagnostique du lymphome en cours de développement. Les progrès effectués dans le séquençage du génome canin ont permis d'élaborer de nouvelles amorces, plus sensibles et plus spécifiques. De même, il est désormais possible d'utiliser des amorces spécifiques de tumeurs. Le seuil de détection très faible de la technique permet de détecter jusqu'à 1 cellule néoplasique parmi 10 000 cellules saines. Cette propriété trouve de nombreuses applications parmi lesquelles la détection de maladie résiduelle minimale en cours de chimiothérapie.

L'objectif de cette étude est d'élaborer un protocole de PARR optimal réalisable dans les conditions d'expérimentation du laboratoire de recherche d'AMaROC à Oniris. Dans un premier temps, quelques généralités sur le lymphome canin seront développées puis le principe de la PARR, ses applications et limites seront détaillés. Dans un second temps, la démarche expérimentale nécessaire à l'élaboration du protocole par le laboratoire de recherche d'AMaROC et ses sensibilité et spécificité seront exposées.

PREMIERE PARTIE: Etude bibliographique

I. Le lymphome canin

Les lymphomes correspondent à des proliférations néoplasiques monoclonales de cellules de la lignée lymphoïde. Dans un premier temps, des rappels concernant le développement physiologique des lymphocytes et les mécanismes à l'origine d'une tumeur sont exposés. Ces rappels sont nécessaires à la compréhension des lymphomes, de leur classification et des outils diagnostiques réalisables.

I.1. Rappels physio-pathologiques

I.1.1. Rappels physiologiques concernant les lymphocytes

I.1.1.1. Les lymphocytes, acteurs du système immunitaire adaptatif

I.1.1.1.1. Le système immunitaire

Le système immunitaire est l'ensemble des organes et des cellules intervenant dans les réactions de défense de l'organisme faisant appel à la reconnaissance des propriétés antigéniques de l'agent agresseur.

Les systèmes cellulaires impliqués dans l'immunité dérivent des cellules souches hématopoïétiques (cf. Figure 1) et consistent en:

- Le système lymphoïde constitué des cellules de la lignée lymphocytaire: les lymphocytes B, T et NK (Natural Killer) ou nuls, leurs précurseurs médullaires (immunoblastes) et les cellules qui en dérivent (cellules centrofolliculaires, plasmocytes).
- Le système des phagocytes mononucléés constitué des cellules mononucléées macrophagiques dispersées dans l'organisme et de leurs précurseurs médullaires et sanguins (monocytes).
- Le système des granulocytes constitué des granulocytes ou polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles.
- Le système des cellules présentatrices d'antigène constitué des cellules dendritiques.

Les lymphocytes NK, le système des phagocytes mononucléés, des granulocytes et des cellules présentatrices d'antigène sont les acteurs cellulaires de l'immunité innée d'un organisme. Ces acteurs agissent suite à la reconnaissance d'éléments signaux de dangers, sans toutefois posséder de récepteurs aux antigènes aussi variés et spécifiques que les acteurs de l'immunité adaptative. Ils sont effectifs immédiatement après leur contact avec un agent pathogène, permettant ainsi l'élimination de 99,9% d'entre eux en 96h. La barrière cutanéo-muqueuse, l'inflammation et le système du complément complètent l'immunité innée.

Les lymphocytes B et T sont spécifiques d'un agent pathogène donné et sont les acteurs de l'immunité adaptative d'un organisme. Ils confèrent une protection tardive (>96h) mais durable contre cet agent grâce aux lymphocytes mémoires.

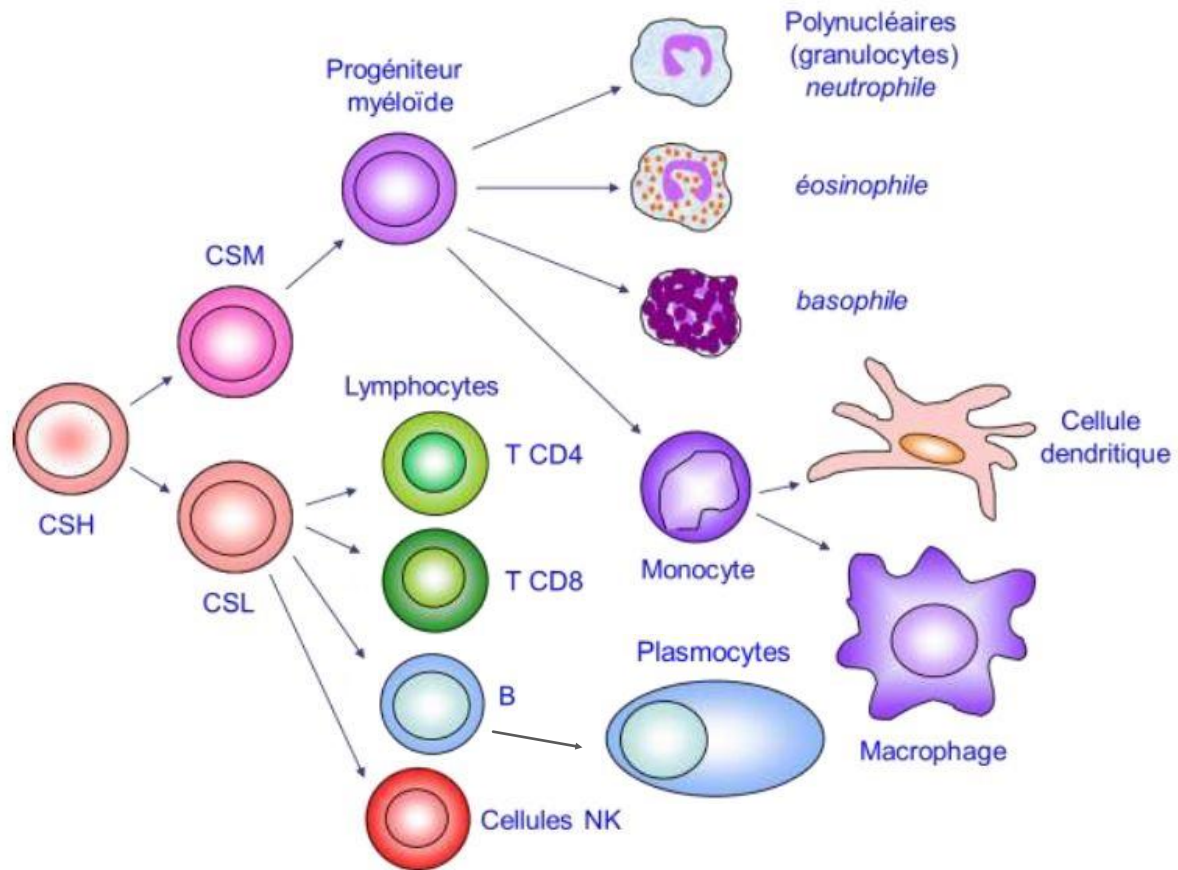


Figure 1. Les systèmes cellulaires impliqués dans l'immunité (Abbal, 2012 (2)).

A partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) totipotente, sont générées des cellules souches lymphoïdes (CSL) et des cellules souches myéloïdes (CSM). Les premières donnent naissance aux lymphocytes B qui se différencient en plasmocytes, aux lymphocytes T CD4 ou CD8 et aux cellules NK. Les secondes sont à l'origine des trois types de granulocytes: polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, ainsi qu'aux monocytes qui se différencient par la suite en cellules dendritiques ou en macrophages.

1.1.1.1.2. Les lymphocytes

Remarque: Les lymphocytes NK représentent un tiers des cellules lymphocytaires et appartiennent au système immunitaire inné. Pour des raisons pratiques, le terme de lymphocytes fera référence aux lymphocytes B et T, objets de cette étude et les lymphocytes NK ne seront pas détaillés.

I.1.1.1.2.1. Description morphologique

Les lymphocytes sont de petites cellules rondes, de 7 à 15 μm de diamètre avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Le cytoplasme contient des mitochondries, des ribosomes libres et un appareil de Golgi (cf. **Figure 2**). Le noyau, volumineux, est intensément coloré par la coloration de May-Grünwald Giemsa. Il existe un type de lymphocyte T cytotoxique particulier. Il s'agit du grand lymphocyte granuleux, à rapport nucléo-cytoplasmique plus faible et contenant des granules azurophiles (cf. Figure 3).

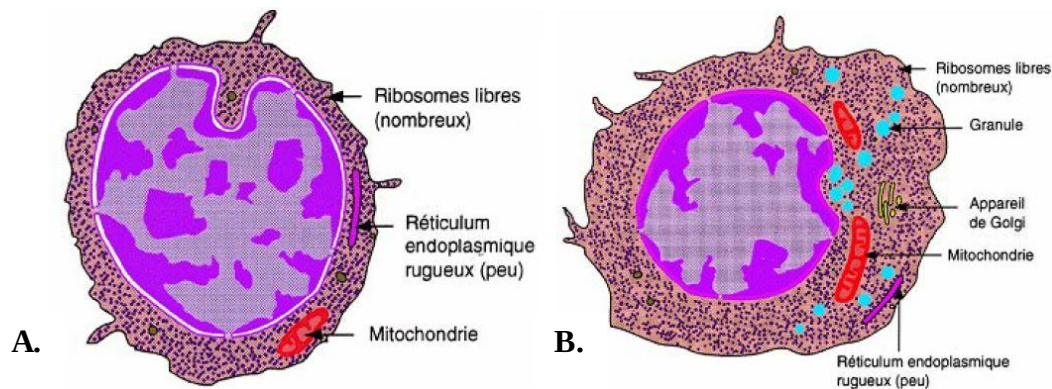


Figure 2. Structure d'un petit lymphocyte (A) et d'un grand lymphocyte granuleux (B) (Spiral, 2009).

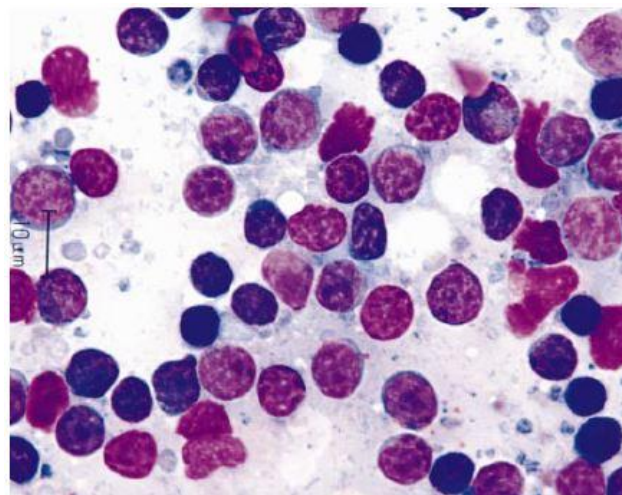


Figure 3. Cytologie de noeud lymphatique d'un chien sain colorée au May-Grünwald Giemsa (Gibson et al., 2004).

Les cellules visibles sur ce frottis sont des lymphocytes, au cytoplasme coloré en bleu et au noyau volumineux coloré en violet. Des noyaux nus, appelés "ombre de Günprecht", sont également visibles et correspondent à un artefact survenant lors de la réalisation d'un frottis.

Les lymphocytes disposent de nombreuses structures moléculaires de surface, les CD (Cluster of Differentiation, ou marqueur de différenciation), définissant l'immunophénotype de la

cellule. Les CD, dont la nomenclature attribue des nombres à chacune d'entre elles, sont catégorisées selon leur fonction (cf. Figure 4 et Figure 5) :

- Formation du complexe antigène/lymphocyte

Les récepteurs spécifiques des antigènes sont des structures complexes de plusieurs protéines capables de se lier spécifiquement aux antigènes et d'émettre un signal de transduction à la cellule. Il s'agit des BCR (B-Cell Receptor) autrement appelés immunoglobulines membranaires pour les lymphocytes B et les TCR (T-Cell Receptor) pour les lymphocytes T.

Exemples:

- ❖ CD3 est le nom donné à l'ensemble des protéines du TCR agissant en tant que transducteurs de signal des lymphocytes T.
- ❖ CD4 et CD8 sont les co-récepteurs à l'antigène capables de reconnaître le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), un système de reconnaissance du soi, de classe II ou I, respectivement. Schématiquement, les CD4 sont présents à la surface des lymphocytes T auxiliaires tandis que les CD8 sont présents à la surface des lymphocytes T cytotoxiques.
- ❖ CD79a et CD79b sont deux petites molécules transductrices de signal, associées au BCR.

Les structures des BCR et des TCR seront détaillées plus précisément au I.1.1.3, étant donné leur importance dans le cadre de cette étude.

- Régulation des fonctions lymphocytaires

Les molécules de surface régulant la réponse lymphocytaire sont majoritairement des récepteurs pour les cytokines, les anticorps ou les composants du complément. Certaines sont des enzymes ou des protéines de transport.

- Adhésion intercellulaire

Les molécules d'adhésion cellulaire assurent les rapprochements cellulaires nécessaires à leurs interactions et contrôlent les déplacements des lymphocytes entre et dans les tissus.

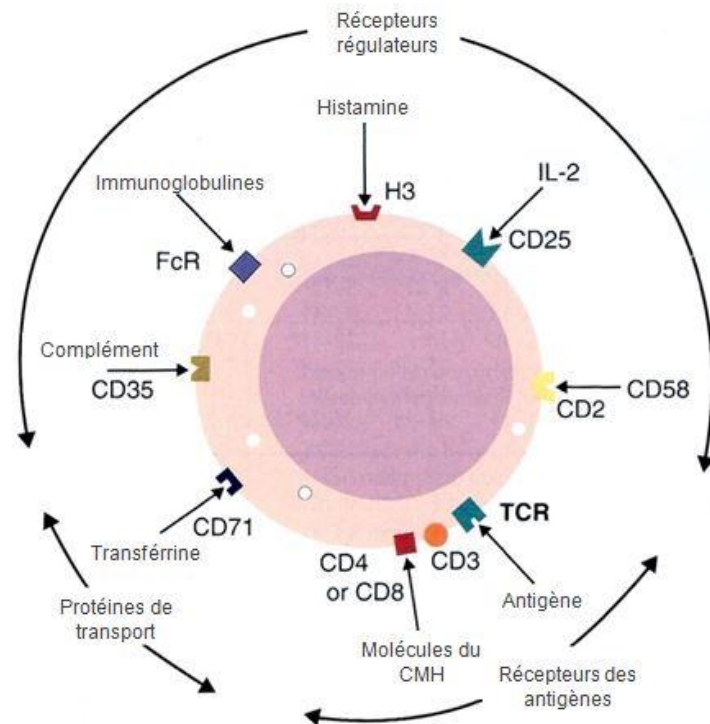


Figure 4. Principales molécules de surface des lymphocytes B, leur ligand et leur fonction (Tizard, 2004). (IL): interleukine.

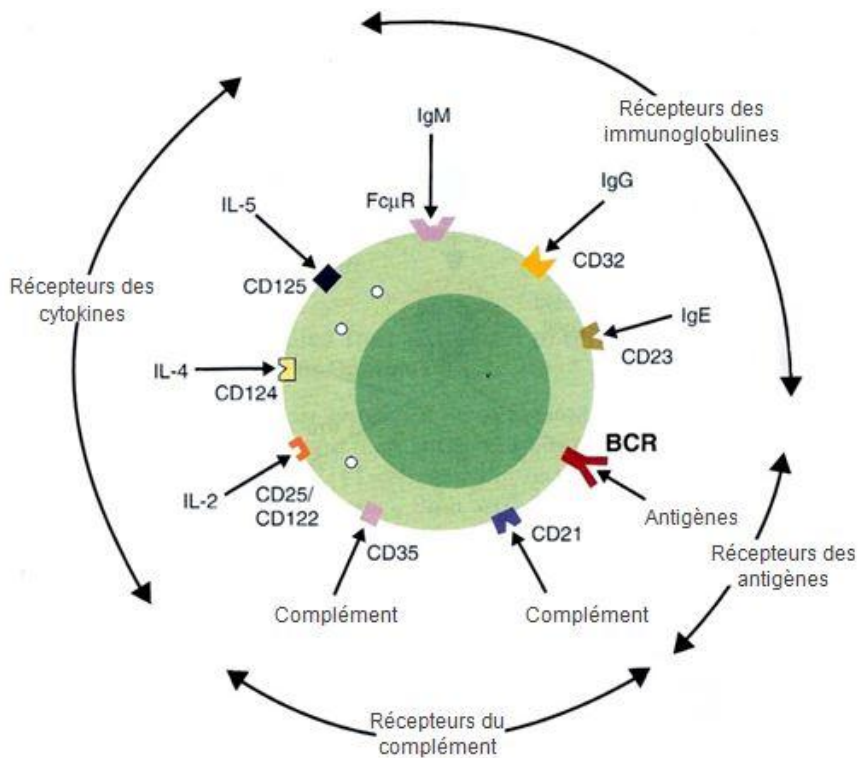


Figure 5. Principales molécules de surface des lymphocytes T, leur ligand et leur fonction (à partir de Tizard, 2004). (CMH): complexe majeur d'histocompatibilité.

Il existe une multitude de sous-populations fonctionnelles de lymphocytes B et T définies par leur immunophénotype et leur capacité à produire différentes cytokines.

I.1.1.1.2.2. Fonction des lymphocytes

Les lymphocytes B et T sont des acteurs majeurs de la défense de l'organisme contre des agents pathogènes, respectivement responsables de l'immunité humorale et cellulaire :

- L'immunité humorale est assurée par les anticorps libérés dans les "humeurs", ou liquides de l'organisme (sang, lymphe, etc.), par les plasmocytes eux-mêmes dérivés des lymphocytes B. Les anticorps circulent librement dans le sang et la lymphe. Ils se fixent principalement aux bactéries et à leurs toxines, ainsi qu'aux virus libres, qu'ils inactivent temporairement et marquent pour favoriser leur destruction par les phagocytes ou le complément.
- L'immunité à médiation cellulaire est assurée par les lymphocytes T et dirigée contre les cellules des tissus infectés par des virus ou des parasites, les cellules cancéreuses et les cellules des greffons étrangers. Leur action est directe, par lyse des cellules cibles (lymphocyte T cytotoxique CD8), ou indirecte, par libération de médiateurs chimiques qui accentuent la réaction inflammatoire ou activent de nouveaux lymphocytes et macrophages (lymphocyte T auxiliaire CD4).

I.1.1.2. Ontogénie des lymphocytes (Nicolas, 2007; Spiral, 2009; Abbal M., 2012 (2))

L'ontogénie des lymphocytes décrit les différents stades des lymphocytes de la cellule souche hématopoïétique à la cellule spécifique effectrice.

I.1.1.2.1. Lymphocytes immatures

Les lymphocytes immatures sont issus des cellules souches lymphoïdes, elles-mêmes dérivées des cellules souches hématopoïétiques totipotentes présentes dans la moelle osseuse.

I.1.1.2.2. Lymphocytes naïfs

Le développement des lymphocytes immatures se poursuit indépendamment des antigènes dans les organes lymphatiques primaires, à savoir la moelle osseuse pour les lymphocytes B et le thymus pour les lymphocytes T. Les lymphocytes acquièrent l'immunocompétence par la génération aléatoire de leurs récepteurs spécifiques par réarrangement des gènes VDJ (cf. I.1.1.3.2). Les lymphocytes B et T subissent alors une sélection positive puis négative dans leurs organes lymphatiques primaires respectifs. Il s'agit dans un premier temps de ne conserver que les lymphocytes capables de reconnaître et de se lier au CMH du soi présentant un peptide (sélection positive). Dans un second temps, ces lymphocytes sont mis en contact avec des antigènes du soi présentés par le CMH. Les cellules dont les récepteurs interagissent trop fortement avec les auto-antigènes sont éliminés (sélection négative). Ceci permet

l'élimination précoce des lymphocytes auto-réactifs incriminés dans les maladies auto-immunes. Seuls 2% des lymphocytes ayant acquis un récepteur spécifique seront conservés à l'issue de cette double sélection.

Les lymphocytes naïfs, devenus immunocompétents et sélectionnés, sont ensuite relargués dans la circulation sanguine et lymphatique et se dispersent dans les organes lymphatiques secondaires (noeuds lymphatiques, rate, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses notamment digestives et respiratoires).

1.1.1.2.3. Lymphocytes matures

La concentration des lymphocytes dans les organes lymphatiques secondaires drainant la lymphe favorisent la rencontre avec les antigènes étrangers. En l'absence de stimulation antigénique, les lymphocytes demeurent à l'état quiescent. En revanche, à la faveur d'un contact avec leur antigène spécifique, les lymphocytes naïfs stimulés achèvent leur ontogénie pour devenir matures et complètement fonctionnels dans les centres germinatifs des noeuds lymphatiques (cf. **Figure 6**). S'ensuit la multiplication clonale de la cellule activée par mitose (l'information génétique est conservée). L'ensemble de ces processus est appelé la sélection clonale. Dans une population clonale, les cellules vont ensuite s'orienter vers des voies de différenciation différentes. Elles se différencient en:

- Cellules effectrices:

Lymphocyte B:

Dans les ganglions lymphatiques, en présence de l'antigène, les lymphocytes B clonaux de même spécificité antigénique se différencient en plasmocytes sécréteurs de plus de 10^5 immunoglobulines (ou anticorps) de même spécificité antigénique, relargués dans la circulation.

Lymphocyte T auxiliaire (CD4):

Les lymphocytes CD4 sélectionnés et activés deviennent des cellules sécrétrices de médiateurs immunitaires: cytokines, protéines ou peptides. Il existe plusieurs sous-types de lymphocytes T auxiliaires, de profils réactionnels et cytokiniques différents (Th1, Th2, ..., Th17 voire Th19). Les plus courants sont les cellules Th1 sécrétrices de l'interféron gamma et de l'interleukine 12, et les cellules Th2 sécrétrices des interleukines 4, 5 et 13. Ces médiateurs immunitaires, par de complexes phénomènes de régulation, renforcent la réponse immunitaire en favorisant l'activation des lymphocytes T CD8 et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes.

Lymphocyte T cytotoxique (CD8):

Les lymphocytes T CD8 sélectionnés et activés migrent dans les différents tissus de l'organisme où ils auront une activité cytolytique sur les cellules cancéreuses ou infectées par un virus.

- Cellules mémoire

L'activation des lymphocytes suite à la rencontre avec l'antigène entraîne une différenciation d'une partie des lymphocytes clonaux en lymphocytes mémoire à durée de vie très grande et capables de réagir rapidement et très efficacement lors d'une deuxième introduction de leur antigène spécifique. Ces lymphocytes mémoire participent à l'éducation du système immunitaire.

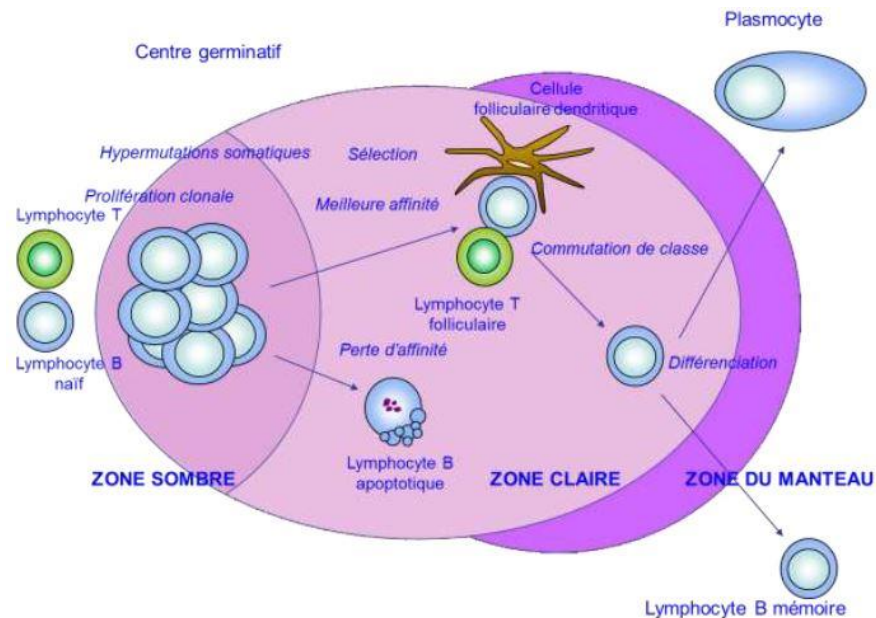


Figure 6. Activation d'un lymphocyte B dans un centre germinatif d'un noeud lymphatique (Abbal M., 2012 (2))

L'activation d'un lymphocyte B naif se déroule dans le centre germinatif après reconnaissance de l'antigène présenté par un lymphocyte T auxiliaire. La prolifération clonale s'effectue dans la zone sombre. La zone claire est le siège de la sélection des lymphocytes B nouvellement formés par la sélection des cellules présentant la meilleure affinité (les autres meurent par apoptose), ainsi que de la commutation de classe. Ces étapes dépendent de contacts avec les cellules dendritiques folliculaires et avec des lymphocytes T helper. Les cellules sélectionnées positivement quittent le centre germinatif sous forme de plasmocytes producteurs d'immunoglobulines ou de lymphocytes B mémoire. Les cellules B naïves n'ayant pas rencontré d'antigène sont repoussées dans la zone du manteau.

I.1.1.3. Acquisition d'un récepteur spécifique (Tizard, 2004; Cozon, 2009)

La reconnaissance spécifique d'un facteur antigénique par un lymphocyte est permise par un récepteur unique exprimé à sa surface, les immunoglobulines (ou BCR: B-Cell Receptor) et les récepteurs des cellules T (ou TCR: T-Cell Receptor).

I.1.1.3.1. Les immunoglobulines

Chaque lymphocyte B porte entre 200 000 et 500 000 BCR identiques. Les immunoglobulines (Ig) libérées par les plasmocytes dérivés des lymphocytes sont des structures similaires à ces BCR.

Un BCR est une structure complexe composée de huit glycoprotéines. Quatre d'entre elles sont impliquées dans la reconnaissance de l'antigène (BCR à proprement parlé), les quatre autres amplifient le signal généré par la liaison de l'antigène et le transmettent à la cellule (transduction du signal):

- Le module de reconnaissance de l'antigène consiste en l'association de deux molécules symétriques, chacune formée de deux chaînes polypeptidiques: une chaîne lourde qui détermine l'isotype (IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE) reliée par des ponts dissulfures à une chaîne légère (κ et λ):
 - Les chaînes lourdes sont constituées de quatre (pour les IgG, IgA et IgD) ou cinq (pour les IgM et IgE) domaines d'environ 110 acides aminés: trois ou quatre domaines C-terminaux constants (CH) et un domaine N-terminal considérablement variable d'un anticorps à l'autre (VH). Ce domaine N-terminal est composé des régions variables (V), des régions de diversité (D) (seulement pour les chaînes lourdes), et des régions de jonction (J). L'extrémité constante des chaînes lourdes correspond au fragment cristallisable (Fc). Il est reconnu par les effecteurs de l'immunité et capable d'activer le complément lorsqu'il s'agit d'une immunoglobuline ou complété d'un domaine transmembranaire permettant son ancrage dans la membrane du lymphocyte B lorsqu'il s'agit d'un récepteur lymphocytaire.
 - Les chaînes légères sont constituées de deux domaines, l'un variable (VL) et l'autre constant (CL) (cf. Figure 7).
Le site de liaison de l'antigène (Fab) est formé par une chaîne légère et des deux domaines N-terminaux d'une chaîne lourde (cf. Figure 8).

Les plus fortes variations de séquence des régions variables des chaînes lourdes et légères sont concentrées dans trois régions qualifiées d'hypervariables de six à dix acides aminés, les CDR (Complementary Determining Region). Chacune de ces CDR est séparée par des régions relativement constantes qualifiées de charpentes, les FR (Framework Region) (cf. Figure 7).

Le repliement des domaines VH et VL définissant la structure tertiaire des chaînes peptidiques permet de rapprocher dans l'espace les 6 CDR qui forment chacun une boucle, l'ensemble constituant le site de liaison de l'antigène (cf. Figure 8).

- Le module de transduction du signal, ou complexe CD79, consiste en l'association de deux dimères glycoprotéiques CD79a-CD79b identiques et situées de part et d'autre du module de reconnaissance de l'antigène.

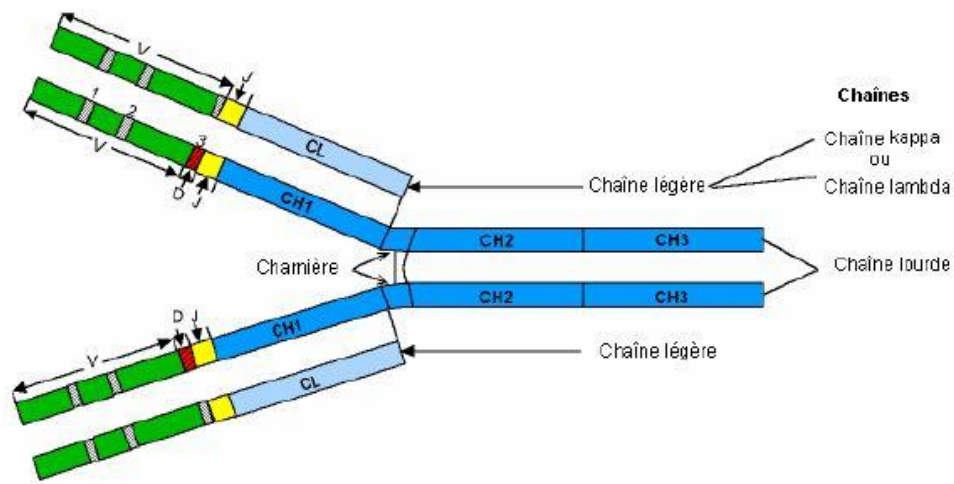


Figure 7. Structure des immunoglobulines et BCR (Cozon, 2009).

La structure de base d'une immunoglobuline comprend deux chaînes polypeptidiques lourdes et deux chaînes polypeptidiques légères. Chaque chaîne possède un domaine variable (VDJ ou VJ) unique et un ou trois à quatre domaines constants pour les chaînes légères (CL) ou lourdes (CH), respectivement. Les domaines variables sont composés des régions variables (V), elles-mêmes constituées de trois régions hypervariables (vert) et de deux à trois régions charpentes (gris), des régions de diversité (D) (rouge) seulement pour les chaînes lourdes, et des régions de jonction (J) (jaune).

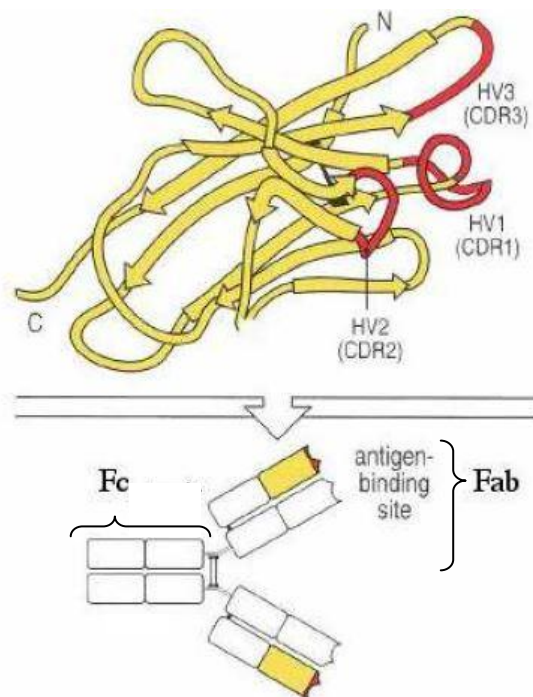


Figure 8. Structure tertiaire d'une chaîne lourde d'immunoglobuline (Cozon, 2009).

(Fab): antigen binding fragment (=site de liaison de l'antigène); (Fc): fragment cristallisable (=site d'interaction cellulaire). Le repliement du domaine variable d'une chaîne lourde (HV) permet de rapprocher les trois régions hypervariables (CDR) afin de constituer le site de liaison de l'antigène (Fab).

I.1.1.3.2. Les récepteurs des cellules T

Chaque lymphocyte T porte 30 000 récepteurs d'antigènes membranaires (TCR) identiques.

Un TCR est une structure complexe composée de huit glycoprotéines. Deux d'entre elles sont impliquées dans la reconnaissance de l'antigène (TCR à proprement parlé), les six autres amplifient le signal généré par la liaison de l'antigène et le transmettent à la cellule (transduction du signal) (cf. Figure 9).

- Le module de reconnaissance de l'antigène est constitué de deux chaînes de la famille des immunoglobulines. Il existe quatre chaînes différentes pour le TCR: α , β , γ , δ . Les associations possibles de chaînes sont α/β et γ/δ . Chaque chaîne est composée d'un domaine variable distal, un domaine constant proximal, une partie transmembranaire et de quelques acides aminés intracytoplasmiques.

A l'image des BCR, la structure tertiaire des chaînes polypeptidiques des TCR permet de rapprocher les trois régions hypervariables, CDR, séparées par des régions charpentes afin d'en constituer un site de liaison de l'antigène.

- Le module de transduction du signal, ou complexe CD3, consiste en l'association de trois dimères de chaînes protéiques: γ - ϵ , δ - ϵ et ζ - ζ ou ζ - η .

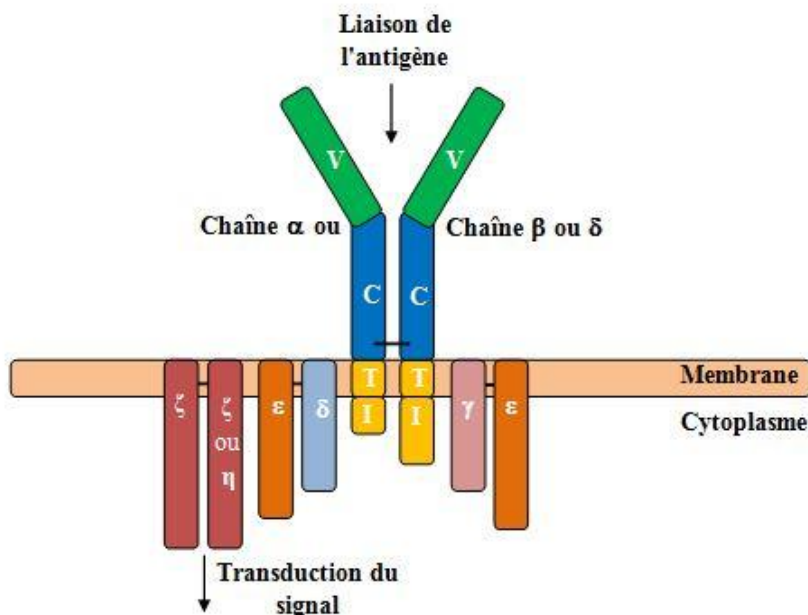


Figure 9. Structure du complexe TCR (d'après Tizard, 2004).

(V): domaine variable des chaînes protéiques; (C): domaine constant des chaînes protéiques; (T): partie transmembranaire des chaînes protéiques; (I): partie intracytoplasmique des chaînes protéiques. L'antigène se lie spécifiquement au récepteur du lymphocyte T, à l'origine d'un signal relayé à la cellule par les dimères γ - ϵ , δ - ϵ et ζ - ζ ou ζ - η .

I.1.1.3.3. Réarrangement des gènes codant les récepteurs

L'organisme est capable de fabriquer plus de 10^{14} de récepteurs à l'antigène différents (Dreitz et al., 1999). Cette diversité est nécessaire afin de lutter contre les innombrables agents pathogènes en constante évolution. Seuls quelques centaines de segments de gènes codant les domaines variables des récepteurs sont à l'origine d'un tel polymorphisme. Celui-ci est rendu possible grâce à un processus de réarrangement des segments d'ADN codant les domaines variables des chaînes polypeptidiques des BCR et TCR. Ce phénomène est appelé recombinaison somatique par opposition à la recombinaison de gènes qui se produit durant la formation des gamètes (Chaubert et al., 2010).

Dans les cellules précurseurs des lignées B canines, il existe approximativement 80 gènes V (région variable), 5 gènes J (région de jonction), et 6 gènes D (région de diversité) différents codant les domaines variables des chaînes lourdes de BCR (Bao et al., 2010). Ces gènes sont en configuration germinale, c'est à dire, non fonctionnels, éloignés les uns des autres sur les chromosomes. A la faveur d'un réarrangement aléatoire, seule une combinaison VDJ parmi plusieurs milliers possibles persiste dans les lymphocytes matures.

Ces recombinaisons sont permises par un complexe enzymatique (VDJ recombinaise) et la présence de séquences signal de recombinaison RSS (Recombination Signal Sequences) pour chacun des gènes V, D ou J. En effet, au cours du réarrangement des gènes codant les domaines variables des chaînes d'immunoglobulines, les VDJ recombinaises reconnaissent les séquences RSS situées en 3' (aval) d'un gène J et en 5' (amont) d'un gène D et induisent un clivage de la molécule d'ADN aux sites RSS permettant le rapprochement des gènes J et D correspondants. Suite à ce clivage, un nombre aléatoire de nucléotides est ajouté entre les gènes cibles. Ce processus est réitéré avec un gène V pour former la combinaison finale VDJ. L'ajout d'un nombre aléatoire de nucléotides participe à la diversité du répertoire des molécules d'immunoglobulines en modifiant la structure tertiaire de la molécule traduite (cf. Figure 10) (Tizard et al., 2004).

Par la suite, le même phénomène se produit pour les domaines variables des chaînes légères des BCR avec la recombinaison d'un gène V et d'un gène J.

Au sein des lymphocytes T, la recombinaison des gènes est similaire à celle des gènes codant la chaîne légère des lymphocytes B. Un réarrangement des gènes s'opère afin de former une combinaison aléatoire d'un gène V et d'un gène J.

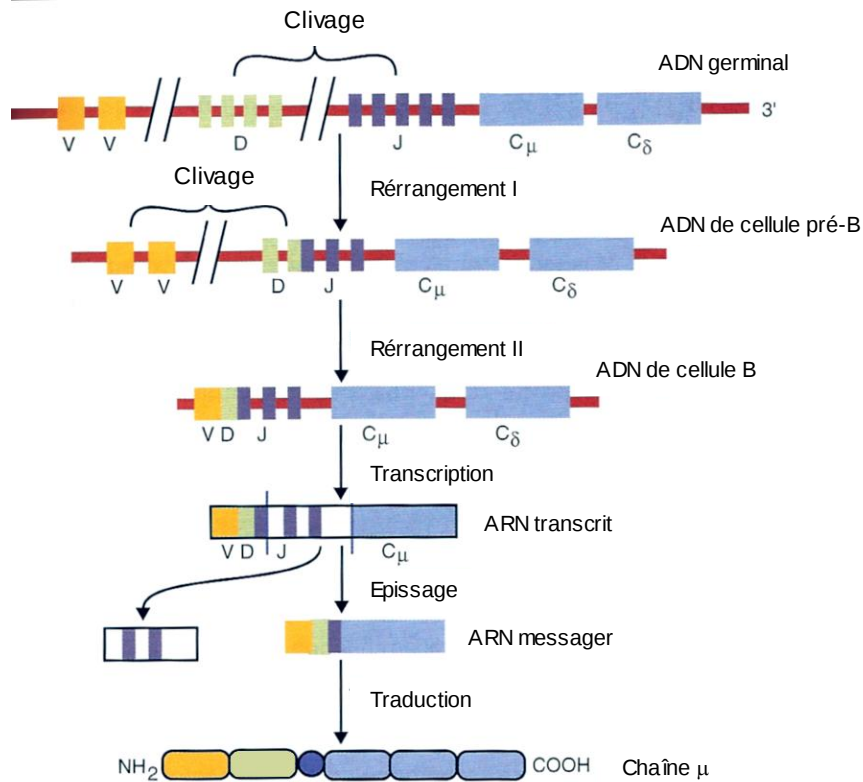


Figure 10. Réarrangements des gènes codant la chaîne lourde d'une immunoglobuline (Tizard, 2004).

La molécule d'ADN est clivée entre un gène D et un gène J puis entre un gène V et les gènes précédemment recombinés DJ (l'ajout des séquences oligo-nucléotidiques n'est pas représenté sur ce schéma). Il y a ensuite transcription de la molécule d'ADN réarrangée et épissage des gènes non recombinés. Un gène codant la région constante est également sélectionné par un mécanisme différent, permettant la traduction d'une chaîne lourde d'immunoglobuline.

Chaque allèle est potentiellement et successivement le siège d'une recombinaison somatique. Dès lors qu'un réarrangement allélique est fonctionnel, le récepteur antigénique est exprimé en surface et inhibe les processus de réarrangement suivants. Il s'agit de l'exclusion allélique. (cf. Figure 11). Ainsi, un seul allèle code un récepteur fonctionnel dans une cellule (Lefranc et al., 2002).

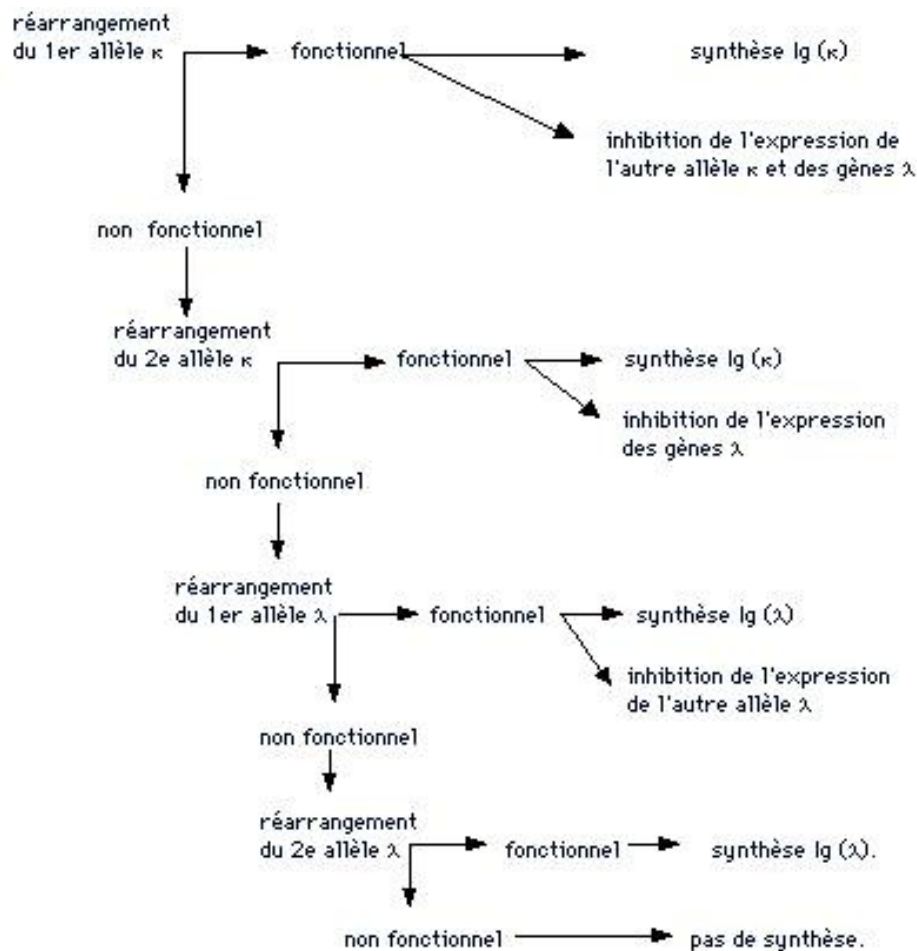


Figure 11. Réarrangements successifs des allèles codant les chaînes légères κ puis des allèles codant les chaînes légères λ jusqu'à la production d'un réarrangement fonctionnel et l'exclusion allélique (Lefranc et al, 2002).

Suite à l'acquisition de leurs récepteurs, les lymphocytes subissent les sélections positive et négative dans les organes lymphoïdes primaires (cf. I.1.1.2.2.).

Enfin, les lymphocytes matures complètent leur répertoire de récepteurs dans les centres germinaux à la faveur d'hypermutation somatique (mutations mono-nucléotidiques, insertions ou délétions de nucléotides). L'organisme est ainsi capable de fabriquer plus de 10^{14} de récepteurs à l'antigène différents (Dreitz et al., 1999).

I.1.2. Rappels physio-pathologiques concernant le lymphome

Dans le cadre d'une réponse immunitaire à un pathogène, les lymphocytes B et T sont activés, prolifèrent puis meurent rapidement par apoptose ou se différencient en lymphocytes mémoire à durée de vie plus longue. Ces mécanismes sont contrôlés par des facteurs de régulation de la multiplication et de la différenciation cellulaire et permettent de réguler la population cellulaire.

A la faveur d'une exposition chimique ou physique, une infection virale ou une mutation génique, regroupés sous le terme de facteurs oncogènes, les cellules peuvent acquérir de nouvelles propriétés (activation des proto-oncogènes, inactivation des gènes suppresseurs de tumeur et des gènes assurant la stabilité du génome, mutations, etc) (cf. Figure 12). Dans la majorité des cas, ces cellules initiées expriment des marqueurs tumoraux à leur surface et sont repérées puis détruites par le système immunitaire. Dans le cas contraire, la cellule initiée acquiert la capacité d'échapper aux mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire. Elle prolifère alors anormalement et donne naissance à de nombreuses cellules-filles tumorales clonales aux propriétés identiques. Ceci entraîne le passage graduel d'une cellule initiée vers une croissance autonome et cancéreuse. Si ces cellules clonales restent groupées en un seul site bien délimité, la néoplasie est qualifiée de bénigne. Cependant, si certaines de ces cellules anormales s'échappent du foyer primaire dans la circulation périphérique sanguine et lymphatique pour se fixer et former des foyers secondaires métastatiques, la néoplasie est qualifiée de maligne (Tizard, 2004). Avant même de détecter des métastases, il est possible de déterminer le degré de malignité d'une tumeur grâce à ses caractéristiques histologiques (envahissement voire destruction des structures adjacentes, nature des cellules néoplasiques, grade de la tumeur, etc).

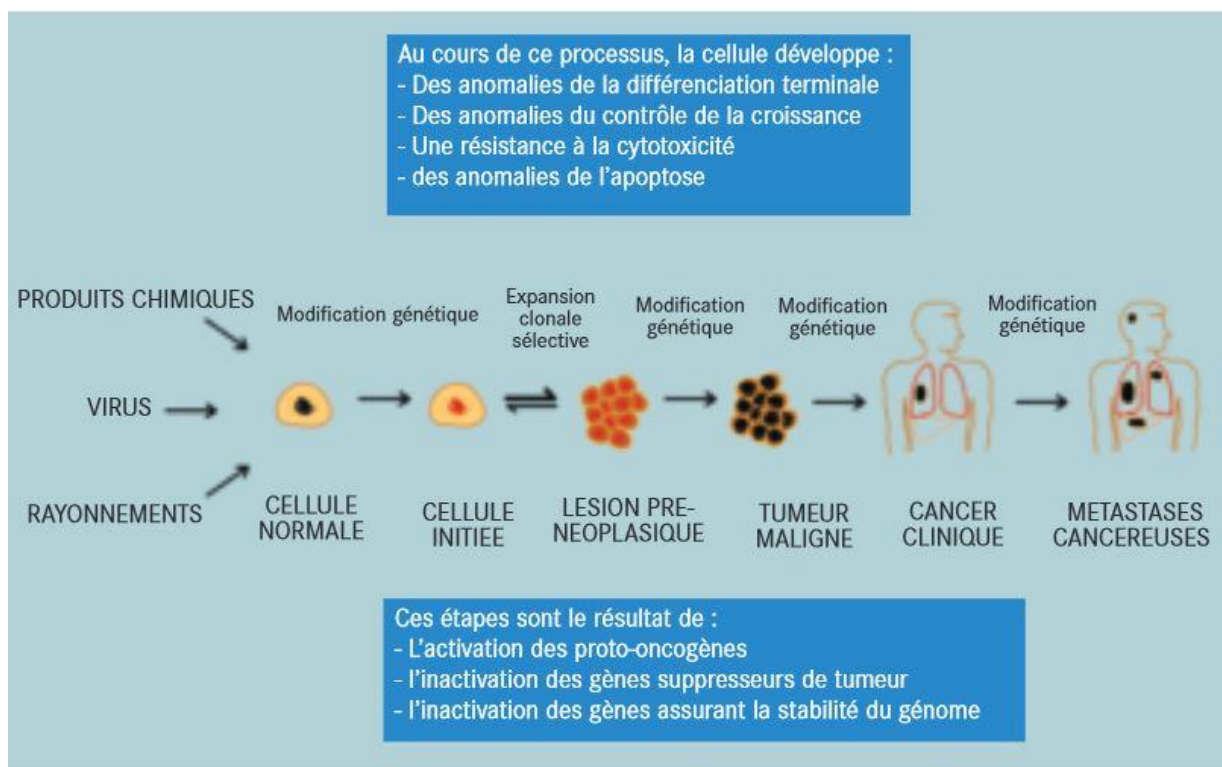


Figure 12. Cancérogenèse (International Agency for Research on Cancer, 2003).

La cancérogenèse est un processus en plusieurs étapes, impliquant un grand nombre d'événements génétiques et épigénétiques successifs à l'origine de modification des proto-oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes anti-métastases.

Les lymphomes, autrement appelés lymphomes malins ou lymphosarcomes, correspondent à une prolifération néoplasique monoclonale voire biclonale de cellules de la lignée lymphoïde. L'ADN de chaque cellule-fille néoplasique est identique et supporte le même réarrangement des gènes codant les récepteurs antigéniques des cellules lymphocytaires. Les lymphocytes néoplasiques expriment donc soit des BCR ou des TCR identiques, soit aucun d'eux selon la nature de la cellule initiée et définissent les lymphomes B, T et NK, respectivement.

Les classifications modernes tendent à faire correspondre autant que possible à un lymphome la cellule normale dont il dérive. Dans un certain nombre de cas, il a été possible de l'identifier (Jaffe et al., 2008). Les lymphomes B peuvent ainsi dériver :

- de cellules B immatures à l'origine des lymphomes lymphoblastiques.
- de cellules B naïves, n'ayant pas traversé le centre germinatif, il s'agira principalement des leucémies lymphoïdes chroniques et des lymphomes du manteau.
- de cellules centrofolliculaires à l'origine des lymphome folliculaire, de la plupart des lymphomes B diffus à grandes cellules et des lymphomes de Burkitt.
- de cellules post centre germinatif à l'origine des lymphomes des zones marginales, de certains lymphomes B diffus à grandes cellules, des lymphomes lymphoplasmocytaires.

Les lymphomes T peuvent dériver:

- de cellules immatures à l'origine des lymphomes et leucémies T lymphoblastiques,
- de cellules T matures à l'origine des lymphomes et leucémies T périphériques.

Les lymphomes NK sont extrêmement rares chez le chien. Il est admis par certains scientifiques qu'ils dérivent de cellules T immatures et présentent certaines de leurs caractéristiques immunophénotypiques. Peu d'études ont été menées à leur sujet (Day, 2008).

I.2. Épidémiologie

Les lymphomes se situent au troisième rang des tumeurs du chien après les tumeurs cutanées et les tumeurs mammaires en terme de fréquence (Ekstrom-Smedby, 2006). Ils représentent entre 7% et 24% des néoplasies canines et 83% des néoplasies hématopoïétiques (Kaiser, 1981; Moulton et al., 1990). Bien qu'aucune étude n'ait été menée afin de déterminer précisément l'incidence annuelle de ces tumeurs dans l'espèce canine, celle-ci est estimée entre 13 et 33 cas pour 100 000 chiens par an. Elle serait de 1,5 cas pour 100 000 chiens de moins d'1 an et 84 cas pour 100 000 chiens entre 10 et 11 ans (Dorn et al., 1970; Teske et al., 1994; Merlo et al., 2008). Au terme d'un recensement des cas de lymphome canin présentés dans vingt structures hospitalières vétérinaires entre 1987 et 1997, l'université de Purdue a observé une augmentation de leur fréquence, de 0,75% à 2%. Cette tendance se confirme aujourd'hui et la fréquence des chiens dont le motif de consultation est un lymphome ne cesse d'augmenter (134/100 000 d'après Dobson et al., 2007). L'âge médian des chiens au moment du diagnostic est situé entre 6 et 9 ans. Il existerait des races pour lesquelles l'incidence du lymphome serait plus élevée (Boxer, Bull mastiff, Basset hound, Saint Bernard, Setter,

Rottweiler, Berger Allemand, Cocker Spaniel, Shetland, Scottish terrier, Airedale et Bouledogue) et d'autres qui semblent au contraire davantage épargnées (Teckel, Spitz nain) (Gavazza et al., 2001; Edwards et al., 2003). L'incidence des lymphomes est moindre pour les femelles non stérilisées (Villamil et al., 2009).

La même tendance est observée chez l'homme. Les lymphomes représentent 5% des tumeurs nouvellement diagnostiquées. Il s'agit de la 5ème cause de mortalité liée au cancer et de la deuxième tumeur en terme de rapidité de croissance tumorale (Jemal et al., 2004).

I.3. Etiologie

De nombreux facteurs de risque ont été identifiés au terme d'études rétrospectives sur les lymphomes canins. Il est cependant impossible pour un animal donné d'établir l'étiologie exacte d'un lymphome tant elle est multifactorielle et complexe (Jaffe et al., 2001).

I.3.1. Facteurs génétiques et moléculaires

Les prédispositions raciales précédemment évoquées sont un élément en faveur de l'existence de facteurs génétiques responsables de la survenue d'un lymphome (Moore et al., 1990). Les récentes avancées techniques de biologie moléculaire, notamment les puces à ADN, ont permis de d'améliorer les connaissances du génome canin et de détecter des aberrations chromosomales récurrentes chez les chiens atteints de lymphome:

- Prédispositions individuelles
 - Trisomie 13 ou 31;
 - Monosomie 14;
 - Mutations génétiques germinales.
- Mutations acquises
 - Mutations somatiques;
 - Altérations de l'expression des gènes suppresseurs de tumeur, du signal de transduction ou de la voie d'apoptose;
 - Modifications épigénétiques (e.g., hypométhylation de l'ADN).

I.3.2. Facteurs immunologiques

La plupart des lymphomes canins surviennent chez des individus par ailleurs manifestement immunocompétents, néanmoins l'association entre les lymphomes et des dysfonctionnements immunitaires primaires a été identifiée dans quelques situations:

- Parmi les maladies à médiation immune du chien, la thrombopénie à médiation immune représente un facteur de risque important de développement de lymphome secondaire (Keller, 1992).
- Une étude évoque une association entre les dysrégulations immunitaires dont sont victimes les chiens atopiques et le risque de développement de lymphome T épithélioïde. Cependant, le lien entre le lymphome et la maladie à proprement parler

ou les traitements immunomodulateurs consécutifs n'a pu être clairement établi (Santoro et al., 2007).

- Un cas de lymphome canin a été rapporté suite à traitement immunosuppresseur à base de cyclosporine (Blackwood et al., 2004). Ce cas demeure isolé.
- Par ailleurs, chez l'homme et le chat, les transplantations d'organe sont des facteurs favorisant le développement de tumeurs viro-induites favorisée par la dépression du système immunitaire. Ainsi, dans une étude cas-témoins menée par Schmiedt et al. en 2009, 24% des chats ayant subi une transplantation rénale ont développé une tumeur par la suite, dont 36% étaient des lymphomes.

I.3.3. Facteurs infectieux

Chez l'homme, une infection par le virus Epstein-Barr a été mise en relation avec certaines formes de lymphome (Levine, 1994). 38,4% et 64% des chiens pour lesquels une sérologie herpèsvirus a été réalisée sont positifs au Royaume-Uni et aux Etats-Unis respectivement. Des anticorps contre des herpèsvirus (autres que les gammaherpèsvirus dont fait partie le virus Epstein-Barr), témoins d'une infection antérieure, ont également été détectés chez des chiens atteints de lymphome cependant la relation avec la tumeur n'est pas clairement établie. Cette découverte, récente, fait actuellement l'objet d'investigations (Milman et al., 2011).

Une infection à *Helicobacter spp.* est susceptible de provoquer des lésions pré-néoplasiques gastriques chez l'homme (Zucca et al., 1998). *H. pylori* est la seconde cause de développement de lymphome alimentaire chez l'homme et figure parmi les cancérigènes de classe I (certains) déterminés l'Organisation Mondiale de la Santé (Sailasuta et al., 2012). Ces mêmes lésions pré-néoplasiques ont été mises en évidence chez le chien et pourraient jouer un rôle dans la lymphomagenèse du lymphome gastrique canin (Rossi et al., 1999). Cependant, il semble que certaines espèces du genre des hélicobacters soient davantage incriminées que d'autres. En effet, *H. pylori* perturberait davantage la sécrétion de gastrine à l'origine d'une hyperacidité gastrique, d'une gastrite chronique voire de lésions métaplasiques pré-néoplasiques que *H. felis*, *H. bilis*, *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. heilmannii* ou *Flexispira rappini* desquelles le chien est naturellement porteur (Sailasuta et al., 2012).

Certaines études rapportant la découverte dans le sérum canin d'anticorps anti-protéines de lentivirus (et plus spécialement anti-VIH) ont encouragé la recherche d'une étiologie virale dans les lymphomes malins canins (Strandstrom et al., 1990). Cependant, devant l'absence de résultats probants, cette hypothèse semble de nos jours abandonnée.

I.3.4. Facteurs environnementaux

L'influence des facteurs environnementaux, controversée, a fait l'objet de nombreuses études dont les résultats divergent souvent. Certains facteurs seraient néanmoins plus souvent incriminés :

- L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) contenu dans certains produits herbicides (Hayes et al., 1991);
- La vie dans une zone industrielle serait un indicateur de risque de développement de lymphome chez le chien (Gavazza et al., 2001). Cette caractéristique implique elle-même plusieurs facteurs non clairement identifiés tels que l'exposition à des produits chimiques industriels émis, le mode de vie des propriétaires (fumeur, profession et exposition à des produits chimiques en particulier, etc).

I.4. Classifications

Les lymphomes non Hodgkiniens sont des hémopathies malignes regroupant un grand nombre d'entités morphologiques distinctes, à la présentation clinique et au pronostic variables. Il est très rapidement devenu nécessaire d'établir des classifications universelles et reproductibles des sous-types de lymphome afin d'uniformiser leurs appellations entre cliniciens hématologues, biologistes et anatomo-pathologistes (Parodi, 2001).

Une classification pertinente doit pouvoir décrire toutes les catégories morphologiques du lymphome, définir des groupes de patients homogènes et prédire le comportement clinique, la réponse aux traitements et le pronostic de chacun des sous-types. Son élaboration est fondée sur la localisation anatomique du lymphome et les caractéristiques histologiques et immunophénotypiques des cellules néoplasiques, plus ou moins identiques à celles de la cellule physiologique dont elles sont issues (Vail et al., 2013).

I.4.1. Classification anatomique

Dans l'espèce canine, il est possible de distinguer les formes nodales (dont le tissu à l'origine du lymphome appartient au système immunitaire) des formes extra-nodales.

- Formes nodales:
 - Forme multicentrique

Elle représente 80% des lymphomes canins (Madewell et al., 1987). Le lymphome multicentrique est caractérisé par une lymphadénopathie généralisée avec une adénomégalie superficielle, fréquemment mandibulaire et pré-scapulaire. En fin d'évolution, il n'est pas rare d'observer une hépatosplénomégalie et une infiltration pulmonaire diffuse (Vail et al., 2013).

- Forme alimentaire

La forme alimentaire est moins fréquente et représente 5% à 7% des lymphomes canins (Madewell et al., 1987) avec une incidence plus élevée chez les mâles (Jemal et al., 2004). Elle est caractérisée par une infiltration lymphocytaire des muqueuse et sous-muqueuse du tractus digestif, parfois multi-segmentaire. Cela se traduit par un épaissement pariétal, une

diminution de la lumière intestinale et fréquemment, des ulcérations. L'infiltration tumorale s'étend régulièrement aux noeuds lymphatiques mésentériques et hépatiques (Couto et al., 1989). Une entérite lymphoplasmocytaire des segments adjacents voire distants de la lésion néoplasique est parfois observée. Certains auteurs considèrent cette entérite comme une lésion pré-lymphomateuse (Breitschwerdt et al., 1982).

- **Forme médiastinale**

La forme médiastinale est présente dans 5% des cas de lymphome (Madewell et al., 1987). Elle est caractérisée par une augmentation de taille des noeuds lymphatiques médiastinaux crâniiaux et/ou du thymus (Vail et al., 2013).

- **Forme extra-nodales**

Les formes extra-nodales primaires apparaissent dans des localisations n'appartenant pas au système lymphatique.

- **Forme cutanée**

Elle peut être localisée ou généralisée, épithéliotrope (mycosis fungoides) ou non-épithéliotrope et se caractérise par des nodules ou plaques localisés ou multiples dermiques ou sous-cutanés. Les lymphomes cutanés peuvent envahir secondairement la muqueuse orale, les noeuds lymphatiques, le foie, la rate et la moelle osseuse (Gross et al., 2005).

- **Forme hépatosplénique**

Cette forme est rare. Elle se caractérise par une infiltration hépatique, splénique et médullaire, épargnant généralement les noeuds lymphatiques (Fry et al., 2003).

- **Forme atypique**

Tous tissu contenant des lymphocytes ou leurs précurseurs est susceptibles d'être la localisation primaire d'un lymphome. Ces lymphomes sont rares et se présentent sous des formes variées (rénale, nerveuse, oculaire, pulmonaire, vasculaire, etc).

I.4.2. Classification histologique

Les lymphomes se développent à partir de cellules lymphocytaires possédant leurs propres caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques, transmises aux cellules-filles néoplasiques. De nombreux systèmes de classification histologique, basés sur ces éléments de différenciation, ont été mis au point successivement en médecine vétérinaire pour classer les lymphomes canins.

Les lymphomes malins canins présentant de nombreuses similitudes avec les lymphomes non Hodgkiniens humains, les classifications appliquées sont dérivées des classifications histologiques humaines.

Ces classifications sont en constante évolution du fait de nouvelles connaissances acquises concernant les marqueurs lymphocytaires, les mécanismes physiopathologiques néoplasiques, les pronostics des lymphomes, grâce aux progrès effectués en biologie moléculaire.

Parmi les nombreuses classifications ainsi mises au point et adaptées (classifications de Rappaport, REAL, etc), les classifications WF (Working Formulation), de Kiel actualisée et WHO (World Health Organization) sont les plus utilisées.

I.4.2.1. Classification WF

La classification WF fut développée dans les années 80 dans le but d'établir des concordances entre les différentes classifications des lymphomes malins non hodgkiniens humains déjà existantes. L'objectif est donc d'établir une terminologie universelle pour chacun des lymphomes afin de faciliter les comparaisons entre les différents essais cliniques réalisés. Cette classification est fondée sur la séparation en trois grandes classes pronostiques, définies par les taux de survie et les caractères architecturaux et morphologiques des lymphomes. Les lymphomes sont ainsi classés selon leur grade de malignité: faible, intermédiaire, haut (cf. Tableau 1). L'immunophénotype n'est pas pris en compte dans cette classification (NCI, 1982).

Tableau 1. Classification WF établie par le NCI (National Cancer Institute) (NCI,1982) et répartition des lymphomes canins (Carter et al., 1986; Teske et al., 1994; Fournel-Fleury et al., 1997)

Grade	Sous-type cellulaire	Carter (n=258)	Teske (n=116)	Fournel (n=92)
Bas grade	Lymphocytaire diffus à petites cellules			
	Folliculaire à petites cellules clivées	5,3%	18,1%	21,7%
	Folliculaire mixte			
	Mycosis fongoïdes			
Grade intermédiaire	Folliculaire à grandes cellules			
	Diffus à petites cellules clivées			
	Diffus mixte	28,4%	75%	52,2%
	Diffus à grandes cellules			
	Cellules moyennes macronucléolées			
Haut grade	Immunoblastique			
	Lymphoblastique			
	Diffus à petites cellules non clivées	66,3%	6,9%	26,1%
	Pléomorphes mixtes			
	Pléomorphes grandes cellules			
	Inclassable			

Selon cette classification, la majorité des lymphomes canins sont de haut grade (Carter et al., 1986) ou de grade intermédiaire (Teske et al., 1994; Fournel-Fleury et al., 1997).

I.4.2.2. Classification de Kiel actualisée

Les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis de mettre au point des techniques utiles pour le diagnostic des lymphomes et la détermination de leur immunophénotype (cytochimie, immunohistochimie, etc). Ces nouvelles données ont été incluses dans une classification, la classification de Kiel actualisée, fondée sur les caractéristiques morphologiques des lymphocytes néoplasiques et leur immunophénotypage. Elle distingue également les lymphomes de bas grade et de haut grade en fonction de leur durée et taux de survie, rémission et guérison (cf. Tableau 2) (Stansfeld et al., 1988).

I.4.2.3. Classification WHO

La classification WHO fut élaborée dans le but de fournir une classification consensuelle intégrant les nouvelles découvertes en matière de biologie moléculaire. Elle repose sur les critères anatomiques, histologiques et immunophénotypiques des lymphomes afin d'améliorer la précision et la reproductibilité du diagnostic des différentes entités néoplasiques ainsi que la prédiction de leur comportement biologique, leur réponse à la chimiothérapie et leur pronostic (Valli et al., 2002). Contrairement aux précédentes classifications, les lymphomes ne sont pas classés en fonction de leur grade histologique (Kiel actualisée) ou de leur agressivité clinique (WF) (cf. Tableau 2).

En se basant sur ces critères, vingt pathologistes de l'université du Wisconsin-Madison Veterinary Medical Teaching Hospital ont établi des diagnostics concordants pour 80% des 300 cas examinés et pour 87% des lymphomes les plus fréquents (représentant eux-mêmes 80% des cas) à savoir les lymphomes B diffus à grandes cellules, les lymphomes de la zone marginale, les lymphomes T périphériques, les lymphomes des zones T (Kiel actualisée), les lymphomes à cellules T précurseurs, les lymphomes folliculaires (Valli et al., 2011).

Tableau 2. Classifications de Kiel actualisée (Stansfeld et al., 1988) et de WHO (Valli et al., 2002) et correspondances:

Classification de Kiel actualisée	Classification WHO
Lymphomes B	
Bas grade	Lymphomes B périphériques
• Lymphome à petites cellules B • Lymphome à petites cellules lymphocytaires ○ Leucémie lymphoïde chronique ○ Leucémie pro-lymphocytaire ○ Leucémie à tricholeucocytes • Prolymphocytaire • Lymphoplasmocytaire • Lymphome des zones marginales • Centroblasto-centrocytaire ○ folliculaire +/-diffus ○ diffus	• - • Leucémie lymphocytaire B chronique/ ou lymphome à petites cellules lymphocytaires / ou lymphome à petites cellules B de bas grade /anaplasique • - • Lymphome lymphoplasmocytaire • Lymphome des zones marginales nodal, Lymphome des zones marginales extranodal, Lymphome des zones marginales splénique • Lymphome folliculaire de grade I/II
Haut grade	
• Centroblastique monomorphe ○ Sous type folliculaire ○ Sous type diffus • Centroblastique polymorphe • Immunoblastique • Anaplasique/Médiastinal	• Lymphome folliculaire de grade III • Lymphome B diffus à grandes cellules • Lymphome B diffus à grandes cellules • Lymphome B diffus à grandes cellules • Lymphome médiastinal à cellules B (Lymphome diffus B à grandes cellules)
Type Burkitt	
Plasmocytoïde	
Lymphome à petites cellules de haut grade	• Lymphome de Burkitt • Pas de corrélation avec la classification WHO • Lymphome du manteau ?

Classification de Kiel actualisée	Classification WHO
Lymphomes T	
Lymphomes à cellules T précurseurs : lymphoblastiques	Lymphomes/leucémies à cellules T précurseurs
Lymphomes à cellules T matures : • Bas grade ○ Prolymphocytaire ○ Pléomorphe à petites cellules ○ Lymphome des zones T • Haut grade ○ Pléomorphe mixte ○ Pléomorphe grandes cellules ○ Immunoblastique ○ Plasmocytoïde ○ Lymphome agressif à cellules à grains • Non classés • Lymphome T cutané ○ Lymphome T cutané bas grade ○ Lymphome T cutané haut grade	Lymphomes/leucémies à cellules T périphériques : • Leucémie lymphoïde chronique à cellule T • Lymphome T périphériques • Lymphome T périphériques • Lymphome T périphériques • Lymphome T périphériques • Lymphome T associé à une entéropathie / ou lymphome extranodal nasal • Inclassables • Mycosis fongoïde/Syndrome de Sérazy • Lymphome T cutané
Néoplasie ni B ni T	Leucémie à cellules NK

La classification WHO est la seule qui différencie les lymphomes nodaux et extra-nodaux. Cependant, elle ne prédit pas de l'agressivité de la tumeur comme le font les classifications WF et de Kiel modifié. Les grades de malignité établis par la classification WF sont corrélés à la survie globale tandis que ceux établis par la classification de Kiel actualisée sont utiles dans le pronostic de la rémission clinique et de la rechute.

La complexité de chacune des classifications et la difficulté de trouver un consensus reflète la diversité des néoplasies regroupées sous le terme de lymphome.

I.5. Signes cliniques

Les signes cliniques associés aux lymphomes canins sont variés, non spécifiques et dépendent de l'extension et de la localisation de la tumeur (ou forme).

I.5.1. Forme nodale

I.5.1.1. Forme multicentrique

Les lymphomes multicentriques sont souvent caractérisés par lymphadénopathie hypertrophique périphérique, discrète, bilatérale, symétrique, indolore, généralisée commençant généralement par les noeuds lymphatiques mandibulaires et pré-scapulaires. Une hépatomégalie, une splénomégalie, une adénomégalie intra-abdominale et une infiltration de la moelle osseuse accompagnent parfois l'adénomégalie périphérique. Le plus souvent, au moment du diagnostic, l'état général des chiens est conservé. 20 à 40% cas présentent cependant des épisodes d'anorexie, de léthargie, d'amaigrissement, de troubles digestifs, d'ascite, de dyspnée, de polyuro-polydipsie et de fièvre (Vail, 2013).

I.5.1.2. Forme alimentaire

Les signes cliniques du lymphome digestif sont non spécifiques: vomissement, anorexie, diarrhée, amaigrissement. La palpation abdominale peut mettre en évidence une masse abdominale, une hypertrophie des noeuds lymphatiques mésentériques ou des anses intestinales épaissies (Couto et al., 1989).

I.5.1.3. Forme médiastinale

La forme médiastinale est caractérisée par un élargissement des structures médiastinales crâiales et/ou du thymus. Les signes cliniques sont occasionnés par la compression des organes intra-thoraciques par la masse formée: dyspnée, toux, régurgitations, oedème de la face, du cou et des antérieurs par compression de la veine cave (Vail et al., 2013). Une hypercalcémie à l'origine d'un syndrome polyuro-polydipsie est associée dans 10% à 40% des cas (Rosenberg et al., 1991).

I.5.2. Forme extra-nodale

I.5.2.1. Forme cutanée

Le lymphome cutané est fréquemment généralisé ou multifocal. Les lésions cutanées sont très variables: nodules, plaques, ulcères, dermatite érythémateuse ou exfoliative associés à une hypopigmentation locale et une alopecie (Vail et al., 2013). Le lymphome cutané se présente lui-même sous deux formes:

- La forme épithéliotrope (mycosis fongoïde) est un lymphome T localisé à l'épiderme. Les lésions sont souvent situées au niveau des jonctions cutanéomuqueuses et de la muqueuse buccale.
- La forme non épithéliotrope est un lymphome T localisé au derme. Cette forme est plus agressive et évolue rapidement vers des lésions cutanées multiples et une

infiltration des noeuds lymphatiques, des organes abdominaux et de la moelle osseuse (Gross et al., 2005).

I.5.2.2. Autres formes extra-nodales

- Les chiens atteints de lymphome hépatosplénique présentent généralement des signes cliniques non-spécifiques tels qu'une léthargie, une dysorexie, un amaigrissement, de la faiblesse voire un ictère (Fry et al., 2003).
- Le lymphome oculaire est la deuxième tumeur oculaire chez le chien après le mélanome (Swanson., 1990). Il résulte de l'infiltration tumorale ou d'uvéites paranéoplasiques. Les signes oculaires incluent des uvéites antérieures, des panuvéites, des conjonctivites, des kératites interstitielles, de l'hyphéma, des hypopions, des synéchies postérieures, des atteintes du segment postérieur (masses choroïdiennes, hémorragies rétinienne), des glaucomes et des décollements de rétine (Swanson, 1990).
- Le lymphome neurologique est soit primaire, soit secondaire à une autre forme de lymphome malin. L'infiltration du système nerveux central est plus fréquente que celle du système nerveux périphérique (Couto et al., 1984). Les signes cliniques sont variés et dépendent du territoire envahi: convulsions, ataxie, paralysie, parésie.
- Les signes cliniques associés aux lymphomes intra-vasculaires sont relatifs aux organes secondairement infiltrés, à savoir les systèmes nerveux et périphériques et les yeux. Cela se traduit par une paraparésie, une ataxie, une hyperesthésie, des convulsions, la cécité, une léthargie, une anorexie, un amaigrissement, de la diarrhée, un syndrome polyuro-polydipsie ou de la fièvre (Vail et al., 2013).

I.6. Diagnostic

Lorsqu'un lymphome est suspecté chez un chien, la démarche diagnostique consiste en un examen clinique, l'établissement du diagnostic différentiel puis la réalisation d'examens complémentaires tels que des analyses hématologiques, biochimiques et urinaires ainsi qu'un recours à l'imagerie. Par la suite, des analyses histologique, cytologique et/ou des techniques de biologie moléculaire permettent de confirmer le diagnostic et de préciser les caractéristiques et la classification du lymphome.

I.6.1. Examen clinique

L'anamnèse et les commémoratifs sont les premiers éléments d'une consultation permettant d'orienter le diagnostic. La race, l'âge, le mode de vie, les antécédents médicaux sont à corréler avec les facteurs de risque connus des lymphomes. Il est également utile de se renseigner sur la durée et le mode d'évolution des signes cliniques dans le temps.

Un examen clinique rigoureux inclut (Vail et al., 2013):

- La palpation de tous les noeuds lymphatiques accessibles
- Un toucher rectal:

Une proportion de chiens non négligeable présente des polypes rectaux correspondant à des agrégats de lymphocytes néoplasiques.

- L'inspection des muqueuses:

Des muqueuses pâles, ictériques, pétéchiales ou ulcérées peuvent être des signes d'anémie ou de thrombopénie secondaires à une myélophthisie, ou une maladie auto-immune, ou bien témoigner d'une insuffisance organique majeure ou d'une urémie.

- La palpation abdominale:

La palpation abdominale permet de détecter d'éventuelles organomégalias, des épaissements pariétaux intestinaux ou des lymphadénopathies hypertrophiques mésentériques.

- L'auscultation pulmonaire:

Des anomalies auscultatoires peuvent être provoquées par la présence d'une masse médiastinale ou d'une effusion pleurale.

- Un examen ophtalmologique:

Une étude a révélé qu'entre un tiers et la moitié des chiens atteints de lymphome présentent des anomalies à l'examen ophtalmologique telles que des uvéites, des hémorragies rétinienne ou des infiltrations oculaires (Krohne et al., 1987).

1.6.2. Diagnostic différentiel

La variété des localisations des lymphomes et de leurs signes cliniques associés rendent le diagnostic différentiel très riche et complexe (cf. Tableau 3).

Tableau 3. Diagnostic différentiel du lymphome canin (Vail et al., 2013)

Forme du lymphome	Diagnostic différentiel
Lymphome multicentrique	• Infections systémiques (bactérienne, virale, parasitaire, fongique) • Désordres dysimmunitaires (e.g., dermatopathies, vasculite, polyarthrite, lupus érythémateux) • Métastases tumorales nodales • Autres tumeurs hématopoïétiques (e.g., leucémie, myélome multiple, sarcome histiocytaire, histiocytose systémique)
Lymphome médiastinal	• Autres tumeurs (e.g., thymome, chémodectome, carcinome thyroïdien ectopique, carcinomatose pleurale) • Maladie infectieuse (e.g., granulomatose, pyothorax) • Divers (e.g., insuffisance cardiaque congestive, chylothorax, hémithorax)
Lymphome alimentaire	• Autres tumeurs gastrointestinales, corps étranger, lymphangiectasie, entérite lymphoplasmocytaire, mycose systémique, ulcère gastroduodénal
Lymphome cutané	• Dermite infectieuse (e.g., pyodermite sévère) • Dermite auto-immune (e.g., pemphigus) • Autres tumeurs cutanées
Lymphome extra-nodal autre	• Grande variété, dépendant de l'organe ou du système impliqué

Les signes cliniques des lymphomes, quelque soit leur forme, ne permettent pas d'orienter le diagnostic. Les examens complémentaires s'avèrent indispensables à l'établissement d'un diagnostic de lymphome.

I.6.3. Examens complémentaires

I.6.3.1. Analyse hématologique

L'anémie est l'anomalie hématologique la plus fréquemment mise en évidence lors de lymphome. Elle est retrouvée dans 60% des cas de lymphome B diffus à larges cellules (Henriques et al., 2014), est généralement non-régénérative, normocytaire et normochrome, conformément aux anémies accompagnant les maladies chroniques (Madewell et al., 1980). Il n'est cependant pas rare d'être en présence d'une anémie régénérative consécutive à des hémorragies ou à une hémolyse en lien avec le lymphome. En cas de myéloptisie (développement d'un tissu anormal au sein de la moelle osseuse comprimant les structures hématopoïétiques), l'anémie est associée à une thrombopénie et une leucopénie (Madewell, 1980). Ainsi, pour des animaux atteints de lymphome et anémiés, des numérations plaquettaire et de réticulocytes ainsi qu'un test de coagulation peuvent s'avérer utiles. Une thrombopénie est mise en évidence dans 24% à 50% des cas de lymphome mais rares sont les

hémorragies cliniquement problématiques (Madewell et al., 1980; Henriques et al., 2014). Enfin, 30% des chiens atteints de lymphome B diffus à larges cellules ont un ratio Neutrophile:Lymphocyte inférieur à la valeur usuelle 3:1. Par ailleurs, un ratio supérieur à cette valeur est associé à un mauvais pronostic (Henriques et al., 2014).

La numération et formule sanguine met en évidence une neutrophilie chez 25% à 40% des chiens et une lymphocytose dans 20% des chiens atteints de lymphome (Madewell et al., 1980).

A la faveur d'un frottis sanguin, la détection de lymphocytes atypiques est révélateur d'un envahissement de la moelle osseuse ou d'une leucémie lymphoblastique primaire, de pronostics très différents (MacEwen et al., 1977).

I.6.3.2. Analyse biochimique

Les analyses biochimiques donnent parfois des informations sur la localisation du lymphome (Vail et al., 2013):

- Une hypoprotéïnémie est davantage observée lors de lymphome alimentaire. En cas d'hyperprotéïnémie, une électrophorèse sérique doit être réalisée afin de rechercher une possible gammopathie monoclonale décelable dans 6% des cas de lymphome canin (MacEwen et al., 1977).
- Une augmentation de l'urémie et de la créatininémie peut être secondaire à une infiltration rénale de la tumeur, une néphrose due à l'hypercalcémie paranéoplasique ou une azotémie prérénale en cas de déshydratation.
- L'augmentation de l'activité des enzymes hépatiques ou de la bilirubinémie peut être consécutive à une infiltration tumorale hépatique.
- Une hypercalcémie d'origine inconnue doit toujours être considérée comme un signe fortement évocateur d'un lymphome. Il s'agit d'une hypercalcémie paranéoplasique associée à environ 15% des lymphomes. Elle est souvent à l'origine d'un syndrome polyuro-polydipsie.

I.6.3.3. Analyse urinaire

L'analyse urinaire est utile pour évaluer la fonction rénale. Ainsi, une isosthénurie associée à une protéinurie peut être le témoin d'un dysfonctionnement rénal. Il est cependant nécessaire de rappeler que l'hypercalcémie, lorsqu'elle est élevée, interfère avec le contrôle de la concentration urinaire par l'hormone anti-diurétique et est à l'origine d'une isosthénurie et d'un syndrome polyuro-polydipsie. Une hématurie peut, quant à elle, être évocatrice d'anomalies hémostatiques (Vail et al., 2013).

I.6.3.4. Imagerie

L'imagerie (radiographie, échographie, tomodensitométrie, etc) est un outil diagnostique très utile pour le diagnostic des lymphomes et leur bilan d'extension.

Des anomalies sur les radiographies thoraciques sont observées dans 60 à 75 % des cas au moment du diagnostic. Les anomalies les plus fréquemment détectées sont une hypertrophie des noeuds lymphatiques thoraciques, une infiltration pulmonaire diffuse, une masse médiastinale et une effusion pleurale. Concernant les infiltrations pulmonaires, la sensibilité est supérieure avec la réalisation d'un lavage broncho-alvéolaire (17% à 34% des chiens atteints de lymphome multicentrique) (Blackwood et al., 1997).

Les radiographies et échographies abdominales révèlent des anomalies dans 50% des cas. Les anomalies radiographiques les plus fréquentes sont l'hépatomégalie, la splénomégalie et l'hypertrophie des noeuds lymphatiques intra abdominaux (Blackwood et al., 1997). L'échographie abdominale permet d'apprécier les modifications architecturales de ces organes en l'absence d'organomégalie et d'évaluer l'organisation en couches de la paroi intestinale. Sa sensibilité est supérieure à celle de la radiographie. De plus, l'échographie donne l'opportunité de réaliser des cyto-ponctions ou biopsies échoguidées afin de confirmer le diagnostic d'infiltration tumorale.

Le recours aux techniques d'imagerie nucléaire (PET/CT, SPECT/CT, PET/IRM) est réservé à la recherche, voire intégré à la pratique courante dans quelques rares centres hospitaliers vétérinaires. Leur grande sensibilité permet de détecter de petits foyers tumoraux et de suivre avec précision la réponse aux traitements instaurés (Lawrence et al., 2009; Ballegeer et al., 2013).

I.6.3.5. Histologie

L'histologie consiste en l'examen microscopique d'une coupe de tissu biopsé ou de pièce d'excision de 4 à 20 µm et colorées au colorant de Wright-Giemsa le plus souvent. Cette analyse permet de diagnostiquer une prolifération tumorale et de définir l'architecture du tissu d'origine, souvent remaniée, par l'étude des cellules dans leur contexte tissulaire. Le type folliculaire précédemment évoqué dans les classifications se caractérise par une prolifération tumorale organisée en nodules séparés par un tissu inter-folliculaire riche en cellules réactionnelles. Le type diffus, quant à lui, présente une prolifération tumorale avec un aspect de nappe cellulaire à laquelle viennent se mêler des cellules réactionnelles. Ces deux types architecturaux peuvent coexister au sein d'un même ganglion ou dans deux ganglions distincts (cf. Figure 13) (Willard et al., 2002; Valli et al., 2011).

Un fort grossissement permet également d'apprécier les caractères cytologiques des cellules néoplasiques.

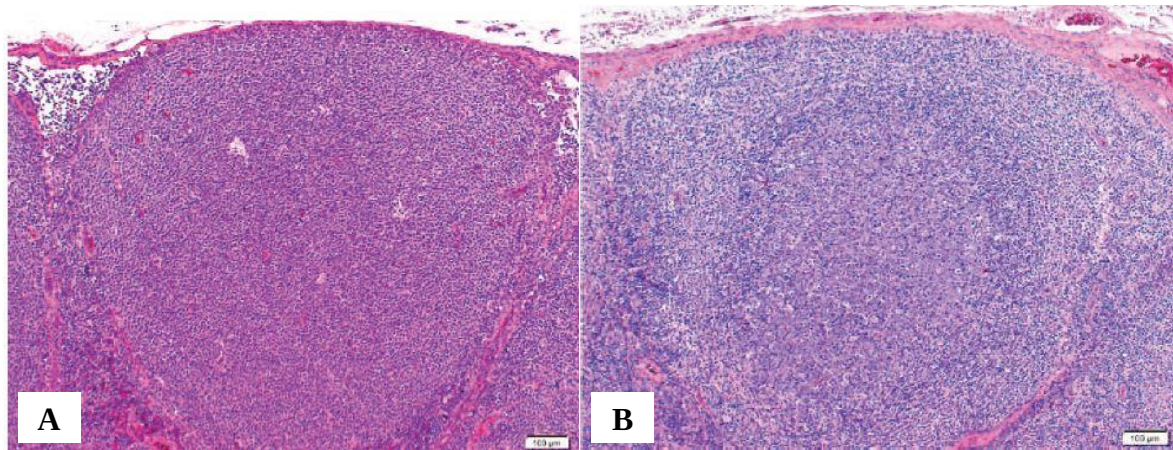


Figure 13. Coupes histologiques d'un noeud lymphatique néoplasique folliculaire (A) et d'un noeud lymphatique hyperplasique (B), colorée au Wright-Giemsa (Valli et al., 2011).

(A): Coupe histologique d'un noeud lymphatique néoplasique folliculaire. L'homogénéité des types cellulaires et de l'architecture, en l'absence de corps tingibles phagocytés est caractéristique de la prolifération lymphomateuse des cellules. La capsule est amincie et le sinus périphérique inter-lobulaire est ouvert; (B): Une ceinture de cellules du manteau est perceptible autour du centre germinale du follicule et encerclée par la zone marginale hyperplasiée, à l'origine de d'un élargissement du follicule. L'architecture du lymphome est respectée.

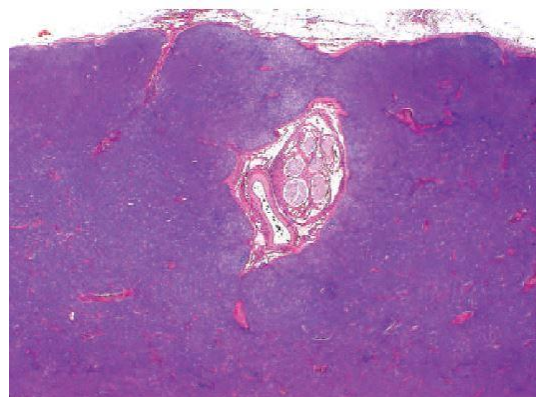


Figure 14. Coupe histologique d'un noeud lymphatique néoplasique diffus (A), colorée au Wright-Giemsa (Valli et al., 2011).

L'effacement de l'architecture nodulaire est caractéristique du type diffus du lymphome. Il est associé à une amincissement de la capsule et une compression du sinus périphérique.

L'histologie est l'examen complémentaire de choix en première intention pour le diagnostic d'un lymphome. Elle permet de fournir un diagnostic pour la grande majorité des lymphomes analysés. Il existe cependant des situations pour lesquels le diagnostic est histologiquement ambigu pour 5% à 10% des cas (Sandberg et al., 2005). Il s'agit notamment de stades précoces de lymphome, de cas chroniques de lymphocytose, de biopsies peu représentatives de la lésion néoplasique, de cas pour lesquels malignité et réactions inflammatoires coexistent (Burnett et al., 2003). De plus, certains carcinomes ou mélanomes métastatiques peu

différenciés peuvent être confondus histologiquement avec un lymphome (Cleary et al., 1984). Le facteur limitant majeur de cette technique repose demeure sa subjectivité. En effet, les résultats d'un analyse histologique sont pathologiste-dépendants (Willard et al., 2002) (cf. Figure 15).

Afin d'en améliorer la sensibilité, l'histologie des noeuds lymphatiques régulièrement réactifs doit être évitée dans la mesure du possible. Ainsi, lorsque plusieurs noeuds lymphatiques sont hypertrophiés, il est préférable de ponctionner les noeuds lymphatiques pré-scapulaires ou poplités plutôt que les mandibulaires. L'envoi de l'intégralité d'un noeud lymphatique, c'est à dire conservé dans sa capsule, aux laboratoires d'analyse est préférable. En effet, cela permet de s'affranchir du risque de ponctionner des régions non représentatives de la lésion et de vérifier l'intégrité de la capsule et la conservation de l'organisation architecturale du noeud lymphatique. Dans le cas d'organes extranodaux, des biopsies laparoscopiques, endoscopiques ou écho-guidées permettent de cibler les régions macroscopiquement atteintes et de limiter la morbidité consécutive aux biopsies (Vail et al., 2013). Concernant les lymphomes cutanés, une attention particulière doit être apportée dans la réalisation des biopsies à l'emporte-pièce afin de ne pas prélever de lésions cutanées secondairement infectées.

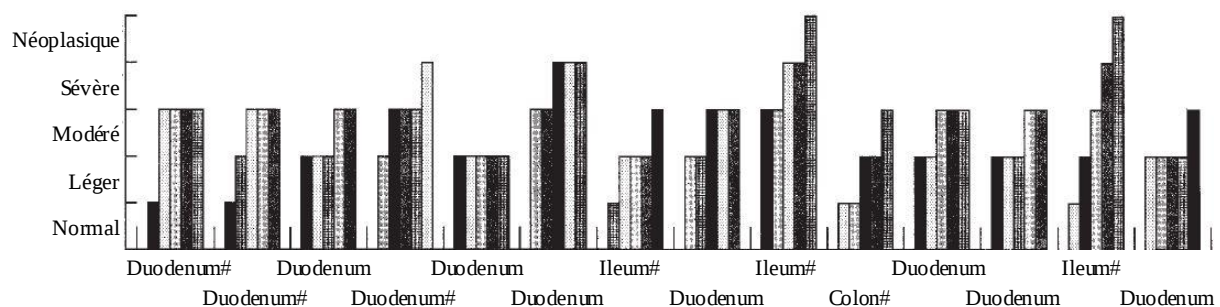


Figure 15. Intensité estimée de l'infiltration cellulaire de la muqueuse intestinale de 14 lames histologiques de nature différente par 5 pathologistes (à partir de Willard et al., 2002).

(#): Prélèvements pour lesquels les variations d'opinion sont les plus importantes. Sur 14 lames analysées, une seule est qualifiée uniformément par les 5 pathologistes, 6 sont quasi-uniformément qualifiée et 7 font l'objet de désaccords importants.

I.6.3.6. Cytologie

La cytologie consiste en l'examen microscopique des cellules prélevées par cytoponction échoguidée ou non, prise de sang ou ponction de liquide cébrospinal ou de liquide d'épanchement. L'aspirat des cytoponctions ou les fluides collectés sont étalés sur une lame et colorés, le plus souvent au colorant de Wright-Giemsa. L'architecture tissulaire du prélèvement n'étant pas conservée, la cytologie est uniquement basée sur l'analyse des cellules prélevées: leur taille et forme, l'aspect de la chromatine, du noyaux et du cytoplasme, l'index mitotique. Dans la majorité des cas, cela suffit à établir un diagnostic de lymphome, d'autant plus que les lymphocytes néoplasiques se présentent très souvent sous la forme de larges cellules monomorphes d'un diamètre supérieur à celui des polynucléaires neutrophiles avec un

noyau soit visible et un cytoplasme basophile, soit indistinct. Des figures de mitose et de volumineux macrophages sont également souvent visibles en cas de lymphome (cf. Figure 16) (Valli et al., 2011; Vail et al., 2013).

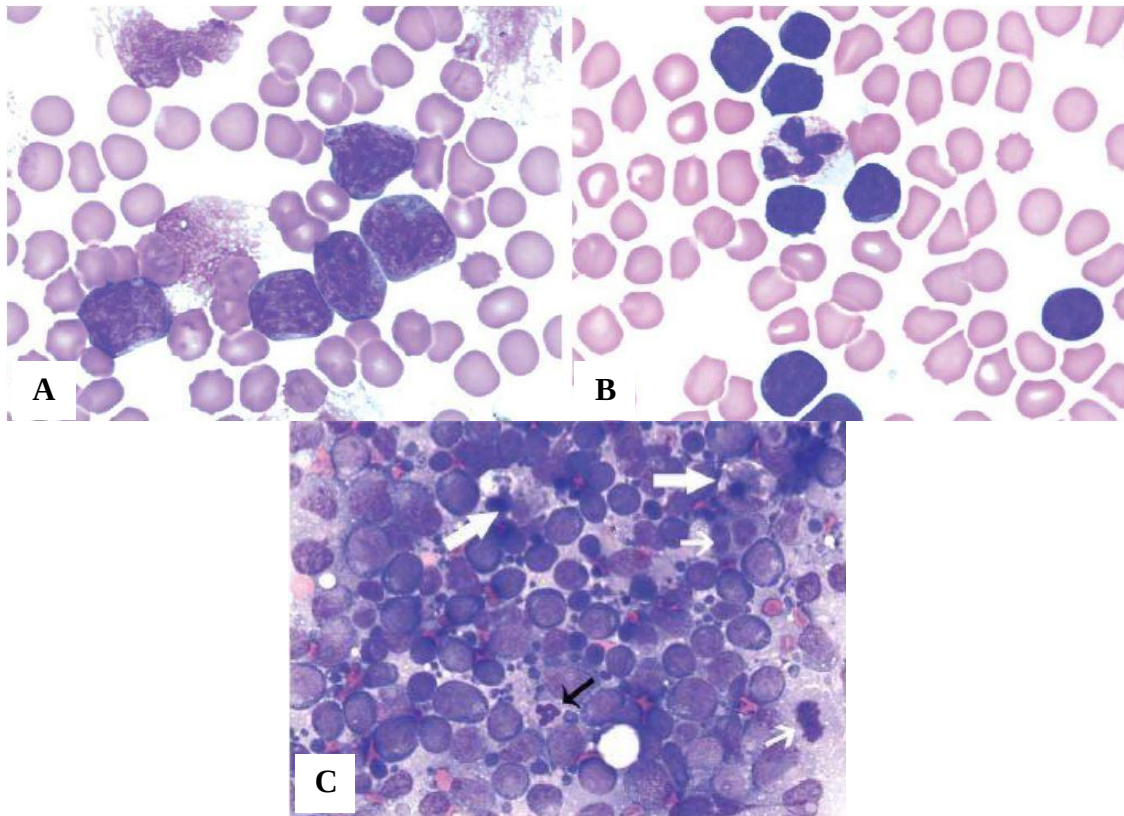


Figure 16. Cytologie à partir de lymphomes canins avec coloration au Wright-Giemsa (objectif du microscope x60) (Vail et al., 2013).

(A): Frottis sanguin périphérique: les cellules lymphocytaires sont larges et contiennent un noyau proéminent. La chromatine de cellules désintégrées est également visible; (B): Frottis sanguin périphérique: les cellules lymphocytaires néoplasiques présentent un aspect normal, leur taille est inférieure à celle des polynucléaires neutrophiles; (C): Cytoponction de noeuds lymphatiques néoplasiques: la cytologie met en évidence une population homogène de grandes cellules lymphocytaires au noyau proéminent et au cytoplasme basophile. Ces cellules sont plus grandes que les polynucléaires neutrophiles (flèche noire). Des figures de mitose (flèche blanche étroite) et de volumineux macrophages à corps tingibles sont également visibles (flèche blanche large).

La cytologie, avec l'histologie, est un bon premier examen en première intention. Elle présente l'avantage supplémentaire d'être facilement et rapidement réalisable dans toute clinique équipée d'un microscope. Elle est également peu invasive et plus sécuritaire par rapport à l'histologie. La perte de l'information architecturale en fait cependant une technique diagnostique moins sensible que l'histopathologie. La sensibilité est également diminuée dans les cas précédemment cités pour l'histologie auxquels s'ajoutent les cas pour lesquels les prélèvements de liquide d'épanchements sont riches en cellules inflammatoires ou au contraire pauvre en cellules lymphocytaires (Burnett et al., 2003).

La sensibilité de la cytoponction peut être augmentée par la réalisation d'un contrôle échographique lors de la cytoponction. En effet, cette technique permet de localiser plus précisément l'endroit de cytoponction et ainsi de limiter les risques d'hémorragies et d'améliorer la représentativité lésionnelle du prélèvement.

I.6.3.7. Immunohistochimie

I.6.3.7.1. Rappel sur l'immunophénotypage

L'immunophénotypage appliqué à l'oncologie est la détermination du type cellulaire à l'origine d'un processus néoplasique. Il repose sur la détection de marqueurs spécifiques de ce type cellulaire à l'aide de diverses techniques.

Dans le cadre des lymphomes, cette information est un élément intervenant dans les classifications modernes. Elle a un intérêt pronostique et thérapeutique et peut également être utilisée à des fins diagnostiques. En effet, au sein d'une structure lymphoïde physiologiquement dotée d'une grande diversité lymphocytaire, la détection d'une population homogène de lymphocytes exprimant les mêmes marqueurs sera en faveur d'un processus néoplasique (Teske et al., 1994; Kiupel et al., 1999; Ponce et al., 2004).

Les marqueurs de différenciation exprimés à la surface d'un type cellulaire donné sont détectés grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques mis en contact:

- avec une coupe de tissu (immunohistochimie);
- avec un prélèvement cytologique (immunocytochimie);
- avec des cellules isolées dans un fluide (cytométrie en flux).

I.6.3.7.2. Principe de l'immunohistochimie

En immunohistochimie, le marquage des lymphocytes est réalisé avec des anticorps dirigés contre les marqueurs de différenciation spécifiques des lymphocytes B (CD21, CD79a), T (CD3, CD4, CD5 voire CD8). Les anticorps dirigés contre les marqueurs de prolifération, Ki 67, AgNOR (Argyrophyl Nucleolar Organizer Regions), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigens) constituent également des outils intéressants dans l'étude des lymphomes canins (Kiupel et al., 1999; Dobson et al., 2001; Riondato, 2013).

Un couple anticorps-antigène peut être visualisé de plusieurs façons. Dans la plupart des cas, un anticorps est conjugué à une enzyme (ex : peroxydase) qui catalyse une réaction de production de couleur (ex : coloration immunoperoxydase) (cf. Figure 17). Alternativement, les anticorps peuvent aussi être marqués par un fluorochrome (ex : FITC, Rhodamine, Texas Red ou Alexa Fluor) et visualisés par immunofluorescence.

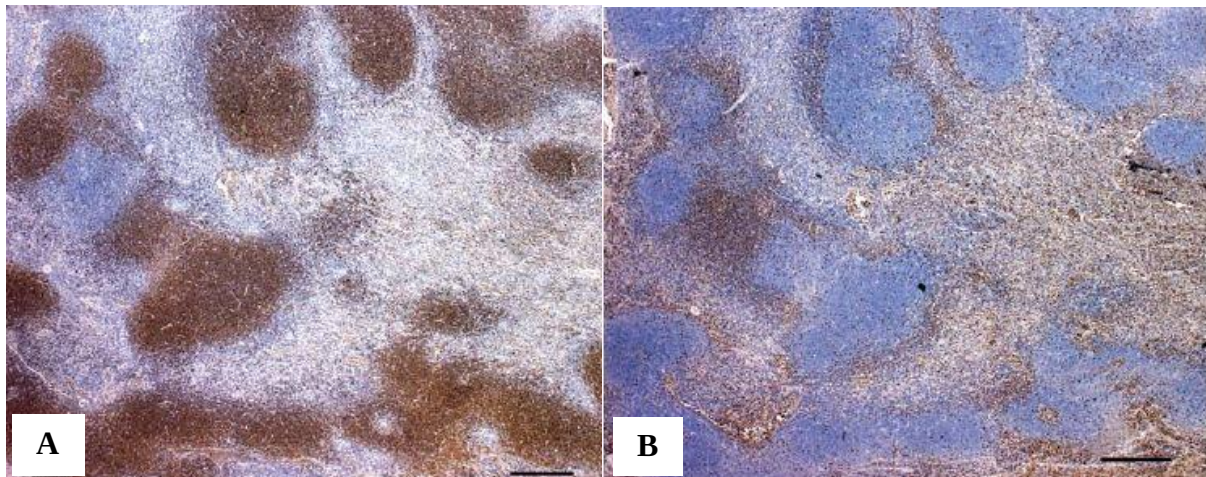


Figure 17. Immunohistochimie à partir d'un lymphome B splénique canin avec coloration au Wright-Giemsa (Delverdier et al., 2010).

(A): expression du marqueur de différenciation CD79a par la population tumorale lymphocytaire B mise en évidence par la coloration brunâtre des cellules par la peroxydase liée à l'anticorps monoclonal anti-CD79a; (B): expression du marqueur de différenciation CD3 par la population lymphocytaire T mise en évidence par la coloration brunâtre des cellules par la peroxydase liée à l'anticorps monoclonal anti-CD3; (barre noire): 500 μ m. Les lymphocytes B néoplasiques prolifèrent en masse au sein des follicules ganglionnaires cernés par une mince bande formée de lymphocytes T.

L'immunohistochimie est plus sensible que l'histopathologie pour le diagnostic de lymphome puisqu'elle s'affranchit partiellement de la subjectivité de la lecture de lame grâce à la coloration des lymphocytes d'intérêt. L'immunophénotypage des lymphocytes est également une information supplémentaire utile au diagnostic de lymphome. L'immunohistochimie est néanmoins confrontée aux mêmes facteurs limitants que l'histologie.

L'immunohistochimie est également très sensible pour la détermination de l'immunophénotypage. Thalheim et al., 2013, rapportent une sensibilité de plus de 99% et considèrent cette technique comme un gold standard.

La classification de Hans, fondée sur l'expression de trois marqueurs (CD10 et Bcl-6 pour les marqueurs des centres germinaux, et MUM-1 pour le marqueur des cellules B activées), est utilisée pour classer les lymphomes B diffus à grandes cellules en deux entités: les lymphomes centro-germinatifs (11%) et les lymphomes non centro-germinatifs (89%) (Nguyen et al., 2013).

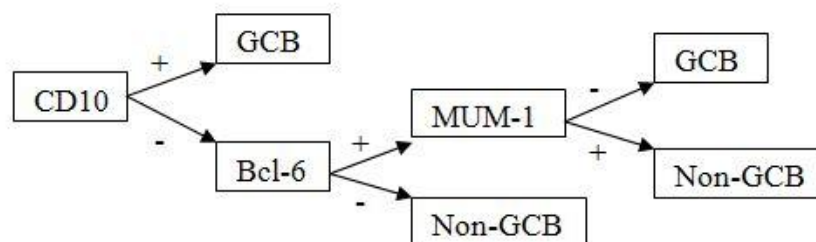


Figure 18. Algorithme de Hans (d'après Nguyen et al., 2013)
(GCB): lymphome B centro-germinatif.

L'immunophénotype déterminé par les marqueurs de différenciation en lymphome B ou T a une valeur pronostique reconnue. Parmi les marqueurs de prolifération, le Ki-67 est un très bon indicateur du grade de malignité de la tumeur (Fournel-Fleury et al., 1997; Poggi et al., 2013; Ibsch et al., 2014). Le seuil de 12,2% des cellules marquées établi par Poggi et al., 2013 a permis de distinguer les lymphomes B et T de bas-grade (n=10) de ceux de haut-grade (n=80) (Poggi et al., 2013). Il semble cependant que ce seuil varie selon les sous-types de lymphome. Ainsi, Ibsch et al., 2014 ont estimé ce seuil à 40% pour distinguer les lymphomes B de bas-grade (n=15) des lymphomes B de haut-grade (n=238). Par ailleurs, il a été montré qu'avec un seuil de cellules marquées par le Ki67 inférieur à 20% ou supérieur à 40% pour les lymphomes B de haut-grade, la durée de survie et le temps de rémission sont significativement inférieurs (Poggi et al., 2014). De nombreux autres marqueurs de prolifération doivent faire l'objet d'études supplémentaires avant leur utilisation courante en cancérologie vétérinaire (Dobson et al., 2001).

I.6.3.8. Immunocytochimie

Le principe de l'immunocytochimie est identique à celui de l'immunohistochimie appliquée à des lames cytologiques. Elle est cependant légèrement moins sensible que l'immunohistochimie pour les raisons évoquées précédemment pour expliquer la différence de sensibilité entre la cytologie et l'histologie.

I.6.3.9. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide.

Les tissus cellulaires doivent être dissociés et les agrégats éliminés afin de pouvoir analyser les cellules en suspension. Celles-ci sont ensuite alignées une à une à l'aide d'un système de centrage hydrodynamique et excitées par un faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à vapeur de mercure ou au xénon. Les signaux optiques ou physiques émis par les cellules sont ensuite collectés, amplifiés, et analysés par un logiciel (cf. Figure 19). Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec les propriétés particulières (Inserm, 2014):

- La lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure de la particule. Si la diffusion de la lumière est mesurée dans l'axe du rayon incident, l'intensité du signal peut être corrélée avec la taille et la viabilité cellulaire.
- La lumière absorbée évolue proportionnellement au diamètre de la cellule (supposée sphérique) et à l'indice d'absorption des constituants cellulaires.

La fluorescence émise par les cellules analysées peut être spontanée, mais le plus souvent, elle est apportée par un fluorochrome couplé à un anticorps monoclonal dirigé contre les marqueurs de différenciation membranaires spécifiques des lymphocytes (CD) (cf. **Tableau 4**). Le fluorochrome absorbe l'énergie du laser et réémet l'énergie absorbée sous forme de photons d'une longueur d'onde plus élevée. L'analyse des signaux permet de distinguer des sous-populations lymphocytaires et ainsi d'immunophénotyper les échantillons.

Les résultats sont représentés sous la forme d'histogramme (1 paramètre) ou de cytogramme (2 paramètres) d'une ou plusieurs populations cellulaires (cf. Figure 20).

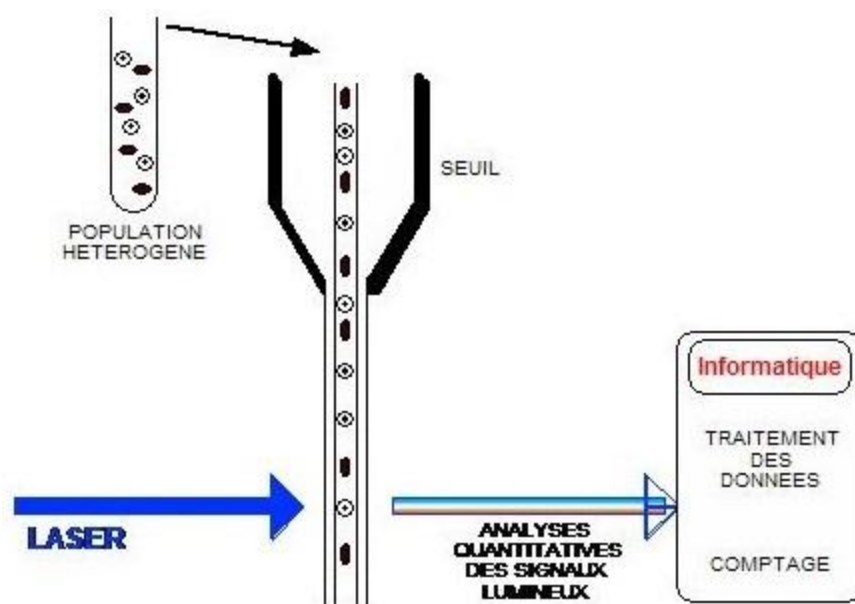


Figure 19. Principe simplifié d'un cytomètre en flux (Inserm, 2014).

Les cellules en suspension sont excitées une à une par le laser. Les signaux lumineux émis par les cellules sont ensuite analysés et traités informatiquement.

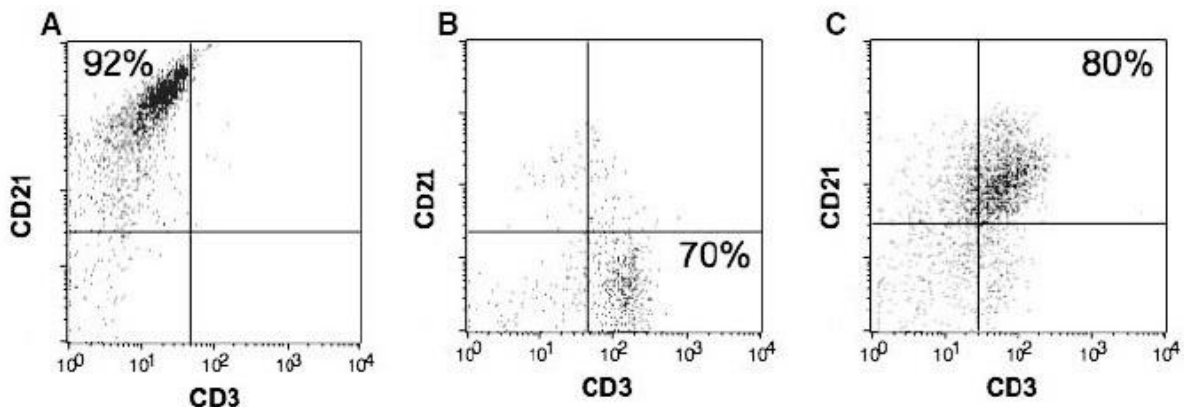


Figure 20. Cytogramme et immunophénotypage des lymphocytes à partir de noeuds lymphatiques de chien par cytométrie en flux (Thalheim et al., 2013).

Les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de cellules exprimant le marqueur de différenciation étudié. Deux marqueurs sont étudiés: le CD21 spécifiques des lymphocytes B et le CD3 spécifiques des lymphocytes T. (A): lymphome B, 92% des cellules expriment le CD21 (quadrant supérieur gauche); (B): lymphome T, 70% des cellules expriment le CD3 (quadrant inférieur droit); (C): lymphome à double lignée, 80% des cellules expriment simultanément le CD21 et le CD3 (quadrant supérieur droit).

Tableau 4. Exemples de marqueurs utilisés pour l'immunophénotypage des lymphomes canins (Poujol et Deleglise).

Antigène	Spécificité cellulaire	Utilisation pratique (prélèvements)
CD3	Lymphocytes T	Immunohistochimie Immunocytochimie Cytométrie en flux (coupes en paraffine, tissus congelés, cytoponction)
CD4	Lymphocytes T auxiliaires	Cytométrie en flux (préparations fraîches, tissus congelés)
CD5	Lymphocytes T	Cytométrie en flux (préparations fraîches, tissus congelés)
CD8	Lymphocytes T cytotoxiques	Cytométrie en flux (préparations fraîches, tissus congelés)
CD21	Lymphocytes B matures	Cytométrie en flux (tissus congelés)
CD34	Précurseurs hématopoïétiques B	Cytométrie en flux (préparations fraîches, tissus congelés)
CD39	Lymphocytes T	Cytométrie en flux (coupes en paraffine, tissus congelés)
CD79a	Lymphocytes B tous stades	Immunohistochimie Immunocytochimie Cytométrie en flux (coupes en paraffine, cytoponction)

La cytométrie en flux réunit les cinq caractéristiques suivantes, essentielles à toute technique analytique :

- Sensibilité de détection: il est possible de détecter une sous-population de cellules très minoritaires exprimant l'antigène ciblé parmi un millier d'autres déterminants antigéniques.
- Analyse quantitative: quantifier les paramètres observés est un atout majeur par rapport aux techniques précédemment exposées.
- Analyse multiparamétrique: la cytométrie en flux est la seule technique de diagnostic et d'immunophénotypage capable d'évaluer simultanément plusieurs paramètres.

- Rapidité: la vitesse moyenne d'analyse d'un cytomètre est comprise entre 1000 et 10 000 cellules par seconde.
- Tri: L'analyse multiparamétrique d'une suspension cellulaire hétérogène permet de définir des sous-populations qui peuvent, par la suite, être séparées physiquement de la population globale avec un taux de pureté de 99%.

Appliquée à l'étude des lymphomes, la cytométrie en flux permet de diagnostiquer la tumeur avec une grande sensibilité (Thalheim et al., 2013), de l'immunophénotyper, de déterminer sa classification et son stade (Marconato et al., 2013), de quantifier les cellules néoplasiques et ainsi suivre leur évolution (Gelain et al., 2008; Papakonstantinou et al., 2013), d'évaluer la SPF (S-Phase Fraction). La SPF reflète le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire (synthèse d'ADN) et permet de différencier les lymphomes canins de bas-grade des lymphomes de haut-grade à partir d'une valeur seuil de 3,9% (Riondato, 2014).

La sensibilité de cette technique permet de privilégier les prélèvements cytologiques, moins invasifs que les biopsies (Lana et al., 2006(2)). L'inconvénient de la cytométrie en flux est qu'elle ne peut être réalisée qu'à partir de prélèvements frais. C'est également une technique complexe et coûteuse (Comazzi et al., 2011).

En médecine humaine, la détection de la clonalité des lymphocytes B se réalise par cytométrie en flux par détermination du ratio des chaînes légères d'immunoglobulines κ et λ . Une clonalité est généralement considérée lorsque ce ratio est supérieur à 1:4 ou inférieur à 1:2 (Kaleem et al., 2001). Cette technique ne peut cependant pas être utilisée en médecine vétérinaire canine tant les variations de ratios $\kappa:\lambda$ sont importantes d'un cas à l'autre (Arun et al., 1996; Comazzi et al., 2011).

I.6.3.10. Southern blot

Le Southern blot est une technique de biologie moléculaire destinée à mettre en évidence la clonalité des cellules lymphocytaires néoplasiques en analysant les réarrangements des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes. Cette technique a été mise au point dans les années 80s en médecine humaine (Cleary et al., 1984; Griesser et al., 1989) et les années 90s en médecine vétérinaire (Momoi et al., 1993; Fivenson et al., 1994).

La première étape du Southern blot consiste en la digestion des molécules d'ADN extraites et purifiées des prélèvements à analyser par des enzymes de restriction spécifiques de la région codant les récepteurs des lymphocytes. Les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse sur le principe du polymorphisme de restriction (variation nucléotidique individuelle modifiant les sites de restriction et la taille des fragments compris entre ces sites) et dénaturés. Ils sont ensuite récupérés sur une membrane de cellulose par capillarité mise en contact avec des sondes marquées par un composé fluorescent et complémentaires des séquences nucléotidiques d'intérêt. Après hybridation des sondes avec leurs fragments complémentaires, les sondes en excès sont éliminées et la fluorescence révèle les fragments d'ADN complémentaires codant les récepteurs des lymphocytes. En cas de lymphome, les gènes réarrangés des lymphocytes clonaux sont identiques. Ils migrent donc à distance égale sur le gel d'électrophorèse et leur grand nombre est responsable d'une immunofluorescence localisée plus intense (=bande) (cf. Figure 21).

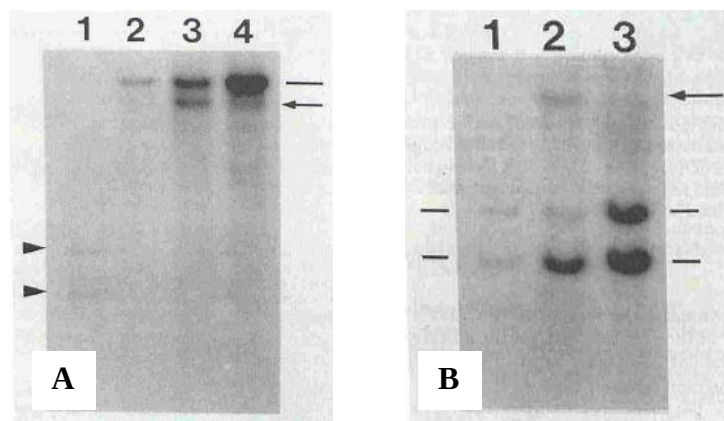


Figure 21. Southern blot mettant en évidence la clonalité des réarrangements des gènes codant une chaîne β d'un récepteur de lymphocyte T néoplasiques lors d'un lymphome T épithélioïde canin (Fivenson et al., 1994).

(A): Fragments digérés par l'enzyme de restriction Eco RI. La ligne 1 représente les fragments de gènes de cellules germinales d'homme (triangle), les lignes 2 et 4 représentent les fragments de gènes de cellules germinales de chiens (traits) et la ligne 3 représente les fragments réarrangés clonaux de lymphocytes néoplasiques canins (flèche); (B): Fragments digérés par l'enzyme de restriction Sac I. Les lignes 1 et 3 représentent les fragments de gènes de cellules germinales de chiens (traits) et la ligne 2 représente les fragments réarrangés clonaux de lymphocytes néoplasiques canins (flèche).

Concernant les lymphocytes T, la grande majorité des laboratoires n'étudient que les réarrangements des gènes TCR- β pour évaluer la clonalité des échantillons testés. En effet, les sondes pour les gènes TCR- δ et TCR- γ sont peu discriminantes et fournissent de nombreux faux-positifs (Greiner et al., 1995).

La technique d'hybridation Southern Blot représente une méthode diagnostique des lymphomes dont la sensibilité est très élevée. Il est possible de détecter des lymphocytes néoplasique lorsque ceux-ci représentent 0,1% à 1% de la population cellulaire totale de l'échantillon analysé (Bourguin et al., 1990). Cette technique présente également l'avantage d'être applicable à des lymphomes exprimant peu de marqueurs antigéniques de surface et/ou peu d'immunoglobulines cytoplasmiques, ou dont l'analyse histologique est difficilement interprétable (Cleary et al., 1984; Vernau et al., 1999). Néanmoins, c'est une technique laborieuse et chronophage. Elle n'est réalisable qu'à partir d'une grande quantité d'ADN (une petite pièce de biopsie ne suffit pas), non extrait de tissus fixés dans le formaldéhyde et inclus en paraffine (Chaubert et al., 2010).

Les examens complémentaires disponibles pour diagnostiquer les lymphomes canins sont variés. Une fois ce diagnostic établi, il est nécessaire d'évaluer l'extension de la tumeur.

I.6.4. Bilan d'extension et stade clinique

Le bilan d'extension est l'ensemble des examens réalisés afin d'évaluer le degré d'extension du lymphome au moment du diagnostic. Un stade clinique est alors défini en fonction des résultats, indépendamment des considérations histologiques et immunophénotypiques. Il permet de préciser le pronostic (cf. Figure 22), d'orienter les décisions thérapeutiques, de faciliter le suivi de l'évolution du lymphome et de classer les animaux atteints en vue d'essais cliniques (Flory et al., 2007). Chez le chien, les critères de définition du stade clinique utilisés sont ceux développés par l'Organisation Mondiale de la Santé (cf. Tableau 5).

Tableau 5. Stades cliniques du lymphome définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO)

Stade	Tissu atteint
1	Atteinte d'un seul noeud lymphatique
2	Atteinte régionale ganglionnaire d'un même côté du diaphragme
3	Atteinte généralisée ganglionnaire
4	Atteinte du foie et/ou de la rate
5	Atteinte du sang périphérique et/ou de la moelle osseuse
Sous-stade	
a	Absence de signe clinique
b	Présence de signe clinique

Le bilan d'extension du lymphome comprend :

- Des analyses hématologiques : une numération formule sanguine, un frottis sanguin et éventuellement un buffy coat (= fraction d'un échantillon de sang après centrifugation située entre le plasma et les hématies contenant la plupart des leucocytes et des plaquettes) pour déterminer si le sang est envahi par des lymphocytes tumoraux.
- Une radiographie du thorax, afin de mettre en évidence une adénomégalie et/ou une infiltration pulmonaire.
- Une échographie abdominale, qui permet de visualiser toute infiltration du foie, de la rate et toute adénomégalie.
- Un myélogramme, qui permet de déterminer le taux d'infiltration de la moelle osseuse par les cellules cancéreuses. Cette technique est décrite dans le paragraphe suivant.

D'après les critères fixés par l'OMS, plus de 80% des chiens atteints de lymphome sont classés en stade 3 ou 4 (Vail et al., 2013).

I.7. Pronostic

Le pronostic des chiens atteints d'un lymphome est extrêmement variable et dépend d'une multitude de facteurs. Bien que la guérison soit rare (<10%), la rémission clinique et la qualité de vie durant les phases de rémission et de survie sont généralement acceptables (taux de survie de 80% à 1 an) (Keller et al., 1993). Il existe cependant des patients pour lesquels les rémissions cliniques et les durées de survie sont très courtes malgré la mise en place de chimiothérapies très agressives.

Les facteurs pronostiques influençant la réponse aux traitements et la durée de survie des chiens atteints de lymphome ont fait l'objet de nombreuses études. Les principaux facteurs sont repris dans le Tableau 6.

Tableau 6. Facteurs pronostiques (d'après Rosenberg et al., 1991; Jagielski et al., 2002; Nguyen et al., 2013; Vail et al., 2013; Henriques et al., 2014; Poggi et al., 2014)

Facteur Pronostique	Forte Corrélation	modérée	Commentaires
Age	X		Les chiens de 4 à 8 ans semblent présenter des durées de rémission et de survie plus élevées.
Sexe	X		Certaines études avancent un pronostic plus favorable pour les femelles.
Localisation anatomique	X		Les lymphomes cutanés diffus, alimentaires et hépatospléniques sont de mauvais pronostic.
Lymphadénopathie médiastinale crâniale	X		Les durées de rémission et de survie sont plus courtes.
Stade clinique WHO	X		Les stades I et II sont de meilleur pronostic tandis que les stades V avec un envahissement de la moelle osseuse sont de mauvais pronostic.
Sous-stade clinique WHO	X		Le sous-stade b est associé à un taux de survie plus faible.
Histologie	X		Les lymphomes de haut-grade sont associés à une bonne réponse à la chimiothérapie mais une durée de survie faible. Les lymphomes de bas grade ont généralement des durées de survie prolongée en l'absence de traitement et répondent peu à la chimiothérapie.
Taille des cellules (cytométrie en flux sur sang périphérique)	X		Les lymphomes à grandes cellules sont généralement de plus sombre pronostic.
Immunophénotype	X		Le phénotype T ainsi que le phénotype B exprimant peu de molécules du CMH II sont associés à un taux de survie plus faible.

Facteur Pronostique	Forte Corrélation	modérée	Commentaires
Expression de la protéine Ki67	X		Ce marqueur de prolifération, lorsqu'il est exprimé par moins de 20% ou plus de 40% des cellules néoplasiques lors de lymphome B de haut-grade de malignité, est associé à une durée de survie et un temps de rémission plus courts.
Double expression des protéines Bcl-2 et c-MYC	X		L'expression simultanée de Bcl-2 (protéine anti-apoptotique de la membrane mitochondriale interne) et c-MYC (proto-oncogène) dévoilée par immunohistochimie est associée à un mauvais pronostic pour les lymphomes B diffus à larges cellules.
Expression de la P-glycoprotéine	X		Cette protéine serait impliquée dans les mécanismes de chimio-résistance. Sa présence est associée à un taux de réponse au traitement et des durées de rémission plus faibles.
Expression des AgNORs	X		L'augmentation de l'expression de cette protéine reflète la prolifération cellulaire et nucléaire, de mauvais pronostic.
Maladie minimale résiduelle (PARR)	X		(ce point est développé II.3.5)
Traitement prolongé aux stéroïdes	X		Les traitements prolongés aux stéroïdes préalablement à la chimiothérapie diminuent le temps de rémission. Le temps d'exposition minimum nécessaire n'est pas connu.
Toxicité hématologique chimiothérapie-induite	X		Les lymphomes de stade III et IV pour lesquels la chimiothérapie est responsable d'une neutropénie ont des durées de rémission plus longues.
Aberrations chromosomales	X		La trisomie du chromosome 13 à l'origine du lymphome est associée à des durées de rémission et de survie plus longues.
Anémie	X		Une anémie associée au lymphome est de mauvais pronostic.
Ratio Neutrophile:Lymphocyte	X		Un ratio supérieur à 3 est associé à une durée de survie moyenne inférieure pour les lymphomes B diffus à larges cellules.
Hypercalcémie	X		L'hypercalcémie est de mauvais pronostic.

(AgNORs: Argyrophyl Nucleolar Organizer Regions)

La maîtrise de ces facteurs pronostiques est essentielle pour estimer la durée de rémission et le temps de survie des patients permettant également d'évaluer la pertinence de la mise en place d'un traitement.

I.8. Traitement

La mise en place d'un traitement d'un chien atteint d'un lymphome est conditionnée par les stade et sous-stade du lymphome, la présence ou non de signes paranéoplasiques, l'état général du chien, les moyens financiers et la disponibilité des propriétaires, leur consentement éclairé concernant les conditions et les taux de réussite des traitements.

En l'absence de traitement, la durée moyenne de survie des chiens se situe entre 4 à 6 semaines après le diagnostic (Morris et al., 2001). A quelques exceptions près, le lymphome est une maladie systémique et nécessite donc un traitement systémique. Celui-ci peut être plus ou moins adapté en fonction du grade du lymphome, voire de sa localisation. Cependant, les caractéristiques histopathologiques et immunophénotypiques interviennent peu dans le choix du protocole en l'état actuel des données disponibles. La chimiothérapie systémique à agents multiples (ou polychimiothérapie) représente le traitement de choix du lymphome canin. Les protocoles fondés sur l'utilisation d'un seul agent obtiennent des résultats moins satisfaisants. Dans de rares cas pour lesquels le lymphome est localisé sur un seul site et le bilan d'extension est négatif, la chirurgie ou la radiothérapie sont des alternatives intéressantes à la chimiothérapie (Vail et al., 2013).

I.8.1. Chimiothérapie

Le lymphome étant chimio-sensible, une rémission clinique est obtenue dans 60% à 90% des cas sous chimiothérapie. Néanmoins, il n'est pas possible d'envisager de guérison avec les protocoles actuellement mis au point. La durée de survie varie entre 12 et 18 mois selon les protocoles (Morris et al., 2001).

La chimiothérapie consiste en:

- Une phase d'induction, intensive, jusqu'à l'obtention d'une rémission clinique;
- Une phase d'entretien dont l'objectif est de maintenir la rémission;
- Une phase de ré-induction le cas échéant, suite à la rechute d'un lymphome ou une chimio-résistance au premier traitement mis en place.

I.8.1.1. Monochimiothérapie

Les protocoles de chimiothérapie basés sur un seul agent chimique sont généralement moins efficaces que les protocoles de polychimiothérapie. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils sont moins toxiques, moins chers et moins chronophages. Les principaux agents chimiques utilisés en médecine vétérinaire sont les corticoïdes (prednisone, prednisolone), la doxorubicine (la plus efficace en monothérapie), la L-asparaginase, la lomustine et la mitoxantrone (cf. Tableau 7).

I.8.1.2. Polychimiothérapie

La polychimiothérapie est plus efficace mais également plus chère, contraignante et toxique que la monochimiothérapie. De nombreux protocoles de polychimiothérapie ont été développés ces vingt dernières années. La plupart d'entre eux dérivent du protocole CHOP (Cyclophosphamide, Hydroxyadriamycine (doxorubicine), Oncovin TM (vincristine), Prednisone) utilisé en médecine humaine. 80% à 95% des chiens sous polychimiothérapie atteignent un état de rémission clinique (cf. Tableau 7). Le temps médian de survie est situé entre 10 et 12 mois et 20% à 25% des chiens traités sont en vie 2 ans après le début de la chimiothérapie (cf. Figure 22).

Les protocoles les plus utilisés en médecine vétérinaire sont le COPLA, le COP, l'ACOPA, le VeLCAP, la L-VCAMP et le MOPP* (C: Cyclophosphamide, O: Oncovin TM (vincristine), P: Prednisone, L: L-asparaginase, A: Adriamycine (= doxorubicine), Ve: Vincristine, M: Mitoxantrone, P*: Procarbazine). Le détail du protocole COPLA est exposé dans le Tableau 8.

Tableau 7. Protocoles de mono- et polychimiothérapie les plus couramment utilisés en médecine vétérinaire (Ettinger et al., 2003)

Protocole	Rémission clinique complète (%)	Durée médiane de survie (jours)	Commentaires
COPLA	80 à 90%	12 mois	25% de survie à 2 ans
COP	60 à 75%	6 à 7 mois	10 à 20% de survie à 1 an
Doxorubicine	75 à 85%	6 à 9 mois	Toxicité cardiaque
Prednisone	50%	1 à 2 mois	Développement de MRD

(C): Cyclophosphamide; (O): Oncovin TM (vincristine); (P): Prednisone; (L): L-asparaginase; (A): Adriamycine (= doxorubicine).

Tableau 8. Protocole COPLA (tel que réalisé par l'ENVT)

Semaine	Cyclophosphamide 250 mg/m ² IV ou PO	Vincristine 0.75 mg/m ² IV	Prednisone 1 mg/kg PO	L-asparaginase 10 000 UI/m ² IM	Doxorubicine 30 mg/m ² IV
Induction					
S1			•	•	
S2		•	•		
S3		•	•		
S4	•	•	•		
Maintenance (répétition de cycles de 6 semaines)					
S7			• (CJA)		•
S10	•	•	• (CJA)		
S13	•	•	• (CJA)		

Ce cycle de maintenance (de S7 à S13) est répété avec un nombre d'injections de doxorubicine maximal de 6. Au delà, le cyclophosphamide et la vincristine sont maintenues sur des cycles de 3 semaines.

(CJA): Corticothérapie à Jours Alternés.

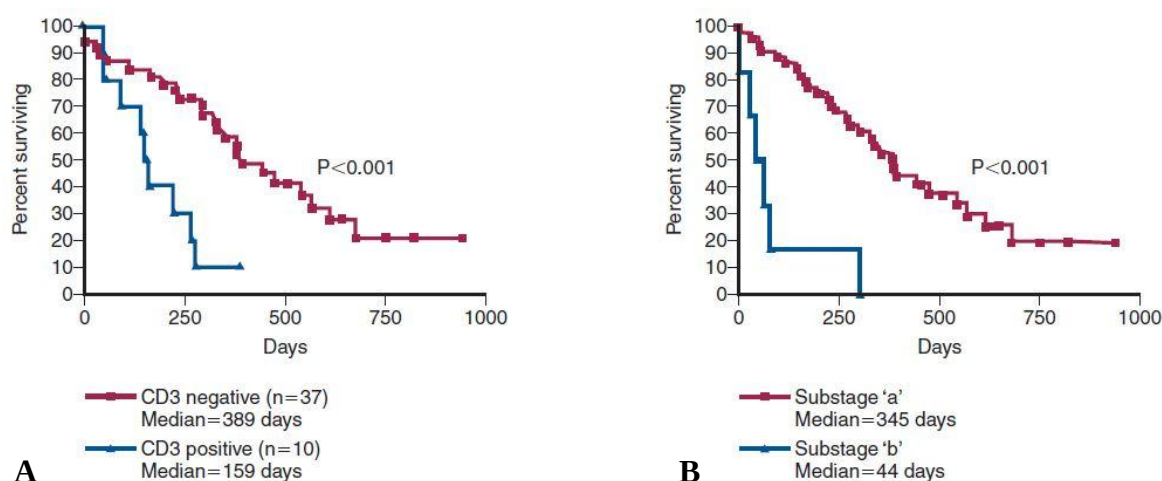


Figure 22. Courbe de survie de chiens sous chimiothérapie avec un protocole dérivé du CHOP (Vail et al., 2005).

(A): courbes de survie en fonction de l'immunophénotype du lymphome. Les chiens atteints de lymphome T ont une durée de survie significativement plus faible que les autres; (B): courbes de survie en fonction du sous-stade du lymphome. Les chiens présentant des signes cliniques en relation avec le lymphome ont une durée de survie significativement plus faible que ceux n'en présentant pas.

I.8.1.3. Chimiothérapie de réinduction

Contrairement aux traitements à visée curative mis en place chez l'homme, les traitements du lymphome canin sont palliatifs et non curatifs. Cela tient à plusieurs aspects. D'une part, les doses de chimiothérapie au m² sont largement supérieures en médecine humaine. Ceci est rendu possible par une meilleure acceptation et une meilleure gestion des effets secondaires chez l'homme tandis que des problèmes éthiques se posent pour l'animal. D'autre part, la médecine humaine bénéficie d'un arsenal thérapeutique plus diversifié et complémentaire (anticorps monoclonaux, radiothérapie interne vectorisée, etc) et d'outils diagnostiques plus sensibles permettant la détection de cellules néoplasiques résiduelles (TEP/CT, etc). Ainsi, du fait de la moindre efficacité des traitements du lymphome canin, la majorité des chiens en rémission feront des rechutes. Cela se traduit par une ré-émergence de cellules néoplasiques clonales du lymphome original. Ces cellules sont appelées MRD (Minimal Residual Disease). Il existe plusieurs causes à ce phénomène :

- La sélection de cellules résistantes à la première chimiothérapie ayant permis une rémission clinique.
- Un dosage et une fréquence d'administration des composés chimiques insuffisants.
- Une incapacité à atteindre les hautes concentrations nécessaires à l'élimination des lymphocytes néoplasiques dans certains sites, tels que le système nerveux central.
- Un traitement préalable à la chimiothérapie aux corticoïdes seuls.

La première étape de la chimiothérapie de réinduction consiste en la réinitialisation du protocole d'induction de la chimiothérapie initiale généralement pendant 80% à 90% du temps nécessaire à la première induction. Cette durée dépend du temps écoulé entre la rémission clinique et la rechute (Flory et al., 2011). Une particularité concernant la doxorubicine consiste à ne pas dépasser plus de six séances du fait de sa toxicité cardiaque cumulative.

En cas d'échec, un nouveau protocole d'induction est établi avec des molécules non incluses dans le protocole CHOP, en monothérapie ou en polythérapie: l'actinomycine D, la mitoxantrone, la doxorubicine (si elle est absente du protocole initial), la L-asparaginase, la lomustine, une combinaison de doxorubicine et de dacarbazine ou la combinaison de méchloréthamine, vincristine (oncovin), procarbazine et prednisone (MOPP) (Vail et al., 2013) (cf.

Tableau 9). Le choix du second protocole d'induction doit tenir compte des paramètres suivants: le coût, l'efficacité, la toxicité, la disponibilité des propriétaires et l'expérience du clinicien vis-à-vis de ces protocoles. Une réponse favorable est obtenue dans 40% à 90%.

Tableau 9. Réponse à différents protocoles de seconde intention (d'après Vail et al., 2013)

Protocole	Nombre d'animaux	Taux de rémission (%)	Rémission clinique complète (%)	Durée médiane de la rémission (jours)	Durée médiane de la rémission complète (jours)
Actinomycine-D	49	41	41	129	129
Dacarbazine	40	35	3	43	144
Dacarbazine ou temozolomide-anthracycline	63	71	55	45	NR
DMAC	54	72	44	61	112
Lomustine	43	27	7	86	110
Lomustine, L-asparginase, prednisone	48	77	65	70	90
Lomustine, Dacarbazine	57	35	23	62	83
Mitoxantrone	44	41	30	NR	127
MOPP	117	65	31	61	63
MPP	41	34	17	56	238

(DMAC): Dexaméthasone, Mélphalan, Actinomycine-D, Cytosine arabinoside; (MOPP): Méchloréthamine, Oncovin™ (vincristine), Procarbazine, Prednisone; (MPP): Méchloréthamine, Procarbazine, Prednisone; NR: Non Renseigné.

Peu de ces protocoles ont fait l'objet d'essais cliniques prospectifs comparatifs et randomisés. Les stades, les critères d'inclusion et d'évaluation de la réponse au traitement varient d'une étude à l'autre. Il est donc difficile de comparer l'efficacité de ces traitements.

1.8.1.4. Cas particulier des lymphomes T

A quelques exceptions près, les lymphomes T multicentriques présentent un taux de réponse à la polychimiothérapie identique à celui des lymphomes B mais une durée de rémission inférieure (cf. Figure 22Figure 22). De plus, l'efficacité de la monochimiothérapie (doxorubicine) semble plus faible pour les lymphomes T (Beaver et al, 2010). Cela remet en cause l'efficacité des traitements couramment employés, cependant aucun essai clinique comparatif randomisé à grande échelle n'a jamais été réalisé en médecine vétérinaire. Quelques études ont néanmoins permis de mettre en évidence quelques tendances. Ainsi, un protocole combinant la L-asparginase et le MOPP augmenterait la durée de rémission des

lymphomes T (Brodsky et al., 2009). L'inclusion précoce de lomustine dans la phase d'inclusion du protocole de chimiothérapie fut proposée à plusieurs reprises, du fait de son efficacité en phase de ré-induction. De nouveau, aucune étude comparative, prospective et randomisée n'a été menée pour le moment. Ossowska et al., 2014 ont comparé rétrospectivement les temps de rémission de chiens atteints de lymphome T de haut-grade, traités avec un protocole CHOP ou un protocole CHOP-Lomustine en première intention. Les temps de rémission sont supérieurs avec le protocole CHOP-Lomustine avec une moyenne de 243 jours pour 49 jours avec le protocole CHOP seul (Ossowska et al., 2014). Le facteur limitant de l'utilisation de la lomustine est sa toxicité rénale. A ce jour, dans l'attente d'études prospectives, l'induction du traitement des lymphomes T est basée sur le protocole CHOP et relayée avec la lomustine dès les premiers signes de progression de la tumeur (Vail et al., 2013).

I.8.2. Chirurgie

La chirurgie est rarement utilisée seule dans le but de traiter un lymphome. Elle s'applique surtout aux lymphomes extra-nodaux, précoces, de stade 1 ou 2 avec un bilan d'extension négatif ou aux lymphomes cutanés localisés. Les lymphomes étant majoritairement multicentriques, rares sont les cas pour lesquels cette technique est suffisante (Vail et al., 2013).

La splénectomie, conjuguée à la chimiothérapie, permettrait d'améliorer la durée de survie des chiens atteints de lymphome multicentrique associé à une infiltration splénique (Brooks et al., 1987). Ces bénéfices sont cependant controversés (Valli et al., 2006).

Enfin, la chirurgie est utile à la réalisation de prélèvements histologiques pour l'établissement d'un diagnostic.

I.8.3. Radiothérapie

La radiothérapie est adaptée aux traitements locaux et trouve donc peu d'applications aux lymphomes. Les lymphocytes n'en demeurent pas moins radiosensibles et la radiothérapie est utilisée dans les cas similaires à la chirurgie lorsque les lésions sont chirurgicalement inaccessibles (Vail et al., 2013).

En association avec la chimiothérapie, la radiothérapie de la moitié du corps a permis d'obtenir un taux de rémission clinique plus élevé (78%) (Williams et al., 2004). Cependant, cette technique n'est pas spécifique des lymphocytes néoplasiques et la myélotoxicité induite est trop importante pour pouvoir l'utiliser sans risque. Une alternative en cours de développement serait de conjuguer la radiothérapie avec une greffe de moelle osseuse (Escobar et al., 2012).

I.8.4. Immunothérapie

L'immunothérapie appliquée à l'oncologie est fondée sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux et de vaccins tumoraux autologues afin de stimuler les défenses immunitaires de l'organisme.

En médecine humaine, le rituximab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD20 des lymphocytes B, utilisé seuls ou en association avec la polychimiothérapie chez des patients atteints de lymphome B de bas-grade, notamment les lymphomes indolents, diffus à grandes cellules, folliculaires et médiastinaux primitifs à grandes cellules (Société canadienne du cancer, 2014). Utilisé seul et en première intention, le taux de réponse est de 50% (6% de rémission complète et 44% de rémission partielle) tandis qu'en association avec la polychimiothérapie, le taux de réponse au traitement atteint 95% (55% de rémission complète et 40% de rémission partielle) (Vail et al., 2013). Cet anticorps monoclonal n'est pas actif chez le chien du fait d'un défaut de reconnaissance du CD20 canin (Impellizeri et al., 2006). L'anticorps MAb-231 dont la cible exprimée par les lymphocytes B est mal connue, a montré des résultats prometteurs au cours d'une étude en 1996 (Jeglum et al., 1996) et prolongé la durée moyenne de survie (493 jours). Cette molécule a cependant été retirée du marché dans les années 90 en l'absence d'essais-contrôle. Elle fait l'objet d'études en recherche vétérinaire afin de mieux de mieux caractériser son action et d'en améliorer son efficacité.

Une seconde application de l'immunothérapie consiste en l'administration de vaccins antitumoraux autologues peu de temps après l'induction de la rémission par polychimiothérapie. Son action permet de prolonger la durée moyenne de survie des chiens vaccinés (341 jours contre 138 jours) (Theilen et al., 1997).

II. La PARR en médecine humaine et vétérinaire

La PARR, ou Polymerase chain reaction (PCR) for Antigen Receptor Rearrangement, est l'étude des réarrangements des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes par PCR. Cette technique de biologie moléculaire est un outil diagnostique du lymphome fondé sur la mise en évidence de la clonalité des réarrangements au sein des lymphocytes néoplasiques grâce à l'amplification des séquences V(D)J. Elle a été mise au point en médecine humaine dans les années 90s (McCarthy et al., 1990, 1991; Weiss et al., 1993) et adaptée à la médecine vétérinaire pour la première fois en 1999 (Vernau et al., 1999). Elle n'est, pour le moment, pas encore commercialement disponible en France.

II.1. Principe de la PARR

II.1.1. Prélèvements

La PARR est une technique de biologie moléculaire réalisable à partir de tissus de nature variée nécessitant des conditions de prélèvement, de conservation et de transport particulières. Le Clinical Immunology Laboratory de l'Etat de Caroline du Nord et le Veterinary Diagnostic Laboratory de l'université de l'Etat du Colorado sont deux laboratoires américains proposant la PARR en examen de routine. Ce dernier fut le siège des premières études et essais vétérinaires concernant la PARR (Vernau et al., 1999; Burnett et al., 2003; Keller et al., 2004; Avery et al., 2004; Lana et al., 2006 (1); Williams et al., 2008). Il est aujourd'hui considéré comme une référence en matière de PARR. Les recommandations suivantes sont en partie tirées des Guidelines rédigées à l'intention des vétérinaires soumettant des prélèvements pour un test PARR dans l'un de ces laboratoires (CSU Dlab, 2011; NCSU Clinical Immunology Laboratory, 2009).

II.1.1.1. Nature des prélèvements

La PARR peut être réalisée sur :

- Sang (200 µL au minimum) prélevé dans un tube EDTA ou étalé sur une lame. Pour s'assurer de la qualité des lames cytologiques, celles-ci peuvent être colorées.
- Liquide d'épanchement prélevé dans un tube EDTA ou étalé sur une lame.
- Matériel obtenu par cytoponction (noeud ganglionnaire ou organe extra-nodal) et conservé dans un tube EDTA sans ajout de sérum physiologique ou étalé sur lame selon l'Université d'Etat du Colorado. L'Université d'Etat de la Caroline du Nord préconise quant à elle de conserver le matériel obtenu dans un tube avec du sérum physiologique.
- Coupes histologiques (généralement 3 ou 4) de 4 à 25 µm réalisées à partir de pièces d'exérèse chirurgicale ou de biopsies. Le centre diagnostique de l'Université d'Etat du Michigan (DCPAH) exige un minimum de 10 lames histologiques enduites, non colorées, sans lamelles.
- Liquide céphalo-rachidien cytocentrifugé et étalé sur lame ou conservé dans un tube EDTA. Un minimum de 50 000 cellules est en général nécessaire à

l'établissement d'un diagnostic par PARR. Ainsi, pour un prélèvement dont le comptage cellulaire est de 100 000 cellules/mL, 0,5 mL de liquide céphalo-rachidien doit être envoyé dans un tube EDTA ou étalé sur des lames.

- Ponction de moelle osseuse conservée dans un tube EDTA.

II.1.1.2. Conservation des prélèvements

Les prélèvements liquidiens (sang, liquides d'épanchement, LCR) sont réfrigérés immédiatement à 4°C après leur collection dans un tube EDTA ou étalés sur lame. La congélation n'est pas nécessaire.

Les lames cytologiques, colorées ou non, peuvent être conservées à température ambiante ou réfrigérées.

Les coupes histologiques sont généralement immédiatement fixées dans le formaldéhyde, fixatif à ce jour le plus largement utilisé. Cette fixation ne doit pas excéder une semaine (Kaneko et al., 2009 (1)). En effet, le formaldéhyde est susceptible de se lier aux acides nucléiques, inhibant ainsi l'activité enzymatique au cours de l'extraction ou de la PCR. Le Veterinary Diagnostic Laboratory de l'université de l'Etat du Colorado estime que cette inhibition de la PARR par le formaldéhyde est responsable d'une absence de résultats pertinents dans 10% des cas (CSU Dlab, 2011). Après fixation, les coupes histologiques sont conservées à -80°C ou incluses dans la paraffine. Le tissu fixé à la formaldéhyde et enrobé de paraffine " Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded" (FFPE), peut être entreposé à +4°C minimum pendant une longue période de temps. Cette méthode de conservation est la plus efficace pour préserver la morphologie histologique du spécimen tissulaire. Bien que Kaneko et al., 2009 (1) aient démontré que la durée d'inclusion en paraffine n'a aucune incidence sur la qualité des résultats de la PARR, il semble qu'à long terme, les molécules d'ADN se fragmentent du fait de l'oxydation à l'air libre. Ceci pose problème si le site de coupure des molécules détériorées intéresse spécifiquement la séquence d'amplification.

Il est également possible de conserver des coupes histologiques fraîches (non congelées) inférieures à 0,5 cm d'épaisseur dans un tampon conservateur tel que le *RNAlater*®, une solution à base d'EDTA disodique dihydraté, de sel de citrate de sodium trisodique dihydraté, de sulfate d'ammonium et d'eau Milli-Q. La plupart des échantillons peuvent ainsi être conservés un mois ou une semaine à température ambiante ou à +4°C, respectivement, après quoi la dégradation de l'ARN et de l'ADN (dans une moindre mesure) peut affecter les analyses PCR. En revanche, une conservation des échantillons dans le tampon à -20°C ou -80°C permet une préservation de l'ADN et de l'ARN relativement bonne à très long terme.

II.1.1.3. Conditions de transport des prélèvements

L'acheminement des prélèvements, accompagnés de leur formulaire d'identification, s'effectue sans précautions particulières en ce qui concerne les lames cytologiques et les coupes histologiques.

Les prélèvements liquidiens doivent être envoyés rapidement sous couvert du froid (Colissimo ou Lettre Max).

II.1.2. Extraction de l'ADN des prélèvements

L'extraction de l'ADN ou de l'ARN des tissus prélevés est l'étape préalable à toutes techniques de biologie moléculaire. La PARR est une technique dite de génétique inverse (appelée également "clonage positionnel"), c'est à dire que l'étude porte sur le génotype pour ensuite déduire des informations sur le phénotype. De ce fait, seul l'ADN est extrait dans le cadre de cette étude.

La technique d'extraction décrite ci-dessous est celle adoptée par l'unité de recherche d'AMaROC. Elle fait appel au kit d'extraction kit NucleoSpin® Tissue DNA, macherey-nagel-Allemagne.

Dans le cas des échantillons FFPE, il est nécessaire, dans un premier temps, d'isoler le prélèvement de la paraffine. Deux gouttes de tampon de lyse T1 sont déposées sur la lame. La pièce tissulaire est ensuite décollée à l'aide d'une lame de scalpel en limitant au maximum l'incorporation de paraffine susceptibles de contenir des inhibiteurs de PCR et mise en solution.

L'extraction de l'ADN à proprement parlée comprend 6 étapes:

- La pré-lyse : digestion des protéines membranaires par la protéinase K.
- La lyse : dénaturation des polypeptides et saturation en sels de la solution par l'ajout de chlorure de guanidinium (CH_6ClN_3).
- La précipitation à l'éthanol absolu : décantation et passage des molécules d'ADN dans la phase aqueuse.
- La fixation de l'ADN : prélèvement de la phase aqueuse et application sur la membrane de silice de la colonne NucleoSpin® Tissue DNA Column. Etablissement de liaisons faibles entre les ions phosphates des ADN (H_2PO_4^-) et les groupements -OH de la membrane.
- Le lavage : précipitation des protéines résiduelles et centrifugation afin de les écarter de la membrane. Cette étape est généralement répétée afin d'en améliorer l'efficacité.
- L'élution : désaturation de la membrane en sels et dissociation des molécules d'ADN de la membrane.

L'ADN élué est par la suite dosé au nanodrop. Il est conservé à +4°C pour une utilisation à court terme ou à -20°C à long terme.

II.1.3. Principe de la PCR (Sambrook et al., 2001; Wallace, 2002; Borde, 2006; Martignat, 2009; Pronovost, 2014)

Définition

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique de répllication ciblée in vitro mise au point par Mullis en 1985. Elle permet de sélectionner et d'amplifier en très grande quantité un fragment d'ADN de plusieurs dizaines à plusieurs milliers de bases nucléotiques à partir d'un génome complexe. C'est une technique utilisée pour détecter la présence d'une séquence particulière et/ou d'en obtenir un nombre de copies suffisant pour une utilisation ultérieure (ex: séquençage).

Principe

La PCR est basée sur les caractéristiques suivantes observées au cours de la répllication de l'ADN:

- Les brins complémentaires d'une molécule d'ADN s'hybrident et se séparent en fonction de la température.
- L'activité enzymatique de l'ADN polymérase thermostable est dépendante de la température.
- L'ADN polymérase ne peut synthétiser le brin complémentaire d'une séquence qu'à partir d'une amorce.

Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN par une ADN polymérase thermostable, basée sur une répétition de cycles de température. Chaque réaction met en oeuvre un couple d'amorces oligonucléotidiques (sens et anti-sens) spécifiques d'un fragment d'ADN à amplifier.

Les amorces sont des oligonucléotides dont la séquence est définie de sorte qu'ils s'hybrident aux extrémités du fragment à amplifier. Elles servent de point d'ancrage à l'ADN polymérase qui synthétise le brin complémentaire de la séquence comprise entre les deux amorces. Un couple d'amorces est composé d'une amorce sens complémentaire du brin 3'-5' de la molécule d'ADN et d'une amorce anti-sens complémentaire du brin 5'-3' (cf. Figure 23).

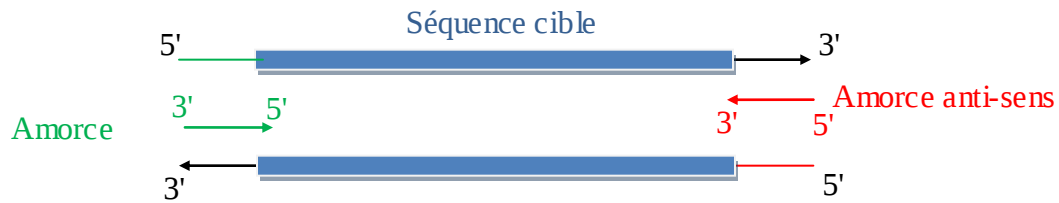


Figure 23. Couple d'amorces encadrant une séquence cible

Les amorces, quelle que soit leur cible, doivent rassembler les caractéristiques suivantes :

- La séquence cible des amorces doit être conservée dans chacune des cellules. En effet, la moindre variation dans l'enchaînement nucléotidique de la séquence compromet l'hybridation de l'amorce et l'amplification.
- Les amorces choisies doivent présenter une spécificité de séquence cible afin qu'elles ne s'hybrident qu'à un seul site et n'amplifient que la région d'intérêt.
- Les amorces utilisées ne doivent pas former de dimères d'amorces, c'est-à-dire s'hybrider entre elles, ou se replier sur elles-mêmes. En d'autres termes, il convient d'éviter les séquences répétées inversées au sein de l'amorce.
- La longueur des amorces doit être comprise entre 16 et 30 nucléotides afin d'avoir une température d'hybridation raisonnablement élevée.
- Les températures d'hybridation des amorces utilisées dans une même réaction doivent être proches.
- L'extrémité 3' doit être riche en bases G et C, garantes d'une meilleure fixation au fragment complémentaire. C'est à partir de cette extrémité que la Taq polymérase initie l'amplification.

Pour chaque PCR, il est conseillé d'utiliser un couple d'amorces appelé "contrôle positif" en complément des couples d'amorces spécifiques de la séquence nucléotidique d'intérêt. Ces amorces sont désignées à l'amplification d'un fragment nucléotidique stable dans toutes les cellules étudiées. Elles ont un rôle de contrôle interne d'amplification. En cas d'absence d'amplification, la qualité de l'ADN et/ou les paramètres intrinsèques à la PCR sont remis en cause et l'analyse réalisée est invalidée.

Les produits de chaque étape de synthèse sont conservés dans le milieu réactionnel et servent de matrices pour les étapes suivantes. La répétition des cycles aboutit à une amplification exponentielle de la séquence cible.

Réactifs

Les réactifs nécessaires à la réalisation d'une PCR sont:

- L'ADN extrait des prélèvements d'intérêt;
- Une ADN polymérase thermostable, la plus connue étant la Taq polymérase (isolée à partir de *Thermus aquaticus*);
- Un à plusieurs couples d'amorces spécifiques de la séquence oligonucléotidique à amplifier;
- Des précurseurs nucléotidiques dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP);
- Une solution tampon contenant du $MgCl_2$ nécessaire à la stabilisation des nucléotides et à l'activation de l'enzyme;
- Une enzyme de relecture à activité exonucléasique.

Programme d'amplification

A température ambiante, les molécules d'ADN se présentent sous forme bicaténaire.

Une première étape, préalable au lancement des réactions de réplication successives, consiste à chauffer le milieu réactionnel à 95°C pendant quelques minutes afin d'optimiser la première étape de dénaturation et, le cas échéant, d'activer la Taq polymérase (HotStart).

Chaque cycle (ou réaction de réplication) est composé de trois étapes correspondant à trois températures différentes programmées dans un thermocycleur (cf. Figure 24). Ces étapes sont la séparation des brins d'ADN, l'hybridation des amorces sur les monobrans d'ADN et enfin l'élongation des brins complémentaires par l'ADN polymérase (cf. Figure 25):

- Dénaturation:

Le chauffage du milieu réactionnel à 95°C pendant quelques dizaines de secondes à une minute sépare les brins des molécules d'ADN (dés hybridation) et homogénéise le milieu. La durée du chauffage est programmée en fonction de la stabilité des fragments bicaténaires à amplifier.

- Hybridation:

La température est abaissée pendant quelques dizaines de secondes afin de permettre l'hybridation des amorces sens et anti-sens aux monobrans d'ADN matrices. Idéalement, cette température doit se rapprocher de la température de fusion T_m (melting Temperature) spécifique de chacune des amorces utilisées. La T_m est la température pour laquelle 50% des amorces est hybridé. Elle est généralement beaucoup plus élevée que la T_m de l'ADN matrice du fait de leur différence de taille. Ainsi, pendant cette étape, l'ADN matrice ne s'hybride pas avec son brin complémentaire et reste disponible pour les amorces.

- **Elongation:**

La température est fixée à 72°C pendant quelques dizaines de secondes à deux minutes. Il s'agit de la température optimale d'activité de l'ADN polymérase. Le brin complémentaire de l'ADN matrice est synthétisé à partir de l'amorce par l'ajout des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend de la longueur du fragment amplifié.

Les cycles sont répétés 30 à 40 fois au cours d'une PCR. En théorie, le nombre de fragments amplifiés double à l'issue de chaque cycle. Cette augmentation exponentielle permet d'obtenir un très grand nombre de copie (2^{30} à 2^{40}) à partir d'un seul fragment d'ADN. En réalité, l'efficacité de la réaction diminue au cours du temps du fait de facteurs limitants (concentration en dNTPs, amorces, etc...).

A l'issue des cycles, une dernière étape à 72°C de plusieurs minutes permet de prolonger l'activité de la Taq polymérase afin de parfaire l'amplification.

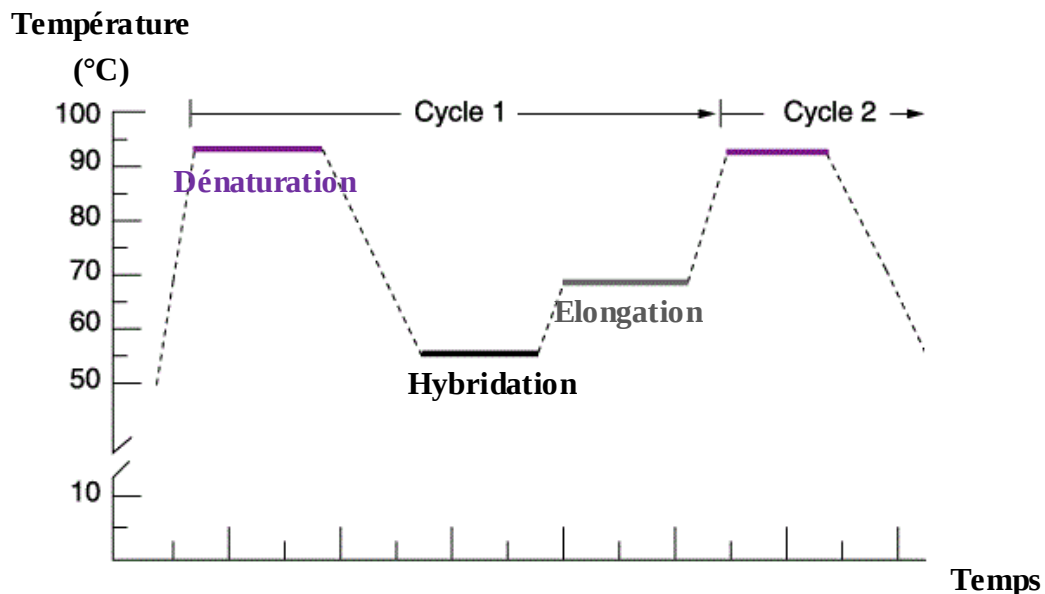


Figure 24. Cycle de température d'une PCR (d'après Miesfeld, 2001).

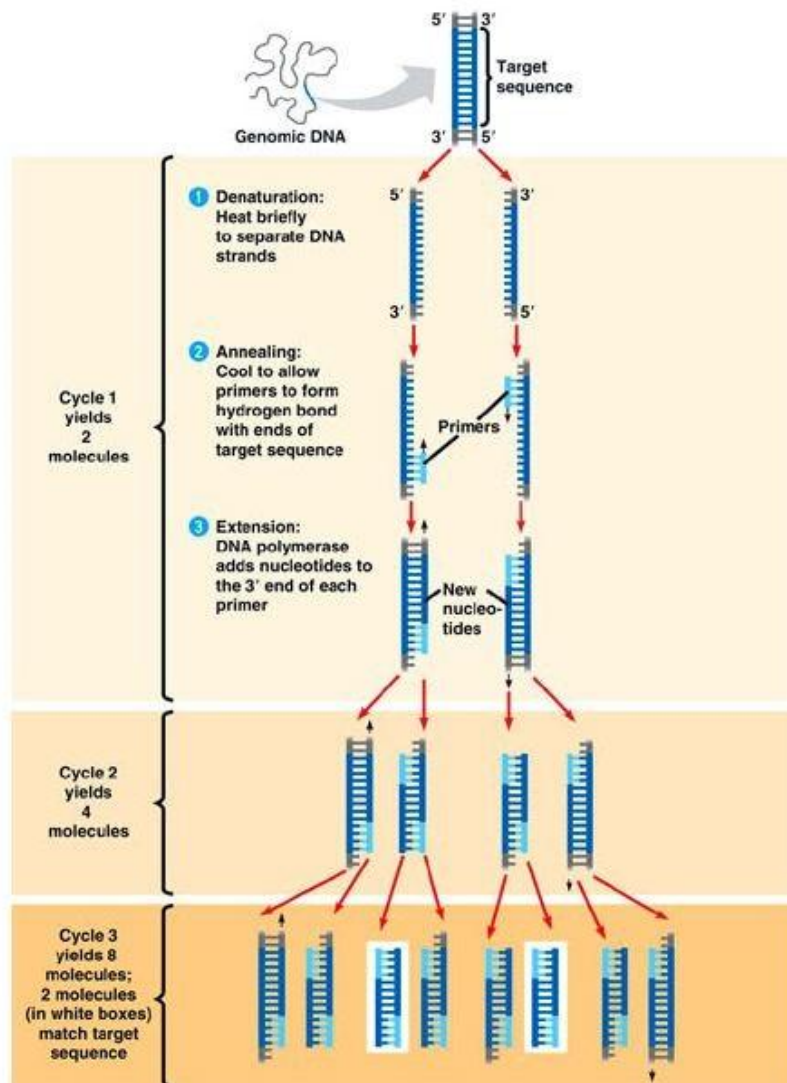


Figure 25. Réaction polymérase par la polymérase (Pronovost, 2014).

(1): Dénaturation; (2): hybridation des amorces; (3): élongation. A l'issue de chaque cycle, le nombre de fragments amplifiés double. A partir du 3ème cycle, des fragments amplifiés de longueur souhaitée apparaissent (encadré blanc).

II.1.4. Adaptation du protocole de PCR à la PARR

II.1.4.1. Particularités de la PARR

La PARR est une PCR qui se propose d'étudier les réarrangements des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes. Chacun de ces gènes est composé de régions hypervariables VDJ pour les chaînes lourdes des BCR, et VJ pour les TCR et les chaînes légères des BCR (cf. I.1.1.3). Il est donc nécessaire d'utiliser des amorces complémentaires de séquences stables encadrant ces régions hypervariables afin de permettre l'amplification des gènes quels que soient leurs réarrangements (cf. Figure 26). Les fragments V(D)J des molécules d'ADN germinales des cellules lymphocytaires non matures, du fait de leur grande taille, ne sont pas amplifiés malgré la fixation des amorces. Ils n'interfèrent donc pas avec les résultats de PCR.

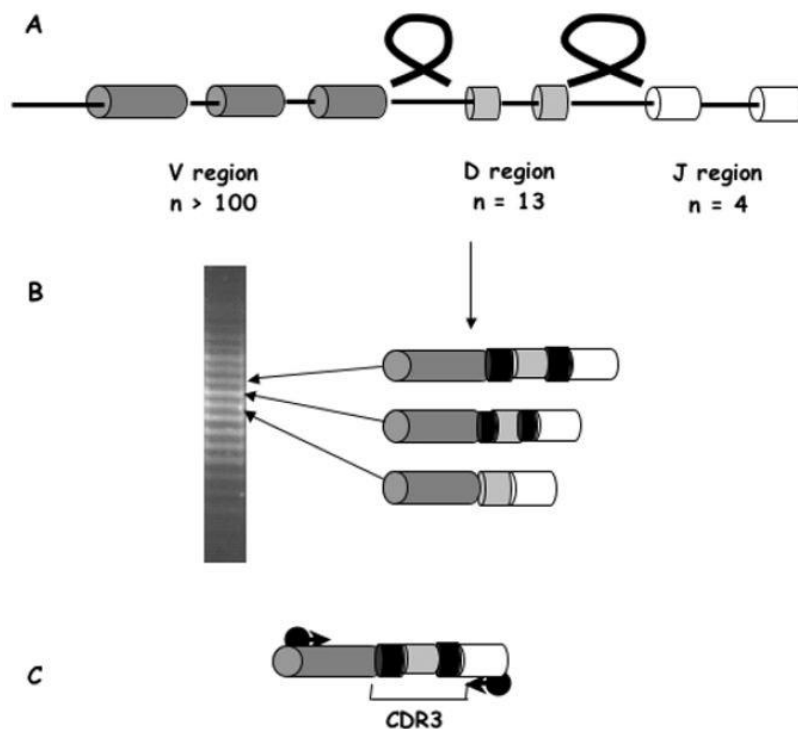


Figure 26. Réarrangements des gènes codant les immunoglobulines au cours de la différenciation des lymphocytes (Avery et al., 2004)

(A): Les molécules d'ADN germinales non réarrangées des cellules lymphocytaires sont composées des segments V, D et J composés de toutes les régions V, D et J possibles; (B): Les segments V, D et J subissent des réarrangements aléatoires au cours de la différenciation cellulaire des lymphocytes et un nombre aléatoire de nucléotides est inséré entre les régions V, D et J. Ces processus sont à l'origine de la diversité des longueurs et des séquences nucléotidiques des gènes codant les immunoglobulines; (C): Les amorces pour la PARR (flèches) doivent être complémentaires de séquences stables et conservées des régions V et J, extérieures à la région hypervariable CDR3.

Amorces des gènes codant les immunoglobulines

La PARR des lymphocytes B est orientée vers l'étude des réarrangements des gènes codant les chaînes lourdes des immunoglobulines. En effet, la région CDR3 des chaînes lourdes est composée de trois segments V, D et J contrairement à celle des chaînes légères dépourvues de segment D. Par conséquent et d'un point de vue pratique, il est plus facile de différencier les séquences amplifiées correspondantes aux chaînes lourdes sur un gel d'électrophorèse du fait de leur plus grande diversité de taille et nucléotidique.

Les amorces choisies pour l'étude des réarrangements des gènes codant les immunoglobulines sont donc systématiquement complémentaires de séquences encadrant la région CDR3 des chaînes lourdes (IgH).

Amorces des gènes codant les récepteurs des cellules T

En médecine humaine, la plupart des laboratoires pratiquant la PARR n'étudie que les réarrangements des gènes TCR γ . En effet, l'analyse du locus γ a donné de bien meilleurs résultats que l'analyse des loci β ou δ . Ceci tient à deux explications: d'une part, les segments V des gènes TCR γ sont peu nombreux, ce qui facilite l'optimisation des amorces, d'autre part, le locus γ est plus souvent réarrangé à la surface des cellules T (Wood et al., 1994; Greiner et al., 1995; Theodorou et al., 1995; Tipold et al., 1996). Le même constat a été mené chez le chien (Vernau et al., 1999).

Les amorces choisies pour l'étude des réarrangements des gènes codant les récepteurs des cellules T sont donc préférentiellement complémentaires de séquences encadrant la région CDR3 des TCR γ .

II.1.4.2. Mise au point d'amorces adaptées à l'étude des lymphomes canins

Vernau et al. en 1999 puis Burnett et al. en 2003 furent les premiers à adapter la PARR au lymphome canin, en élaborant des amorces adaptées à l'espèce canine.

Pour l'étude des réarrangements des gènes codant les récepteurs des lymphocytes T, Burnett et al., 2003 ont mis au point une amorce complémentaire d'une séquence nucléotidique conservée dans la région V γ (TCR γ 3) et deux amorces complémentaires de séquences conservées dans la région J γ (TCR γ 1 et TCR γ 2). Ces séquences conservées ont pu être détectées en comparant cinq séquences nucléotidiques codant les récepteurs des cellules T. Le même protocole a permis de mettre au point une amorce spécifique de la région V (CB1) et deux amorces spécifiques de la région J (CB2 et CB3) des CDR3 codant les immunoglobulines. Par la suite, les amorces de Burnett et al., 2003 ont été largement reprises dans les études suivantes, le protocole alors mis en place faisant office de référence en médecine vétérinaire (Keller et al., 2004; Wilkerson et al., 2005; Lana et al., 2006 (1); Williams et al., 2008; Fukushima et al., 2009; Kaneko et al., 2009a; Kaneko et al., 2009b, Yagihara et al., 2009; Gentilini et al., 2009; Takanosu et al., 2010; Chaubert et al., 2010; Thaleim et al., 2013).

Depuis la mise au point de ces premières amorces, le séquençage du génome canin s'est largement développé grâce aux Eukaryotic Genome Sequencing Projects. Les techniques bioinformatiques, basées sur les bases de données des séquences génomiques canines, ont permis de caractériser le répertoire VH canin et d'identifier de nouvelles séquences conservées au sein des segments V, D et J des récepteurs lymphocytaires (cf. Figure 27) (Bao et al., 2010).

Plusieurs études vétérinaires ont été menées dans le but de mettre au point de nouvelles amorces plus sensibles et spécifiques à certains types de lymphome grâce aux nouvelles connaissances acquises du génome canin (cf. Tableau 10) (Tamura et al., 2006; Yagihara et al., 2007; Gentilini et al., 2009; Chaubert et al., 2010; Takanosu et al., 2010).

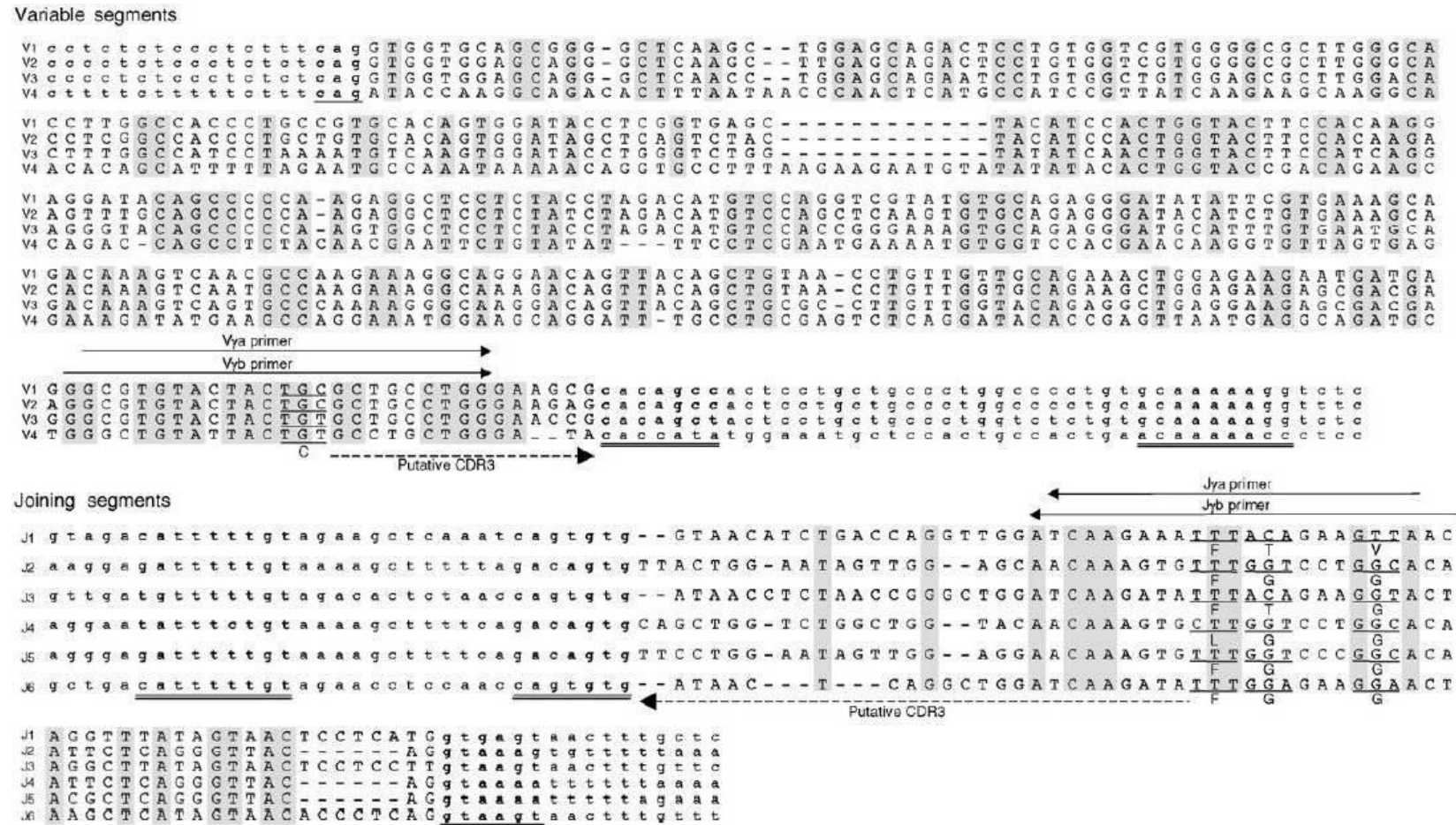


Figure 27. Analyse des séquences nucléotidiques des 4 segments V et des 6 segments J du gène TCR γ et mise au point des amorces Vya, Vyb, Jya et Jyb (Yagihara et al., 2007).

(caractères gras soulignés): site accepteur (5') ou donneur (3') pour l'épissage; (caractères gras doublement soulignés): séquence signal de recombinaison; (caractères majuscules): séquences nucléotidiques des segments V entre le site accepteur 5' et la séquence signal de recombinaison 3' ou séquences nucléotidiques des segments J entre le site donneur 3' et la séquence signal de recombinaison 5'; (caractères minuscules): séquences des introns; (encadrés gris): séquences conservées des segments V et J; (flèches en pointillés): région hypervariable CDR3 du gène TCR γ ; (flèches pleines): l'amorce Vya complémentaire des séquences V1, V2 et V3, l'amorce Vyb complémentaire de la séquence V4, l'amorce Jya complémentaire des séquences J1, J3 et J6, et l'amorce Jyb complémentaire des séquences J2, J4 et J6.

II.1.4.3. Mise au point d'amorces spécifiques des tumeurs

Pour améliorer la sensibilité et la spécificité de la PARR, il est possible de mettre au point des amorces spécifiques d'une tumeur. Ces amorces sont alors utilisées pour le suivi de la MRD d'une tumeur (maladie résiduelle minimale) ou pour la mise en relation de deux lymphomes concomitants ou successifs chez le même animal (cf II.3). (Burnett et al., 2004; Yamazaki et al., 2008).

Pour ce faire, des vecteurs clonaux sont créés à partir des produits de PARR d'une lignée cellulaire dérivée d'un lymphome T canonique (de référence) et leur séquence nucléotidique est analysée. Les régions adjacentes de ces séquences sont recherchées dans la base de données du génome canin (GenBank) en utilisant le programme de recherche BLAST (Basis Local Alignment Search Tool) mis à disposition par le NCBI (National Center for Biotechnology Information). Les séquences des régions adjacentes sont ensuite utilisées pour élaborer les amorces qui seront spécifiques de la tumeur initialement analysée (Yamazaki et al., 2008).

II.1.4.4. Intérêt de l'association de plusieurs couples d'amorces

Les séquences, dites conservées, encadrant les régions hypervariables sont sujettes à une certaine variabilité nucléotidique d'un lymphocyte à un autre. Il est nécessaire d'identifier les séquences les plus stables possible afin de mettre au point des amorces sensibles mais celles-ci ne pourront reconnaître la totalité des lymphocytes du fait de cette variabilité.

En médecine humaine, pour augmenter la sensibilité de la PARR, plusieurs couples d'amorces ciblant différentes régions des gènes codant les récepteurs des cellules lymphocytaires sont utilisés simultanément. Ceci a pour effet de diminuer le risque de faux-négatifs en augmentant la probabilité qu'une amorce soit effectivement complémentaire des séquences encadrant les régions hypervariables des lymphocytes (Lawnicki et al., 2003; Van Dongen et al., 2003). Ainsi, il a été démontré que l'ajout d'amorces permettant l'amplification de séquences codant les chaînes légères des immunoglobulines permettait d'atteindre une sensibilité de la PARR proche de 100% (Van Dongen et al., 2003).

En médecine vétérinaire, cette association de couples d'amorces a d'autant plus d'intérêt que l'étude du génome canin n'a pas permis d'identifier de séquences stables encadrant la région CDR3 et pouvant être le support d'amorces universelles. Gentilini et al., 2009 a procédé à un Gene scanning (technique exposée en II.1.5.2) en associant six couples d'amorces différents pour chaque analyse PARR (IgH major, IgH minor, TCR γ , T α , 5'FWR1 et 3'FWR1) (cf. Tableau 10). La sensibilité obtenue atteint alors les 97,9%. Cette valeur est supérieure aux sensibilités des PARR réalisées avec les mêmes couples d'amorces individuellement (cf. II.2.2) (Gentilini et al., 2009).

Tableau 10. Couples d'amorces utilisés en médecine vétérinaire pour amplifier les séquences codant les récepteurs des cellules lymphocytaires B (IgH) et T (TCR).

Mise au point:	Produit	Nom de l'amorce	Spécificité d'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')
Vernau 1999	Canine TCRγ CDR3	TCR γ 2U	VH	TG(G/T)-TGC-AGA-A(A/G)C-TGG-AGA-AGA
		TCR γ 2L	JH	GCA-CTG-TGC-CAG-GAC-CAA-ATA
	Canine IgH CDR3	D Ig 1U	VH	G(A/C)C-G(A/C/G)-TCA-CCA-TCT-CCA-(A/G)(A/G)G
		D Ig 1L	JH	TGA-(A/G)GA-GAC-(A/G)GT-GAC-C(A/T)G-GGT
		D Ig 2L	JH	GGA-CAC-GAA-GA(C/G)-TGA-GGT-GCC
Burnett 2003	Contrôle C μ	Sigmf1	C μ	TTC-CCC-CTC-ATC-ACC-TGT-GA
		Sr μ 3	C μ	GGT-TGT-TGA-TTG-CAC-TGA-GG
	IgH major	CB1	VH	CAG-CCT-GAG-AGC-CGA-GGA-CAC
		CB2	JH	TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT
	IgH minor	CB1	VH	CAG-CCT-GAG-AGC-CGA-GGA-CAC
		CB3	JH	TGA-GGA-CAC-AAA-GAG-TGA-GG
	TCRγ	TCR γ 1	JH	ACC-CTG-AGA-ATT-GTG-CCA-GG
		TCR γ 2	JH	GTT-ACT-ATA-AAC-CTG-GTA-AC
		TCR γ 3	VH	TCT-GGG-ATG-TAT-TAC-TGT-GCT-GTC-TGG
Tamura 2006	IgH Tamura	Tamura F	VH	ACA-CGG-CC(A/C/G)-TGT-ATT-ACT-GT
		Tamura R	JH	TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-C
	IgH 5' FWRI	FAM_5' FWRI	VH	GAG-GTG-CAG-CTG-GTG-GAG-TCT
		CB2	JH	TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT
	IgH 3' FWRI	FAM_3' FWRI	VH	GCC-TCT-GGA-TTC-ACC-TTC-AG
		J2	JH	AGG-AGA-CGG-TGA-CCA-GGG-T
Gentilini 2009	IgH FWRI-ci	FWRI-ci	VH	AGG-TGC-AGT-TGG-TGG-AGT-CT
		J4	JH	GAG-GAG-ACG-GTG-ACC-AGG-GTT
	IgH FWRI-co	FRWI-co	VH	ACT-CTC-CTG-TGT-GGC-CTC-TG
		J3	JH	AGG-AGA-CGG-TGA-CCA-GGG-TTC
	Contrôle β -Actin	β -Actin_F2	β -Actin	ACC-ACT-GGT-ATT-GTC-ATG-GAC-TCT-G
		β -Actin_R2	β -Actin	GCT-CTT-CTC-CAG-GGA-GGA-CGA

Mise au point	Produit	Nom de l'amorce	Spécificité d'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')
Yagihara 2009	TCR V γ a-J γ a	V γ a J γ a	VH JH	CGTGTACTACTGCGCTGCCTGG TACCTTCTG(C/T)AAATATCTTGA
	TCR V γ b-J γ b	V γ b J γ b	VH JH	GGCTGTATTACTGTGCCTGCTGG TGTGCCAGGACCAAGCACTTTGTT
	TCR V γ a-J γ b	V γ a J γ b	VH JH	CGTGTACTACTGCGCTGCCTGG TGTGCCAGGACCAAGCACTTTGTT
	TCR V γ b-J γ a	V γ b J γ a	VH JH	GGCTGTATTACTGTGCCTGCTGG TACCTTCTG(C/T)AAATATCTTGA
Chaubert 2010	dTCR V γ a-J γ a	dV γ a dJ γ a	VH JH	GGCGTGTACTACTGCGCTGCC TACCTTCTGTAAATATCTTGATC
	dTCR V γ a-J γ b	dV γ a dJ γ b	VH JH	GGCGTGTACTACTGCGCTGCC TGTGCCAGGACCAAGCACTTT
	dTCR V γ b-J γ a	dV γ b dJ γ a	VH JH	GGCTGTATTACTGTGCCTGCTGG TACCTTCTG(C/T)AAATATCTTGA
	dTCR V γ b-J γ b	dV γ b dJ γ b	VH JH	GGCTGTATTACTGTGCCTGCTGG TGTGCCAGGACCAAGCACTTT

(VH): amorce sens complémentaire d'une séquence stable du segment V (FRWI ou FRWIII); (JH): amorce anti-sens complémentaire d'une séquence stable du segment J.

II.1.5. Révélation des produits d'amplification de la PARR

II.1.5.1. Electrophorèse sur gel

Principe

Il s'agit de séparer les séquences amplifiées et naturellement chargées en provoquant leur migration sur un support gélifié sous l'effet d'un champ électrique.

Le squelette des molécules d'ADN est composé de groupements phosphate chargés négativement. Ainsi, l'application d'un champ électrique déplacera les fragments d'acides nucléiques amplifiés vers l'anode chargée positivement. La vitesse de migration sera fonction de leur taille et des conditions d'électrophorèse.

Deux types de gel sont couramment utilisés: le gel d'agarose et le gel de polyacrylamide. Au moment de sa fabrication, des puits sont formés à l'extrémité du gel à l'aide d'un peigne. Les échantillons y sont déposés avec un tampon de charge pour augmenter leur densité et les maintenir au fond du puits (Martignat, 2009). Le gel est ensuite déposé dans une cuve d'électrophorèse contenant du Tris-Acétate-EDTA entre l'anode et la cathode. Le champ électrique est appliqué pendant un certain temps, variable en fonction du voltage et de la mobilité électrophorétique des molécules. Les molécules d'ADN vont alors migrer vers l'anode. En passant à travers les mailles de l'agarose ou du polyacrylamide, elles seront séparées selon leur taille. Plus les fragments d'ADN amplifiés sont grands, plus ils seront ralentis par les mailles du gel. Les fragments les plus petits seront donc les plus éloignés du

point de dépôt. Leur taille est estimée en comparant leur mobilité électrophorétique (distance parcourue sur le gel) à celle de fragments d'ADN de taille déterminée (marqueur de taille).

Les produits de PCR sont ensuite visualisés grâce à un fluorochrome spécifique des acides nucléiques incorporé dans la composition du gel. Le colorant se fixe sur l'ADN et le révèle par émission de la lumière de fluorescence dans un transilluminateur (UV). Le Bromure d'Ethidium est le marqueur le plus couramment utilisé. Il doit être manipulé avec précaution car c'est un produit mutagène, cancérigène et tératogène. De nouveaux fluorochromes tels que le SafeView et le GelRed, moins toxiques et plus sensibles, tendent à remplacer le Bromure d'Ethidium.

Choix du gel d'électrophorèse

La spécificité de la PARR dépend fortement de la résolution de la technique de séparation des produits de PCR. Une résolution trop faible augmente le risque de confondre deux fragments amplifiés distincts de quelques paires de base seulement.

Le pouvoir de séparation de l'électrophorèse sur gel dépend de la réticulation du gel (taille moyenne des mailles du réseau) elle-même fonction de sa concentration en agarose ou polyacrylamide. Une forte concentration entraîne un maillage plus dense favorisant la séparation de fragments de petite taille. Inversement, une faible concentration est préférée pour la séparation de gros fragments (cf. Tableau 11 et Tableau 12).

Tableau 11. Pouvoir de séparation de l'ADN en fonction de la concentration en agarose du gel d'électrophorèse (Sambrook et al., 2001)

Concentration en agarose % (masse/volume)	Pouvoir de séparation de l'ADN (bases)
0,7	800-10000
0,9	500-7000
1,2	400-6000
1,5	200-3000
2,0	100-2000

Tableau 12. Pouvoir de séparation de l'ADN en fonction de la concentration en polyacrylamide du gel d'électrophorèse (Sambrook et al., 2001)

Concentration en polyacrylamide (% (masse/volume))	Pouvoir de séparation de l'ADN (bases)
3,5	1000-2000
5	80-500
8	60-400
12	40-200
15	25-150
20	6-100

Le gel de polyacrylamide possède un pouvoir discriminant supérieur à celui du gel d'agarose (Chaubert et al., 2010). Il représente la technique de séparation de choix pour les PARR (Avery et al., 2012). Cependant, l'acrylamide en poudre ou à l'état liquide est extrêmement toxique, particulièrement pour le système nerveux, cancérigène et tératogène. Le gel formé n'est plus toxique mais il est plus difficile et long à préparer, plus cher et plus fragile que le gel d'agarose.

Malgré un pouvoir discriminant plus faible, Vernau et al., 1999; Tamura et al., 2006; Yamazaki et al., 2008 et Gentilini et al., 2009 ont utilisé le gel d'agarose avec succès pour l'analyse des produits de PARR, la concentration du gel variant de 2,2 à 4%.

Techniques adjuvantes d'électrophorèse sur gel

Au terme d'une PARR conventionnelle, les produits amplifiés dont les séquences ne diffèrent que de quelques nucléotides forment parfois des bandes très proches sur le gel, jusqu'à se confondre en cas de migration insuffisante (bande polyclonale). Ce phénomène est appelé pseudo-clonalité et est à l'origine de résultats faux-positifs (Avery et al., 2012). L'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP) et l'analyse des hétéroduplex (SCGE) sont deux techniques de biologie moléculaire permettant d'augmenter la spécificité de la PARR.

- L'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP)

Dans un tampon dénaturant et sous l'effet de la chaleur suivie d'un refroidissement rapide, les monobrans d'ADN se séparent et adoptent une structure secondaire totalement dépendante de leur séquence nucléotidique. La moindre variation nucléotidique peut modifier cette structure. L'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins (ou SSCP) se base sur la différence de migration des différentes conformations des monobrans des fragments amplifiés pour les différencier sur un gel non dénaturant d'agarose ou de polyacrylamide (cf.Figure 28) (Wallace, 2002)

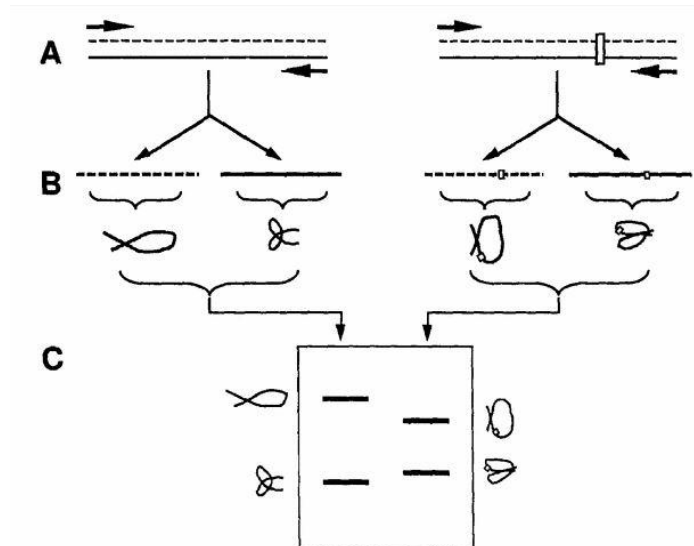


Figure 28. Principe de l'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins (Booth, 1996).

(A): Amplification de fragments d'ADN par un couple d'amorces identiques, différents d'une paire de base; (B): Dénaturation des molécules d'ADN par la chaleur suivie d'un refroidissement rapide. Les monobrans adoptent une structure secondaire spécifique de leur séquence nucléotidique; (C): Séparation des monobrans par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

L'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins s'avère utile pour améliorer la spécificité des résultats de la PARR. Les smears et les bandes de faible intensité détectés avec la PARR classique disparaissent avec la PARR-SSCP par dispersion des bandes polyclonales (cf. II.1.6). Les bandes d'amplification clonale sont plus nettes. Cette technique permet également de déterminer le caractère monoallélique ou bi-allélique des réarrangements. Théoriquement, dans le cas de réarrangement bi-allélique, deux bandes devraient être observées en PARR-SSCP puisque les deux monobrans présenteront des séquences, conformations et mobilités électrophorétiques différentes (Han et al., 2004). Parfois, plus de deux bandes distinctes sont obtenues sans que la cause ne soit élucidée (Han et al., 2004; Kaneko et al., 2009 (1)) (cf. Figure 29).

La complexité et le temps consacré à la procédure limitent son utilisation en routine. Elle représente cependant une alternative intéressante lorsque des doutes subsistent après avoir réalisé une PARR conventionnelle.

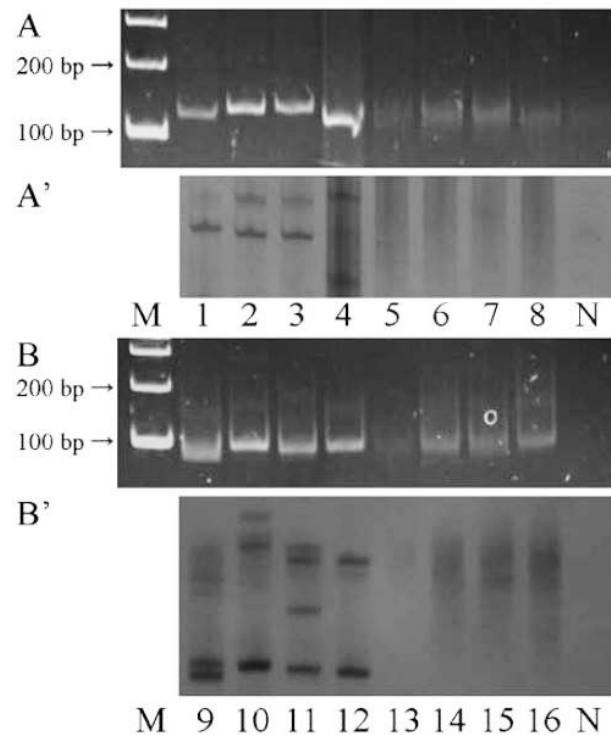


Figure 29. Comparaison des résultats d'une PARR conventionnelle et d'une PARR-SSCP réalisées dans les mêmes conditions expérimentales (Kaneko et al., 2009 (1)).

(A): PARR conventionnelle réalisée à partir de 4 prélèvements de lymphome B canins (1-4) et 4 prélèvements de nature différente (5-8) avec les amorces IgH major; (B): PARR conventionnelle réalisée à partir de 4 prélèvements de lymphome T canins (9-12) et 4 prélèvements de nature différente (13-16) avec les amorces TCR γ ; (A'): PARR-SSCP réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que (A); (B'): PARR-SSCP réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que (B); (M): marqueur de taille de produits de PCR; (N): témoin négatif (eau stérile). Des lymphocytes clonaux sont détectés à partir des prélèvements de lymphome B (1-4) avec les amorces IgH major et à partir des prélèvements de lymphome T (9-12) avec les amorces TCR γ . Cela se traduit par une bande monoclonale avec la PARR conventionnelle et deux à plusieurs bandes nettes avec la PARR-SSCP. Les smears obtenus avec la PARR conventionnelle (A et B, 5-8 et 13-16) disparaissent avec la PARR-SSCP (A' et B', 5-8 et 13-16).

- Analyse des hétéroduplex (CSGE)

L'analyse des hétéroduplex (CSGE : Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis) permet également d'augmenter la spécificité de la PARR en dispersant les bandes polyclonales (Wallace, 2002).

Les hétéroduplex sont des associations (duplex) de deux monobrin d'ADN différents de quelques nucléotides. Ils sont générés dans des conditions légèrement dénaturantes à partir des différents produits de PCR (ex: dénaturation des brins d'ADN à 95°C pendant 5 minutes puis ré-hybridation avec des monobrin différents à 4°C pendant 30 minutes avec l'ajout de bis-acrolyl-piperazine dans le gel de polyacrylamide) (Takanosu et al., 2010). Les homoduplex sont formés à partir des monobrin identiques en excès, c'est à dire

majoritairement à partir des brins des fragments clonaux amplifiés en cas de lymphome (Lakhotia et al., 2003).

Les mésappariements des hétéroduplex affectent la conformation de la molécule formée (hélice, boucle, coude, hernie, pseudo-noeud) et leur mobilité électrophorétique s'en trouve modifiée par rapport aux homoduplex. Au terme de l'électrophorèse, les hétéroduplex seront donc séparés des homoduplex. Ainsi, une bande polyclonale détectée avec la PARR conventionnelle se dispersera et disparaîtra ou s'estompera avec la PARR-CSGE. Les bandes monoclonales, quant à elles, seront toujours présentes (cf. Figure 30 et Figure 31).

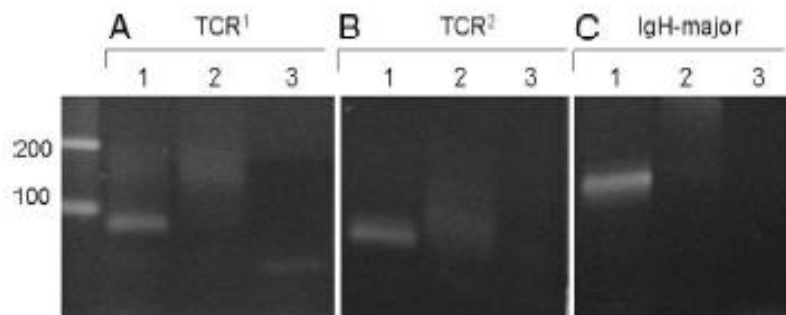


Figure 30. PARR conventionnelle et CSGE à partir de prélèvements tissulaires duodénaux non tumoraux (Takanosu et al., 2010)

(A): couple d'amorces ciblant les gènes codant les récepteurs des lymphocytes T (TCR^1); (B): couple d'amorces ciblant les gènes codant les récepteurs des lymphocytes T (TCR^2). (C): couple d'amorces ciblant les gènes codant les immunoglobulines des lymphocytes B (IgH-major); (1): PARR conventionnelle; (2): PARR-CSGE; (3): témoin négatif (eau stérile). Les bandes obtenues après une PARR conventionnelle ont disparu après analyse des hétéroduplex (bandes polyclonales).

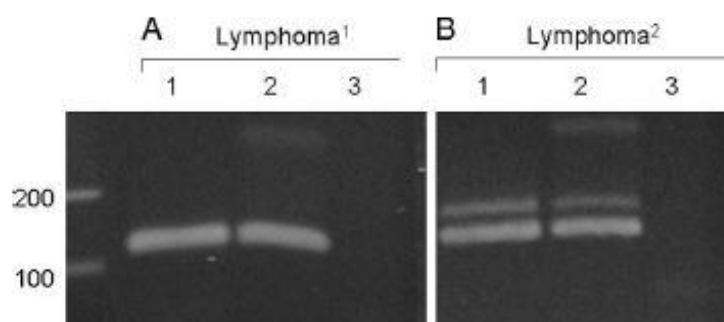


Figure 31. PARR conventionnelle et CSGE à partir de prélèvements ganglionnaires lymphomateux avec les amorces IgH-major ciblant les gènes codant les immunoglobulines des lymphocytes B (Takanosu et al., 2010)

(A): lymphome¹ multicentrique; (B): lymphome²; (1): PARR conventionnelle; (2): PARR-CSGE; (3): témoin négatif (eau stérile). Les bande obtenues après une PARR conventionnelle sont toujours présentes après analyse des hétéroduplex (bandes monoclonale et biclonale).

La sensibilité de la CSGE est estimée à 90% pour des séquences nucléotidiques comprises entre 250 pb et 500pb (Wallace, 2002). Cette technique est particulièrement recommandée lorsque les prélèvements analysés sont riches en cellules lymphocytaires immunocompétentes et générateurs de pseudoclonalité. Ainsi, Takanosu et al., 2010 ont amélioré la spécificité de la PARR de 0% à 96% grâce à l'analyse des hétéroduplex à partir de 30 biopsies intestinales (26 entérites lymphoplasmocytaires et 4 lymphomes alimentaires).

Aucun équipement spécifique n'est requis pour l'analyse des hétéroduplex. Seule la composition du gel d'électrophorèse est adaptée. De plus, cette analyse est peu chronophage par rapport à une PARR conventionnelle. La manipulation est réalisable en 5 à 6 heures (Takanosu et al., 2010). Cette technique peut être adoptée en routine ou lors de cas particuliers (résultats équivoques, suspicion de lymphome intestinal, ...) (Avery et al., 2004).

- Autres techniques

Les techniques de biologie moléculaires suivantes appliquées à l'électrophorèse sur gel sont des techniques appliquées aux PARR en médecine humaine avec des résultats très encourageants. Elles n'ont pour le moment jamais fait l'objet d'études en médecine vétérinaire.

- L'électrophorèse en gradient de dénaturation (DGGE)

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a été, pour la première fois, appliquée à la PARR par Bourguin et al., 1990. Il s'agit de soumettre les fragments d'ADN à différentes concentrations croissantes en dénaturant dans le gel d'électrophorèse (ex: urée et formaldéhyde). Les deux brins d'ADN se séparent plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en paires de bases AT et GC, les paires de bases GC étant plus stables. Ainsi, deux molécules distinctes possèdent des brins qui ne se sépareront pas au même moment et migreront alors différemment, la mobilité électrophorétique des monobrans étant plus faible (Bourguin et al., 1990; Wood et al., 1994; Theodorou et al., 1995). L'addition de séquences riches en guanine et cytosine (GC clamps) à l'extrémité 5' des amorces augmentent la spécificité de l'électrophorèse DGGE (Greiner et al., 1995).

- L'électrophorèse en gradient de température (TGGE)

La TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) est comparable à la DGGE sur le principe. Un gradient de température croissant est appliqué au gel d'électrophorèse dénaturant. Les deux brins d'ADN se séparent plus ou moins rapidement avec l'augmentation de la température en fonction de leur composition en paires de bases AT et GC, les paires de bases GC étant plus stables (Zhu et al., 2001).

II.1.5.2. Electrophorèse capillaire

Principe

L'électrophorèse capillaire est une méthode de séparation analytique récente, très performante, rapide, quantitative et reproductible. Son pouvoir discriminant, de l'ordre d'une paire de base, est supérieur à celui des électrophorèses sur gel et améliore la spécificité de la PARR (Thalheim et al., 2013; Kuo et al., 2007; Pai et al., 2005; Bagg et al., 2002; Gentilini et al., 2009).

La technique combine un capillaire de silice étroit, de l'ordre de quelques dizaines de micromètres de diamètre rempli de solution ou de gel tampon, et des voltages très importants (plusieurs dizaines de kV) pour séparer les molécules sur la base de leur différence de rapport charge/taille. Les produits de PCR sont détectés par absorption UV, fluorimétrie ou conductimétrie directement dans le capillaire par un système optique de détection relié à un module d'acquisition des données (cf. Figure 32. Schéma du système d'électrophorèse capillaire (Lafont, 2005)Figure 32) (Lafont, 2005). Il est possible d'améliorer la sensibilité de la technique de révélation des produits de PCR par l'incorporation de marqueurs fluorescents dans les amorces détectés grâce à un module supplémentaire extérieur à l'appareil commercial, et l'analyse simultanée de la courbe de dénaturation thermique (= technique du Gene scanning) (Gentilini et al., 2009).

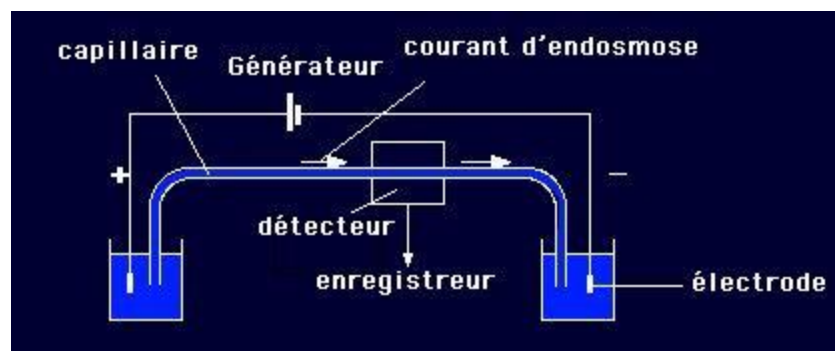


Figure 32. Schéma du système d'électrophorèse capillaire (Lafont, 2005)

Ces données sont affichées sous la forme d'un électrophorégramme, qui donne la réponse du détecteur en fonction du temps. Les produits de PCR apparaissent comme des pics dont la hauteur est représentative de la quantité de produits identiques détectés déduite de l'immunofluorescence émise et de l'absorbance. La position sur l'abscisse est représentative de la longueur du fragment amplifié en paire de base déduite de la vitesse de migration (déduction rendue possible avec l'utilisation de séquences témoins de taille connue) (cf. Figure 33) (Blessum, 1999).

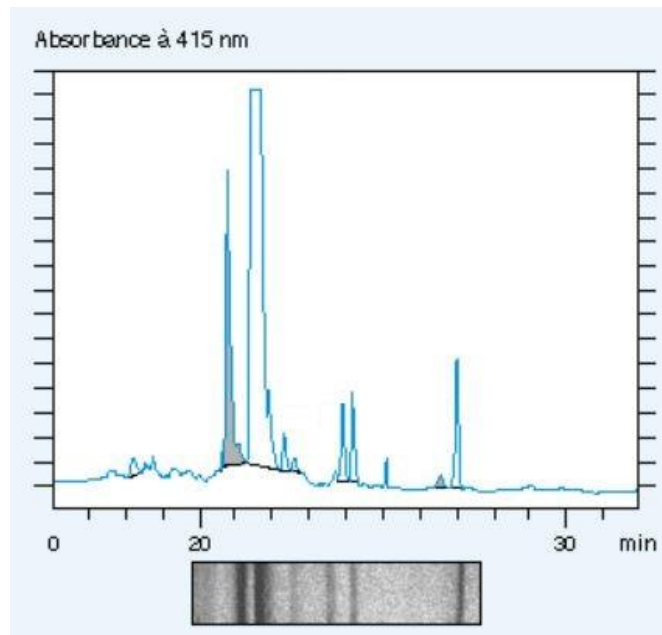


Figure 33. Comparaison d'une électrophorèse capillaire et d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide réalisées sur le même échantillon (hémolysat normal). Chaque pic sur l'électrophorégramme correspond à une bande sur le gel, la hauteur des pics étant corrélée à l'intensité des bandes. (Blessum, 1999)

La détection de la fluorescéine est hautement sensible. L'électrophorèse capillaire permet ainsi la détection d'une faible quantité d'échantillon d'ADN. Cette technique est également rapide, automatisée, quantitative et à haut-débit, un lot de différents échantillons pouvant être analysés simultanément. La difficulté de cette technique réside en son calibrage. En effet, la détection des produits de PCR nécessite leur passage dans le capillaire par électro-injections et dépend étroitement du réglage des paramètres tels que le kilovoltage et le temps de passage dans le capillaire. Ces paramètres conditionnent l'interprétation des électrophorégrammes.

Variante

La PARR-4 couleurs est une variante de l'électrophorèse capillaire utilisée en médecine humaine. Chaque couple d'amorces est marqué par des fluorochromes de couleur différente. Ainsi, après électrophorèse capillaire, il est possible de déterminer plus précisément la localisation des réarrangements. Vega et al., 2001 ont marqué différemment 4 couples d'amorces TCR γ et pu déterminer quelle était la région V γ concernée par les réarrangements pour chacun des lymphomes. Dans cette étude, la sensibilité de la technique est de 98% pour 90% avec une PARR conventionnelle.

II.1.5.3. Puces à ADN

Les puces à ADN contiennent des oligonucléotides ou sondes ADN fixées sur un support. L'ensemble des oligonucléotides représente l'ensemble des régions variables (V) et de jonction (J) susceptibles d'être réarrangées. Après la PARR, les produits de PCR sont dénaturés et incubés sur les puces à ADN. Les monobrin des séquences amplifiées se fixent

alors sur l'oligonucléotide complémentaire. Après révélation, il est possible d'identifier précisément les régions concernées par les réarrangements (cf. Figure 34) (Gra et al., 2007). Cette technique est utilisée en recherche.

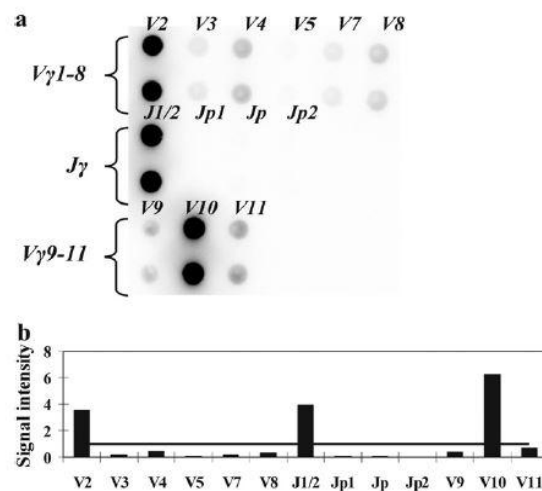


Figure 34. PARR et révélation des produits de PCR sur des puces à ADN (Gra et al., 2007).

(a): Puce à ADN après hybridation des monobrans issus d'un échantillon clonal; (b): Mesure de l'intensité des signaux émis par les fluorochromes. Le signal seuil est symbolisé par la ligne horizontale. Les signaux en provenance des sondes V γ 2, V γ 10 et J γ 1/2 sont plus intenses et sont les témoins des réarrangements clonaux bialléliques de ces gènes.

II.1.6. Analyse des produits d'amplification de la PARR

II.1.6.1. Lecture d'un gel d'électrophorèse

A l'issue de la PCR, les produits obtenus correspondent aux séquences nucléotidiques amplifiées comprises entre un couple d'amorces spécifique. Ils sont séparés par électrophorèse sur gel et révélés par émission de la lumière de fluorescence du fluorochrome fixé dans un transilluminateur (UV).

Dans le cas des animaux sains ou atteints d'un processus inflammatoire, les séquences sont soit non amplifiées, soit amplifiées en petit nombre et très diversifiées (cf. Figure 35). Cela se traduit sur le gel d'électrophorèse par:

- Une absence de visualisation des produits par défaut d'amplification;
- Une absence de visualisation des produits en raison de leur petit nombre;
- De nombreuses bandes (= réarrangement polyclonal);
- Un smear (= trace ou frottis correspondant à une faible quantité de produits amplifiés monoclonaux ou polyclonaux, respectivement).

En revanche, dans le cas des lymphomes, la séquence des cellules clonales présentant le même réarrangement est amplifiée en très grand nombre (cf. Figure 35). Cela se traduit sur le gel d'électrophorèse par :

- Une bande forte unique (réarrangement monoclonal) correspondant à l'accumulation des produits de PCR identiques;
- Deux bandes fortes (réarrangement biclonal).

L'intensité et la largeur de la bande sont en général proportionnelles au nombre de copies de la séquence amplifiée. Elles donnent ainsi des indications quant à la quantité de cellules néoplasiques B ou T dans le tissu prélevé sans pour autant être assez précises pour être exploiter dans la gestion clinique d'un cas (Chaubert et al., 2010).

Les amorces à partir desquelles une séquence est amplifiée renseignent sur l'immunophénotype des lymphomes. En effet, une bande forte obtenue avec un couple d'amorces spécifiques des gènes codant les immunoglobulines ou les récepteurs des lymphocytes T est en faveur d'une monoclonalité des cellules lymphocytaires B ou T, respectivement (Vernau et al., 1999). Les amorces spécifiques d'une tumeur permettent de mettre en relation deux lymphomes (cf. II.1.4.2).

Les marqueurs de taille permettent d'estimer la taille des produits de PCR.

Exemple de lecture de gel d'électrophorèse (Burnett et al., 2003)

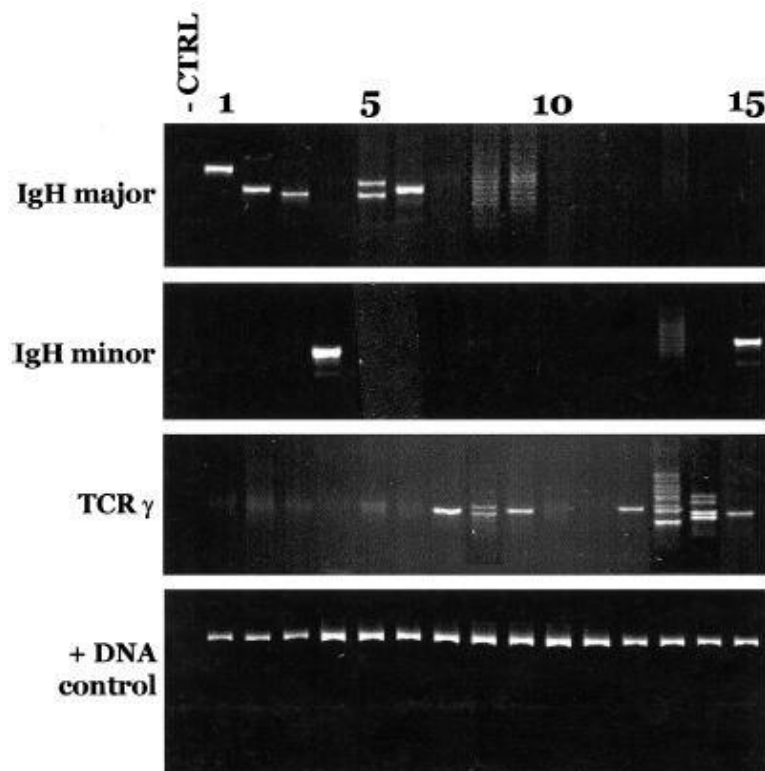


Figure 35. PARR réalisée avec les couples d'amorces IgH major, IgH minor, TCRγ et Cμ pour le contrôle positif, à partir d'un témoin négatif (eau stérile) et de 15 échantillons de nature différente (Burnett et al., 2003).

Dans un premier temps, la PARR est validée en s'assurant qu'aucune amplification ne soit présente à partir du témoin négatif et que les amorces contrôle aient amplifié leur séquence spécifique à partir de chacun des échantillons testés.

- Echantillon 1: leucémie lymphoblastique (moelle osseuse) → une bande forte avec les amorces IgH major caractéristique d'un réarrangement monoclonal des gènes codant les immunoglobulines (lymphome B).
- Echantillon 2: lymphome (biopsie) → une bande forte avec les amorces IgH major caractéristique d'un réarrangement monoclonal des gènes codant les immunoglobulines (lymphome B).
- Echantillon 3: lymphome (liquide d'épanchement péritonéal) → une bande forte avec les amorces IgH major caractéristique d'un réarrangement monoclonal des gènes codant les immunoglobulines (lymphome B).
- Echantillon 4: leucémie lymphocytaire (sang) → une bande forte avec les amorces IgH minor caractéristique d'un réarrangement monoclonal des gènes codant les immunoglobulines (lymphome B).
- Echantillon 5: lymphome (biopsie) → deux bandes fortes avec les amorces IgH major caractéristiques d'un réarrangement biclonal des gènes codant les immunoglobulines (lymphome B).
- Echantillon 6: lymphome (aspirat de cytoponction) → une bande forte avec les amorces IgH minor caractéristique d'un réarrangement monoclonal des gènes codant les immunoglobulines (lymphome B).
- Echantillon 7: leucémie lymphocytaire (sang) → une bande forte avec les amorces TCR γ caractéristique d'un réarrangement monoclonal des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes T (lymphome T).
- Echantillon 8: lymphome (moelle osseuse) → deux bandes fortes avec les amorces TCR γ caractéristiques d'un réarrangement biclonal des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes T (lymphome T).
- Echantillon 9: lymphome (liquide d'épanchement pleural) → une bande forte avec les amorces TCR γ caractéristique d'un réarrangement monoclonal des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes T (lymphome T) associée à un smear avec les amorces IgH major caractéristique d'une population lymphocytaire B non néoplasique.
- Echantillon 10: lymphome (liquide cébrospinal) → pas de bande visible caractéristique d'une absence d'amplification (faux-négatif).
- Echantillon 11: lymphome (moelle osseuse) en provenance du même chien que l'échantillon 10 → pas de bande visible caractéristique d'une absence d'amplification (faux-négatif).

- Echantillon 12 : lymphome (moelle osseuse) → une bande forte avec les amorces TCR γ caractéristique d'un réarrangement monoclonal des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes T (lymphome T).
- Echantillon 13: lymphome (sang) → plusieurs bandes (faux-négatif)
- Echantillon 14: lymphome (sang) → plusieurs bandes (faux-négatif)
- Echantillon 15: leucémie

II.1.6.2. Lecture d'un électrophorégramme

A l'issue de l'électrophorèse capillaire, la détection des produits de PARR dans le capillaire est retranscrite sous la forme d'un électrophorégramme. Les produits de PCR y sont représentés par des pics dont la position sur l'abscisse indique la taille du fragment amplifié en paires de base et dont la hauteur est proportionnelle à la quantité de produits détectés.

Une population lymphocytaire polyclonale est caractérisée par de multiples pics de différentes tailles, fréquemment arrangés selon une distribution gaussienne. Une population lymphocytaire monoclonale est caractérisée par (Gentilini et al., 2009):

- Un pic unique, étroit dont la taille correspond à la taille des fragments encadrés par les amorces;
- Un pic au moins deux fois plus haut que les autres pics;
- Deux pics de hauteur égale (cf. Figure 36).

Selon la sensibilité et la spécificité de la PARR et les paramètres de l'électrophorèse capillaire, il se peut que les séquences réarrangées des lymphocytes sains ne soient pas amplifiées et/ou détectées. Cela se traduit par une absence de signal et une courbe plane sur l'électrophorégramme (Jeon et al., 2007).

Exemple de lecture d'électrophorégramme (Avery, 2012)

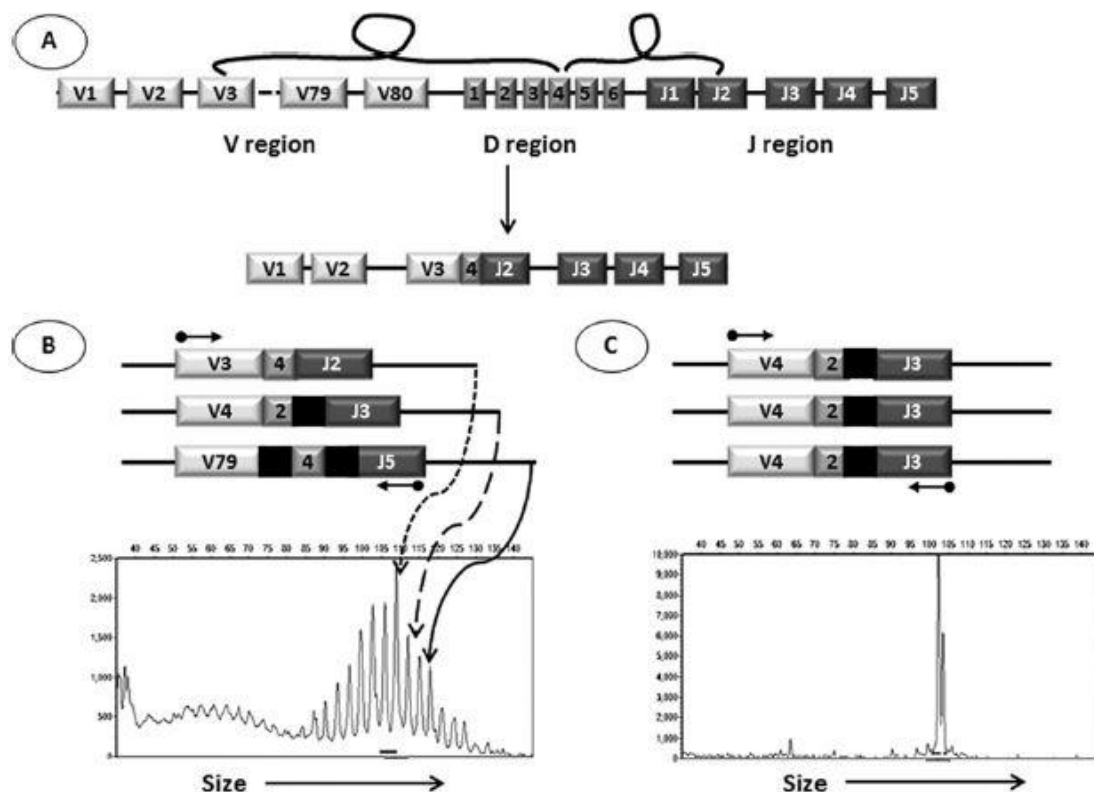


Figure 36. Interprétation de l'analyse électrophorétique capillaire des réarrangements des gènes amplifiés par PARR codant les récepteurs des lymphocytes (Avery et al., 2012).

(A): représentation de la diversité génétique des régions V (80), D (6) et J (5) codant les immunoglobulines chez le chien (Bao et al., 2010) et réarrangement aléatoire des segments afin de former une combinaison unique V-D-J; (B): ajout d'un nombre aléatoire de nucléotides (en noir) entre chaque région, conférant une longueur unique aux gènes réarrangés V-D-J; (C): amplification des séquences V-D-J encadrées par les amorces (petites flèches) et analyse des produits de PCR par électrophorèse capillaire. Lorsque les molécules d'ADN analysées proviennent d'une population hétérogène de lymphocytes B, les produits de PCR sont de différentes tailles et caractérisés par de nombreux pics sur l'électrophorégramme. En cas de néoplasie, les lymphocytes dérivent d'un même clone. Les séquences nucléotidiques V-D-J amplifiées sont donc identiques et caractérisées par un pic unique sur l'électrophorégramme.

II.1.6.3. Intreprétation des résultats

II.1.6.3.1. Interprétation de la monoclonalité

La PARR est basée sur le principe selon lequel toute malignité est clonale (cf. I.1.2). Les séquences identiques des cellules clonales sont amplifiées en très grand nombre et cela se traduit par l'apparition d'une bande unique de forte intensité sur le gel d'électrophorèse. Cependant la réciproque n'est pas toujours vérifiée: la monoclonalité des réarrangements n'équivaut pas systématiquement à un processus malin. Il existe en effet des situations pour lesquelles la PARR met en évidence des réarrangements clonaux en l'absence de lymphome.

Chez l'homme, il existe un certain nombre de maladies lymphoprolifératives bénignes parfois clonales, dont certains désordres lymphoprolifératifs liés au virus de l'immunodéficience humaine (VIH), des lymphocytoses à grands lymphocytes granuleux, des lymphadénopathies angio-immunoblastiques, une infection par le virus Epstein-Barr. Une population cellulaire clonale sanguine peut également être détectée chez certaines personnes âgées avec la PARR (Scott et al., 1994; Semenzato et al., 1997; Rockman, 1997; Callan et al., 1998).

Chez le chien, l'infection à *Escherichia coli* est la plus souvent incriminée. Cette infection mime les réarrangements clonaux des gènes codant les récepteurs des lymphocytes T. Une fois traitée, les réarrangements clonaux ne sont plus détectables (Vernau et al., 1999; Burnett et al., 2003). Ces lymphocytes T pourraient correspondre à une sous-population de lymphocytes pré-néoplasiques telle que rapportée en médecine humaine suite à une infection par le virus T-lymphotropique humain (HTLV, Human T-cell lymphotropic virus) (Cavrois et al., 1996). Cependant, il est plus probable qu'il s'agisse d'une sous-population de lymphocytes réactifs en réponse à un stimulus antigénique puisqu'ils ne sont plus détectables une fois l'infection contrôlée. Des infections à *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* et *Rickettsia rickettsii* sont également reconnues pour être à l'origine de l'expansion de clones lymphocytaires aux Etats-Unis (Rissetto et al., 2014).

L'existence de telles clonalités bénignes implique la nécessité d'interpréter les résultats de la PARR en les confrontant aux données cliniques et épidémiologiques.

II.1.6.3.2. Interprétation de la biclonalité

Des réarrangements biclonaux sont parfois détectés par PARR. Ces doubles réarrangements peuvent être de même immunophénotype (B ou T) ou d'immunophénotype différent (B et T).

- Biclonalité de même immunophénotype

Les réarrangements biclonaux détectés avec un même couple d'amorces peuvent avoir plusieurs origines:

- Une absence d'exclusion allélique

Au cours de la différenciation des lymphocytes, dès lors qu'un réarrangement allélique est productif, le récepteur antigénique est exprimé en surface et inhibe les processus de réarrangement suivants. Par un mécanisme pour le moment inconnu, certaines cellules lymphocytaires ont des réarrangements de gènes bialléliques voir davantage. Pourtant, seul l'un de ces réarrangements est fonctionnel et exprimé. Ce double réarrangement se traduit par la coexistence de deux séquences nucléotidiques différentes et amplifiées par les mêmes couples d'amorces (Rassenti, 1997; Yagihara et al., 2007; Gentilini et al., 2009).

- La coexistence de deux populations lymphocytaires clonales malignes indépendantes

Les lymphomes composés, avec les caractéristiques phénotypiques de plus d'un sous-type tumoral sur le même site, sont rares et n'ont été mis en évidence, à ce jour, que chez l'homme (Choi et al., 1996; Fend et al., 1999). En revanche, il est plus fréquent de trouver deux lymphomes concomitants de sous-type différent sur des sites distincts. Deux hypothèses peuvent potentiellement expliquer la présence de ces multiples lymphomes:

- Les clones secondaires dérivent du premier lymphome à la suite de modifications génétiques successives.
- Les multiples clones se forment simultanément suite à une exposition à des facteurs cancérogènes, une infection virale pronéoplasique (ex: le virus T-lymphotropique humain) ou des anomalies génétiques, épigénétiques ou microsatellitaires (Okawa et al., 2011).

- Biclonalité d'immunophénotype différent

Occasionnellement, la PARR révèle une biclonalité d'immunophénotype différent. Ce phénomène a été reporté dans plusieurs études (Burnett et al., 2003; Wilkerson et al., 2005; Gelain et al., 2008) et estimé à 5% des lymphomes T canins et 21% des lymphomes canins de la zone marginale d'après Burnett et al., 2003 et Valli et al., 2006.

Les réarrangements biclonaux détectés par plusieurs couples d'amorces peuvent avoir plusieurs origines:

- La présence de lymphocytes réactifs à diversité limitée

Les proliférations de cellules néoplasiques s'accompagnent parfois d'une population bénigne réactive de lymphocytes à diversité limitée en raison d'une dysrégulation immunitaire d'origine néoplasique (Valli et al., 2006; Bagg et al., 2006).

- Des réarrangements de gènes codant les TCR dans des cellules B néoplasiques

Il n'a jamais été formellement démontré que les réarrangements des gènes codant les TCR ne se réalisaient pas au sein des lymphocytes B. Cependant, des systèmes de régulation et d'inhibition de ce type de réarrangement sont fortement suspectés. A la faveur d'un processus néoplasique, ces derniers pourraient être dérégulés, entraînant des réarrangements tels qu'ils peuvent être observés dans les lymphocytes T (Krejci et al., 2005).

- La coexistence de deux populations lymphocytaires clonales malignes indépendantes

Lorsque deux phénomènes néoplasiques concomitants sont rapportés, la plupart sont de même immunophénotype. Peu d'études concernant deux lymphomes d'immunophénotype différent ont été publiées dans le milieu vétérinaire. Un cas de

lymphome B de haut grade associé à une leucémie lymphocytaire T chronique a été décrit en 2012 (Okawa et al., 2012).

II.1.6.3.3. Erreurs d'interprétation

- Faux négatifs

Un résultat est considéré comme faux-négatif en cas d'absence d'amplification clonale malgré la présence d'une atteinte néoplasique. La production de faux-négatifs par PARR varie entre 9% et 28% selon les études vétérinaires (Burnett et al., 2003; Lana et al., 2006(1)).

Les faux-négatifs sont générés par les situations suivantes:

- Une absence d'amplification avec le couple d'amorces utilisé

L'amplification des séquences hypervariables dépend de la capacité des amorces à cibler, s'hybrider et amplifier ces séquences V(D)J recombinées. La diversité des régions V, D et J et l'absence de séquences constantes communes à toute la population cellulaire lymphocytaire ne permet pas la mise au point d'amorces universelles capables de détecter tous types de réarrangements (Burnett et al., 2003; Chaubert et al., 2010).

- Les cas de biclonalité ou d'oligoclonalité évoqués précédemment

Il est parfois difficile de discerner un cas de biclonalité ou oligoclonalité d'un cas de polyclonalité. Des examens complémentaires sont alors nécessaires pour lever l'ambiguïté (histologie, immunohisto-cytologie, cytométrie de flux,...).

- Une bande clonale de faible intensité

Une bande clonale mineure peut être rapportée dans le cas où les cellules néoplasiques sont sous-représentées au sein de la population cellulaire de l'échantillon du fait d'une réaction inflammatoire périphérique, d'une mauvaise représentativité tumorale de l'échantillon, de l'origine lymphoïde de l'organe prélevé (Burnett et al., 2003; Van Dongen et al., 2003). C'est notamment le cas des lymphomes intestinaux qui s'accompagnent d'une inflammation lymphocytaire sévère à l'origine de nombreux faux-négatifs (Fukushima et al., 2009).

- Une dégradation de l'ADN

La qualité de l'ADN est évaluée avec les amorces contrôle. Une absence d'amplification à partir de ces amorces traduit la dégradation de l'ADN et la scissure de la molécule au sein de la séquence normalement amplifiée. L'ADN se dégrade plus ou moins rapidement selon les conditions de stockage. C'est le cas de l'ADN des lames colorées stockées à température ambiante à long terme (Gentilini et al., 2009) ou de l'ADN fixé dans le formaldéhyde pendant plus d'une semaine (Kaneko et al., 2009 (1)).

- Un lymphome NK

La leucémie agressive à cellules tueuses naturelles (cellules NK) est un cancer lymphoprolifératif très rare pour lequel aucun couple d'amorces n'est décrit (Vail et al., 2013).

- Faux positifs

Un faux-positif est considéré lorsqu'un réarrangement monoclonal ou biclonal est détecté malgré l'absence de lymphome. Ce phénomène est connu sous le nom de pseudoclonalité. Plusieurs facteurs à l'origine de ce manque de spécificité ont pu être identifiés :

- Un pouvoir discriminant trop faible de la technique de séparation des produits de PCR

Une variation de quelques bases suffit à l'élaboration de cellules immunitaires différentes. L'électrophorèse peut alors ne pas être suffisamment sensible et discriminante pour distinguer les différents produits de PCR. Cela se traduit sur le gel par une bande forte correspondant à plusieurs gènes "agglutinés" (Takanosu et al., 2010). Il existe des techniques biomoléculaires telles que l'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins ou l'analyse des hétéroduplex qui permettent de dissiper ces bandes et d'améliorer le pouvoir discriminant de l'électrophorèse (cf. II.1.5).

- Les cas de monoclonalité non néoplasique évoqués précédemment
- Des bandes artéfactuelles

Les bandes artéfactuelles sont généralement des bandes obtenues hors des limites de taille attendue. Il s'agit le plus souvent de dimères d'amorces, de petite taille, ou bien de séquences amplifiées à partir de l'ADN de cellules souches, non réarrangé, dont la taille excède les séquences réarrangées (Gentilini et al., 2009).

II.2. Sensibilité et spécificité de la PARR en médecine vétérinaire

La PARR est la seule technique, avec le Southern blot, qui mette en évidence la clonalité des lymphocytes en cas de lymphome. C'est une technique relativement récente en médecine vétérinaire (Vernau et al., 1999) en cours d'étude et d'amélioration, afin d'en faire une méthode diagnostique fiable des lymphomes canins.

II.2.1. Variabilité des sensibilité et spécificité de la PARR

Les sensibilité et spécificité de la PARR sont variables d'une étude vétérinaire à l'autre (cf. Tableau 13). Elles sont mesurées en comparant les résultats de la PARR à ceux de la méthode gold standard, l'immunohistochimie.

Tableau 13. Sensibilité de la PARR pour la détection de la clonalité des lymphomes, des lymphomes B et des lymphomes T du chien selon les études vétérinaires.

	Sensibilité lymphome (n= nombre total de cas)		Spécificité lymphome (n= nombre total de cas)	
	Sensibilité lymphome B (n/N= nombre de cas/nombre total)	Sensibilité lymphome T (n/N= nombre de cas/nombre total)	Spécificité lymphome B (n/N= nombre de cas/nombre total)	Spécificité lymphome T (n/N= nombre de cas/nombre total)
Vernau et al. 1999	-		-	
	-	100% (3/9)	-	100% (3/9)
Burnett et al. 2003	91% (77/101)		96% (77/101)	
	96% (28/46)	83% (18/46)	83% (28/46)	96% (18/46)
Tamura et al. 2006	-		-	
	100% (5/12)	-	100% (5/12)	-
Valli et al. 2006	-		-	
	85% (n=46)	63% (n=8)	-	-
Avery et al. 2009	75% (n=800)		94% (n=800)	
	-	-	-	-
Fukushima et al. 2009	66,7% (n=12)		-	
	-	-	-	-
Gentilini et al. 2009	97,9% (n=96)		-	
	100% (61/96)	94,3% (35/96)	100% (61/96)	100% (35/96)
Kaneko et al. 2009 (2)	100% (4/78)		-	
	-	-	-	-
Yagihara et al. 2009	87% (n=31)		-	
	80% (5/31)	84% (25/31)	-	100% (25/31)
Chaubert et al. 2010	80% (46/75)		100% (46/75)	
	66% (12/75)	85% (34/75)	100% (12/75)	100% (34/75)
CSU Dlab 2011	75%		94%	
	-	-	-	-
Thalheim et al. 2013	-		-	
	70% (46/62)	81% (16/62)	94% (46/62)	67% (16/62)

II.2.2. Facteurs de variabilité

Plusieurs facteurs de variabilité de la fiabilité de la PARR ont pu être identifiés en comparant les conditions de réalisation des différentes études humaines et vétérinaires. L'identification de ces facteurs permet d'adapter les conditions de réalisation de la PARR et d'améliorer la fiabilité diagnostique de la technique.

II.2.2.1. Amorces

La partie II.1.4.1 expose la difficulté voire l'impossibilité de mettre au point des amorces capables de cibler et de permettre l'amplification de toutes les séquences nucléotidiques réarrangées codant les récepteurs des lymphocytes. L'étude de la région hypervariable CDR3 nécessite de combiner plusieurs couples d'amorces pour augmenter la sensibilité de la PARR.

Exemple:

- ❖ Gentilini et al., 2009 ont obtenu une sensibilité de détection de clonalité de 100% pour les lymphomes B en combinant cinq couples d'amorces spécifiques des gènes IgH. Utilisés individuellement, la sensibilité de la PARR n'excède pas 87% (cf. Tableau 14).

Tableau 14. Sensibilité de la PARR pour la détection de la clonalité des lymphomes B canins en fonction du couple d'amorces utilisé.

Couple d'amorces spécifique des gènes IgH	Sensibilité (pour 61 lymphomes B testés)
Combinaison des cinq couples d'amorces	100%
IgH major	87%
IgH minor	0% (2 lymphomes)
Tamura	39,6 %
3'FWR1	80%
5'FWR1	82%

Afin d'améliorer la sensibilité de la PARR, il est également possible d'adapter les amorces utilisées au type de lymphome suspecté, voire de mettre au point des amorces spécifiques d'une tumeur.

Exemple:

- ❖ Yamazaki et al., 2008 a mis au point des amorces spécifiques d'une lignée cellulaire dérivée d'un lymphome T canin. A partir de ces amorces, il fut possible de détecter

la clonalité de cellules néoplasiques représentant 0,01% des cellules présentes dans l'échantillon analysé.

II.2.2.2. Nature du lymphome

La nature des lymphomes testés est également source de variabilité de sensibilité de la PARR.

Exemples:

- ❖ Chaubert et al., 2010 ont pu détecter une clonalité des lymphocytes dans 85% des 34 lymphomes T étudiés. Cette sensibilité est variable selon le type de lymphome T. En effet, elle est de 97% pour les lymphomes T cutanés et 71% pour les lymphomes T non-cutanés. Cette différence de sensibilité est à rapprocher du fait que les amorces utilisées ont été mises au point en analysant les profils de réarrangements de 12 lymphomes T cutanés épithéliotropes et seulement 2 lymphomes T non cutanés.
- ❖ La sensibilité de détection de clonalité des lymphomes B indolents varie entre 80% et 100% selon le sous-type histologique dans l'étude de Valli et al., 2006.
- ❖ Fukushima et al., 2009, obtiennent une sensibilité de 66,7% pour les lymphomes alimentaires avec le protocole de Burnett et al., 2003 qui obtiennent une sensibilité de 91% pour un panel de lymphomes plus diversifié.

II.2.2.3. Nature du prélèvement

La technique permet de détecter la clonalité des cellules néoplasiques lorsque celles-ci représentent de 0,1 à 10% de la population cellulaire selon la nature du tissu prélevé (0,1% pour le foie, 1% pour la rate et les noeuds lymphatiques, 10% pour le thymus) (Burnett et al., 2003). La sensibilité dépend donc de la nature tissulaire du prélèvement étudié. De même, la qualité du prélèvement caractérisée par la représentativité de la tumeur, la quantité de cellules néoplasiques absolues et relatives par rapport aux cellules inflammatoires influencent les résultats de la PARR.

Exemple:

- ❖ La sensibilité de la PARR observée dans l'étude de Burnett et al., 2003 (91%) à partir d'échantillons tissulaires variés (sang, moelle osseuse, liquides d'épanchement, cytoponction d'organes internes) est supérieure à celle obtenue avec le même protocole dans l'étude de Thalheim et al., 2013 (74%) à partir de prélèvements de noeuds lymphatiques.
- ❖ L'utilisation d'amorces spécifiques d'une tumeur permet d'obtenir une sensibilité de la PARR proche de 100% à partir d'un échantillon correspondant à cette tumeur (cf. II.1.4.3; Yamazaki et al., 2008). Cependant, ce cas particulier ne reflète pas la sensibilité de la technique en situation de diagnostic.

II.2.2.4. Mode conservation des prélèvements

Il existe plusieurs mode de conservation des prélèvements avant que ceux-ci ne soient évalués. Certains ne nécessitent aucun traitement conservateur et sont rapidement testés, à l'état frais. D'autres sont conservés le temps de leur acheminement jusqu'au laboratoire d'analyse ou à plus long terme dans les laboratoires de recherche. Les techniques les plus couramment utilisées sont la fixation dans le formaldéhyde, l'inclusion en paraffine, la réfrigération ou la congélation pour les pièces histologiques, la fixation sur lame colorée ou la réfrigération pour les prélèvements liquidiens et cytologiques. Ces techniques influencent la sensibilité de la PARR.

Exemples:

- ❖ En médecine humaine, Bagg et al., 2002, reportent une impossibilité de réaliser une PARR à partir de 43,1% des échantillons FFPE du fait d'une dégradation de l'ADN pour 2,8% seulement des échantillons frais ou réfrigérés. Cependant, dans cette étude, les techniques de réalisation des FFPE ainsi que le durée de conservation n'ont pu être contrôlées.
- ❖ Kaneko et al., 2009 (1) ont mis en relation le temps de fixation dans le formaldéhyde des tissus et la sensibilité de la PARR (amplification à partir du couple d'amorces contrôle positif). Il est ainsi conseillé de ne pas excéder une semaine de fixation, aucune amplification n'étant obtenue après quatre semaines de fixation.
- ❖ Gentilini et al., 2009 ont comparé leurs résultats en fonction du mode de conservation de leurs échantillons. Il s'est avéré que la sensibilité des PARR réalisées à partir de prélèvements de biopsie et de cytoponction congelés (93,2%) était plus élevée que celle des PARR réalisées à partir de lames cytologiques colorées (75,1%).

II.2.2.5. Chimiothérapie en cours

Les protocoles de chimiothérapie en place visent à éliminer toutes les cellules néoplasiques dans le but d'une rémission complète. En cours ou fin de traitement, le nombre de cellules néoplasiques est susceptible de passer en dessous du seuil de détection de la PARR. Il est possible d'abaisser ce seuil de détection grâce à l'élaboration d'amorces spécifiques de la tumeur étudiée et en cours de traitement (Yagihara et al., 2008) (cf. II.3.4).

II.2.2.6. Paramètres des cycles de PCR

Les paramètres intrinsèques à la PCR, tels que les températures d'hybridation ou la durée des cycles, doivent être adaptés aux couples d'amorces utilisés et à la nature des échantillons analysés, afin d'obtenir une sensibilité optimale.

Il n'est pas possible d'utiliser simultanément des amorces de températures d'hybridation trop éloignées dans une même réaction. En effet, il serait impossible de déterminer une température commune permettant aux deux amorces de se fixer optimalement aux séquences

complémentaires de la molécule d'ADN à analyser. La sensibilité de la PARR s'en trouverait alors largement affectée.

Exemple:

- ❖ Gentilini et al., 2009 ont adapté les paramètres de la PCR pour chacun des différents couples d'amorces utilisés dans l'étude (cf. Tableau 15).

Tableau 15. Paramètres et cycles de la PARR adaptés au couples d'amorces (Gentilini et al., 2009)

Primer set	Cycling conditions
Cp	95 °C × 3 min – 40× (95 °C × 30 s – 58 °C × 30 s – 72 °C × 30 s) 72 °C × 30 min
CB major	95 °C × 3 min – 40× (95 °C × 30 s – 58 °C × 20 s – 72 °C × 20 s) 72 °C × 30 min
CB minor	95 °C × 3 min – 40× (95 °C × 30 s – 58 °C × 20 s – 72 °C × 20 s) 72 °C × 30 min
TCR	95 °C × 3 min – 40× (95 °C × 30 s – 58 °C × 20 s – 72 °C × 20 s) 72 °C × 30 min
Tamura	95 °C × 3 min – 40× (95 °C × 30 s – 56 °C × 20 s – 72 °C × 20 s) 72 °C × 30 min
5' FWRI	95 °C × 3 min [10× (94 °C × 30 s – 65 °C – 0.5 °C × 20 s – 72 °C × 20 s)] [30× (95 °C × 30 s – 58 °C × 30 s – 72 °C × 30 s)] 72 °C × 30 min
3' FWRI	95 °C × 3 min [10× (94 °C × 30 s – 65 °C – 0.5 °C × 20 s – 72 °C × 20 s)] [30× (95 °C × 30 s – 58 °C × 30 s – 72 °C × 30 s)] 72 °C × 30 min
FWRI_co	95 °C × 3 min [10× (94 °C × 30 s – 65 °C – 0.5 °C × 20 s – 72 °C × 20 s)] [30× (95 °C × 30 s – 58 °C × 30 s – 72 °C × 30 s)] 72 °C × 30 min
FWRI_ci	95 °C × 3 min [10× (94 °C × 30 s – 65 °C – 0.5 °C × 20 s – 72 °C × 20 s)] [30× (95 °C × 30 s – 58 °C × 30 s – 72 °C × 30 s)] 72 °C × 30 min
β-Actin	94 °C × 3 min – 40× (94 °C × 20 s – 58 °C × 25 s – 72 °C × 25 s) 72 °C × 5 min

II.2.2.7. Technique de séparation des produits de PCR

La spécificité de la PARR dépend fortement de la résolution de la technique de séparation des produits de PCR. Une résolution trop faible augmente le risque de confondre 2 bandes normalement distinctes et proches en terme de paires de base. Cette confusion mène alors à la détection de faux-positifs. (Avery et al., 2012). Les techniques de séparation des produits de PCR les plus couramment utilisées sont l'électrophorèse sur gels d'agarose ou de polyacrylamide et l'électrophorèse capillaire. La littérature classe les sensibilités de ces techniques ainsi:

capillaire > gel de polyacrylamide > gel d'agarose

Exemple:

- ❖ La PARR initialement mise au point par Chaubert et al. 2010 était basée sur l'analyse des produits de PCR par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Le pouvoir discriminant de cette technique s'est avéré insuffisant pour séparer les fragments d'ADN compris entre 57 et 89 bp spécifiques des amorces utilisées. Un second gel de polyacrylamide 20% est alors utilisé avec une résolution satisfaisante.

Associées à l'électrophorèse sur gel, l'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins (SSCP) et l'analyse des hétéroduplex (SCGE) permettent d'augmenter le pouvoir discriminant et la spécificité de la technique.

Exemple:

- ❖ Takanosu et al., 2010 sont passés d'une spécificité de 0% à 96% grâce à l'analyse des hétéroduplex à partir de 30 biopsies intestinales dont 4 étaient des lymphomes.

II.2.2.8. Laboratoire

Outre les facteurs de variabilité imputables aux propriétés des échantillons testés et aux paramètres de la PCR, les caractéristiques et pratiques propres à chaque laboratoire sont à l'origine d'une variabilité dans les résultats de la PARR. Il s'agit de conditions atmosphériques du laboratoire, du matériel technique à disposition, des conditions de stockage du matériel biologique, des techniques d'extraction de l'ADN des échantillons, de l'expérience des manipulateurs, etc. (Avery et al., 2012).

II.3. Intérêts et applications de la PARR

En médecine humaine, la détection de la clonalité lymphocytaire est généralement réalisée afin de distinguer un processus néoplasique d'un processus hyperplasique, de détecter une maladie résiduelle minimale après chimiothérapie, de détecter des cellules tumorales circulantes dans le système sanguin périphérique (Langerak, 2001; Van Belzen, 1997). Il en est de même en médecine vétérinaire à quelques exceptions près.

II.3.1. Diagnostic différentiel Hyperplasie inflammatoire/ Lymphome

L'intérêt premier de la PARR est de fournir un outil biomoléculaire objectif et sensible capable de différencier une lymphoprolifération néoplasique d'une lymphoprolifération réactive par la mise en évidence de la clonalité des lymphocytes par l'étude des réarrangements des gènes codant les récepteurs de ces cellules.

Dans la majorité des cas, cette différenciation est possible par une analyse morphologique simple au microscope des lymphocytes. Il existe cependant des situations pour lesquelles certains lymphomes sont histologiquement et/ou cytologiquement indiscernables des hyperplasies inflammatoires. La PARR représente alors une alternative diagnostique intéressante de par sa sensibilité et sa spécificité (Avery et al, 2012).

Exemple:

- ❖ Le lymphome indolent est un lymphome évoluant à bas-bruit sur plusieurs années et non curable. Il s'agit des lymphomes B de la zone marginale, du manteau ou folliculaires, et des lymphomes T de la zone T. Ces tumeurs peuvent être difficiles à diagnostiquer par histologie du fait du maintien de la structure folliculaire et de la confusion avec un noeud lymphatique hyperplasique. De même, la cytométrie de flux est généralement peu concluante. Les lymphomes indolents sont sous-diagnostiqués et la PARR constitue un excellent outil biomoléculaire pour les détecter (Valli et al, 2006).
- ❖ La différenciation histologique entre un lymphome intestinal et une maladie inflammatoire chronique intestinale est difficile, particulièrement chez le chat. La PARR, associée à l'histologie et l'immunohistologie, permet le diagnostic de 82,6% des lymphomes intestinaux félines pour 78,2% avec l'association de

l'histologie et de l'immunohistologie et 72,1% avec l'histologie seule (Kiupel et al., 2011).

II.3.2. Immunophénotypage

Les amorces utilisées lors d'une PARR sont spécifiques des gènes codant les immunoglobulines des lymphocytes B ou des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes T. Ainsi, en déterminant le couple d'amorces à l'origine d'une amplification clonale, il est possible de déterminer l'immunophénotype du lymphome.

La caractérisation et la documentation de l'immunophénotypage est une première étape nécessaire au développement de corrélations clinico-pathologiques. Elle permet par la suite de fournir un diagnostic plus précis et des informations utiles quant au pronostic (cf. II.3.7) (Vernau et al., 1999). En effet, la majorité des études s'accordent pour considérer l'immunophénotypage comme un élément pronostique objectif majeur des lymphomes canins. Les chiens atteints de lymphome T ont en effet des durées de rémission et un taux de survie inférieurs aux chiens atteints de lymphome B (cf. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Greenlee et al., 1990; Kiupel et al., 1999; Ponce et al., 2004; Williams et al., 2008).

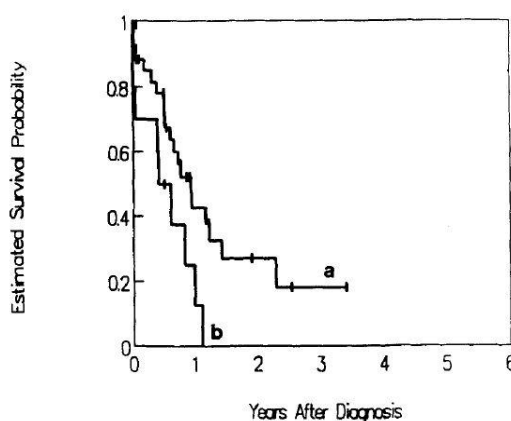


Figure 37. Courbe de survie des chiens atteints de lymphome B (a) et de lymphome T (b) (Greenlee et al., 1990).

Le taux de survie à 14 mois après le diagnostic est de 45% pour les chiens atteints de lymphome B et de 0% pour les chiens atteints de lymphome T.

Différencier un lymphome B d'un lymphome T n'est cependant pas suffisant pour fournir un pronostic précis. En effet, chacun des sous-types de lymphome est caractérisé par un pronostic, des médianes de survie et des durées moyennes de rémission différents. Certains sous-types tels que le lymphome B de type Burkitt, très agressif et dont la médiane de survie est de 15 jours, ne correspondent pas à la dichotomie précédemment énoncée (Ponce et al., 2004).

Bien que la PARR puisse donner une indication pronostique significativement valable par immunophénotypage, une analyse histologique ou une cytométrie en flux est nécessaire pour sous-typier les lymphomes et préférable pour préciser le pronostic.

A la faveur d'un sondage organisé par la Veterinary Cancer Society auprès des vétérinaires oncologistes présents à la conférence de 2009, 76% ont déclaré qu'ils recherchaient

systématiquement l'immunophénotype du lymphome une fois celui-ci diagnostiqué. 31% des cliniciens affirment par la suite adapter le traitement en fonction des résultats (Thalheim et al., 2013). Cependant, pour ce dernier point, il est préférable d'avoir des informations complémentaires sur le sous-type du lymphome. Ces informations ne sont pas accessibles par PARR et une analyse histologique ou une cytométrie en flux sont alors nécessaires.

II.3.3. Haute sensibilité sur une faible quantité de matériel en provenance de tissus de nature variée

Le seuil de détection de la PARR est très faible. La PARR conventionnelle détecte une clonalité à partir d'échantillons dans lesquels les cellules néoplasiques représentent 0,1 à 10% de la population cellulaire selon la nature du tissu prélevé (0,1% pour le foie, 1% pour la rate et les noeuds lymphatiques, 10% pour le thymus; cf. Figure 38) (Burnett et al., 2003). Ce seuil de détection atteint les 0,01% avec des couples d'amorces spécifiques de la tumeur évaluée ou avec la PARR en temps réel (Yamazaki et al., 2008). La PARR est donc réalisable à partir d'une faible quantité de matériel en provenance de tissus de nature variée. Ceci lui permet de s'affranchir des facteurs limitants habituels suivants:

- Localisation du lymphome
- Stade du lymphome
- Nature et qualité du prélèvement

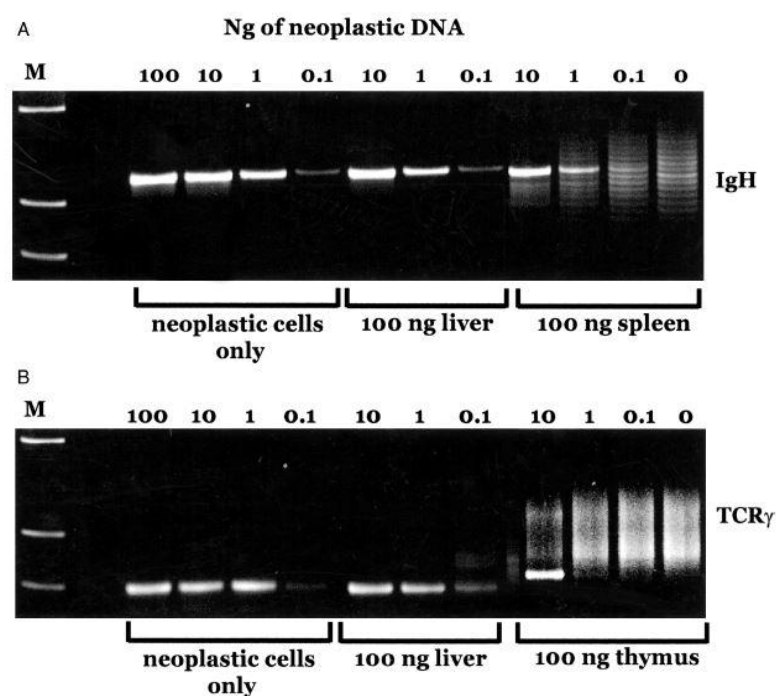


Figure 38. Etablissement d'un seuil de détection de la PARR à partir d'échantillons dilués (Burnett et al., 2003).

(A): PARR avec le couple d'amorces IgH major; (B): PARR avec le couple d'amorces TCR γ ; (M): marqueur de taille. De l'ADN extrait de cellules lymphocytaires néoplasiques est dilué avec un facteur 10 (de 100 ng à 0,1 ng) dans du sérum physiologique, dans 100 ng de foie et dans 100 ng de thymus.

Une clonalité est détectée lorsque les cellules néoplasiques représentent jusqu'à 0,1% de la population cellulaire dans un environnement hépatique et 10% dans un environnement thymique.

II.3.3.1. Localisation du lymphome

Les lymphomes localisés dans les structures lymphoïdes (noeuds lymphatiques, thymus, MALT, etc) sont parfois difficilement détectables, quelque soit la technique de biologie moléculaire utilisée. Ceci est imputable à la présence en très grand nombre de lymphocytes matures polyclonaux dans ces organes. Cette répartition polyclonale est également observable en cas de réaction inflammatoire concomitante voire consécutive au lymphome. Bien que diminuée, la sensibilité obtenue avec la PARR est néanmoins largement supérieure à celle des autres techniques de biologie dont la cytométrie en flux (Joetzke et al., 2012).

Exemple:

- ❖ Du fait d'une accumulation de nombreuses cellules lymphocytaires immunocompétentes dans la muqueuse intestinale (GALT), les biopsies intestinales fournissent souvent de faux-positifs, quelle que soit la technique de phénotypage utilisée. La PARR associée à une analyse des hétéroduplex permet quant à elle, de détecter la clonalité des lymphocytes néoplasiques avec une plus grande spécificité (Takanosu et al., 2010).

II.3.3.2. Stade du lymphome

En début d'évolution, la quantité de lymphocytes néoplasiques, les remaniements histologiques sont parfois peu prononcés et indétectables autrement que par la PARR. Il en est de même en phase de rémission (cf. II.3.4).

Exemple:

- ❖ En médecine vétérinaire, il est difficile de distinguer les infiltrats lymphocytaires néoplasiques cutanés des infiltrats réactionnels. En effet, le stade précoce d'un lymphome T épithéliotrope (ou mycosis fongoïde) mime, cytologiquement et histologiquement, les dermatoses inflammatoires. La PARR, avec une sensibilité de 95% pour les lymphomes T épithéliotropes, est tout à fait indiquée dans ce cas de figure. D'autant plus que le diagnostic précoce de ce type de lymphome présente un grand intérêt, le mycosis fongoïde pouvant rapidement évoluer en sa forme agressive (Chaubert et al., 2010).

II.3.3.3. Nature et qualité du prélèvement

La PARR peut se réaliser à partir de tous types de prélèvement (Burnett et al., 2003):

- Prélèvements biopsiés d'organes ou ostéo-médullaires (incluant les prélèvements peu représentatifs de la lésion).
- Prélèvements cytologiques d'organes, de fluides cavitaires, de moelle osseuse ou de sang.

L'immunocytochimie ou l'immunohistochimie, quant à elles, requièrent la biopsie des noeuds lymphatiques. C'est une technique plus invasive, plus coûteuse que la cytoponction qui implique la sédation ou l'anesthésie de l'animal (Thalheim et al., 2013).

De plus, la PARR est réalisable à partir de cellules vivantes ou mortes contrairement à la cytométrie en flux qui ne peut se réaliser qu'à partir de cellules vivantes, conservées en milieu salin.

II.3.4. Dépistage précoce chez des individus cliniquement sains à risque

La sensibilité de la PARR permet de détecter des cellules lymphocytaires néoplasiques présentes en très faible quantité, de l'ordre d'1 cellule néoplasique sur 100 avec la PARR conventionnelle (Keller et al., 2004; Lana et al., 2006(1)) et d'1 cellule néoplasique sur 10 000 avec la PARR en temps réel (Yamazaki et al., 2008). On peut alors envisager de pouvoir détecter ces cellules lors de stades précoces de lymphome avant même l'apparition de signes cliniques. Cela permettrait de mettre en place un traitement précoce et d'en augmenter son efficacité.

La prévalence du lymphome canin ne justifie pas les investissements financiers et techniques que représenteraient des dépistages appliqués à l'ensemble de la population canine. Cependant, il est possible de cibler des populations à risque. Ainsi, Zucca et al., 1998 ont mis en évidence des lymphocytes clonaux dans des prélèvements de muqueuse gastrique de deux hommes souffrant d'une gastrite à *Helicobacter pylori*. Ces patients ont par la suite développé un lymphome MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissue). La PARR permettrait donc d'anticiper l'apparition des signes histologiques et cliniques. Ceci a d'autant plus d'importance que dans le cas des lymphomes MALT consécutifs à une gastrite à *Helicobacter pylori*, la suppression du stimulus antigénique provoqué par la bactérie à un stade précoce de la prolifération clonale de lymphocytes B pourrait suffire pour stopper le processus malin avant qu'il ne devienne irréversible. Un lien entre des conditions immunosuppressives et le développement de lymphomes a également été rapporté, suite à une transplantation d'organe ou une infection par le virus *Epstein-Barr* chez l'homme et plus récemment chez le chien (Levine, 1994; Milman et al., 2011), une maladie à médiation immune (ex: thrombopénie à médiation immune) chez le chien (Keller, 1992) ou une infection par le FeLV ou le FIV chez le chat (Macy, 2013).

La PARR offre donc un outil de dépistage des lymphomes applicable chez les individus à risque.

II.3.5. Détection de la maladie résiduelle minimale et suivi thérapeutique

Les progrès thérapeutiques effectués ces dernières années et le développement de polychimiothérapies permettent aujourd'hui une rémission clinique complète dans 58% à 96% des cas. Cependant, la majorité des chiens atteints de lymphome meurt des conséquences du lymphome échappant au traitement ou d'une rechute. Des cellules tumorales résiduelles

échappant au traitement seraient à l'origine des rechutes après une rémission, alors seulement clinique (Pott et al., 2006). Ces cellules, persistantes après chimiothérapie, sont appelées maladie résiduelle minimale (MRD: Minimal Residual Disease) et sont souvent non détectables par les techniques diagnostiques standard telles que l'hématologie, l'histologie, la cytologie ou la cytométrie en flux (Yamazaki et al., 2008). La PARR qualitative a permis de détecter les MRD dans le sang périphérique ou des prélèvements de moelle osseuse à partir des années 1980 en médecine humaine (Campana et al., 1995). La PARR en temps réel permet, quant à elle, de quantifier et de suivre l'évolution de la MRD en médecine humaine (Mandigers et al., 2001) et vétérinaire (Yamazaki et al., 2008). La sensibilité de cette technique est telle que la présence d'1 cellule néoplasique parmi 10 000 cellules saines dans l'échantillon testé suffit pour établir un diagnostic de lymphome (Yamazaki et al., 2008). C'est 100 fois supérieur aux seuils de détection obtenus dans les études canines précédentes (Keller et al., 2004; Lana et al., 2006(1)). Ces résultats n'ont été possibles qu'avec la mise au point de couples d'amorces spécifiques du lymphome étudié.

La détection de la MRD présente de nombreux intérêts cliniques, pronostiques, thérapeutiques et offre de nouvelles perspectives en recherche.

II.3.5.1. Reprise anticipée de la chimiothérapie et prévention de la rechute clinique

Une augmentation de la maladie résiduelle minimale est le signe précurseur d'une rechute. La décision de la reprise ou de la mise en place d'une nouvelle chimiothérapie basée sur l'évaluation de la maladie résiduelle minimale avant l'apparition des signes cliniques améliore les chances de succès thérapeutique et le pronostic (Mandigers et al., 2001).

II.3.5.2. Comparaison avec des signes cliniques évocateurs de rechute clinique

Certains signes cliniques ont été comparés avec l'évolution de la MRD dans le but d'en faire des éléments pronostiques. Il se trouve que l'évolution du volume des noeuds lymphatiques périphériques correspond à l'évolution de la MRD à des stades précis tels que l'induction de la rémission, son maintien, la rechute puis la progression néoplasique. Cependant, un décalage temporel existe et il est parfois difficile d'évaluer une légère hypertrophie de noeud lymphatique en début de rechute (cf. Figure 39) (Yamazaki et al., 2008).

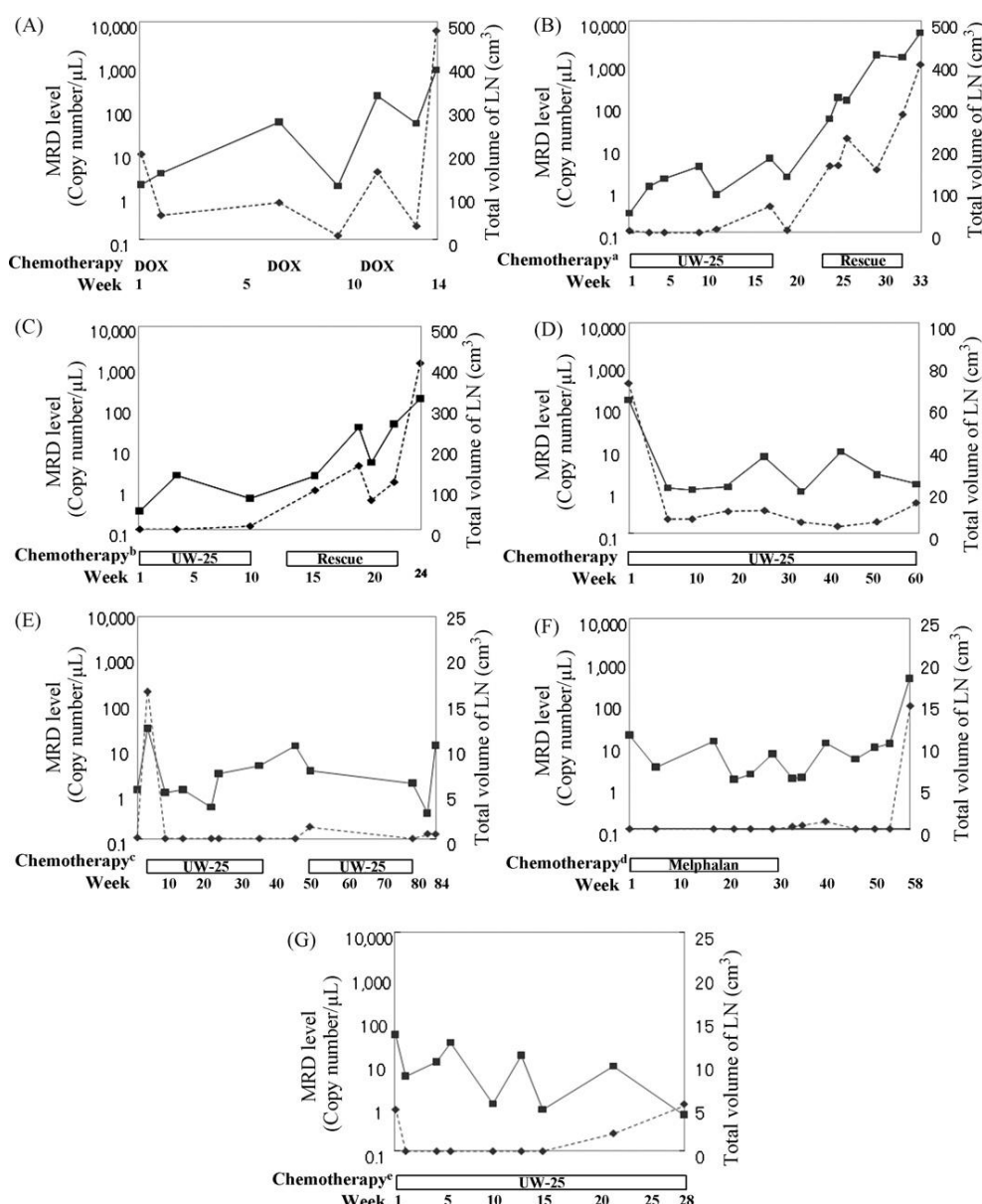


Figure 39. Suivi de l'évolution du niveau de MRD (en nombre de produit amplifié/ μ L) et du volume des noeuds lymphatiques (en cm^3) sur plusieurs semaines chez 7 chiens atteints de lymphome et sous chimiothérapie (marqués de A à G)(Yamazaki et al., 2008).

Les protocoles de chimiothérapie sont les suivants: (DOX): doxorubicine; (UW-25): protocole de chimiothérapie établi par l'Université du Wisconsin à base de cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisolone; (Melphalan): melphalan après les 3 premières semaines du UW-25; (Rescue): traitement de secours en cas de rechute à base de lomustine, dacarbazine, cytarabine, L-asparaginase et melphalan. Quel que soit le cas, le stade du lymphome, le protocole de chimiothérapie, une MRD est toujours détectable. A l'exception du cas (E), il y a augmentation de la MRD à plus ou moins long-terme. L'évolution du volume des noeuds lymphatiques est généralement en corrélation avec l'évolution de la MRD mais des décalages et des divergences existent.

II.3.5.3. Etude de l'efficacité des traitements

La PARR en temps réel permet d'évaluer et de remettre en cause les protocoles de chimiothérapie mis en place. Malgré l'efficacité clinique du protocole cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisolone sur les lymphomes canins, aucun des cas intégrés à l'étude de Yamazaki et al., 2008 ne présentaient de rémission moléculaire (cf. Figure 39). L'efficacité de ce protocole de chimiothérapie est donc remise en cause et de nouveaux protocoles sont depuis en cours d'élaboration en médecine vétérinaire. A l'inverse, la technique de biologie moléculaire permet de valider certains protocoles. Ainsi, un nombre considérable de patients atteints de lymphome du manteau et traités avec le protocole de chimiothérapie sus-cité, associé à de la radiothérapie et une transplantation de cellules souches autologues présente une rémission moléculaire en médecine humaine (Provan et al., 1996; Pott et al., 2006).

II.3.5.4. Développement de chimiothérapie MRD-guidée

Le suivi de la MRD permet d'établir des protocoles de chimiothérapie adaptés à l'individu. Il s'agit de la chimiothérapie MRD-guidée. L'évolution des lymphomes canins étant plus rapide que chez l'homme, ceux-ci représentent un modèle d'étude convoité pour le développement de chimiothérapie MRD-guidée en médecine humaine (Yamazaki et al., 2008), pour les types homologues aux lymphomes de l'homme.

II.3.5.5. Facteur pronostique

Si la détection de MRD permet d'exclure la guérison et représente un mauvais pronostic, son absence ne permet pas de conclure à une guérison complète (Van der Velden, 2002).

Tout comme la quantification des cellules néoplasiques avant la chimiothérapie, la quantification de la MRD n'a aucune valeur prédictive sur la réponse au traitement ni sur une possible rémission clinique ou totale (Mandigers et al., 2001; Van Oers et al., 2010).

II.3.5.6. Evaluation du matériel de transplantation

La détection de MRD est d'une grande utilité afin évaluer l'absence de lymphocytes néoplasiques dans le matériel de transplantation avant xénogreffe et surtout autogreffe de moelle osseuse (Frimberger et al., 2006).

II.3.5.7. Compréhension de la cinétique de propagation et de régression tumorales

Le suivi de la MRD et sa quantification sont des outils potentiellement exploitables pour la compréhension des mécanismes moléculaires et le comportement biologique des tumeurs (Tsai et al., 2012).

II.3.6. Evolution d'un lymphome et mise en relation de lymphomes successifs

Chez l'homme, le développement d'un processus néoplasique lymphopoïétique secondaire à un lymphome pré-existant n'est pas rare. Ainsi, des lymphomes B à grandes cellules se développent à partir de 10% des cas d'un lymphome splénique de la zone marginale, d'évolution initialement indolente. Dans la majorité des cas, les lymphomes secondaires sont de plus haut grade de malignité.

La PARR permet de répondre à la question suivante: le second processus néoplasique dérive-t'il du même clone que le premier ou s'agit-il d'une nouvelle formation clonale? Dans le premier cas, les gènes clonaux des deux tumeurs seront réarrangés de la même façon et auront des séquences identiques. Dans le second cas, les gènes clonaux des deux tumeurs seront différemment réarrangés (Avery, 2012).

Burnett et al., 2004 ont mis en relation un lymphome B multicentrique et un myélome secondaire apparu lors de la phase de rémission du lymphome chez un labrador. Des amorces spécifiques du premier clone ont été créées et utilisées pour amplifier l'ADN d'échantillons prélevés à partir du myélome. L'obtention de produits de PCR permet de conclure que le second processus néoplasique dérive du premier malgré une présentation phénotypique différente. S'il n'est pas possible de créer ces amorces spécifiques de la tumeur initiale, il est possible d'estimer la taille des produits de PCR en provenance des deux lymphomes à l'aide des marqueurs de taille. S'il s'agit du même clone, la taille des produits sera identique (Gentilini et al., 2009). Cette méthode est tout de même moins précise que la première.

A l'inverse, Okawa et al., 2011 rapporte un cas de lymphome B de haut grade concomitant mais consécutif à une leucémie lymphoïde chronique à cellule T chez un labrador. La PARR a mis en évidence les deux immunophénotypes.

L'intérêt d'établir une relation entre deux processus néoplasiques consécutifs est d'adapter le traitement. Lorsqu'une relation est avérée, la seconde néoplasie pourrait être la conséquence d'une sélection chimiothérapie-résistante. Il est alors nécessaire de modifier la thérapie mise en place. (Burnett et al., 2004). Dans le cas de deux néoplasies indépendantes et concomitantes, des anomalies génétiques ou épigénétiques, une instabilité microsatellitaire, une infection virale pro-néoplasique ou une exposition à des facteurs environnementaux cancérigènes doivent être suspectées (Okawa et al., 2011).

II.3.7. Intérêt pronostique

II.3.7.1. Détection du lymphome

La détection de lymphocytes clonaux dans une lésion représente un facteur de mauvais pronostic. Kaneko et al., 2009 ont comparé les temps de survie de 51 chiens atteints d'une entérite. Parmi eux, 6 présentaient des réarrangements clonaux des lymphocytes T au sein de prélèvements intestinaux réalisés par endoscopie, dont 2 étaient atteints d'un lymphome diagnostiqué par histologie. La durée de survie moyenne des chiens pour lesquels des

réarrangements clonaux des lymphocytes T ont été détectés par PARR est significativement plus courte ($p < 0,0001$) (cf. Figure 40). Ceci confirme le fait que la détection de lymphocytes clonaux par PARR est un facteur de mauvais pronostic, de surcroît plus fiable que l'histopathologie.

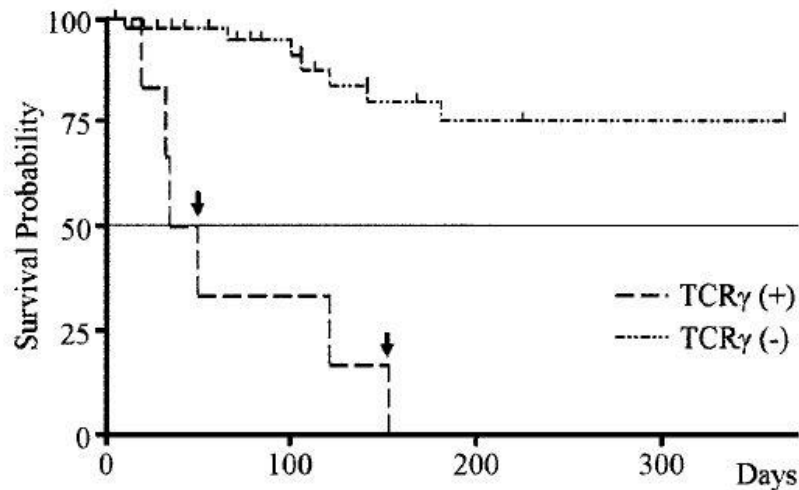


Figure 40. Courbe de survie des chiens atteints d'une entérite avec des réarrangements clonaux des lymphocytes T (n=6) ou sans réarrangements clonaux des lymphocytes T (n=45). (Kaneko et al., 2009 (2))

(TCRγ(+)): chiens pour lesquels des réarrangements clonaux des lymphocytes T ont été détectés par PARR; (TCRγ(-)): chiens pour lesquels aucun réarrangement clonal des lymphocytes T n'a été détecté par PARR; (flèches): temps de survie des deux lymphomes confirmés histologiquement. La durée de survie moyenne des chiens pour lesquels des réarrangements clonaux des lymphocytes T ont été détectés par PARR est significativement plus courte ($p < 0,0001$).

II.3.7.2. Quantité de cellules néoplasiques circulantes

Les avis divergent quant à la valeur pronostique de la quantification absolue des cellules néoplasiques circulantes avant chimiothérapie ou de la MRD. Certaines études s'accordent sur le fait que le nombre absolu de ces cellules ne reflète pas l'activité de la tumeur et n'a aucune valeur pronostique sur la réponse au traitement ni sur la survie (Mandigers et al., 2001; Van Oers et al., 2010). Néanmoins, Williams et al., 2008 ont établi une corrélation entre le nombre de cellules lymphocytaires T détectées par la cytométrie en flux au moment du diagnostic et le taux de survie chez le chien (cf. Figure 41). Leurs résultats confirment la tendance observée en médecine humaine grâce à la PARR en temps réel (RQ-PARR) (Van der Velden et al., 2003; Pott et al., 2006).

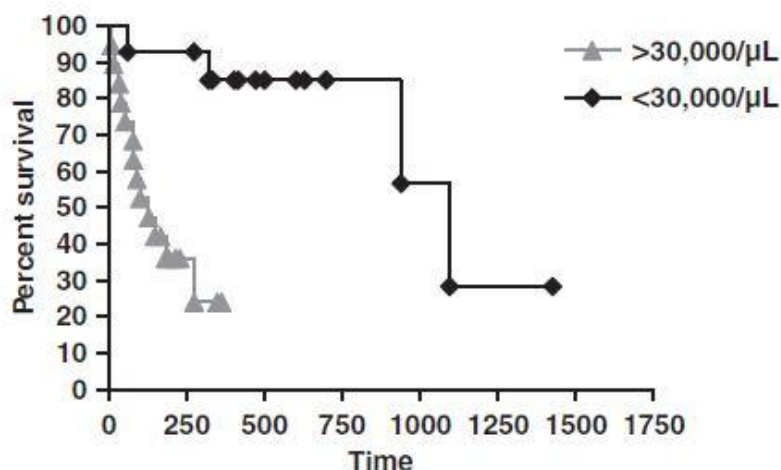


Figure 41. Courbe de survie chez les chiens atteints de lymphome T en fonction du nombre de lymphocytes T circulants détectés par la cytométrie en flux au moment du diagnostic (Williams et al., 2008). La médiane de survie pour les chiens dont le nombre de cellules T circulantes est inférieur à 30 000 cellules/ μ L (losange noir) est de 1098 jours et pour ceux dont le nombre est supérieur à 30 000 cellules/ μ L (triangle gris) est de 131 jours.

Toutes ces études s'accordent cependant sur l'intérêt pronostique majeur de l'analyse qualitative et relative du nombre de cellules néoplasiques. Schématiquement, une diminution du nombre de lymphocytes néoplasiques pendant la chimiothérapie indiquerait une réponse favorable au traitement tandis qu'une augmentation de la MRD serait un élément en faveur d'une rechute, de sombre pronostic.

II.3.7.3. Stade clinique du lymphome

Le bilan d'extension des lymphomes se base sur la classification WHO (cf. Tableau 5). Un stade clinique est ainsi assigné à un lymphome indépendamment des considérations histologiques et immunophénotypiques.

Dans de nombreuses études, le stade clinique du lymphome est considéré comme un facteur pronostique (Vail et al., 2013). Le stade 5, caractérisé par un envahissement de la moelle osseuse ou du système sanguin périphérique par les lymphocytes néoplasiques, est notamment un facteur pronostique sombre. La détermination de ce stade est classiquement basée sur la détection microscopique subjective de ces cellules néoplasiques. La PARR, dont la sensibilité de détection est supérieure, serait donc un outil plus objectif et discriminant pour déterminer les stades cliniques terminaux des lymphomes et établir un pronostic.

Chez l'homme, Mitterbauer-Hohendanner et al., 2004 a en effet démontré que la présence de lymphocytes B néoplasiques détectés par PARR dans le sang et/ou la moelle osseuse est associée à un plus faible taux de survie (le taux de survie à 5 ans est de 66% pour les PARR-négatifs et de 26% pour les PARR-positifs). Cette étude a également montré que la PARR était un outil plus précis que l'histologie pour déterminer le stade clinique d'un lymphome et y associer un pronostic (Mitterbauer-Hohendanner et al., 2004) (cf. Figure 42).

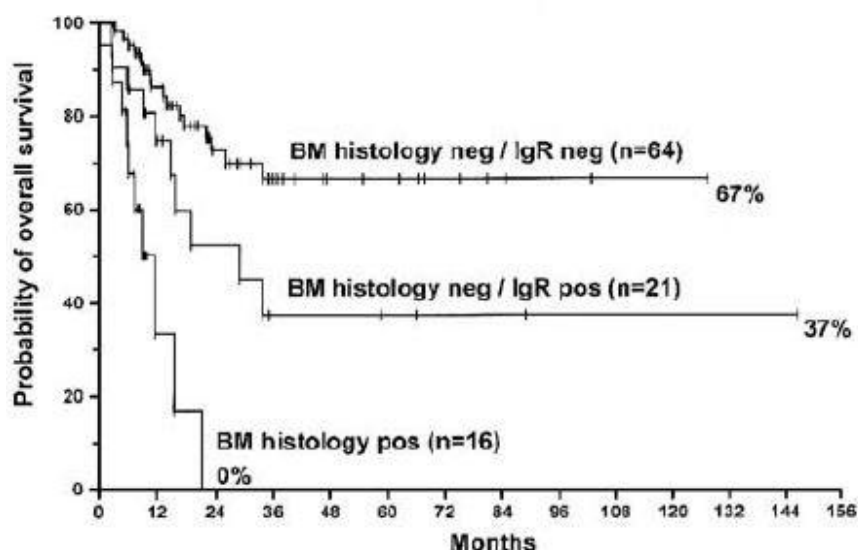


Figure 42. Courbe de survie des patients atteints de lymphome B selon les résultats histologiques et PARR de la moelle osseuse (Mitterbauer-Hohendanner et al., 2004).

BM: moelle osseuse; IgR: réarrangement clonal des gènes codant les immunoglobulines; neg: négatif; pos: positif. Le taux de survie des patients dont les résultats PARR et histologiques sont négatifs est de 67% à 5 ans. Le taux de survie des patients dont les résultats PARR et histologiques sont positifs est de 0% à 2 ans. Le taux de survie des patients dont les résultats PARR sont positifs et histologiques négatifs est de 37% à 5 ans. On peut donc en conclure que la détection des lymphocytes néoplasiques dans la moelle osseuse est un facteur pronostique d'une part, et que la PARR est une méthode plus précise que l'histologie classiquement utilisée pour établir un stade clinique d'autre part.

Chez le chien, les stades cliniques cytologiquement définis et la présence ou non de signes cliniques (sous-stade) sont fortement prédictifs de la survie de l'animal (Ponce et al., 2004; Vail et al., 2013). En revanche, ceci n'est plus valable si le stade 5 est déterminé par la PARR. En effet, la PARR détecte des lymphocytes néoplasiques circulants dans 76% des cas de lymphomes de stade classés cytologiquement 3 et 4. Leur présence, avec un tel seuil de détection, n'est pas un élément prédictif de la rémission clinique ni de la survie chez le chien (Lana et al., 2006(1)). Flory et al., en 2007, ont comparé différentes méthodes, autres que la PARR, pour évaluer le stade des lymphomes. Il s'est avéré, une nouvelle fois, que plus les examens effectués étaient développés et sensibles, plus le nombre de lymphomes classés dans les stades 4 et 5 sont nombreux (cf. Figure 43) et moins la classification WHO n'a de valeur pronostique.

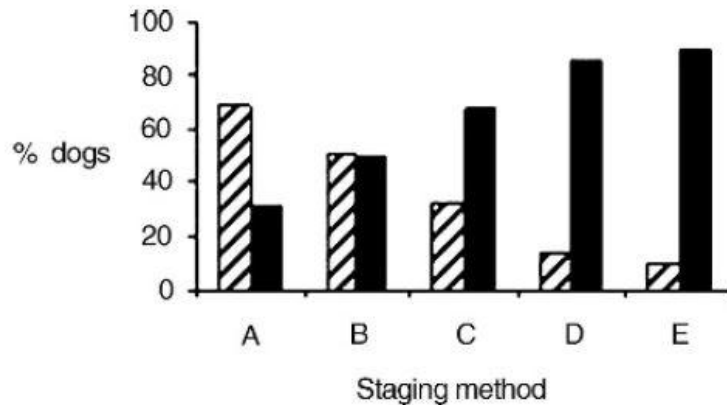


Figure 43. Proportion de chiens (n=59) atteints de lymphome de stade 1 à 3 (barres rayées) ou de stade 4 et 5 (barres noires) en fonction des examens ayant permis de déterminer ces stades (Flory et al., 2007).

(A): examen clinique et numération sanguine; (B): examen clinique, numération sanguine, radiographies abdominales et thoraciques; (C): examen clinique, numération et formule sanguines, radiographies abdominales et thoraciques; (D): examen clinique, numération et formule sanguines, radiographies thoraciques, échographie abdominale; (E): examen clinique, numération et formule sanguines, radiographies thoraciques, échographie abdominale, cytologie de moelle osseuse. La proportion de chiens dont le lymphome est évalué aux stades 4 ou 5 augmente avec la sensibilité des examens effectués. Flory et al., 2007 ont qualifié ce phénomène de migration statistique des stades.

En conclusion, chez l'homme, la mise en évidence de lymphocytes néoplasiques dans le sang ou la moelle osseuse, caractéristiques du stade 5 de la classification de WHO, est un facteur pronostique sombre (Van der Velden, 2003; Mitterbauer-Hohendanner et al., 2004). En revanche, chez le chien, la détermination des stades définis par l'Organisation Mondiale de la Santé n'a de valeur pronostique que si elle est basée sur l'examen clinique et l'analyse histologique (Ponce et al., 2004). La détection de lymphocytes néoplasiques dans le sang ou la moelle osseuse par PARR n'est pas adaptée à cette classification, la sensibilité étant trop importante (Ponce et al., 2004; Vail et al., 2013). Il serait néanmoins intéressant d'établir des valeurs seuil de détection afin d'intégrer la PARR à un système de classification plus sensible et adapté, comme cela a pu être fait avec la détection de lymphocytes néoplasiques par cytométrie en flux dans la moelle osseuse (Marconato et al., 2013).

II.3.7.4. Immunophénotypage

L'immunophénotypage établi par la PARR est considéré comme une valeur pronostique par de nombreuses études. Le recours à des techniques telles que l'histologie ou la cytométrie en flux est néanmoins nécessaire pour sous-typier les lymphomes et préférable pour préciser le pronostic (cf. II.3.2).

II.3.8. Outil de recherche

La PARR trouve un intérêt certain en recherche vétérinaire et l'essai de nouveaux protocoles thérapeutiques. L'efficacité d'un traitement peut être évaluée en effectuant un suivi de la MRD.

De plus, le suivi de la MRD et sa quantification sont des outils potentiellement exploitables pour la compréhension des mécanismes moléculaires responsables d'une mauvaise réponse ou d'un échappement au traitement (Tsai et al., 2012).

Bien que le comportement biologique de la plupart des tumeurs soit assimilable à ceux des néoplasies chez l'homme, les mécanismes moléculaires ne sont pas complètement élucidés. L'identification des séquences génomiques canines est un élément indispensable à la compréhension des mécanismes de régulation des cellules tumorales et l'identification des gènes impliqués dans la tumorigénèse. La PARR est une première étape indispensable au séquençage des gènes réarrangés des cellules néoplasiques (Tsai et al., 2012). Ainsi, grâce à l'analyse directe des séquences amplifiées des gènes codant le TCR γ des mycosis fungoides (lymphome T épithélioïde de stade précoce), il a été montré que les réarrangements ne s'opéraient qu'au sein de la région de jonction 4 (J4). Ceci suggère fortement un comportement biologique spécifique des lymphomes T cutanés primaires (Chaubert et al., 2010). Cette même étude a également permis d'identifier une nouvelle et septième région de jonction (J) fonctionnelle au sein des gènes codant les TCR γ , localisée en amont de J5.

II.4. Limites de la PARR

II.4.1. Information

La PARR est une méthode diagnostique des lymphomes basée sur l'étude des réarrangements des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes B et T. Ceci exclut donc la possibilité de diagnostiquer les lymphomes NK, rares chez le chien.

Bien que la PARR fournisse des informations sur l'immunophénotype de la néoplasie (B ou T), celles-ci ne sont généralement pas suffisantes pour classer le lymphome, fournir un pronostic précis ou adapter un traitement spécifique (cf. II.3.7).

II.4.2. Sensibilité

Malgré une meilleure connaissance des séquences du génome canin, aucun couple d'amorces permettant l'amplification de l'ensemble des réarrangements possibles n'a été identifié pour le moment. Malgré la possibilité d'associer plusieurs couples d'amorces, cela limite la sensibilité de la PARR (cf. II.1.4.4 et Tableau 16).

Tableau 16. Sensibilités comparées entre l'immunohistochimie (gold standard), la cytométrie en flux et la PARR (Thalheim et al., 2013)

		Cytométrie en flux				PARR			
		B	T	B et T	Ind.	B	T	B et T	Ind.
IHC	B (n=46)	42	1	2	1	31	1	1	13
	(100%)	(91%)	(2%)	(4%)	(2%)	(67%)	(2%)	(2%)	(28%)
	T (n=16)	0	16	0	0	0	12	1	3
	(100%)	(0%)	(100%)	(0%)	(0%)	(0%)	(75%)	(6%)	(19%)

(IHC): immunohistochimie; (B): lymphome B; (T): lymphome T; (B et T): lymphome B et T; (Ind.): indéterminé.

La PARR est moins sensible que l'immunohistochimie et la cytométrie en flux. Ces résultats sont cependant à moduler, les lymphomes inclus dans l'étude ne présentant pas de difficultés diagnostiques particulières par immunohistochimie (cf. II.3.1). Par ailleurs, il se peut que l'immunohistochimie, considérée comme la méthode diagnostique gold standard des lymphomes canins, donne lieu à des résultats erronés. Des expressions aberrantes de marqueurs de différenciation (CD) ont précédemment été décrits (Sangle et al., 2011).

II.4.3. Prix

La PARR est une technique faisant intervenir du matériel coûteux par rapport à l'histologie ou la cytologie, d'autant plus si la révélation des produits amplifiée est réalisée par électrophorèse capillaire. D'un point de vue individuel, le prix de l'analyse d'un échantillon est augmenté par rapport à une PCR standard du fait de la nécessité d'utiliser plusieurs couples d'amorces (Gentilini et al., 2009). Le laboratoire diagnostique vétérinaire de l'Université d'Etat du Colorado facture 115 dollars l'analyse de PARR en utilisant les 4 couples d'amorces mises au point par Burnett (CSU Dlab, 2011). Ce prix est supérieur à celui de l'histologie, la cytologie, et comparable à celui de la cytométrie de flux, l'immunohistologie et l'immunocytologie

II.4.4. Temps

La PARR est une méthode diagnostique nécessitant approximativement une journée pour extraire l'ADN des échantillons, 1h à 1h30 pour amplifier les fragments d'ADN et 1h30 à 2h30 pour l'électrophorèse. En cas de double contrôle comme il est réalisé au laboratoire diagnostique vétérinaire de l'Université d'Etat du Colorado, ces étapes sont répétées deux fois mais peuvent être simultanées. Il est donc possible d'obtenir un résultat diagnostique en deux jours. C'est plus rapide que l'histologie, l'immunohistologie et le Southern blot mais plus lent que la cytologie, l'immunocytologie et la cytométrie en flux.

II.5. Conclusion

La PARR, de par sa sensibilité et les informations fournies, n'est pas l'outil diagnostique de choix en première intention. Elle est néanmoins d'un intérêt majeur dans un certain nombre de situations (analyse histopathologique douteuse, stades précoces de lymphome, détection de MRD, analyse de liquide d'épanchement, etc). Le laboratoire diagnostique vétérinaire de l'Université d'Etat du Colorado a établi un algorithme décisionnel permettant d'orienter le choix de l'analyse la plus appropriée (cf. Tableau 17).

Tableau 17. Choix du test diagnostique du lymphome en fonction des anomalies détectées et des résultats histologiques et cytologiques (CSU Dlab, 2011)

Anomalie détectée	Nature de l'échantillon	Histologie/Cytologie	Analyse appropriée
Lymphocytose	Sang périphérique	Petits lymphocytes matures	Cytométrie en flux
Lymphocytose	Sang périphérique	Lymphoblastes / Lymphocytes immatures	Cytométrie en flux
Numération et Formule sans anomalie	Sang périphérique	Lymphoblastes / Lymphocytes immatures	Cytométrie en flux Immunocytochimie
Adénomégalie	Cytoponction ou exérèse du noeud lymphatique	Forte suspicion de lymphome	Cytométrie en flux
Adénomégalie	Cytoponction ou exérèse du noeud lymphatique	Population homogène de petits lymphocytes	Cytométrie en flux
Adénomégalie	Cytoponction ou exérèse du noeud lymphatique	Population lymphocytaire hétérogène ou réactive avec de rares lymphocytes suspects	PARR
Organomégalie	Cytoponction ou biopsie du l'organe	Idem adénomégalie	Idem adénomégalie
Epanchement pleural ou péritonéal	Liquide d'épanchement	Nombreux lymphocytes anormaux / Nombreux petits lymphocytes	Cytométrie en flux
Masse médiastinale	Cytoponction de la masse	Suspicion de lymphome ou de thymome	Cytométrie en flux
Epanchement pleural ou péritonéal	Liquide d'épanchement	Rares lymphocytes anormaux	PARR
Maladie gastro-intestinale	Cytoponction ou exérèse du noeud lymphatique mésentérique	Population lymphocytaire réactive ou anormale	PARR
Augmentation du nombre de leucocytes dans le liquide cébrospinal	Liquide cébrospinal	Augmentation du nombre de lymphocytes normaux ou anormaux	PARR
Leucopénie	Cytoponction de moelle osseuse	Présence de lymphoblastes	Cytométrie en flux
Leucopénie	Cytoponction de moelle osseuse	Présence de petits lymphocytes	Cytométrie en flux
Leucopénie	Cytoponction de moelle osseuse	Suspicion de cellules néoplasiques	PARR

La PARR est un outil diagnostique du lymphome canin récent, adapté à un certain nombre de situations pour lesquelles l'histologie/cytologie, l'immunohistochimie/immunocytochimie et la cytométrie en flux ne sont pas suffisamment sensibles. Elle permet de s'affranchir partiellement de certains facteurs limitants tels que le nombre de cellules néoplasiques dans l'échantillon à analyser, la nature du lymphome, la nature du prélèvement. Elle représente également un examen de choix pour le suivi thérapeutique d'un lymphome traité par chimiothérapie.

Dans une seconde partie, les différentes manipulations expérimentales ayant été nécessaires afin d'aboutir au protocole de PARR adopté par le laboratoire de recherche d'AMaROC, ainsi que les sensibilité et spécificité de ce protocole seront exposées.

DEUXIEME PARTIE: Etude expérimentale

I. Objectifs de l'étude

Plusieurs études ont précédemment été menées afin de déterminer la sensibilité de la PARR appliquée au diagnostic du lymphome canin. Les résultats diffèrent énormément d'une étude à l'autre, entre 66,7% et 100% (Fukushima et al., 2009; Kaneko et al., 2009 (2)). Ces variations peuvent être inhérentes aux propriétés des échantillons testés (taille du panel, type et sous-type de lymphome, nature des tissus prélevés, chimiothérapie en place, ...), aux caractéristiques et pratiques propres à chaque laboratoire (conditions atmosphériques, matériel technique à disposition, mode de prélèvements, conditions de stockage et techniques d'extraction de l'ADN des échantillons, expérience des manipulateurs,...) et au protocole utilisé (amorces, paramètres de la PCR, résolution de la technique de révélation des produits de PCR,...). Cela souligne la nécessité de mettre au point un protocole et d'en évaluer la sensibilité qui sera propre à chaque laboratoire (Avery, 2012).

L'objectif de cette étude expérimentale est ainsi de mettre au point un protocole techniquement réalisable dans les conditions offertes par l'unité de recherche d'AMaROC.

II. Matériels et outils

II.1. Echantillons analysés

Pour la mise au point de la technique, trente-six échantillons de lymphomes B et T (dont vingt coupes histologiques de noeuds lymphatiques fixées au formaldéhyde puis incluses en paraffine (FFPE), deux lames cytologiques après cytoponction de noeuds lymphatiques et quatorze prélèvements de noeuds lymphatiques conservés dans du RNAlater®) et douze échantillons témoins (dont neuf coupes histologiques FFPE et trois échantillons de sang périphérique de chien sain) ont été analysés. Ces échantillons proviennent du Laboratoire d'Histopathologie Animale (LHA) d'Oniris, du Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Oniris et de l'Institut de Génétique et Développement de Rennes:

- 29 lames histologiques FFPE de 10 µm d'épaisseur correspondant à des pièces d'exérèse de noeuds lymphatiques, mises à disposition par le LHA d'Oniris:
 - 2 noeuds lymphatiques hyperplasiques (11-4711 ; 13-5392E)
 - 2 noeuds lymphatiques normaux (12-1128 ; 10-4737)
 - 5 noeuds lymphatiques sains ou hyperplasiques (08-5560; 14-1642; 14-1798; 08-5559; 14-1804)
 - 10 lymphomes B (05-0582 ; 05-0334 ; 05-1660 ; 05-4187; 06-4055; 07-2050; 06-4322; 06-2989; 06-4619; 06-4132)
 - 10 lymphomes T (05-441 ; 06-993 ; 06-1045 ; 06-2042; 09-1206; 09-5055B; 08-1050; 08-0551; 09-1710; 09-2655)
- 2 lames cytologiques correspondant au matériel de cytoponction de noeuds lymphatiques de chiens atteints de lymphome B (Emy; Gump) prélevé dans le Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Oniris
- l'ADN de 14 pièces d'exérèse chirurgicale ou post-mortem de noeuds lymphatiques hypertrophiés, extrait par l'Institut de Génétique et Développement de Rennes:

- 8 lymphomes B (Bavona; Portos; Azaro; Pancho; Aston; Raboue; Athéna; Edelbut)
- 6 lymphomes T (Bouba; Twain; Serene; Ugo; Nouria; Quiny)
- 3 échantillons de sang périphérique de chien sain (CN sain) non FFPE, prélevés dans le Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire d'Oniris

Les prélèvements histologiques sont obtenus par biopsie ou exérèse chirurgicale d'un noeud lymphatique du vivant de l'animal ou lors de l'autopsie.

Les prélèvements traités par le LHA d'Oniris sont rapidement fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine après réception puis sont conservées à température ambiante. Les échantillons de sang périphérique sont réfrigérés et conservés à une température de 4°C. Enfin, les prélèvements de noeuds lymphatiques réalisés par des vétérinaires exerçant en activité libérale et traités par l'Institut de Génétique et Développement de Rennes sont conservés dans un tampon conservateur *RNAlater*® et stockés à 4°C avant que l'ADN en soit extrait. Les délais entre la mort de l'animal (le cas échéant), la réalisation des prélèvements, le traitement dans le *RNAlater*® et l'extraction d'ADN ne sont pas connus et variables.

Il est à noter qu'un diagnostic définitif n'a pas été établi pour trois de ces échantillons. En effet, concernant l'échantillon Nouria, le rapport fait état d'un lymphome T malin probable. Le diagnostic de lymphome cutané épithéliotrope a été établi par analyse histologique pour l'échantillon Quiny cependant l'immunophénotypage n'a pas été confirmé par immunohistochimie. La grande majorité des lymphomes cutanés sont des lymphomes T. Il existe néanmoins quelques rares cas de lymphomes B cutanés par diffusion métastatique (Ponce et al., 2010). Enfin, après analyse histologique de l'échantillon Portos, un doute persiste entre un lymphome B et un sarcome histiocytaire.

II.2. Extraction de l'ADN

La technique d'extraction de l'ADN des échantillons adoptée par l'unité de recherche d'AMaROC fait appel au kit d'extraction NucleoSpin® Tissue DNA, macherey-nagel-Allemagne.

Matériel :

- Réactifs : Kit NucleoSpin® Tissue, Macherey-Nagel-Allemagne
Ethanol 96-100%
- Equipement : Pipettes monocanal
Centrifugeuse
Vortex
Bain-Marie (maxi de 90°C)
Equipement de protection individuel (blouse, gants, lunettes de protection)

Concernant les échantillons fournis par l'Institut de Génétique et Développement de Rennes, la technique d'extraction de l'ADN utilisée est identique.

L'ADN élué est par la suite dosé au nanodrop afin d'évaluer sa concentration en ADN (cf. Tableau 18) et conservé à +4°C.

Tableau 18. Dosage de l'ADN des échantillons analysés dans l'étude expérimentale

Mode de conservation	Type de lymphome	Nature tissulaire	Nom de l'échantillon	Concentration en ADN (ng/μL)
FFPE	-	Ganglion sain	12-1128	126,9
			10-4737	75,2
		Ganglion hyperplasique	11-4711	97,2
			13-5392E	545,9
		Ganglion sain ou hyperplasique	08-5560	50,6
			14-1642	79,2
			14-1798	128,8
			08-5559	76,7
			14-1804	29
	Lymphome B	Ganglion	05-0582	14,7
			05-0334	218,6
			05-1660	275,6
			05-4187	549,3
			06-4055	641,9
			07-2050	237,5
			06-4322	317,3
			06-2989	68,3
			06-4619	51,6
			06-4132	768
	Lymphome T	Ganglion	05-0441	296,5
			06-0993	34,4
			06-1045	369,8
			06-2042	215,2
			09-1206	313,6
			09-5055B	116,9
			08-1050	43,7
			08-0551	593,7
			09-1710	544,2
			09-2655	452,9

Mode de conservation	Type de lymphome	Nature tissulaire	Nom de l'échantillon	Concentration en ADN (ng/μL)	
Sang réfrigéré	-	Sang	1	AD	
			2	AD	
			3	AD	
Lames cytologiques	Lymphome B	Ganglion	Emy	AD	
			Gump	AD	
RNAlater®	Lymphome B	Ganglion	Azaro	100	
			Pancho	100	
			Aston	100	
			Raboue	100	
			Athéna	100	
			Edelbut	100	
		Rate	Bavona	100	
		AD	Portos #	100	
		Lymphome T	Ganglion	Bouba	100
				Rate	Serene
	Peau			Quiny #	100
	Ugo			100	
		AD	Nouria #	100	
			Twain	100	

(-): absence de lymphome; (AD): absence de donnée; (#): suspicion de lymphome et immunophénotype non confirmé

II.3. PCR

Plusieurs protocoles de PCR ont été mis au point et ajustés selon les résultats obtenus. Les diverses manipulations ont nécessité le matériel suivant:

- Equipement: Pipettes monocanal
Micro-centrifugeuse
Vortex
Thermocycleur: C1000™ Thermal Cycleur, Bio-Rad
Equipement de protection individuel (blouse, gants, lunettes de protection)

- Réactifs:

- Mix:

Dans un premier temps, le mix HOT FIREPol® Blend 5X Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne, Estonie) avec lequel l'unité de recherche d'AMaROC obtient régulièrement de bons résultats est choisi pour la mise au point de la PARR. Les mix Ready to Load contiennent tous les réactifs nécessaires à la réalisation de la PCR:

- Taq polymérase HOT FIREPol® DNA polymerase, Solis BioDyne
- Enzyme de relecture à activité exonucléasique
- 5X de solution tampon Blend Master Mix Buffer contenant 7,5 mM de MgCl₂ nécessaire à la stabilisation des nucléotides et à l'activation de l'enzyme
- 2 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- BSA (Bovine Serum Albumin): agent stabilisateur par prévention non-spécifique de l'adhésion des protéines aux surfaces
- Colorant bleu (xylène cyanol): témoin de migration jusqu'à 3500-4500 paires de base sur le gel d'électrophorèse
- Colorant jaune: témoin de migration jusqu'à 35-40 pb

Par la suite, des mix ont été recomposés afin de pouvoir adapter les concentrations de certains de leurs constituants:

- 0.025U de TAQ polymérase
- 1X de tampon contenant du MgCl₂ (Mg²⁺ nécessaire au fonctionnement de la Taq polymérase)
- 0.2mM de chaque dNTP
- 1X de Q-solution permettant d'abaisser l'énergie nécessaire pour séparer les doubles brins
- 5µL de matrice dans 25µL de volume réactionnel

- Taq polymérase:

- HOT FIREPol® DNA polymerase, Solis BioDyne Taq polymérase
- HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen
- TaKaRa Taq™ Hot Start Version, Takara Shuzo

- Amorces :

Les amorces mises au point par Burnett et al., 2003, Tamura et al., 2006 et Yagihara et al., 2009 ont été testées dans cette étude expérimentale. Leurs caractéristiques sont consignées dans le tableau suivant:

Tableau 19. Caractéristiques des amorces utilisées dans l'étude expérimentale

Produit	Amorce	Spécificité d'amorce	T _m	Séquence de l'amorce
Contrôle C _μ	Sigmf1	C _μ	62°C	TTC-CCC-CTC-ATC-ACC-TGT-GA
	Srμ3	C _μ	60°C	GGT-TGT-TGA-TTG-CAC-TGA-GG
Contrôle c-Kit	RcontrolecKit	c-Kit	48,9°C	GTTCCCTAAAGTCATTGTTACACG
	FcontrolecKit	c-Kit	50,6°C	CCCATGTATGAAGTACAGTGGAAG
IgH major	CB1	VH	55,1°C	CAG-CCT-GAG-AGC-CGA-GGA-CAC
	CB2	JH	53,1°C	TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT
IgH minor	CB1	VH	55,1°C	CAG-CCT-GAG-AGC-CGA-GGA-CAC
	CB3	JH	60°C	TGA-GGA-CAC-AAA-GAG-TGA-GG
IgH Tamura	Tamura F	VH	58°C	ACA-CGG-CC(A/C/G)-TGT-ATT-ACT-GT
	Tamura R	JH	52°C	TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-C
TCR_γ	TCR _γ 1	JH	62°C	ACC-CTG-AGA-ATT-GTG-CCA-GG
	TCR _γ 2	JH	54°C	GTT-ACT-ATA-AAC-CTG-GTA-AC
	TCR _γ 3	VH	54,6°C	TCT-GGG-ATG-TAT-TAC-TGT-GCT-GTC-TGG
TCR V_γa-J_γa	V _γ a	VH	55,3°C	CGTGTACTACTGCGCTGCCTGG
	J _γ a	JH	39,5°C	TACCTTCTG(C/T)AAATATCTTGA
TCR V_γb-J_γb	V _γ b	VH	53,7°C	GGCTGTATTACTGTGCCTGCTGG
	J _γ b	JH	52,3°C	TGTGCCAGGACCAAGCACTTTGTT
TCR V_γa-J_γb	V _γ a	VH	55,3°C	CGTGTACTACTGCGCTGCCTGG
	J _γ b	JH	52,3°C	TGTGCCAGGACCAAGCACTTTGTT
TCR V_γb-J_γa	V _γ b	VH	53,7°C	GGCTGTATTACTGTGCCTGCTGG
	J _γ a	JH	39,5°C	TACCTTCTG(C/T)AAATATCTTGA

(T_m): Température de fusion des amorces à partir de laquelle 50% d'entre elles sont appariées à leur séquence complémentaire.

- Le couple d'amorces nommé IgH major (CB1/CB2) permet d'amplifier une séquence de l'ordre de 120 paires de bases du gène d'intérêt de la plupart des lymphocytes B. La température d'hybridation fixée par Burnett et al., 2003 est 60°C.

- Le couple d'amorces nommé IgH minor (CB1/CB3) permet d'amplifier une séquence de l'ordre de 120 paires de bases du gène d'intérêt d'une faible proportion de lymphocytes B. La différence entre ces deux couples d'amorces est située sur l'amorce antisens qui permet une meilleure affinité en fonction du fragment J utilisé lors de la recombinaison. La température d'hybridation fixée par Burnett et al., 2003 est 60°C.
- Le couple d'amorces nommé IgH Tamura (TamuraF/TamuraR) permet d'amplifier une séquence de 80 à 150 pb du gène d'intérêt de la plupart des lymphocytes B. La température d'hybridation fixée par Tamura et al., 2006 est 54°C.
- Les couples d'amorces nommés TCR γ (TCR γ 1/TCR γ 2 et TCR γ 1/TCR γ 3) permettent d'amplifier une séquence de l'ordre de 90 paires de bases correspondante au gène d'intérêt des lymphocytes T. De même que pour les lymphocytes B, il existe deux amorces antisens permettant une meilleure affinité avec l'extrémité J du gène d'intérêt. Contrairement aux amorces antisens CB2 et CB3, les deux amorces antisens TCR γ 2 et TCR γ 3 peuvent cohabiter dans la même réaction sans se dimériser. La température d'hybridation fixée par Burnett et al., 2003 est 60°C.
- Les couples d'amorces nommés TCR V γ a-J γ a, TCR V γ a-J γ b, TCR V γ b-J γ a et TCR V γ b-J γ b permettent d'amplifier un fragment de 55 à 90 paires de bases correspondant au gène d'intérêt des lymphocytes T. Les températures d'hybridation fixées par Yagihara et al., 2009 sont 60°C, 69°C, 60°C et 62°C, respectivement.
- Le couple d'amorces nommé C μ (Sigmf1/Sr μ 3) est par ailleurs utilisé en tant que contrôle positif de la PCR. Il permet l'amplification d'une séquence constante de 130 paires de bases présente sur tous les ADN génomiques. La présence de cette bande sur le gel d'électrophorèse permet de valider la PCR et la qualité de l'ADN de l'échantillon. La température d'hybridation fixée par Burnett et al., 2003 est 60°C.
- Le couple d'amorces nommé c-Kit (RcontrolecKit/FcontrolecKit) est également utilisé en tant que contrôle positif de la PCR. Il permet l'amplification d'une séquence constante de 190 paires de bases présente sur tous les ADN génomiques. La température d'hybridation est 56°C.

II.4. Electrophorèse

Le gel d'électrophorèse habituellement utilisé par l'unité de recherche d'AMaROC est un gel d'agarose à 2,2% permettant de séparer des produits de PCR de l'ordre de 100 paires de base et dont la composition est la suivante:

- Agarose: Eurobio (4,4g pour 200 mL de TBE 1X)
- Tampon TBE : TBE 5X, VWR (200 mL)
- Fluorochrome:
 - GelRed Nucleic Acid Gek Stain in Water 10 000X, VWR (20 µl pour 200ml de TBE)
 - SafeView (20 µl pour 200ml de TBE 1X)
- Marqueur de 100 pb, 200 pb et 300 pb: DNA Ladder Ready to Load, Solis Biotec

L'équipement nécessaire consiste en:

- Cuve d'électrophorèse : Midigel XL, Apex, France (200 mL et 400 mL)
- Transilluminateur pour photo de gels : ChemiDoc XRS, Bio-Rad

III. Mise au point d'un protocole optimisé de PARR

Un premier protocole de PARR a été établi en s'inspirant de celui mis au point par Burnett et al., 2003. Par la suite, afin d'optimiser les résultats de la technique, certains paramètres ont été ajustés, tels que :

- La dilution des échantillons
- La température
- La durée des cycles
- La Taq polymérase
- Les dNTP et la solution Q du mix
- Le fluorochrome
- Les amorces

III.1. Premier essai inspiré du protocole de Burnett et al. (2003)

Le premier protocole établi s'inspire de celui mis au point par Burnett et al. (2003). Les cycles ainsi que les amorces sont conservés. Le mix, la Taq polymérase et le gel d'électrophorèse sont adaptés aux pratiques de l'unité de recherche d'AMaROC.

Protocole:

- Echantillons: un témoin négatif (eau stérile), un ganglion sain (12-1128), deux lymphomes B (05-0334, 05-1660) et deux lymphomes T (05-0441, 06-2042)
- Mix et Taq polymérase: HOT FIREPol® Blend 5X Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne, Estonie)
- Couples d'amorces: C μ , IgH major, IgH minor et TCR γ
- Cycles de PCR:

95°C	→	15 min	
95°C	→	10 sec	X 35 cycles
55°C	→	30 sec	
72°C	→	20 sec	
72°C	→	5 min	
15°C	→	∞	

- Electrophorèse:
 - Préparation du gel: 4,4 g d'agarose et 20 μ L de GelRed dans 200 mL de TBE 1X
 - Dépôt des échantillons dans les puits du gel: 20 μ L d'échantillons amplifiés avec un tampon de charge dans chaque puits
 - Migration pendant 2h à 2h30 à 120 volts

Résultats:

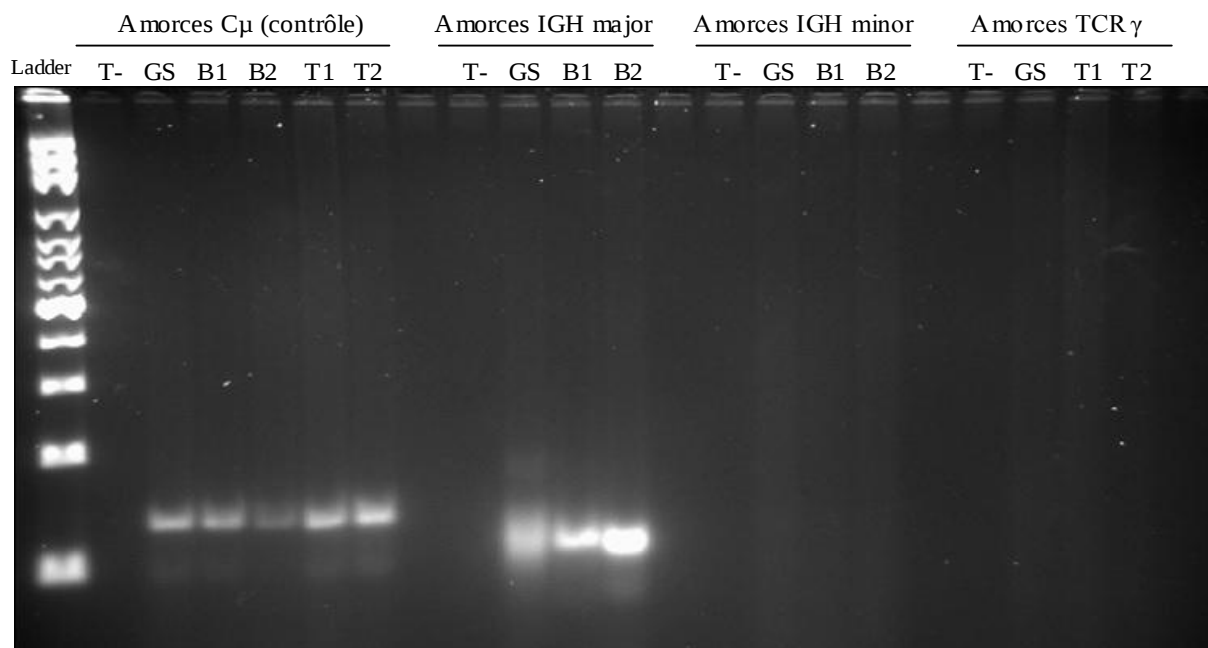


Figure 44. PARR réalisée avec les paramètres du protocole Burnett

T- : témoin négatif (eau stérile), GS : ganglion sain (12-1128), B1 : lymphome B (05-0334), B2 : lymphome B (05-1660), T1 : lymphome T (05-0441), T2 : lymphome (T 06-2042).

L'électrophorèse sur gel d'agarose a révélé, pour chacun des échantillons testés, des produits de PCR de 130 pb amplifiés avec le couple d'amorces contrôle C μ . L'amplification est donc possible avec ce protocole. De même, aucune molécule d'ADN n'a été amplifiée à partir des témoins négatifs, à savoir de l'eau stérile. Cela permet de confirmer la spécificité de l'amplification de l'ADN des échantillons et d'exclure une éventuelle contamination au cours de la manipulation.

Le couple d'amorces IgH major a permis l'amplification d'un smear de 120 pb pour le ganglion sain et de bandes spécifiques de 120 pb pour les lymphomes B. Cependant, aucune amplification n'est obtenue avec les couples d'amorces IgH minor et TCR γ .

Conclusion:

Devant l'absence d'amplification à partir des amorces IgH minor et TCR γ avec le protocole modifié de Burnett et al., 2003, il s'est avéré nécessaire de modifier certains paramètres du protocole. Il est utile de rappeler ici que le couple d'amorces IgH minor n'amplifie qu'une minorité des lymphomes B comparé au couple IgH major. Il est donc illusoire d'espérer une amplification pour tout échantillon de lymphome B testé.

III.2. Dilution des échantillons

L'absence d'amplification à partir des couples d'amorces IgH minor et TCR γ peut potentiellement être expliquée par la présence en grande quantité d'inhibiteurs de la PCR présents dans la paraffine des échantillons FFPE et consécutivement dans l'éluat de l'ADN extrait. L'objectif de la manipulation suivante est de réduire l'action de ces inhibiteurs en diluant les échantillons.

Protocole:

Les éluats d'ADN extrait sont dilués au 1/5. Le protocole précédant est conservé.

Résultats:

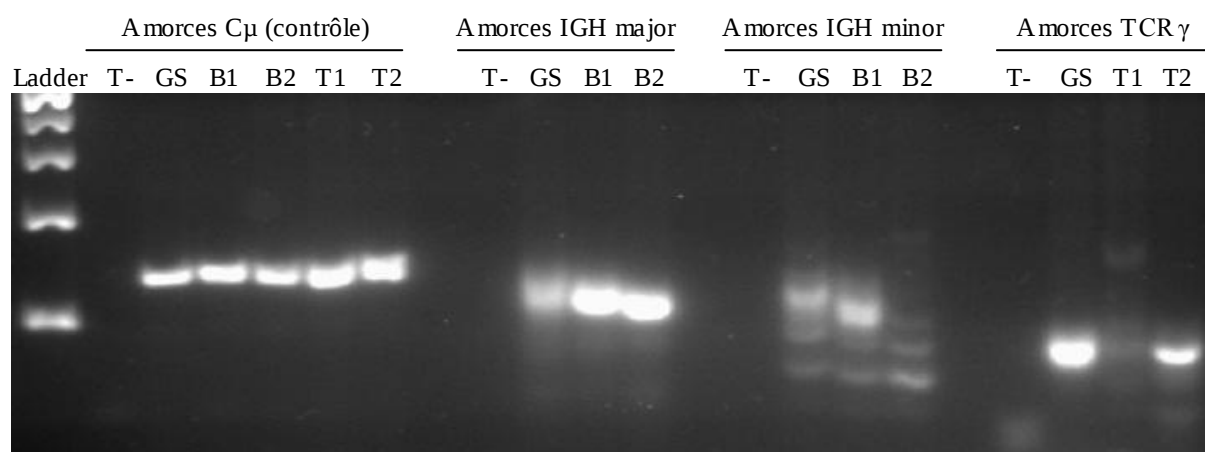


Figure 45. PARR réalisée avec dilution au 1/5 des échantillons

T- : témoin négatif (eau stérile), GS : ganglion sain (12-1128), B1 : lymphome B (05-0334), B2 : lymphome B (05-1660), T1 : lymphome T (05-0441), T2 : lymphome T (06-2042)

Le couple d'amorces contrôle C μ permet une amplification de molécules d'ADN de 130 pb pour chacun des échantillons. Le témoin négatif est effectivement négatif pour chacun des échantillons.

Les résultats obtenus à partir du couple d'amorces IgH major sont identiques et plus nets par rapport au protocole précédent. Des bandes polyclonales sont obtenues pour chacun des échantillons testés avec le couple d'amorces IgH minor. Enfin, le couple d'amorces TCR γ a permis l'obtention d'une bande unique pour le ganglion sain et le lymphome T06-2042. Un smear est obtenu à partir du lymphome T05-0441.

Conclusion:

Ces résultats sont encourageants cependant la révélation des produits de PCR à partir du ganglion sain devrait fournir un smear ou des bandes polyclonales et non une bande unique tandis que les lymphomes devraient être caractérisés par des bandes nettes et uniques et non des smears.

La dilution des échantillons permet bien de limiter l'action des inhibiteurs contenu dans la paraffine. Par la suite, de nouveaux paramètres ont été modifiés afin d'améliorer la résolution de la technique tout en conservant la concentration initiale des échantillons dans l'optique d'étudier l'effet des changements de paramètres malgré la présence d'inhibiteurs dans les échantillons.

III.3. Gradient de température

Au cours de la PCR, après un début de cycle à 95°C favorisant l'activation de l'enzyme et la dénaturation des molécules d'ADN, la température est abaissée afin de permettre l'hybridation des molécules d'ADN avec les amorces. La température d'hybridation est calculée en fonction de la séquence des amorces. Elle se situe généralement 5°C en dessous du T_m (température de fusion) de l'amorce utilisée. Lorsque plusieurs amorces sont utilisées dans la même réaction, il est nécessaire de réaliser un gradient de température pour chaque couple d'amorces afin de déterminer la température d'hybridation.

III.3.1. IgH major

Protocole:

Un gradient de température entre 55°C à 48°C avec le couple d'amorces IgH major a été réalisé à partir d'un témoin négatif, d'un échantillon de sang de chien sain, d'un échantillon de ganglion sain (12-1128) et de deux échantillons de lymphome B (05-0334 et 05-1660).

Résultats:

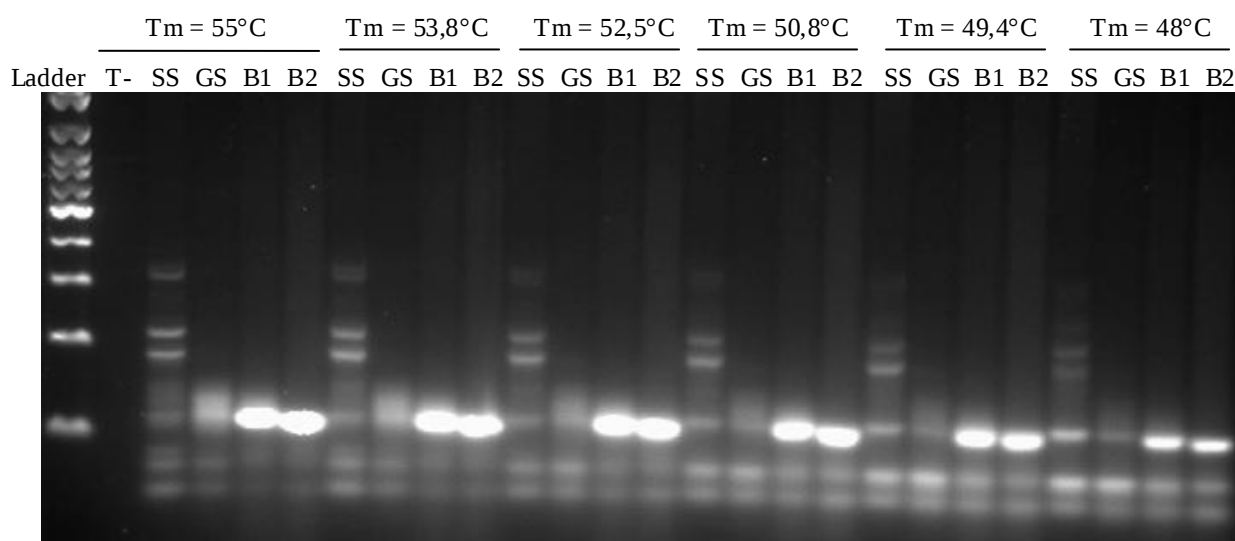


Figure 46. PARR avec un gradient de température et le couple d'amorces IgH minor

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GS : ganglion sain (12-1128), B1 : lymphome B (05-0334), B2 : lymphome B (05-1660)

Les bandes de 120 pb correspondantes à la séquence ciblée par les amorces IgH major sont plus nettes, moins étalées aux basses températures pour les échantillons 05-0334 et 05-1660. Elles sont ainsi moins assimilables à des smears. Cette même bande est de plus en plus visible pour les deux échantillons sains avec la baisse de température. Parallèlement, les multiples bandes pour le sang de chien sain et le smear pour le ganglion sain s'estompent. Cette perte de contraste peut mener à de faux-positifs et n'est pas recherchée. Le meilleur compromis semble se trouver à des températures d'hybridation comprises entre 49°C et 50°C.

Les bandes inférieures à 100 pb correspondent à des dimères d'amorces.

III.3.2. IgH minor

Un gradient de température entre 55°C à 48°C avec le couple d'amorces IgH minor est réalisé à partir d'un témoin négatif, d'un échantillon de sang de chien sain, d'un échantillon de ganglion sain (12-1128) et de deux échantillons de lymphome B (05-0334 et 05-1660).

Résultats:

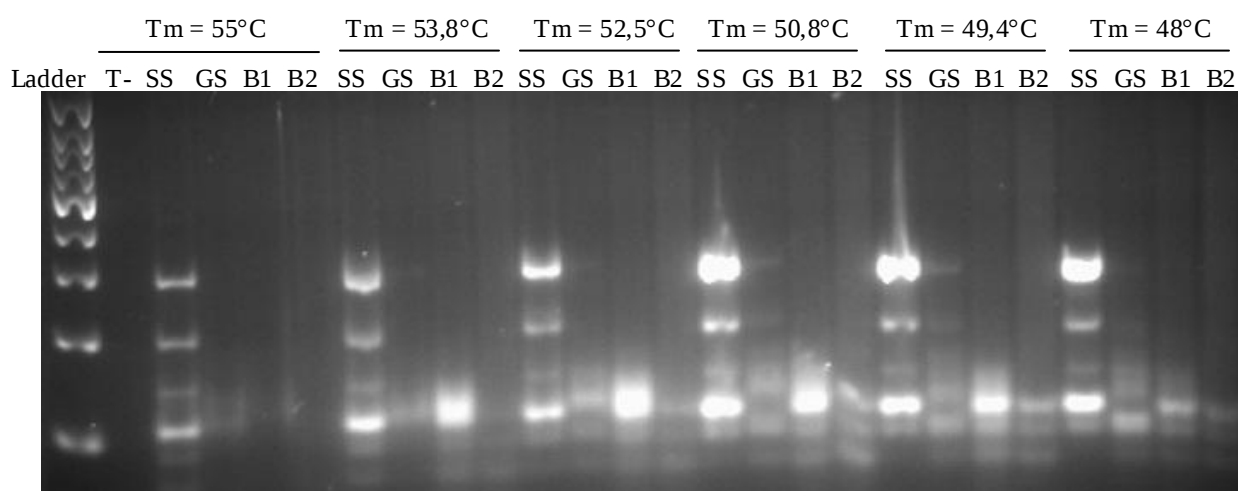


Figure 47. PARR avec un gradient de température et le couple d'amorces IgH minor.

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GS : ganglion sain (12-1128), B1 : lymphome B (05-0334), B2 : lymphome B (05-1660).

Un fort bruit de fond est présent sur le gel d'agarose pour les températures comprises entre 52,2°C et 50,8°C.

Les résultats à 49,9°C et 48°C sont identiques avec une perte d'intensité des bandes à 48°C.

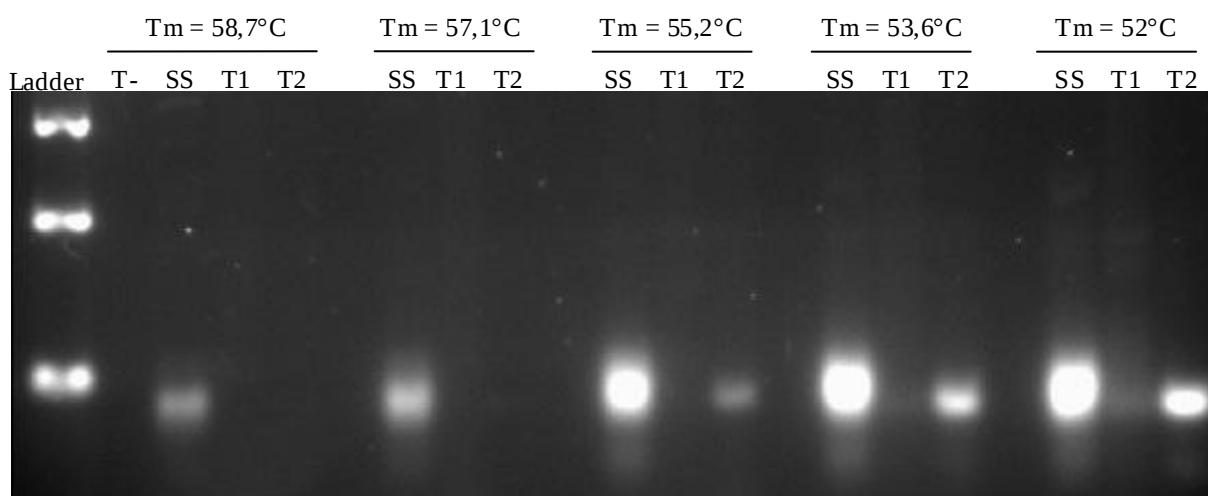
Aucune bande non spécifique n'est observée à ces températures.

III.3.3. TCR γ

Protocole:

Un gradient de température entre 59°C à 52°C avec le couple d'amorces TCR γ est réalisé à partir d'un témoin négatif, d'un échantillon de sang de chien sain et de deux échantillons de lymphome T (05-0441 et 06-2042). Les résultats étant plus concluants pour la température la plus basse, un second gradient a été réalisé entre 55°C et 48°C avec l'ajout d'un échantillon de lymphome T supplémentaire (06-1045).

Résultats:



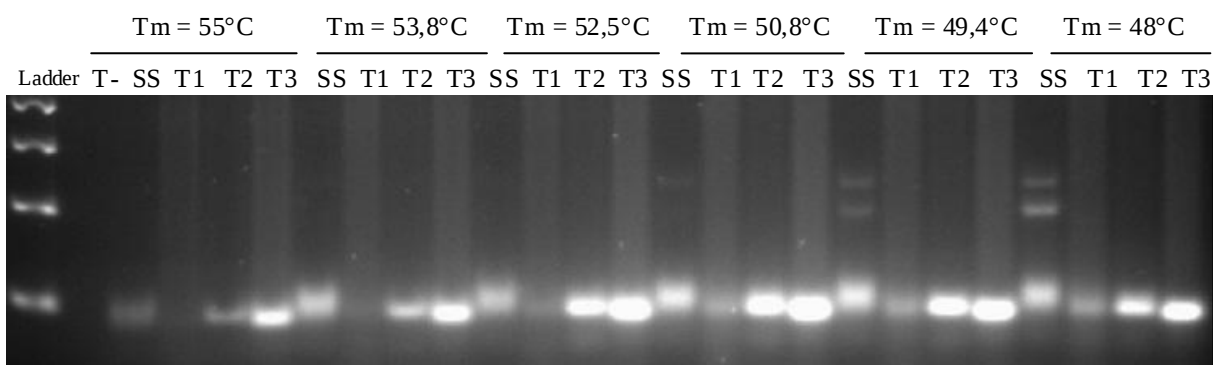


Figure 48. PARR avec un gradient de température de 58,7°C à 52°C et le couple d'amorces TCR γ .

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, T1 : lymphome T (05-0441), T2 : lymphome T (06-2042), T3 : lymphome T (06-1045)

L'intensité des bandes révélées sur le gel d'agarose est maximale pour les basses températures. En deçà de 50,8°C, de nouvelles bandes non spécifiques à la séquence ciblée par le couple d'amorces sont visualisables à partir des échantillons de ganglion sain. Ces bandes non désirées sont d'autant plus visibles à 48°C. Il n'est donc pas nécessaire de descendre à des températures moindres au risque de perdre la spécificité des amorces.

On remarque que pour l'échantillon 05-0441, aucune séquence n'est clairement amplifiée quelque soit la température, et ce malgré sa forte concentration en ADN (375 μ g/mL). Cela est probablement dû à une forte concentration en inhibiteurs de PCR et/ou une fragmentation trop importante de l'ADN du fait d'une conservation prolongée de l'échantillon par fixation au formaldéhyde et inclusion en paraffine.

III.3.4. C μ

Protocole:

Un gradient de température similaire est réalisé pour le couple d'amorces C μ afin de contrôler son efficacité à ces mêmes températures. Un témoin négatif, des échantillons de sang de chien sain, de ganglion sain (12-1128), de lymphome B (05-334) et de lymphome T (06-1045) sont utilisés pour cette expérience.

Résultats:

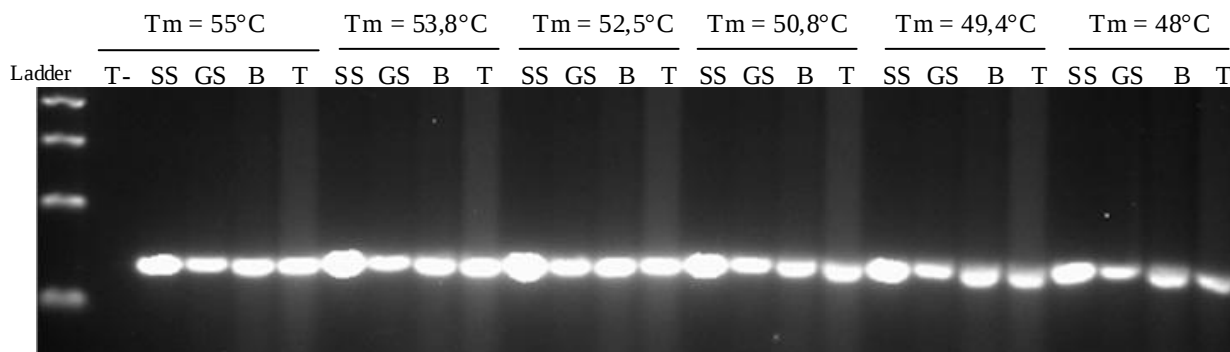


Figure 49. PARR avec un gradient de température et le couple d'amorces contrôle C μ .

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GS : ganglion sain (12-1128), B : lymphome B (05-0334), T : lymphome T (06-1045).

Une bande nette de 130 pb est visualisable quelque soit la température d'hybridation. Le couple d'amorces C μ est donc utilisable pour chacune de ces températures.

III.3.5. Conclusion

La réalisation d'un gradient de température d'hybridation a permis de déterminer des températures optimales pour chacun des couples d'amorces. Les bandes spécifiques sont plus nettes et moins assimilables à des smears à de faibles températures. Le bruit de fond est moins important. Cependant, il est nécessaire de ne pas trop abaisser la température au risque de perdre la spécificité des amorces. La température d'hybridation de 49°C a été retenue pour la suite de l'étude.

Malgré l'amélioration des résultats obtenus avec cette nouvelle température d'hybridation, il est parfois difficile de distinguer une bande faible ou large d'un smear.

III.4. Taq polymérase

Les premiers essais ont été réalisés avec la Taq polymérase Solis Biodyne, Estonie que l'unité de recherche d'AMaROC a l'habitude de manipuler. Deux nouvelles Taq polymérases ont été testées au cours des essais suivants.

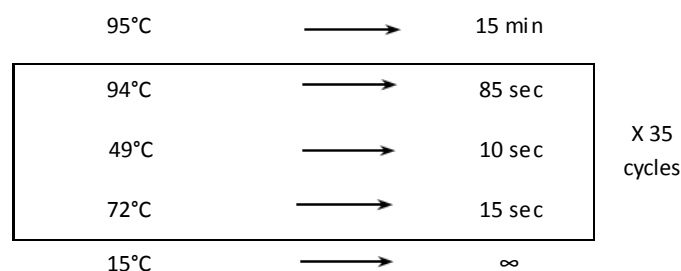
III.4.1. HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen

La HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen est largement citée et utilisée dans les publications vétérinaires (Burnett et al., 2003; Lana et al., 2006(1); Kaneko et al., 2009 (1); Kaneko et al., 2009 (2); Fukushima et al., 2009; Yamazaki et al., 2008; Chaubert et al., 2010; Thaleim et al., 2013). AMaROC possède un exemplaire de cette enzyme périmé depuis l'été 2012. Le laboratoire Qiagen a néanmoins affirmé que cela n'aurait pas d'incidence sur les résultats.

La HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen est fournie avec une solution Q. Celle-ci a pour effet d'abaisser l'énergie nécessaire pour séparer les doubles brins d'ADN riches en bases G et C. D'après le laboratoire, cette solution n'est pas indispensable et son utilisation doit être adaptée à chaque protocole.

Protocole:

Un premier essai est réalisé à partir d'un témoin négatif, des échantillons de sang de chien sain, de ganglion hyperplasique (13-5392E), de lymphomes B (05-0334) et T (05-0441) avec les couples d'amorces C μ , IgH major, IgH minor et TCR γ . La température d'hybridation est maintenue à 49°C.



Résultats:

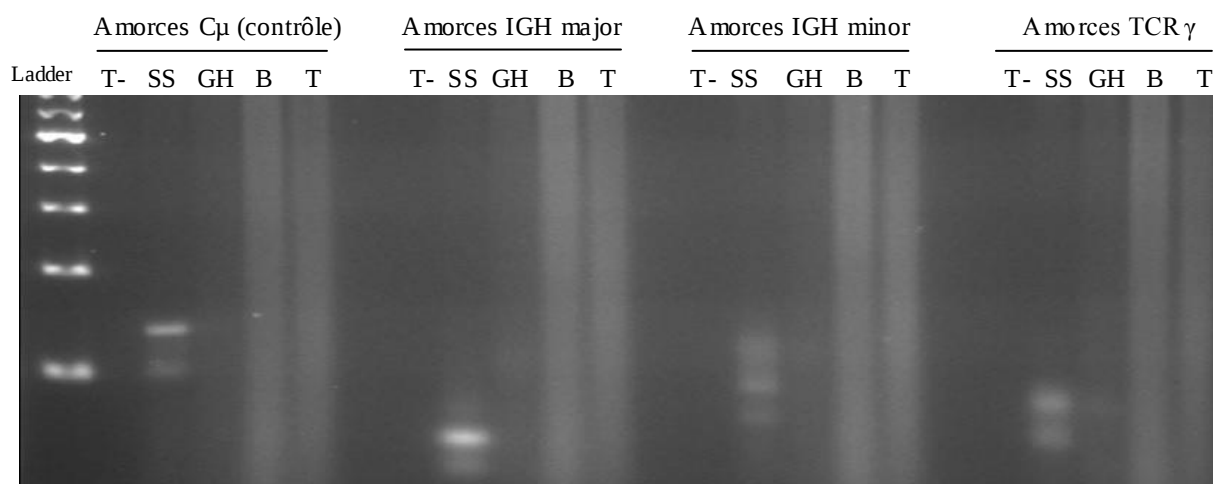


Figure 50. PARR réalisée avec la HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen.

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GH : ganglion hyperplasique (13-5392E), B : lymphome B (05-4187), T : lymphome T (05-0441).

Après révélation sur gel d'électrophorèse, seuls des produits amplifiés à partir du sang de chien sain sont détectés. Il s'agit de l'unique échantillon utilisé non FFPE. Ces résultats permettent de conclure néanmoins au relatif bon fonctionnement de la Taq polymérase puisque des séquences d'ADN ont été amplifiées.

Une cause possible de la médiocrité des résultats pouvait résider dans la température d'hybridation inférieure à celle recommandée par le laboratoire Qiagen pour la HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen. Ainsi, un nouvel essai a été réalisé en augmentant la température d'hybridation à 60°C. Cependant, aucune amélioration n'a été notée, si ce n'est une dégradation (résultats non exposés).

Conclusion:

L'amplification obtenue avec la HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen dans les conditions précédemment décrites est de mauvaise qualité. Plusieurs paramètres peuvent être à l'origine de cette absence d'amplification. La concentration en dNTP ainsi que la présence de la solution Q ont notamment été remis en cause. Une troisième PARR a donc été réalisée à partir des mêmes échantillons avec le couple d'amorces contrôle C μ seul afin d'économiser les réactifs. Pour chaque échantillon, un mix avec les anciens ou les nouveaux (plus concentrés) dNTP et avec ou sans la solution Q est préparé.

Résultats:

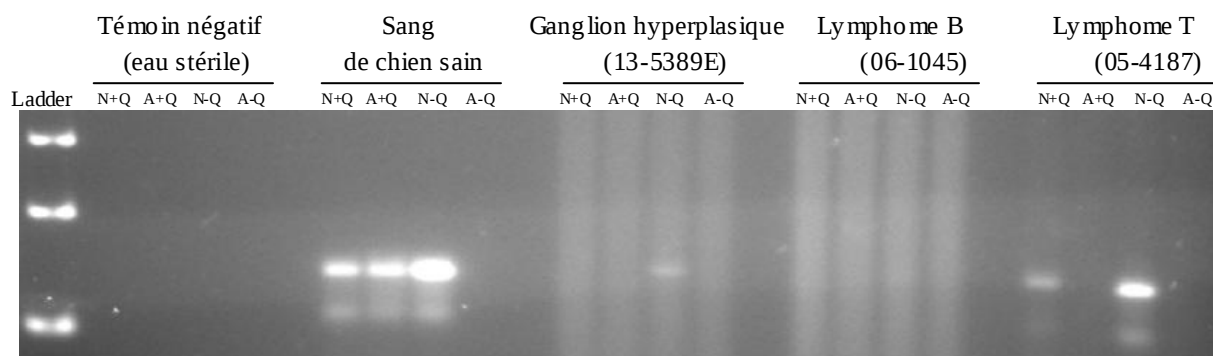


Figure 51. PARR réalisée avec les anciens ou les nouveaux (plus concentrés) dNTP et avec ou sans la solution Q.

N+Q : Nouveaux dNTP avec la solution Q, A+Q : Anciens dNTP avec la solution Q, N-Q : Nouveaux dNTP sans la solution Q, A-Q : Anciens dNTP avec la solution Q.

L' amplification d'une séquence de 130 pb à partir du sang de chien sain est effective pour trois des quatre combinaisons possibles: avec les nouveaux dNTP et la solution Q, avec les nouveaux dNTP sans la solution Q, avec les anciens dNTP et la solution Q. Une bande de 130 pb est également détectée à partir des échantillons 05-4187 et 13-5392E avec les nouveaux dNTP sans la solution Q. Enfin, la séquence cible a été amplifiée à partir de l'échantillon 05-4187 avec les nouveaux dNTP et la solution Q.

Conclusion

Les anciens dNTP devaient effectivement être trop peu concentrés pour le bon fonctionnement de cette Taq polymérase. La solution Q ne semble pas nécessaire à la réalisation de la PARR. Enfin, il semble que les échantillons FFPE détiennent trop d'inhibiteurs d'activité enzymatique, à l'exception de l'échantillon 05-4187.

La HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen, bien qu'utilisée avec succès au cours de précédentes études, n'a pas été retenue pour l'élaboration du protocole. On ne peut exclure le fait que ces mauvais résultats soient imputables au dépassement de la date de péremption. Cependant, le prix de l'enzyme n'a pas permis d'envisager de nouvelle acquisition.

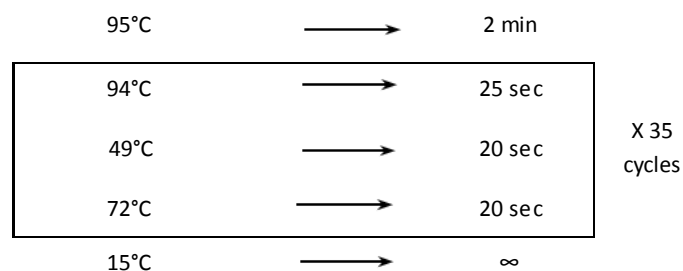
III.4.2. TaKaRa Z-Taq™ DNA Polymerase

Takanosu et al., 2010 ont mis au point une PARR avec l'enzyme TaKaRa Taq™ Hot Start Version, Takara Shuzo. AMaROC possède une version de cette Taq polymérase non Hot Start: la TaKaRa Z-Taq™ DNA Polymerase. Cette caractéristique oblige à manipuler l'enzyme sur glace pendant la préparation des échantillons.

Protocole:

La PARR est réalisée à partir d'un témoin négatif, d'échantillons de sang de chien sain, de ganglion sain (10-4737), de lymphomes B (05-4187) et T (06-0993) avec les couples d'amorces C μ , IgH major, IgH minor et TCR γ .

Les paramètres du cycle de PARR optimisé par Takanosu et al, 2010 ont été transposés à ce nouvel essai:



Résultats:

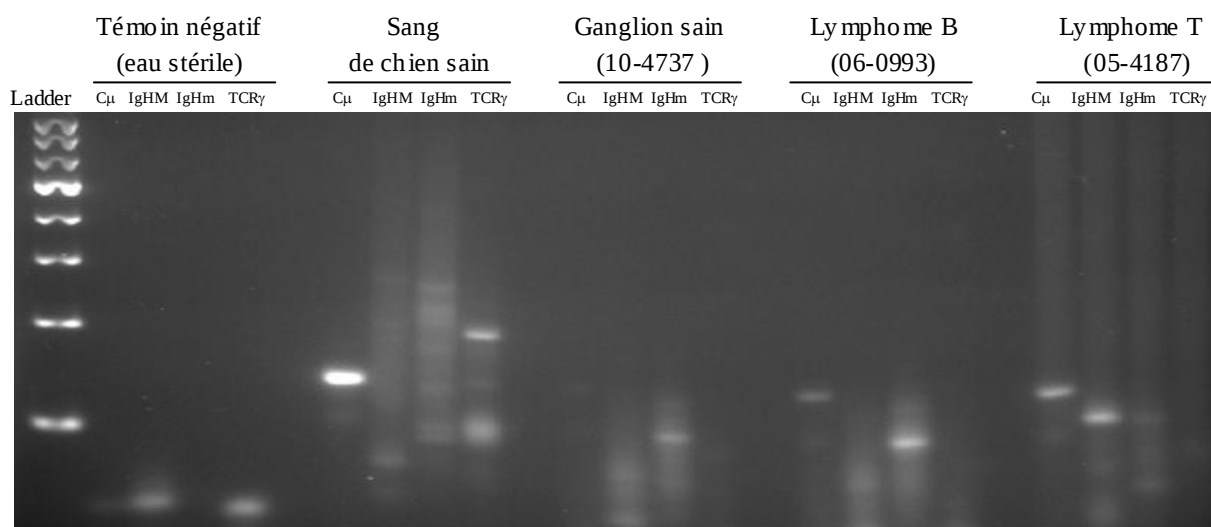


Figure 52. PARR réalisée avec la TaKaRa Z-Taq™ DNA Polymérase.

C μ : couple d'amorces contrôle C μ , IgHM : couple d'amorces IgH major, IgHm : couple d'amorces IgH minor, TCR γ : couple d'amorces TCR γ .

La bande spécifique de 130 pb normalement obtenue avec le couple d'amorces contrôle C μ est absente pour l'échantillon 10-4737 et faible pour l'échantillon 06-0993. De plus, il est impossible de différencier le smear du ganglion sain (10-3747) et la bande du lymphome B 06-993 avec le couple d'amorces IgH minor. Cette problématique s'est déjà présentée avec la Taq polymérase Solis Biotec.

Conclusion:

L'utilisation de la TaKaRa Z-Taq™ DNA Polymérase ne présente aucun intérêt majeur par rapport à la Taq polymérase Solis Biotec. Celle-ci, moins chère, sera donc conservée pour la suite de l'étude.

Plusieurs paramètres ont par la suite été modifiés afin d'optimiser les résultats obtenus avec la Taq polymérase Solis Biotec.

III.5. Durée des cycles

Chaque cycle est composé de 3 étapes successives: la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Les durées des étapes du cycle peuvent être allongées ou raccourcies en fonction de la composition en bases G-C de l'ADN et des amorces ainsi que de l'activité de l'ADN polymérase:

- La durée de l'étape de dénaturation est la durée nécessaire à la dénaturation de l'ADN et dépend de sa composition en bases G-C.
- La durée de l'étape d'hybridation est fixée afin de laisser le temps aux amorces de s'hybrider correctement sans que l'ADN total n'ait le temps de se réhybrider.
- Le temps d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et de la vitesse de polymérisation de l'enzyme.

III.5.1. Cycle long

Protocole:

Dans un premier temps, le cycle habituellement utilisé par l'unité de recherche dans le cadre des diagnostics de mastocytome, plus long, est appliqué à la PARR.

95°C	→	15 min	
95°C	→	40 sec	X 35 cycles
49°C	→	40 sec	
72°C	→	40 sec	
72°C	→	10 min	
15°C	→	∞	

Les échantillons utilisés pour cet essai sont un témoin négatif, des échantillons de sang de chien sain, de ganglion sain (12-1128), et de deux lymphomes correspondant chacun aux couples d'amorces testées IgH major, IgH minor et TCR γ (Lymphomes B 05-334 et 05-1660, lymphomes T 05-0441 et 06-2042). Par ailleurs, chacun de ces échantillons est testé avec les amorces contrôles C μ .

Résultats:

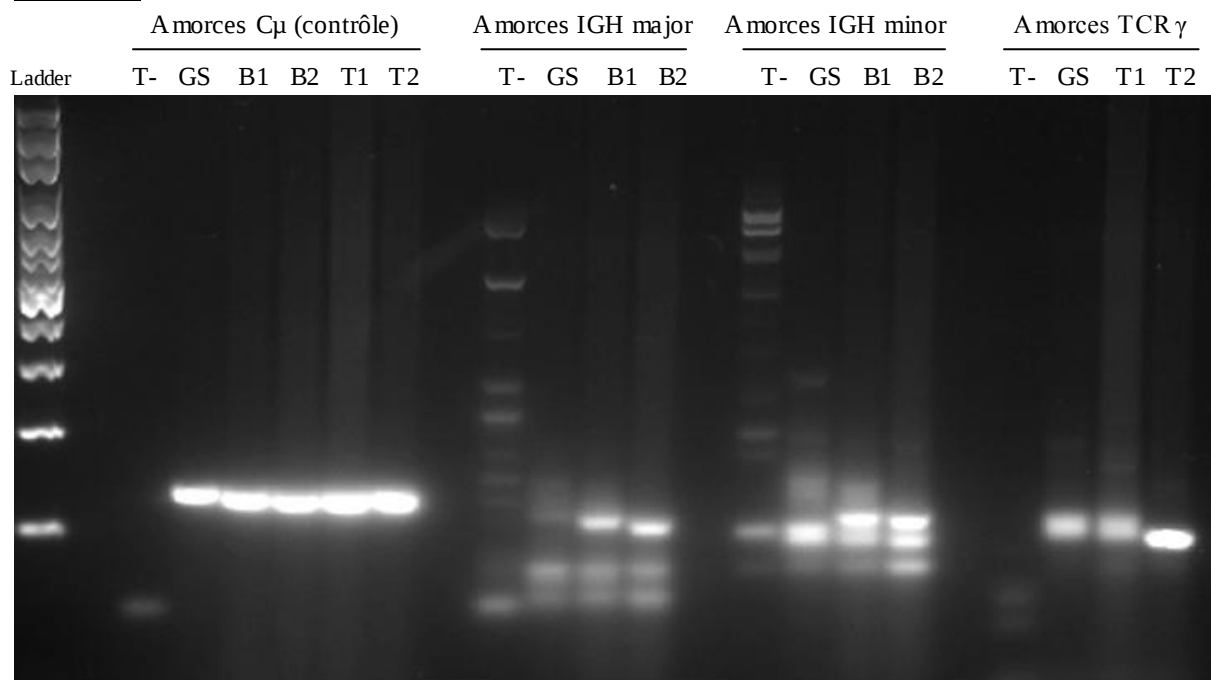


Figure 53. PARR avec cycles d'amplifications longs.

T- : témoin négatif (eau stérile), GS : ganglion sain (12-1128), B1 : lymphome B (05-0334), B2 : lymphome B (05-1660), T1 : lymphome T (05-0441), T2 : lymphome T (06-2042).

A l'issue de ce nouveau cycle, la séquence contrôle a été amplifiée pour tous les échantillons. Seuls des dimères d'amorces apparaissent pour le témoin négatif.

Comme pour le cycle précédent, des bandes spécifiques monoclonales sont détectées pour les lymphomes B et T avec les couples d'amorces IgH major et TCR γ respectivement. De multiples bandes sont obtenues avec le couple d'amorces IgH minor.

De nombreuses bandes non spécifiques de moins de 80 pb sont visualisées avec toutes les amorces à l'exception de C μ . Il s'agit très probablement de dimères d'amorces.

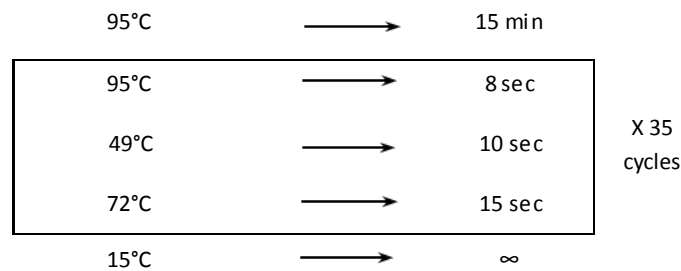
Conclusion:

Malgré l'ajustement de la durée du cycle, il n'est pas plus aisé de différencier le smear du ganglion sain et la bande du lymphome T 05-0441. Ce cycle ne présente donc aucun avantage. Il est plus long et moins précis que le précédent.

III.5.2. Cycle court

Protocole:

Dans un second temps, la durée des cycles fut diminuée en accord avec les recommandations du fournisseur de la Taq polymérase Solis Biodine.



Résultats:

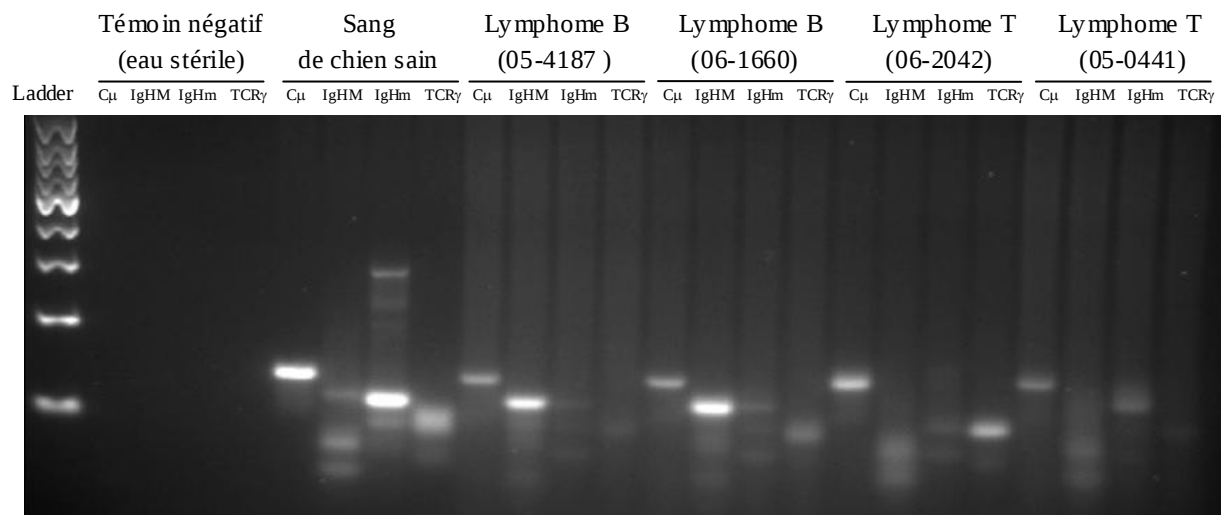


Figure 54. PARR avec cycles d'amplifications courts.

C μ : couple d'amorces contrôle C μ , IgHM : couple d'amorces IgH major, IgHm : couple d'amorces IgH minor, TCR γ : couple d'amorces TCR γ .

Le nombre de bandes non spécifiques ainsi que l'intensité de ces bandes sont diminués par rapport aux cycles précédents. Ainsi, les bandes spécifiques sont plus facilement identifiables. La séquence contrôle a été amplifiée pour tous les échantillons. Une bande forte monoclonale est obtenue avec IgH major à partir des lymphomes B 05-4187 et 06-1660 ainsi qu'avec TCR γ à partir du lymphome T 06-2042. Seuls des smears ont été obtenus avec le lymphome T 05-0441.

Une forte bande apparait avec les amorces IgH minor pour l'échantillon de sang de chien sain pour lequel seuls des smears ou de multiples faibles bandes sont attendues. Ceci peut potentiellement être expliqué par le fait que ce prélèvement est le seul non FFPE, d'où une activité de la Taq polymérase plus importante. Toutefois, le diagnostic ne s'en trouve pas affecté puisque la présence de multiples bandes concomitante exclut tout phénomène monoclonal.

Conclusion:

Ce cycle permet pour la première fois d'établir un semblant de diagnostic. Chacun des échantillons possède une séquence amplifiée par le couple d'amorces C μ et un couple d'amorces correspondant à son immunophénotypage à l'exception du lymphome T 05-0441.

Dilution des échantillons:

Afin d'augmenter la résolution du test concernant cet échantillon, un nouvel essai a été réalisé en conservant les paramètres du cycle précédant et en diluant au 1/5 les échantillons.

Malgré la dilution permettant de s'affranchir partiellement de l'effet des inhibiteurs de la PCR contenus dans la paraffine, aucune amélioration n'est notée concernant le lymphome T 05-441 (résultats non présentés).

Augmentation du nombre d'échantillons:

Avant de conclure à une altération de la qualité de l'ADN de l'échantillon 05-0441, le test PARR est réalisé sur davantage d'échantillons. En cas d'absence d'amplification avec TCR γ à partir d'autres échantillons, celle-ci pourrait alors être imputable au protocole.

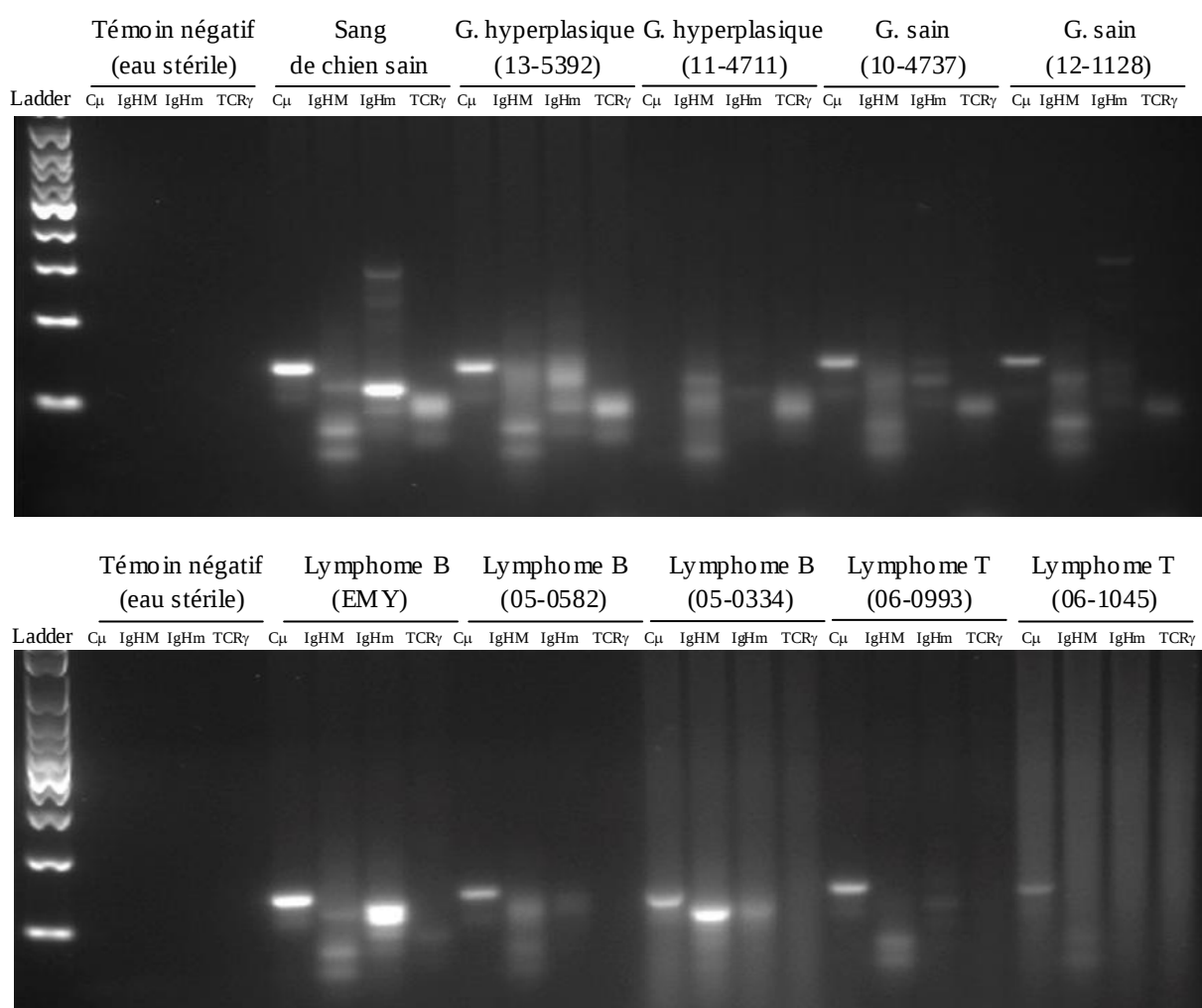


Figure 55. PARR avec cycles d'amplifications courts (2)

G. : ganglion, C μ : couple d'amorces contrôle C μ , IgHM : couple d'amorces IgH major, IgHm : couple d'amorces IgH minor, TCR γ : couple d'amorces TCR γ .

Les résultats révèlent une absence d'amplification par le couple d'amorces TCR γ pour les lymphomes B EMY, 05-0582 et 05-0334 et les lymphomes T 06-0993 et 06-1045.

Conclusion:

Il semble nécessaire d'ajuster certains paramètres de la PARR afin de permettre l'amplification des séquences cibles avec le couple d'amorces TCR γ .

III.6. Second gradient de température

La température d'hybridation précédemment utilisée fut déterminée pour un cycle plus long que ce dernier. L'absence d'amplification des séquences spécifiques par le couple d'amorces TCR γ pourrait être expliquée par une mauvaise adaptation de la température d'hybridation pour un cycle court. Un nouveau gradient de température est réalisé.

Protocole:

IgH minor et TCR γ sont les couples d'amorces pour lesquels les résultats sont pour le moment insatisfaisants. Il n'est cependant pas possible d'attribuer ce défaut d'amplification à la spécificité du couple d'amorces (d'autant plus avec IgH minor) ou à des paramètres de PARR mal ajustés.

Un gradient de température entre 55°C à 48°C est réalisé avec le couple d'amorces IgH minor à partir d'un témoin négatif et des échantillons de sang de chien sain, de ganglion hyperplasique (13-5392E), de lymphome B (05-0334) et T (05-0441).

Un second gradient de température entre 54,6°C à 48°C est réalisé avec le couple d'amorces TCR γ à partir d'un témoin négatif et des échantillons de sang de chien sain, de ganglion sain (12-1128), de lymphome B (05-0334) et T (05-0441).

La révélation des produits de PCR amplifiés avec TCR γ a été réalisée dans une cuve d'électrophorèse de 400 mL, une électrode de la cuve de 200 mL n'étant plus en état de marche. L'électrophorèse a donc eu lieu sur un gel de 400 mL avec 35 μ L de Gel red à la place de 20 μ L. Le pouvoir discriminant du gel d'électrophorèse étant dépendant du temps de migration et de la réticulation de ce gel (Körkkö et al., 1998), la concentration du gel a été augmentée à 2,5%. Dix grammes d'agarose ont été dilués dans 400 mL de TBE.

Résultats:

IgH minor:

Le couple d'amorces IgH minor permet l'obtention de larges bandes polyclonales ou de smears pour chacun des échantillons pour les températures entre 55°C et 51,8°C. Entre 49,4°C et 48°C, une bande spécifique monoclonale de 120 pb apparaît à partir du lymphome B et les bandes et smears détectés à partir des autres échantillons sont moins intenses. Les résultats sont ainsi moins équivoques (résultats non présentés).

TCR γ :

Aucune séquence amplifiée par la PARR n'est révélée à partir de l'échantillon 05-0441. Ceci est très certainement imputable à une mauvaise qualité de l'ADN de l'échantillon.

Seuls des smears ont été obtenus quel que soit l'échantillon non spécifique et la température d'hybridation. Ceux-ci sont d'autant plus intenses pour les températures 48°C et 49,4°C.

Conclusion:

La température d'hybridation optimale serait donc autour de 49°C pour les couples d'amorces IgH minor et TRC γ , conformément aux manipulations précédentes.

III.7. Fluorochrome

Dans l'optique d'améliorer la résolution d'image, un second fluorochrome, incorporé au gel d'électrophorèse, est testé. Tout comme le GelRed précédemment utilisé, le SafeView est un marqueur d'acide nucléique. Ces deux composés se fixent sur l'ADN et le révèlent par émission de la lumière de fluorescence dans le transilluminateur. Le SafeView est réputé pour être plus précis et favoriser la distinction entre les bandes et les smears.

III.7.1. SafeView dans une cuve de 400 mL

Protocole:

La manipulation est réalisée dans une cuve d'électrophorèse de 400 mL pour les raisons citées en précédemment. Le gel est préparé avec 10 g d'agarose et 20 μ L de SafeView dans 400 mL de TBE. La PARR est réalisée à partir d'un témoin négatif, d'échantillons de sang de chien sain, de ganglion hyperplasique (13-5392E), de lymphomes B (EMY, 05-0334) et T (05-0441) avec les couples d'amorces C μ , IgH major, IgH minor et TCR γ .

Résultats:

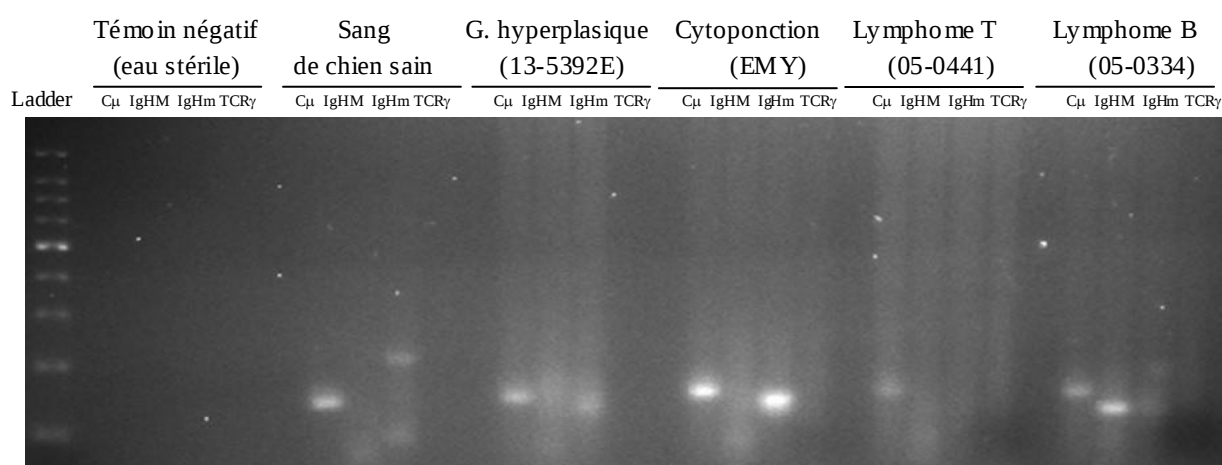


Figure 56. PARR avec le SafeView en tant que fluorochrome dans une cuve d'électrophorèse de 400 mL.

G. : ganglion, C μ : couple d'amorces contrôle C μ , IgHM : couple d'amorces IgH major, IgHm : couple d'amorces IgH minor, TCR γ : couple d'amorces TCR γ .

Après révélation des produits de PARR, un traitement informatique de l'image fut nécessaire (saturation, correction gamma) afin de diminuer le bruit de fond, d'où la mauvaise visualisation des marqueurs de taille moléculaire (ladder). Les bandes obtenues sont cependant plus nettes. La distinction avec un smear est désormais plus facile.

Des bandes spécifiques sont obtenues pour les lymphomes B (EMY, 05-0334) tandis qu'aucune séquence spécifique n'a été amplifiée pour le lymphome T (05-0441). Une bande

non spécifique est apparue à partir de l'échantillon de sang de chien sain avec le couple d'amorces IgH minor (faux-positif).

Conclusion:

La différenciation entre les bandes et les smears est plus aisée avec le SafeView. Le fort bruit de fond initialement présent pourrait être dû à une mauvaise répartition du fluorochrome dans la cuve d'électrophorèse lors de sa préparation. Un nouvel essai dans une cuve plus petite a été réalisé dès réparation de la cuve de 200 mL.

III.7.2. SafeView dans une cuve de 200 mL

Protocole:

Le nouveau gel est préparé avec 4,4 g d'agarose et 20 µL de SafeView dans 200 mL de TBE puis coulé dans la cuve d'électrophorèse de 200 mL. Le protocole précédent est repris avec un nouveau lymphome T (06-1045 à la place de 05-0441).

Résultats:

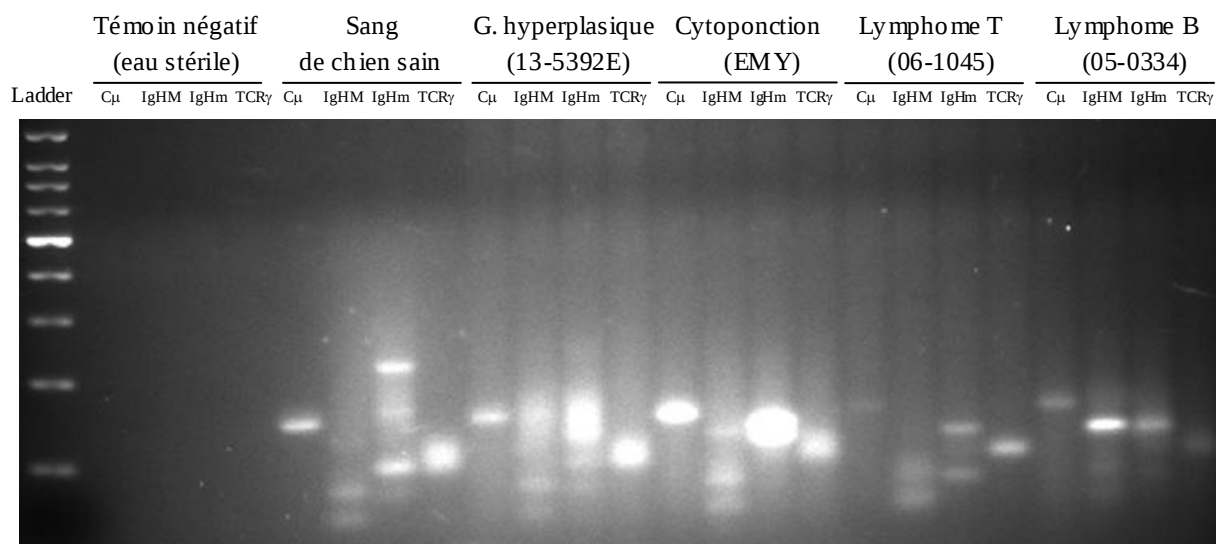


Figure 57. PARR avec le SafeView en tant que fluorochrome dans une cuve d'électrophorèse de 200 mL.

G. : ganglion, Cµ : couple d'amorces contrôle Cµ, IgHM : couple d'amorces IgH major, IgHm : couple d'amorces IgH minor, TCRγ : couple d'amorces TCRγ.

Le gel obtenu avec les nouvelles concentration et répartition du fluorochrome est très différent. Les bandes et smears sont plus intenses et de nouvelles amplifications sont dévoilées (un smear à partir du lymphome B (EMY) avec les amorces TCRγ, des bandes polyclonales à partir du lymphome B (EMY) avec les amorces IgH major et du lymphome T (05-0441) avec les amorces IgH minor). Toutefois, le bruit de fond est encore important au détriment de la résolution de l'image.

Conclusion:

Le SafeView révèle davantage les bandes lorsqu'il est fortement concentré et augmente le contraste avec les bandes à faible concentration lorsqu'il est faiblement concentré. Ceci permet en règle générale de faciliter la distinction entre les bandes vraies et les smears ou les bandes non spécifiques. Cependant, le bruit de fond dont il est responsable détériore la qualité de l'image. Le GelRed bien que moins précis est donc le fluorochrome qui sera conservé pour la suite des expériences.

III.8. Amorces

La qualité du test repose en grande partie sur la capacité des amorces à cibler les séquences du génome réarrangé codant les récepteurs des lymphocytes. Un nouveau protocole est mis en place avec les amorces mises au point par Yagihara et al., 2006 et Tamura et al., 2006.

Protocole:

Les PARR sont réalisées à partir d'un témoin négatif, d'échantillons de sang de chien sain, de ganglion hyperplasique (13-5392E), de lymphomes B (05-1660) et T (06-2042) avec les couples d'amorces V γ a-J γ a, V γ a-J γ b, V γ b-J γ a, V γ b-J γ b et IgH Tamura. Le couple d'amorces contrôle c-Kit est également intégrée à l'expérience.

Un gradient de température d'hybridation entre 60°C et 48°C est réalisé pour chacun des couples d'amorces.

Résultats:

V γ a-J γ a:

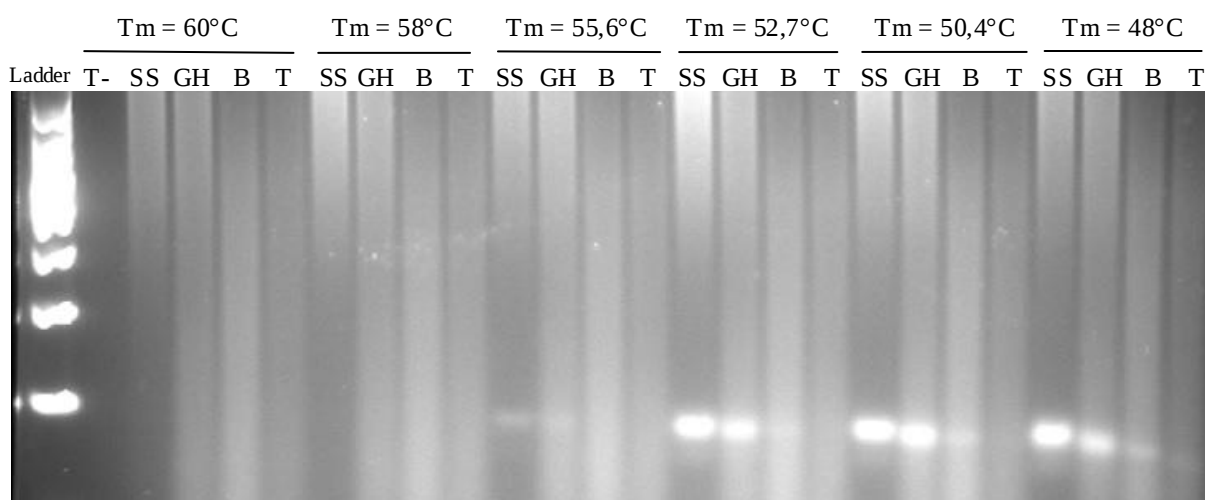


Figure 58. PARR avec le couple d'amorces V γ a-J γ a.

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GH : lymphome hyperplasique (13-5392E), B : lymphome B (05-1660), T : lymphome T (06-2042).

Des séquences de 80 pb ont été amplifiées en grande quantité à partir des échantillons de sang de chien sain et de ganglion hyperplasique (13-5392) et en faible quantité à partir de l'échantillon de lymphomes B (05-1660) pour des températures d'hybridation variant entre 52,7°C et 48°C. Cependant, aucune amplification n'a eu lieu pour le lymphome d'intérêt T.

V γ a-J γ b:

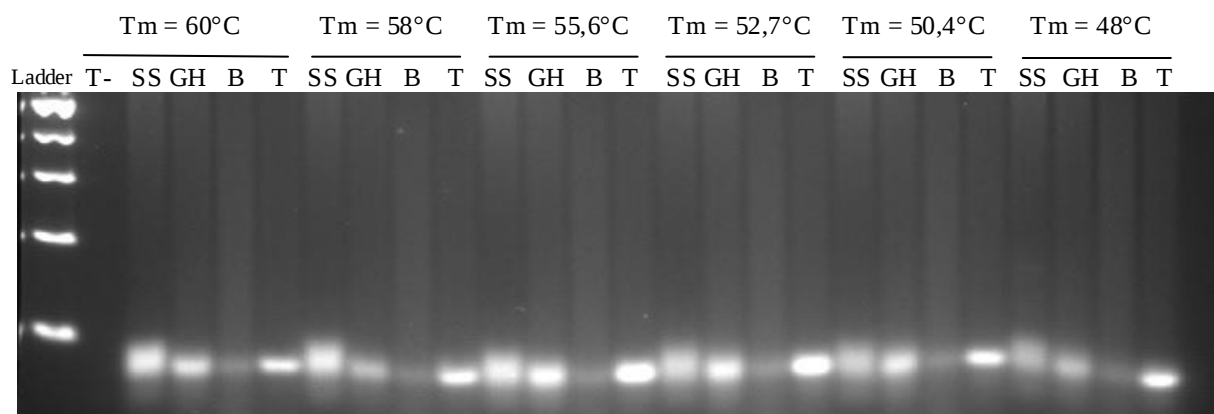


Figure 59. PARR avec le couple d'amorces V γ a-J γ b.

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GH : lymphome hyperplasique (13-5392), B : lymphome B (05-1660), T : lymphome T (06-2042).

Une bande nette de 80 pb est obtenue à partir de l'échantillon de lymphome T (06-2042) quelque soit la température d'hybridation. Des smears sont obtenus à partir des autres échantillons. L'intensité de ces smears décroît avec l'abaissement de la température d'hybridation. La température d'hybridation optimale semble être 48°C.

Un second gradient de température a été réalisé entre 70°C à 60°C. Les résultats obtenus ne présentent pas d'intérêt du fait d'une diminution de l'intensité des bandes.

V γ b-J γ a:

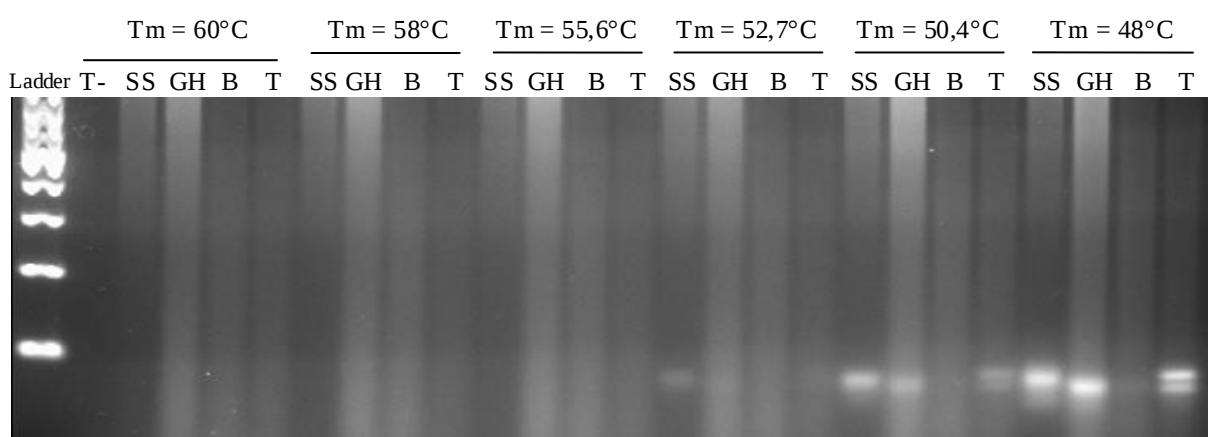


Figure 60. PARR avec le couple d'amorces V γ b-J γ a.

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GH : lymphome hyperplasique (13-5392), B : lymphome B (05-1660), T : lymphome T (06-2042).

Une faible bande de 80 pb apparaît à partir de l'échantillon de sang de chien sain à 52,7°C. Des bandes de 80 pb et de 70 pb sont visualisables à partir des échantillons de sang de chien sain et de ganglion hyperplasique (13-5392), respectivement. Un réarrangement biclonal caractérisé par la présence de deux bandes distinctes de 80 pb et 70 pb est détecté à partir de l'échantillon de lymphome T (06-2042) à 50,4°C et 48°C. L'intensité de la fluorescence et la résolution sont optimales pour 48°C.

Vyb-Jyb:

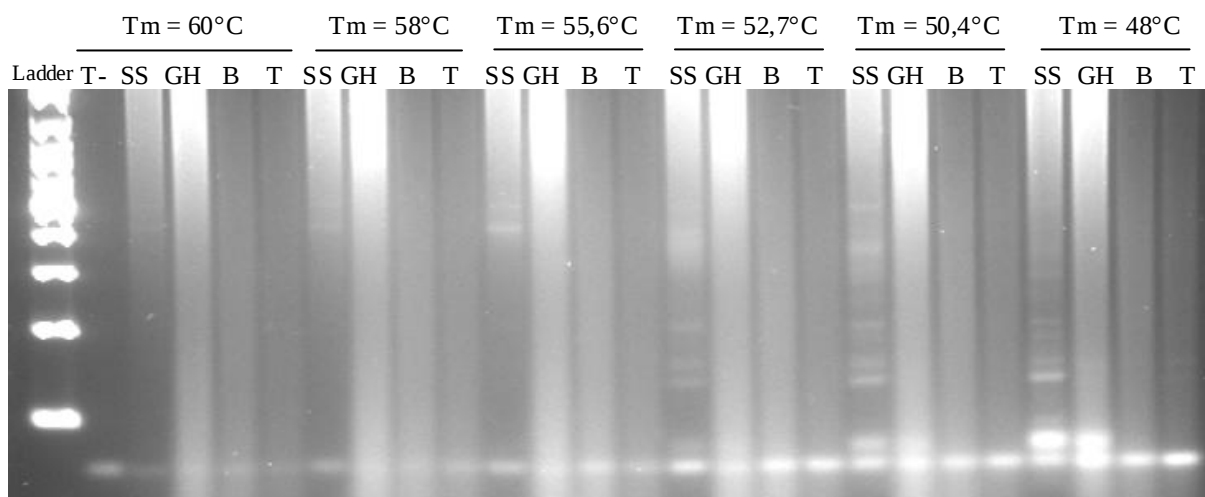


Figure 61. PARR avec le couple d'amorces Vyb-Jyb.

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GH : lymphome hyperplasique (13-5392), B : lymphome B (05-1660), T : lymphome T (06-2042).

Des dimères d'amorces sont visualisables pour chacun des échantillons. De multiples bandes sont perceptibles pour l'échantillon de sang de chien sain à toutes les températures. Une bande de 80 pb apparaît pour l'échantillon de ganglion hyperplasique (13-5392) en deçà de la température d'hybridation de 52,7°C. L'intensité de la fluorescence des bandes augmente avec l'abaissement de la température d'hybridation. Aucune amplification n'a eu lieu pour les échantillons de lymphome T (06-2042).

Un second gradient de température a été réalisé entre 70°C à 60°C. Les résultats obtenus ne sont pas exploitable du fait d'un bruit de fond important et de nombreux dimères d'amorce.

IgH Tamura:

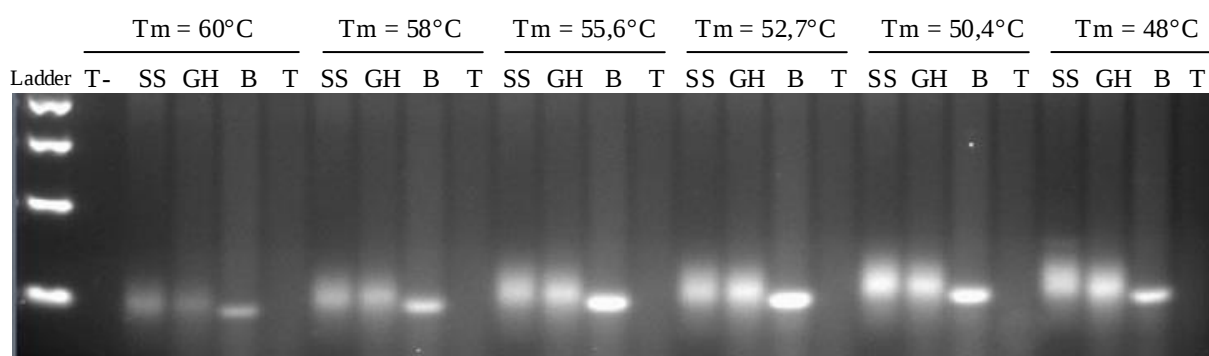


Figure 62. PARR avec le couple d'amorces IgH Tamura.

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GH : lymphome hyperplasique (13-5392), B : lymphome B (05-1660), T : lymphome T (06-2042).

Des smears sont obtenus pour les échantillons de sang de chien sain et de ganglion hyperplasique (13-5392). La séquence de 80 pb spécifique du couple d'amorces est amplifiée à partir de l'échantillon de lymphome B (05-1660) quelque soit la température d'hybridation. Aucune séquence n'a été amplifiée à partir de l'échantillon de lymphome T (06-2042). L'intensité des bandes et smears augmente avec l'abaissement de la température d'hybridation. La température d'hybridation optimale semble être 48°C.

c-Kit:

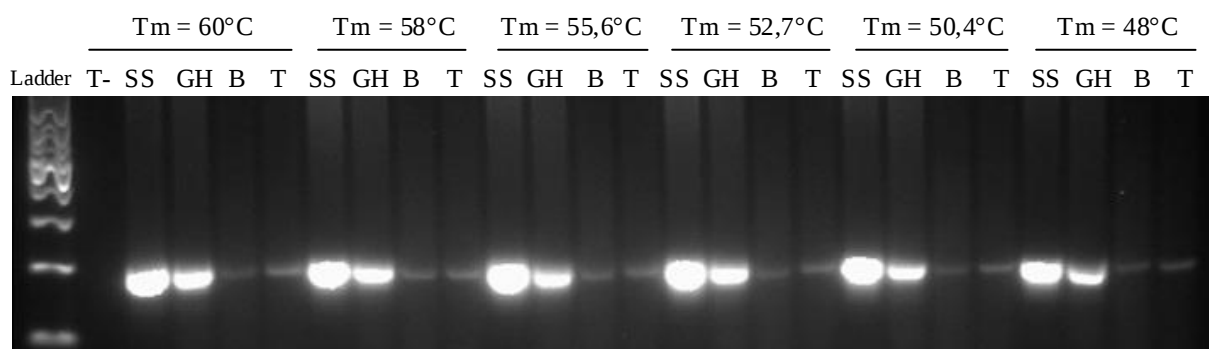


Figure 63. PARR avec le couple d'amorces contrôle c-Kit.

T- : témoin négatif (eau stérile), SS : sang de chien sain, GH : lymphome hyperplasique (13-5392), B : lymphome B (05-1660), T : lymphome T (06-2042).

Des bandes de forte intensité pour les échantillons de sang de chien sain et de ganglion hyperplasique (13-5392) et de faible intensité pour les échantillons de lymphomes B (05-1660) et T (06-2042) sont obtenus quelque soit la température d'hybridation.

Conclusion:

Les couples d'amorces V γ a-J γ a et V γ b-J γ b ne sont pas suffisamment spécifiques des lymphomes T et ne seront pas retenus pour la suite des expériences. Les couples d'amorces V γ a-J γ b et J γ b-J γ a sont conservés avec une température d'hybridation fixée à 48°C.

IV. Validation du protocole mis en place

IV.1. Protocole

A l'issue des manipulations précédentes, le protocole suivant a été retenu et nommé protocole "PARR AMaROC":

- Echantillons: 2 μ L d'ADN d'une concentration comprise entre 29 et 641,9 ng/ μ L (cf. Tableau 18) ou 2 μ L d'eau stérile pour les témoins négatifs
- Mix et Taq polymérase: HOT FIREPol[®] Blend 5X Master Mix Ready to Load (Solis BioDyne, Estonie)
- Couples d'amorces:
 - Contrôle: C μ et c-Kit
 - Lymphome B: IgH major, IgH minor et IgH Tamura
 - Lymphome T: TCR Burnett, TCR V γ a-J γ b, TCR V γ b-J γ a
- Cycles de PCR:

- Pour les amorces C μ , IgH major, IgH minor et TCR Burnett:

95°C	→	15 min	
95°C	→	8 sec	X 35 cycles
49°C	→	10 sec	
72°C	→	15 sec	
15°C	→	∞	

- Pour les amorces c-Kit, IgH Tamura, TCR V α J β , TCR V β J α :

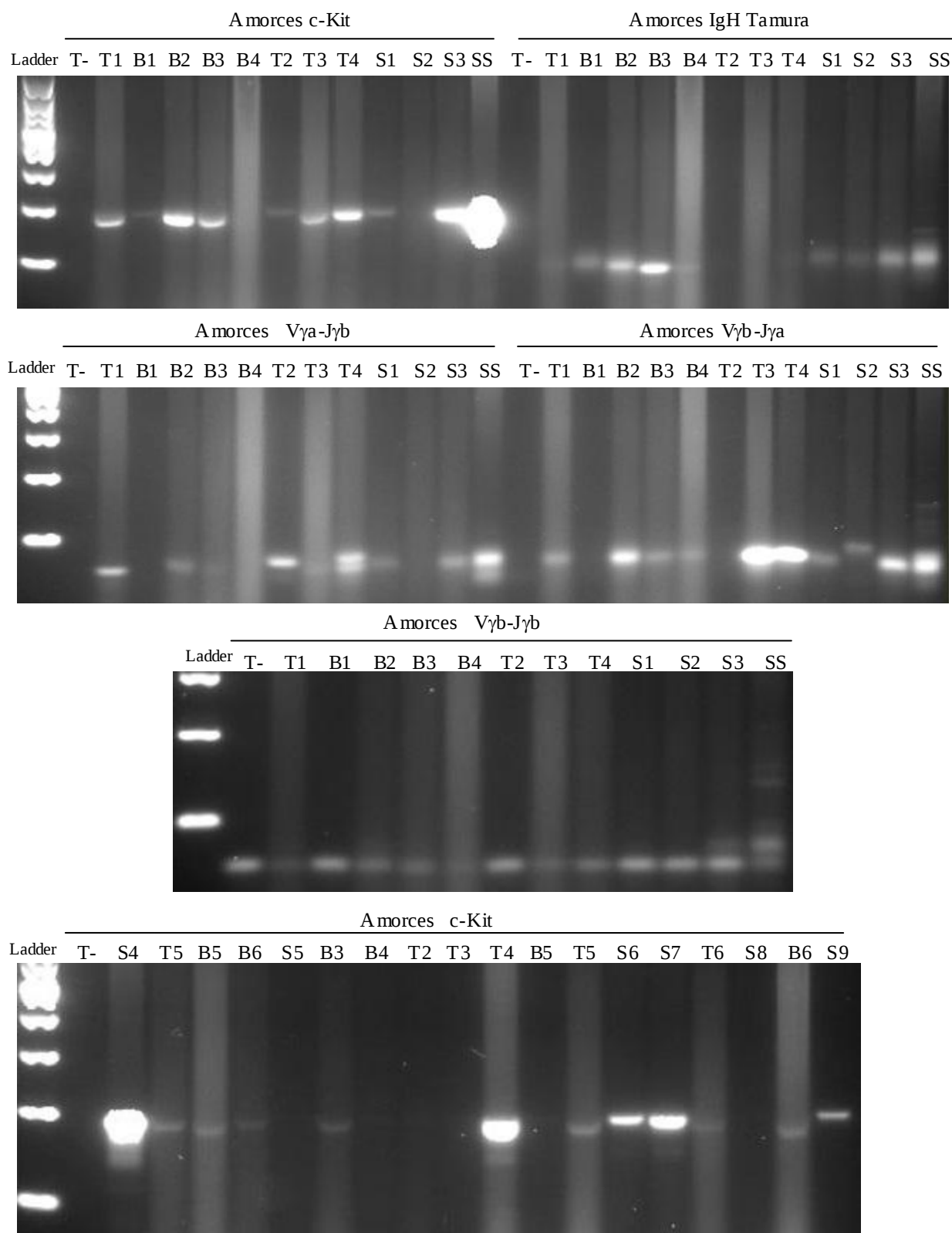
95°C	→	15 min	
95°C	→	45 sec	X 30 cycles
48°C	→	30 sec	
72°C	→	20 sec	
15°C	→	∞	

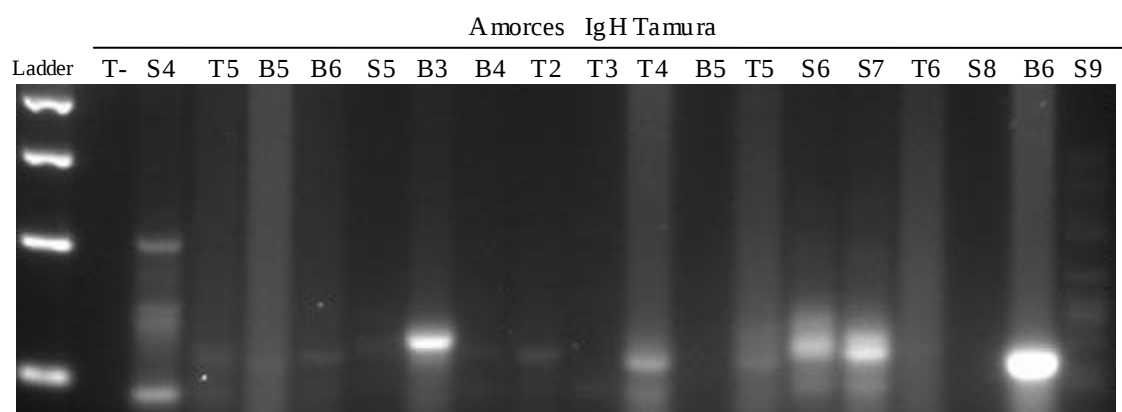
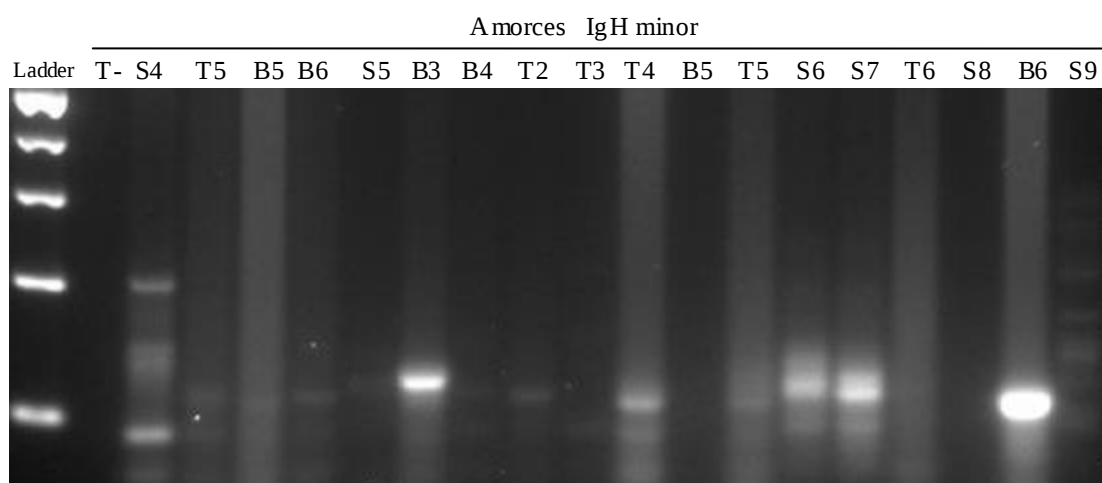
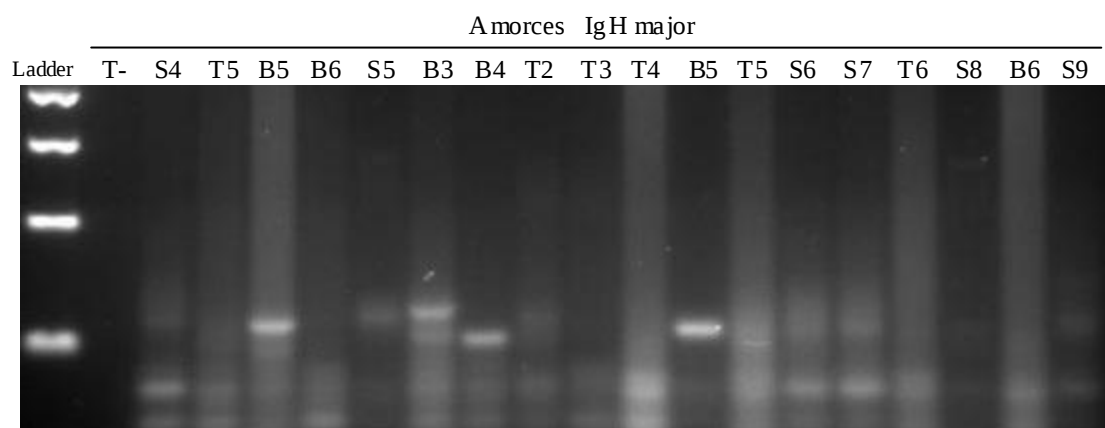
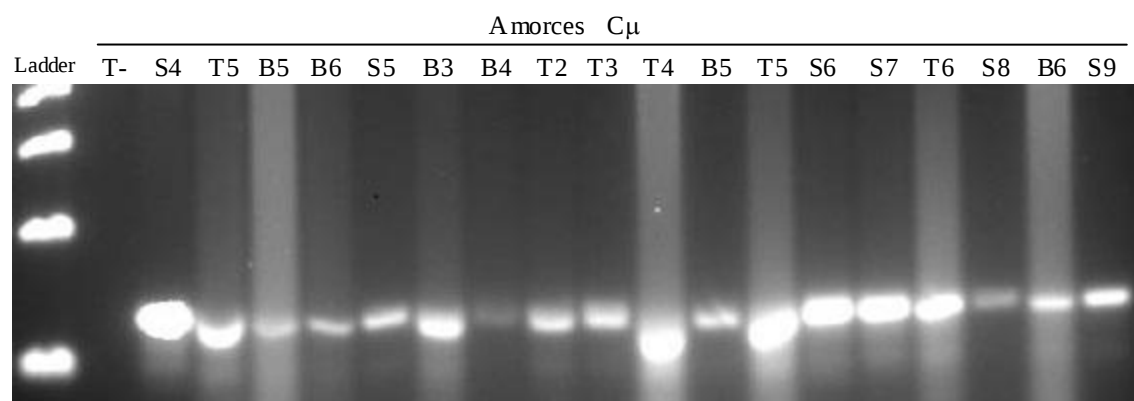
- Electrophorèse:
 - Préparation du gel d'agarose à 2,2%: 4,4 g d'agarose et 20 μ L de GelRed dans 200 mL de TBE 1X
 - Dépôt des échantillons: 20 μ L d'échantillons par puits (eau stérile pour le témoin négatif)
 - Migration pendant 2h30 à 120 volts

IV.2. Echantillons FFPE

Le protocole "PARR AMaROC" a été, dans un premier temps, appliqué à tous les échantillons FFPE disponibles.

IV.2.1. Résultats de la PARR





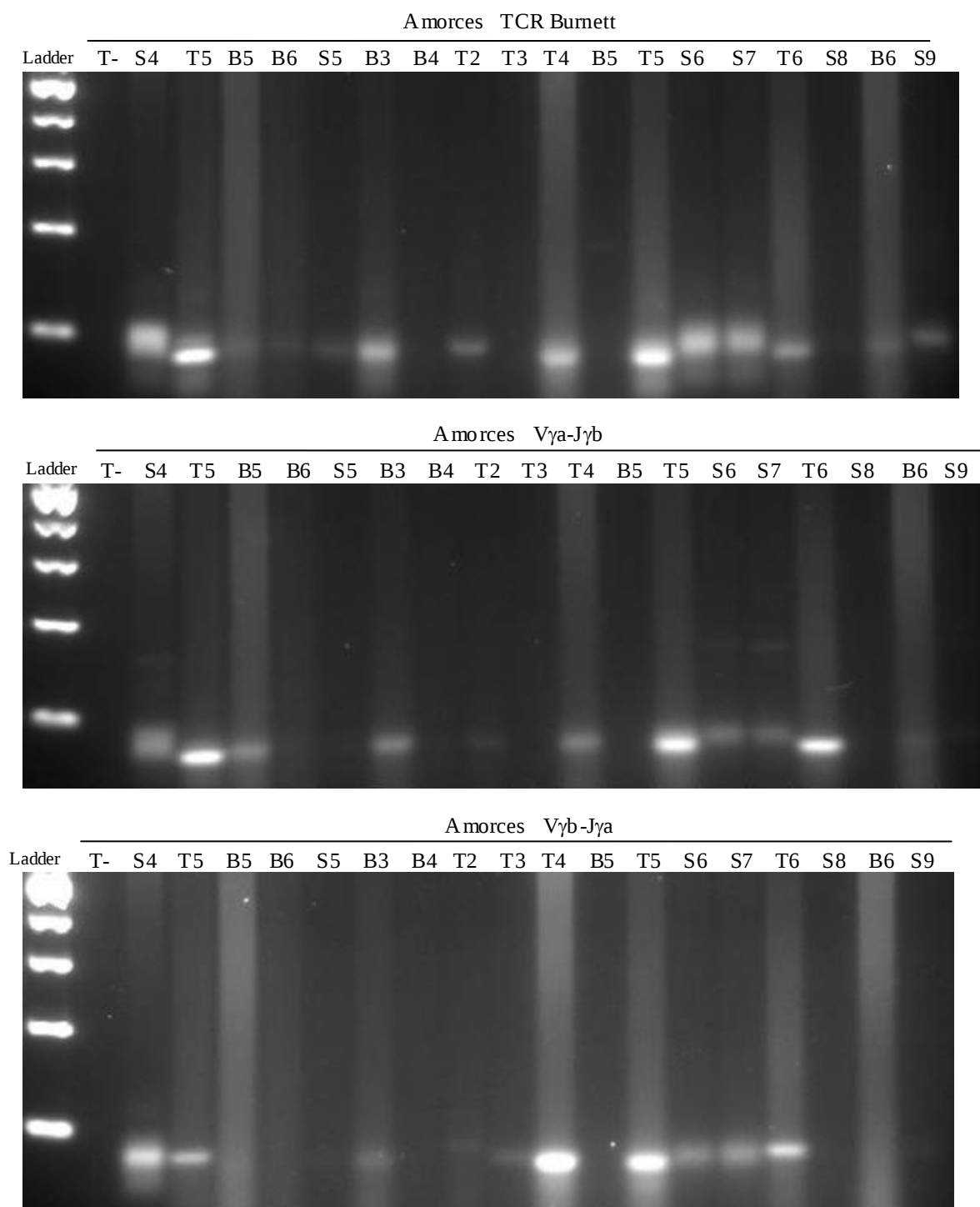


Figure 64. PARR réalisée à partir des échantillons FFPE

(T-) : témoin négatif (eau stérile); (B1): lymphome B 05-0582; (B2): 05-0334; (B3): 05-1660; (B4): 05-4187; (B5): 06-4055; (B6): 07-2050; (S1): 08-5560; (B7): 06-4322; (B8): 06-2989; (B9): 06-4619; (B10): 06-4132; (T1): lymphome T 05-0441, (T2): 06-0993; (T3): 06-1045, (T4): 06-2042; (T5): 09-1206; (T6): 09-5055B; (T7): 08-1050; (T8): 08-551; (T9): 09-1710; (T10): 09-2655; (S1): ganglion sain ou hyperplasique 10-4737, (S2): 11-4711; (S3) : 12-1128; (S4): 13-5392E; (S5): 08-5560; (S6): 14-1642; (S7): 14-1798; (S8): 08-5559; (S9): 14-1804; SS: sang de chien sain.

Tableau 20. Résultats de la PARR obtenus à partir des échantillons FFPE avec le protocole "PARR AMaROC"

Echantillons FFPE		Amorces contrôle		Amorces lymphome B			Amorces lymphome T		
		Cμ	c-Kit	IGH Major Burnett	IGH Minor Burnett	IgH Tamura	TCR Burnett	TCR Vγa-Jγb	TCR Vγb-Jγa
Ganglion sain	12-1128	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Smear 120 pb	Smear 100 pb	Smear 90 pb	Bande 80 pb	Smear 80 pb
	10-4737	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Smear 120 et 130 pb	Smear 100 pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb	Smear 80 pb
Ganglion hyperplasique	11-4711	Rien	Rien	Smear 120 pb	Smear 120 pb	Smear 100 pb	Smear 90 pb	Smear 90 pb	Rien
	13-5392E	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Smear 90 et 120 pb	Smear 95pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb	Bande ou smear 70 pb
Ganglion sain ou hyperplasique	08-5560	Bande 130 pb	Rien	Smear 120 pb	Smear 120 pb	Rien	Smear 90 pb	Rien	Rien
	14-1642	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Smear 120 pb	Smear 100 pb	Smear 100 pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb
	14-1798	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Bandes 110 et 120 pb	Smear 100 pb	Smear 100 pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb
	08-5559	Bande 130 pb	Rien	Rien	Rien	Rien	Rien	Rien	Rien
	14-1804	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Smear	Rien	Smear 100 pb	Rien	Rien
Sang de chien sain	-	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear	Smear	Smear	Smear	Smear	Smear
Lymphome B	05-0582	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Smear 120 pb	Bande ou smear 100 pb	Rien	Rien	Rien
	05-0334	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Smear 120 pb	Bande 90 pb	Rien	Bande 80 pb	Smear 80 pb
	05-1660	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Smear 120 pb	Bande 90 pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb	Rien
	05-4187	Bande 130 pb	Rien	Bande 120 pb	Rien	Rien	Rien	Smear 80 pb	Rien
	06-4055	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Rien	Bande ou smear 100 pb	Rien	Smear 90 pb	Rien
	07-2050	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Smear 120 pb	Bande 100 pb	Rien	Rien	Rien

Echantillons FFPE		Amorces contrôle		Amorces lymphome B			Amorces lymphome T		
		Cμ	c-Kit	IGH Major Burnett	IGH Minor Burnett	IgH Tamura	TCR Burnett	TCR Vγa-Jγb	TCR Vγb-Jγa
Lymphome B	06-4322	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bandes 110 et 120 pb	Bande 120 pb	Rien	Smear 90 pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb
	06-2989	Bande 130 pb	Rien	Bande 110 pb	Rien	Bande 100 pb	Rien	Rien	Rien
	06-4619	Bande 130 pb	Rien	Bande 120 pb	Rien	Bande ou smear 100 pb	Rien	Rien	Rien
	06-4132	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Bande 110 pb	Rien	Smear 90 pb	Rien	Rien
Lymphome T	05-0441	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 70 et 80 pb	Smear 120 pb	Rien	Rien	Smear 80 pb	Bande 70 pb
	06-0993	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Smear 120 pb	Rien	Rien	Rien	Bande 80 pb
	06-1045	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Rien	Rien	Rien	Bande 80 pb	Rien
	06-2042	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 70 et 80 pb	Rien	Rien	Bande 90 pb	Bande 80 pb	Bande 70 et 80 pb
	09-1206	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Smear 120 pb	Rien	Bande 90 pb	Bande 80 pb	Bande 80 pb
	09-5055B	Bande 130 pb	Rien	Rien	Smear 120 pb	Rien	Bande ou smear 90 pb	Bande ou smear 90 pb	Bande ou smear 90 pb
	08-1050	Bande 130 pb	Rien	Rien	Rien	Rien	Rien	Rien	Smear 80 pb
	08-0551	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Bande ou smear 110 pb	Rien	Bande ou smear 90 pb	Smear 90 pb	Bande 80 pb
	09-1710	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Smear 120 pb	Smear 100 pb	Bande 90 pb	Bande 80 pb	Bande 80 pb
	09-2655	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Rien	Rien	Bande ou smear 90 pb	Bande 80 pb	Bande 80 pb

(gris clair): résultats correspondant à l'immunophénotype à la nature et à l'immunophénotype des échantillons analysés (vrai-positif ou vrai-négatif); (blanc): résultats ne correspondant pas à l'immunophénotype à la nature et à l'immunophénotype des échantillons analysés (faux-positif ou faux-négatif); (gras): bandes monoclonales ou polyclonales obtenues à l'issue de la PARR.

Aucune amplification n'est obtenue à partir des contrôles négatifs (eau stérile), ce qui signifie que les échantillons et les réactifs de la PCR n'ont pas été contaminés. Chaque produit amplifié à partir des autres échantillons provient bien de l'ADN de ces échantillons.

Aucune amplification n'est obtenue à partir de l'échantillon 11-4711 avec les couples d'amorces contrôle, probablement en raison d'une dégradation trop importante de l'ADN. Il n'est donc pas possible d'interpréter les résultats obtenus.

De même, aucun fragment n'est amplifié avec le couple d'amorces contrôle c-Ki à partir des échantillons 08-5560, 08-5559, 05-4187, 06-2989, 06-4619, 09-5055B et 08-1050, faisant état d'une dégradation partielle de l'ADN de ces échantillons. Cela pourrait suffire à expliquer l'absence d'amplification avec les couples d'amorces spécifiques pour les échantillons 09-5055B et 08-1050. Une amplification est obtenue à partir de chacun des échantillons sus-cités avec le couple d'amorces contrôle Cμ. Ce dernier manquerait donc de sensibilité pour la détection de la dégradation de l'ADN.

Dans certains cas, il n'est pas possible de différencier un smear d'une bande. Dans ce cas, le résultat est considéré comme négatif, étant donné que le manipulateur ne peut conclure avec certitude.

IV.2.2. Analyse statistique des résultats

Les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative du protocole "PARR AMaROC" sont évaluées dans cette étude en comparant les résultats obtenus avec ceux de l'immunohistochimie, considérée comme le gold standard des méthodes diagnostiques du lymphome.

- La sensibilité de la PARR est la probabilité que le test détecte la clonalité des réarrangements de lymphocytes néoplasiques ainsi que leur immunophénotypage chez les chiens atteints de lymphome. Plus la sensibilité est élevée, plus l'intérêt de la PARR en tant qu'outil de suivi thérapeutique des lymphomes est grand.

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FN}}$$

VP = (Vrai Positif) réarrangements clonaux de lymphocytes B ou T détectés chez un chien atteint de lymphome B ou T, respectivement

FN = (Faux Négatif) aucun réarrangement clonal des lymphocytes détecté chez un chien atteint de lymphome.

- La spécificité de la PARR est la probabilité que le test ne détecte aucune clonalité des réarrangements de lymphocytes chez les chiens non atteints de lymphome. Elle correspond également à la probabilité que le test ne détecte aucune clonalité des réarrangements de lymphocytes T chez les chiens atteints de lymphome B, et réciproquement.

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

VN = (Vrai Négatif) aucun réarrangement clonal des lymphocytes détecté chez un chien non atteint de lymphome ou aucun réarrangement clonal des lymphocytes B ou T détecté chez un chien atteint de lymphome T ou B, respectivement

FP = (Faux Positif) réarrangements clonaux de lymphocytes B ou T détectés chez un chien non atteint de lymphome ou réarrangements clonaux de lymphocytes B ou T détectés chez un chien atteint de lymphome T ou B respectivement.

En pratique, plus la spécificité de la PARR est grande, plus un résultat positif est susceptible d'être correct.

- La valeur prédictive positive de la PARR est la probabilité que le chien soit atteint d'un lymphome (B ou T) lorsqu'une clonalité des réarrangements de lymphocytes (B ou T) est détectée.

$$\text{Valeur prédictive positive} = \frac{VP}{VP + FP}$$

- La valeur prédictive négative de la PARR est la probabilité que le chien ne soit pas atteint de lymphome lorsqu'aucune clonalité des réarrangements de lymphocytes n'est détectée.

$$\text{Valeur prédictive négative} = \frac{VN}{VN + FN}$$

Le test exact de Fisher est le test statistique utilisé dans cette étude (en raison d'effectifs inférieurs à 5). Les résultats de la PARR sont considérés comme statistiquement significatifs pour une $p\text{-value} < 5.10^{-2}$.

Les tableaux de contingence nécessaires au calcul des valeurs statistiques sont dressés à partir des résultats consignés dans le Tableau 20 (cf. Tableau 21).

Tableau 21. Tableaux de contingence des résultats de PARR à partir des échantillons FFPE

	PARR (lymphome)	
	Positif	Négatif
Lymphome	17 (VP)	3 (FN)
Témoin négatif	2 (FP)	7 (VN)

P-value (Fisher exact) = 2.10^{-3}

	PARR (lymphome B)	
	Positif	Négatif
Lymphome B	9	1
Autre	1	18

P-value (Fisher exact) = 1.10^{-5}
(Autre) : Témoin négatif et lymphome T

	PARR (lymphome T)	
	Positif	Négatif
Lymphome T	8	2
Autre	2	17

P-value (Fisher exact) = 4.10^{-4}
(Autre) : Témoin négatif et lymphome B

Les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative du protocole "PARR AMaROC" pour le diagnostic du lymphome canin en général, du

lymphome B et du lymphome T en particulier, sont calculées à l'aide de ces tableaux de contingence.

Tableau 22. Sensibilité et spécificité de la PARR à partir des échantillons FFPE

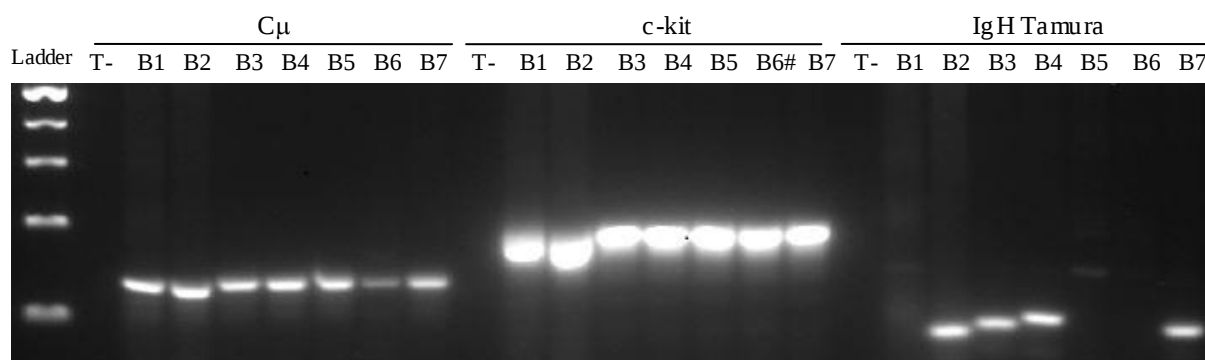
	Echantillons FFPE		
	Lymphome	Lymphome B	Lymphome T
Sensibilité	85%	90%	80%
Spécificité	77,8%	94,7%	89,5%
Valeur prédictive positive	89,5%	90%	80%
Valeur prédictive négative	70%	94,7%	89,5%
P-value (Fisher exact)	2.10^{-3}	1.10^{-5}	4.10^{-4}

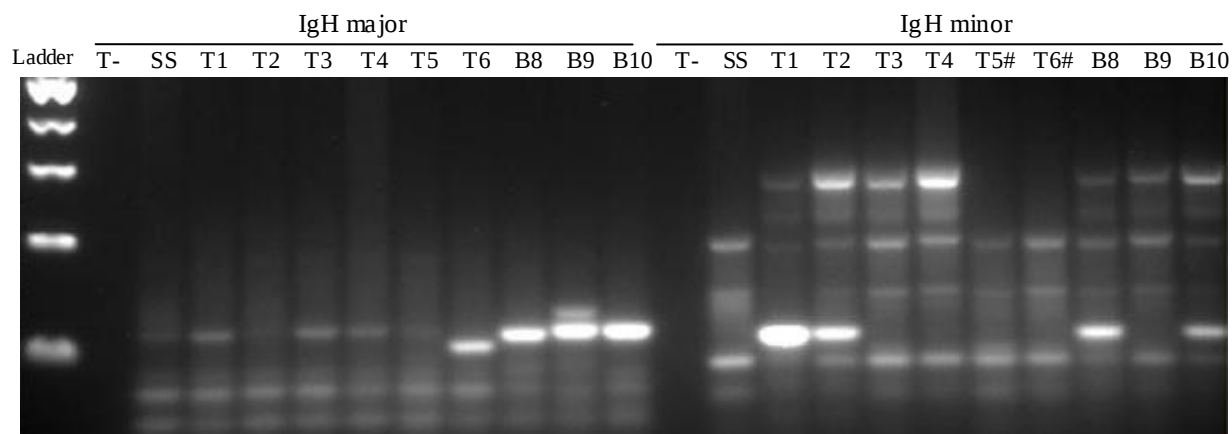
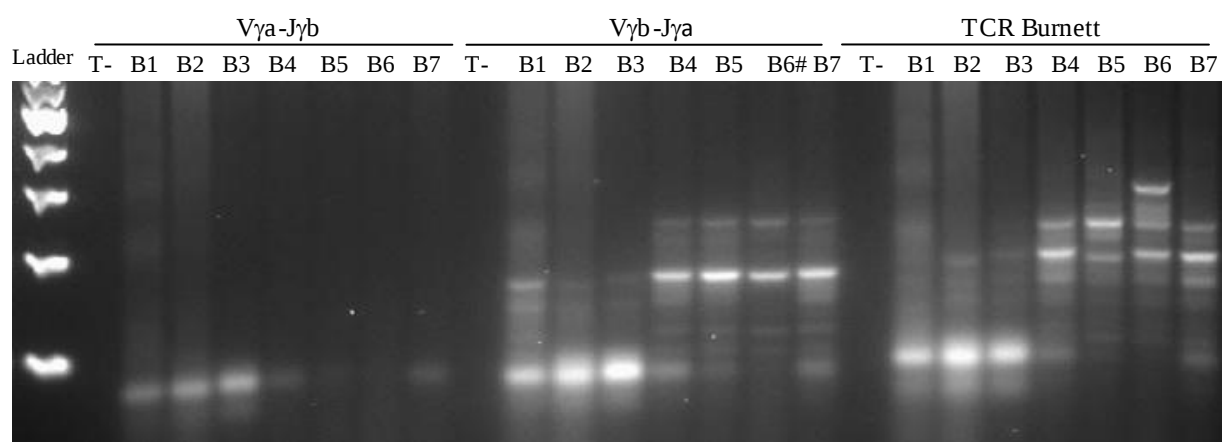
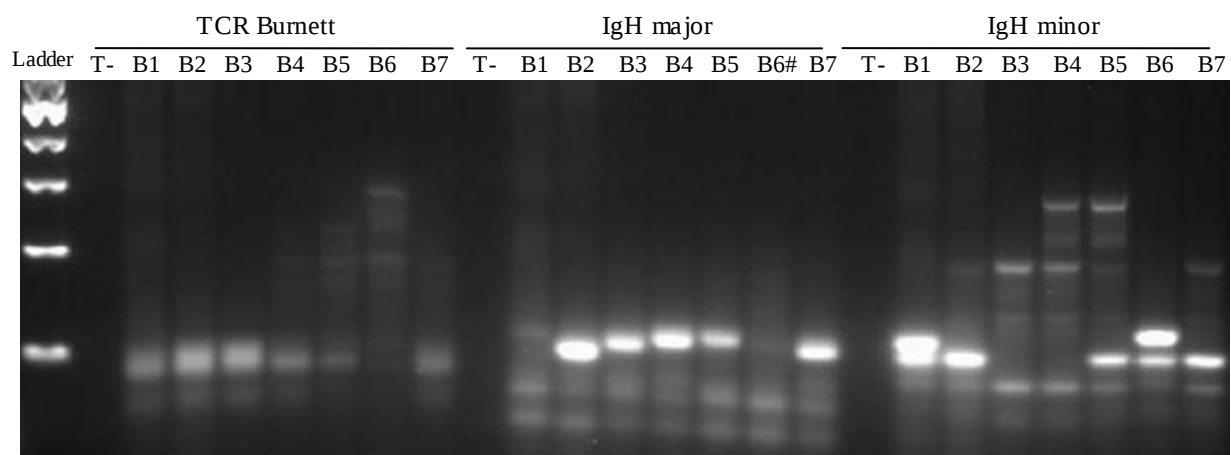
La sensibilité de la PARR avec le protocole élaboré par l'unité de recherche d'AMaROC à partir d'échantillons FFPE est de 85%, tous lymphomes confondus. Elle est de 90% pour les lymphomes B et 80% pour les lymphomes T. La spécificité est de 77,8%, tous lymphomes confondus. Elle est de 94,7% pour les lymphomes B et 89,5% pour les lymphomes T. Ces dernières sont supérieures à la spécificité de la PARR tous lymphomes confondus du fait du nombre plus élevé de cas négatifs intégrés à l'analyse.

IV.3. Echantillons non FFPE

Le protocole "PARR AMaROC" a été, dans un second temps, appliqué à tous les échantillons non FFPE disponibles. Il s'agit des deux prélèvements par cytoponction de noeuds lymphatiques et des quatorze prélèvements histologiques de noeuds lymphatiques conservés dans le *RNAlater*®.

IV.3.1. Résultats de la PARR





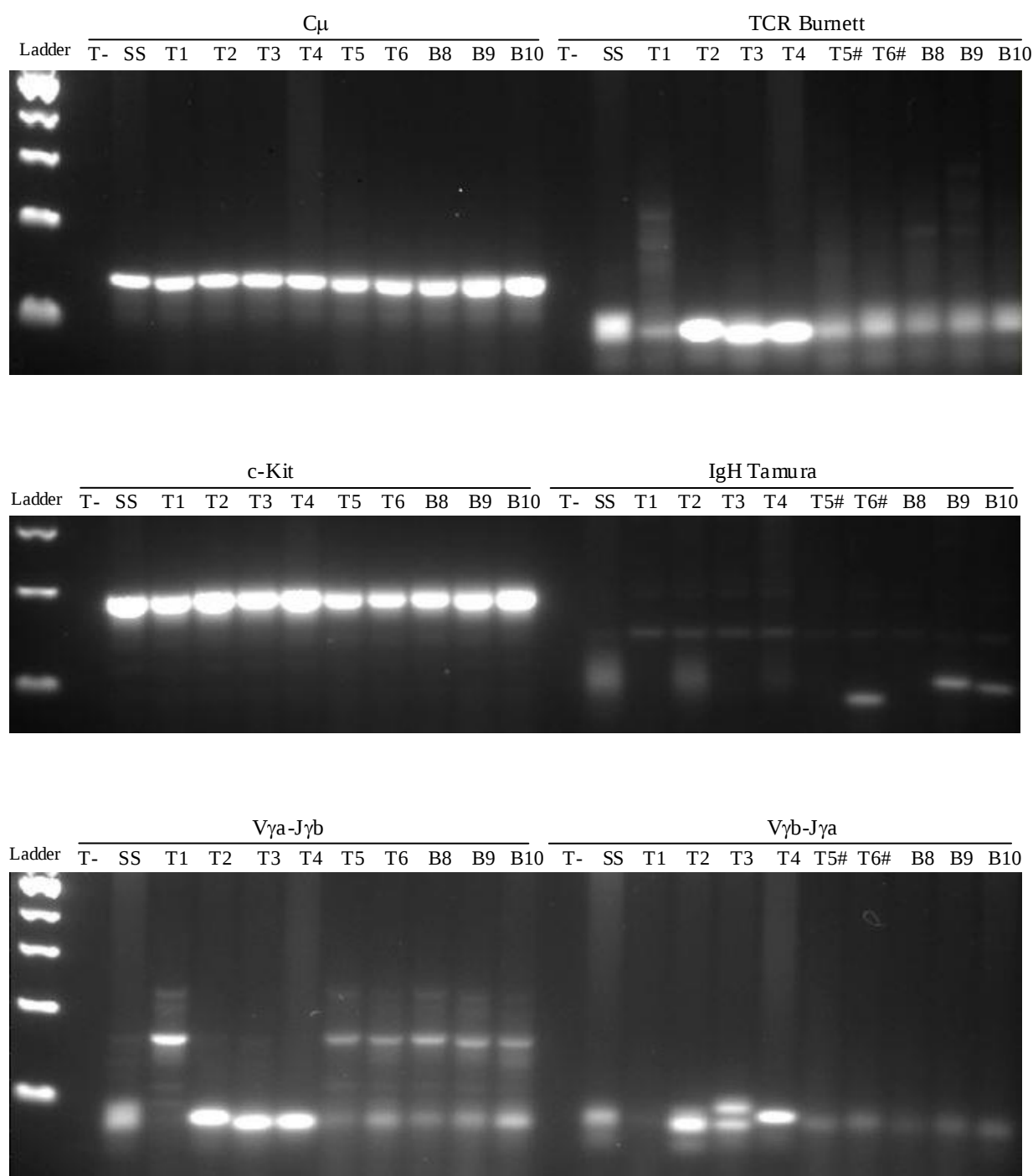


Figure 65. PARR réalisée à partir des échantillons conservés dans le *RNAlater*®
 (T-): Témoin négatif (eau stérile); (SS): Sang de chien sain; (B1): Emy; (B2): Gump; (B3): Bavona; (B4): Portos; (B5): Azaro; (B6): Pancho; (B7): Aston; (T1): Bouba; (T2): Twain; (T3): Serene; (T4): Ugo; (T5): Nouria; (T6): Quiny; (B8): Raboue; (B9): Athéna; (B10): Edelbut.; (#): suspicion de lymphome et immunophénotypage non confirmé

Tableau 23. Résultats de la PARR obtenus à partir des échantillons non FFPE avec le protocole "PARR AMaROC"

Echantillons non FFPE		Amorces contrôle		Amorces lymphome B			Amorces lymphome T		
		Cμ	c-Kit	IGH Major Burnett	IGH Minor Burnett	IgH Tamura	TCR Burnett	TCR Vγa-Jγb	TCR Vγb-Jγa
Lymphome B (Cytoponction)	Emy	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 130 pb	Bandes 120 et 130 pb	Rien	Smear 90 pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb
	Gump	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Bande 120 pb	Bande 80 pb	Smear 90 pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb
Lymphome B (RNAlater®)	Bavona	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Bandes parasites	Bande 85 pb	Smear 90 pb	Smear ou bande 90 pb	Smear 80 pb
	Portos #	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Bandes parasites	Bande 90 pb	Smear 90 pb	Smear 90 pb (+ bandes parasites)	Smear 80 pb
	Azaro	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Bande 120 pb (+ bandes parasites)	Bandes 130 pb	Smear 90 pb	Bandes parasites	Rien
	Pancho	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Bandes 120 et 130 pb	Rien	Rien	Bandes parasites	Rien
	Aston	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Bande 120 pb	Bande 80 pb	Smear 90 pb	Smear 90 pb (+ bandes parasites)	Smear 80 pb
	Raboue	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Bande 120 pb (+ bandes parasites)	Bandes parasites 150 pb et 200 pb	Smear 90 pb	Smear 80 pb Bande 160 pb	Smear 80 pb
	Athéna	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bandes 120 et 130 pb	Bandes parasites	Bande 100 pb (+ bandes parasites 150 pb et 200 pb)	Smear 90 pb	Smear 80 pb Bande 160 pb	Smear 80 pb
	Edelbut	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Bande 120 pb (+ bandes parasites)	Bande 95 pb (+ bandes parasites 150 pb et 200 pb)	Smear 90 pb	Smear 80 pb Bande 160 pb	Smear 80 pb

Echantillons conservés dans le <i>RNAlater</i> ®		Amorces contrôle		Amorces lymphome B			Amorces lymphome T		
		Cμ	c-Kit	IGH Major Burnett	IGH Minor Burnett	IgH Tamura	TCR Burnett	TCR Vγa-Jγb	TCR Vγb-Jγa
Lymphome T (<i>RNAlater</i> ®)	Bouba	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Bande 120 pb (+ bandes parasites)	Smear 100 pb (+ bandes parasites 150 pb et 200 pb)	Bande 90 pb	Bande 160 pb	Rien
	Twain	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Rien	Bande 120 pb (+ bandes parasites)	Smear 100 pb (+ bandes parasites 150 pb et 200 pb)	Bande 90 pb	Bandes 80 et 160 pb	Bande 80 pb
	Serene	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Bandes parasites	Bandes parasites 150 pb et 200 pb	Bande 90 pb	Bandes 80 et 160 pb	Bandes 80 et 90 pb
	Ugo	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Bandes parasites	Smear 100 pb (+ bandes parasites 150 pb et 200 pb)	Bande 90 pb	Bandes 80 et 160 pb	Bande 80 pb
	Nouria #	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear 120 pb	Bandes parasites	Bandes parasites 150 pb et 200 pb	Bande ou smear 90 pb	Smear 80 pb Bande 160 pb	Smear 80 pb
	Quiny #	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Bande 120 pb	Bandes parasites	Bande 80 pb (+ bandes parasites 150 pb et 200 pb)	Smear 90 pb	Smear 80 pb Bande 160 pb	Smear 80 pb
Sang de chien sain	-	Bande 130 pb	Bande 190 pb	Smear	Smear	Smear	Smear	Smear	Smear

(#): Suspicion de lymphome et immunophénotypage non confirmé; (gris clair): résultats correspondant à l'immunophénotype à la nature et à l'immunophénotype des échantillons analysés (vrai-positif ou vrai-négatif); (blanc): résultats ne correspondant pas à l'immunophénotype à la nature et à l'immunophénotype des échantillons analysés (faux-positif ou faux-négatif); (gris): bandes monoclonales ou polyclonales obtenues à l'issue de la PARR.

Aucune amplification n'est obtenue à partir des contrôles négatifs, ce qui signifie que les échantillons n'ont pas été contaminés. Chaque produit amplifié à partir des autres échantillons provient bien de l'ADN de ces échantillons.

Les fragments spécifiques des couples d'amorces contrôle ont été amplifiés à partir de tous les échantillons. L'ADN de ces échantillons est donc relativement bien conservé.

Un bruit de fond est présent sur tous les gels en quantité plus importante par rapport aux PARR réalisées à partir des échantillons FFPE.

Dans certains cas, il n'est pas possible de différencier un smear d'une bande. Le manipulateur ne pouvant conclure à un lymphome avec certitude, le résultat est considéré comme négatif. Ces situations sont plus fréquentes à partir des échantillons conservés dans le *RNA later*®.

Une bande de faible intensité de 160 pb environ est obtenue avec le couple d'amorces IgH Tamura à partir de la majorité des échantillons. Cette taille de fragment correspond à la limite de taille spécifique des fragments normalement amplifiés par ce couple d'amorces (80 à 150 pb). Il est difficile de conclure à des bandes monoclonales, des smears ou des bandes parasites n'intervenant pas dans l'interprétation.

IV.3.2. Analyse statistique des résultats

L'analyse statistique exposée dans le paragraphe IV.2.2. est appliquée aux résultats obtenus avec le protocole "PARR AMaROC" à partir des échantillons non FFPE.

En raison du nombre limité d'échantillon témoin (un seul échantillon de sang de chien sain), les sensibilité, spécificité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative de la PARR ne sont pas statistiquement valables en ce qui concerne le diagnostic de lymphome, tout immunophénotype confondu (P-value (Fisher exact) = 0,18).

En revanche, ces valeurs ont pu être déterminées pour le diagnostic du lymphome B et du lymphome T à l'aide de tableaux de contingence et des formules précédemment exposées.

Tableau 24. Tableaux de contingence des résultats de PARR à partir des échantillons non FFPE.

	PARR (lymphome B)	
	Positif	Négatif
Lymphome B	10	0
Autre	3	4
P-value (Fisher exact) = 1.10^{-2}		
(Autre) : Témoin négatif et lymphome T		

	PARR (lymphome T)	
	Positif	Négatif
Lymphome T	4	2
Autre	0	11
P-value (Fisher exact) = 6.10^{-3}		
(Autre) : Témoin négatif et lymphome B		

Tableau 25. Sensibilité et spécificité de la PARR à partir des échantillons non FFPE

	Echantillons non FFPE	
	Lymphome B	Lymphome T
Sensibilité	100%	66,7%
Spécificité	57,1%	100%
Valeur prédictive positive	76,9%	100%
Valeur prédictive négative	100%	84,6%
P-value (Fisher exact)	1.10^{-2}	6.10^{-3}

La sensibilité de la PARR avec le protocole élaboré par l'unité de recherche d'AMaROC à partir d'échantillons non FFPE (cytoponction ou prélèvements conservés dans du *RNAlater®*) est de 100% pour les lymphomes B et 66,7% pour les lymphomes T. La spécificité est de 57,1% pour les lymphomes B et 100% pour les lymphomes T. Contrairement à l'hypothèse initiale, le recours à des échantillons non FFPE (dépourvus des facteurs inhibiteurs imputables au formaldéhyde) ne donne pas de résultats supérieurs à l'analyse des échantillons FFPE.

IV.4. Analyse statistique globale

Une analyse statistique regroupant les résultats obtenus à partir de tous les échantillons testés a ensuite été réalisée afin de caractériser la qualité du protocole "PARR AMaROC".

Tableau 26. Tableaux de contingence des résultats de la PARR (protocole "PARR AMaROC")

	PARR (lymphome)	
	Positif	Négatif
Lymphome	31	5
Témoin négatif	2	8

P-value (Fisher exact) = 2.10^{-4}

	PARR (lymphome B)	
	Positif	Négatif
Lymphome B	19	1
Autre	4	22

P-value (Fisher exact) = 7.10^{-8}

(Autre) : Témoin négatif et lymphome T

	PARR (lymphome T)	
	Positif	Négatif
Lymphome T	12	4
Autre	2	28

P-value (Fisher exact) = 3.10^{-6}

(Autre) : Témoin négatif et lymphome B

Tableau 27. Sensibilité et spécificité de la PARR (protocole "PARR AMaROC")

	Tous les échantillons		
	Lymphome	Lymphome B	Lymphome T
Sensibilité	86,1%	95%	75%
Spécificité	80%	84,6%	93,3%
Valeur prédictive positive	93,9%	82,6%	85,7%
Valeur prédictive négative	61,5%	95,6%	87,5%
P-value (Fisher exact)	2.10^{-4}	7.10^{-8}	3.10^{-6}

La sensibilité de la PARR avec le protocole élaboré par l'unité de recherche d'AMaROC est de 86,1%, tous lymphomes confondus. Elle est de 95% pour les lymphomes B et 75% pour les lymphomes T. La spécificité du test est de 80%, tous lymphomes confondus. Elle est de 84,6% pour les lymphomes B et 93,3% pour les lymphomes T.

L'unité de recherche d'AMaROC a ainsi mis au point un protocole de PARR dont les sensibilité et spécificité sont satisfaisantes, similaires voire supérieures à celles obtenues lors de précédentes études (cf. Tableau 13).

DISCUSSION

La PARR est une méthode diagnostique des lymphomes récemment adaptée à la médecine vétérinaire. Cette technique de biologie moléculaire consiste à détecter, amplifier et révéler la clonalité des réarrangements des gènes codant les récepteurs antigéniques des lymphocytes néoplasiques. L'objectif de cette étude est de mettre au point un protocole de PARR optimal réalisable dans les conditions expérimentales de l'unité de recherche d'AMaROC d'Oniris et d'évaluer la sensibilité et la spécificité de ce test en vue de le proposer en routine diagnostique aux vétérinaires français.

La technique d'extraction d'ADN des échantillons est celle couramment utilisée par l'unité de recherche faisant appel au kit d'extraction NucleoSpin® Tissue DNA, macherey-nagel-Allemagne. La technique d'électrophorèse choisie est l'électrophorèse sur gel d'agarose Eurobio à 2,2%. Plusieurs études vétérinaires ont utilisé avec succès ce gel (Vernau et al., 1999; Tamura et al., 2006; Yamazaki et al., 2008 et Gentilini et al., 2009).

La première étape de l'étude a consisté à adapter les paramètres de la PCR suivants: amorces, dilution des échantillons, température, durée des cycles, Taq polymérase, dNTP, solution Q du mix, fluorochrome. Huit couples d'amorces ont été retenus pour cette étude dont deux couples d'amorces contrôle (C μ et C-Kit), trois couples d'amorces spécifiques des lymphocytes B (IgH major, IgH minor et IgH Tamura) et trois couples d'amorces spécifiques des lymphocytes T (TCR γ , TCR V γ a-J γ b et TCR V γ b-J γ a). L'association de plusieurs couples d'amorces est préconisée dans de nombreuses études afin d'augmenter la sensibilité de la PARR (Gentilini et al., 2009). Parmi les quatre couples d'amorces mis au point par Yagihara et al., 2007 (TCR V γ a-J γ a, TCR V γ a-J γ b, TCR V γ b-J γ a et TCR V γ b-J γ b), seuls les couples TCR V γ a-J γ b et TCR V γ b-J γ a ont été conservés du fait d'une mauvaise spécificité obtenue avec les deux autres couples d'amorces. Ceci va à l'encontre de l'étude menée par Yagihara et al., 2009 à l'issue de laquelle les auteurs ont conservé les couples d'amorces TCR V γ a-J γ b et TCR V γ b-J γ b pour un panel similaire à notre étude.

La dilution des échantillons FFPE a permis de diminuer la concentration des inhibiteurs de PCR présents dans la paraffine des échantillons.

Des gradients de température ont été réalisés pour chacun des couples d'amorces afin de déterminer la température d'hybridation optimale pour chacun d'eux (49°C pour les amorces de Burnett et al., 2003 et 48°C pour les amorces de Tamura et al., 2006 et Yagihara et al., 2009). Ces températures sont inférieures à celles préconisées par les auteurs des études précitées et davantage en accord avec les T_m prédictibles en rapport avec la séquence nucléotidique des amorces (cf. Tableau 19). Cela pourrait être expliqué par des conditions expérimentales différentes et propres au laboratoire de recherche et notamment l'utilisation d'une Taq polymérase différente.

La durée des cycles a également été modifiée en fonction des amorces. Les cycles retenus sont les suivants: 95°C pendant 8 secondes, 49°C pendant 10 secondes puis 72°C pendant 15 secondes pour les couples d'amorces C μ , IgH major, IgH minor et TCR γ et 95°C pendant 45

secondes, 48°C pendant 30 secondes puis 72°C pendant 20 secondes pour les couples d'amorces C-Kit, IgH Tamura, TCR V γ a-J γ b, TCR V γ b-J γ a pendant 30 cycles.

Plusieurs Taq-polymérases ont été testées. La Taq polymérase Solis Biodyne, Estonie classiquement utilisée par l'unité de recherche d'AMaROC s'est avérée la plus performante comparée aux Taq polymérases plus largement utilisées dans la littérature vétérinaire (HotStarTAQ® DNA Polymerase, Qiagen et TaKaRa Taq™ Hot Start Version, Takara Shuzo). Toutefois, un doute persiste concernant la Taq polymérase Qiagen du fait de la date de péremption du lot testé.

Le fluorochrome a également fait l'objet de plusieurs essais. Les résultats obtenus avec le GelRed se sont avérés plus nets qu'avec le SafeView. Aucune étude vétérinaire n'a pour le moment été menée dans le but de comparer l'intérêt de ces deux fluorochromes pour la PARR.

La seconde partie de l'étude a consisté à réaliser le protocole de PARR établi par l'unité de recherche d'AMaROC sur un nombre plus conséquent d'échantillons fournis par le Laboratoire d'Histopathologie Animale (LHA) d'Oniris et l'Institut de Génétique et Développement de Rennes (9 échantillons histologiques FFPE sains, 3 échantillons de sang périphérique sain, 10 prélèvements histologiques FFPE de lymphome B, 2 prélèvements de cytoponction de lymphome B, 8 prélèvements histologiques conservés dans du *RNAlater*®, 10 prélèvements histologiques FFPE de lymphome T, 6 prélèvements histologiques conservés dans du *RNAlater*® de lymphome T).

Face à l'absence d'amorces capables de s'hybrider avec la totalité des séquences nucléotidiques lymphocytaires, nous avons fait le choix, bien que plus onéreux, de multiplier le nombre de couples d'amorces utilisés, conformément aux recommandations de Gentilini et al., 2009. Ce choix est conforté par le fait que chacun des couples d'amorces est à l'origine d'amplifications uniques permettant d'établir un diagnostic à l'instar des autres couples d'amorces pour lesquels les résultats sont faussement négatifs pour un échantillon donné. Seul le couple d'amorces TCR Burnett n'apporte pas de plus-value par rapport aux deux autres couples spécifiques des lymphocytes T sur les seize échantillons de lymphome T analysés. L'unité de recherche d'AMaROC se procure les amorces auprès de fournisseurs, ce qui élève le coût des consommables pour une analyse PARR à huit couples d'amorces répartie sur deux gels d'agarose entre 24,30 euros et 33,52 euros par chien.

Lors de la lecture des gels d'électrophorèse, il est parfois difficile de distinguer un smear d'une bande faible. L'interprétation des résultats est dépendante de la sensibilité du protocole d'amplification, de la résolution de la technique de séparation des produits amplifiés et de la subjectivité du manipulateur. Cette dernière ne peut être limitée qu'en améliorant les deux premiers points. C'est pourquoi, de nombreux paramètres ont été étudiés et modifiés au cours d'une première partie expérimentale afin d'obtenir une amplification optimale des fragments nucléotidiques de gènes réarrangés. Les différences nucléotidiques entre les fragments amplifiés de plusieurs lymphocytes peuvent être minimales d'où la nécessité d'une technique de séparation de ces fragments de grande résolution. Le gel d'agarose 2,2% a été choisi par

l'unité de recherche d'AMaROC pour des raisons pratiques. Le pouvoir discriminant de ce gel semble suffisant pour la majorité des échantillons analysés. Cependant, il persiste des cas équivoques pour lesquels il est impossible de conclure à un smear ou une bande faible. Le temps d'électrophorèse étant maximal (2h30), on ne peut espérer disperser les bandes pseudo-clonales en allongeant ce temps d'électrophorèse au risque de faire sortir les produits amplifiés du gel. Il se peut qu'une technique de séparation de meilleure résolution soit nécessaire pour ces cas particuliers. L'analyse du polymorphisme de conformation des simples brins ou l'analyse des hétéroduplex pourraient suffire à disperser les faibles bandes obtenues en cas de pseudo-clonalité et ainsi faciliter l'interprétation des gels (Kaneko et al., 2009(1); Takanosu et al., 2010). La première technique étant complexe et chronophage, l'analyse des hétéroduplex serait préférable. Une alternative consisterait à changer la composition du gel avec du polyacrylamide, de manipulation plus délicate mais de pouvoir de séparation plus grand. Quelques études vétérinaires ont mis en évidence la supériorité du gel de polyacrylamide par rapport au gel d'agarose pour séparer les produits de PARR (Chaubert et al., 2010; Avery et al., 2012). Enfin l'électrophorèse capillaire, capable de séparer des produits différents d'une seule paire de bases, est la technique de séparation au plus fort pouvoir discriminant (Avery et al., 2012; Thalheim et al., 2013). L'amélioration du pouvoir discriminant de la technique d'électrophorèse permettrait d'améliorer la spécificité de la PARR en dispersant les bandes pseudo-clonales à l'origine d'un faux-positif ou de l'aspect ambigu d'un smear. Les bandes faibles prenant l'aspect de smear peuvent être liées à une faible quantité de produits clonaux amplifiés dans le cas de lymphome de stade précoce, de prélèvements de mauvaise qualité, de la présence d'inhibiteurs de la PCR dans les prélèvements ou d'ADN fragmenté. L'inhibition de la PCR est plus fréquente avec les échantillons conservés en FFPE du fait de la liaison du formaldéhyde aux acides nucléiques (Kaneko et al., 2009 (1)). La fragmentation des molécules d'ADN est imputable à leur oxydation à l'air libre ou bien au processus de déparaffination adopté dans certains protocoles d'extraction d'ADN. Lorsque le site de coupure des molécules détériorées intéresse spécifiquement la séquence d'amplification, celle-ci ne peut être réalisée. Dans cette étude, la méthode d'extraction d'ADN des échantillons n'inclut pas de déparaffination afin de limiter la dégradation de l'ADN. La taille maximale des fragments amplifiés au cours de la PARR est de 190 paires de bases avec le couple d'amorces contrôle c-Kit. Aucune amplification n'a eu lieu pour 8 des 29 échantillons FFPE analysés avec ce couple d'amorces. Il semble qu'à moins d'être conservé dans des conditions défavorables, l'ADN de ces échantillons ne devrait pas être dégradé au point de ne pas permettre d'amplification de fragments de si petite taille. Le second couple d'amorces contrôle C μ permet l'amplification de fragments de l'ordre de 130 paires de bases. Il est associé à l'absence d'amplification d'un seul échantillon. Parmi les 5 échantillons en provenance de lymphome non amplifiés par le couple d'amorces contrôle c-Kit, tous ont été amplifiés par le couples d'amorces d'amorces contrôle C μ et 3 ont été amplifiés par des couples d'amorces spécifiques des lymphomes. Le couple d'amorces c-Kit manquerait donc de spécificité tandis que C μ manquerait de sensibilité, d'où notre décision de conserver ces deux couples d'amorces contrôle.

Les échantillons fournis par l'Institut de Génétique et Développement de Rennes correspondent à de l'ADN extrait de prélèvements de noeuds lymphatiques conservés dans

une solution tampon *RNAlater*® et stockés à +4°C. Du fait de l'absence de fixation au formaldéhyde et de son potentiel effet inhibiteur, nous nous attendions à des résultats plus nets et une meilleure sensibilité de la PARR. Cependant, il s'est avéré qu'un bruit de fond parasitait tous les gels d'agarose en quantité plus importante par rapport aux gels des échantillons FFPE et que la sensibilité de la technique pour les lymphomes T était diminuée (66,7%). Plusieurs hypothèses ont été énoncées à ce propos. Celles concernant la technique d'extraction employée, la concentration élevée en ADN ou une éventuelle contamination ont été écartées du fait de l'utilisation d'un protocole d'extraction similaire à celui pratiqué par l'unité de recherche d'AMaROC, d'une concentration en ADN des échantillons fixée à 100 ng/μL et d'une absence de produits amplifiés visualisables à partir du témoin négatif. Une qualité altérée de l'ADN analysé pourrait être à l'origine de résultats sub-optimaux, quoique l'obtention de bandes nettes avec les amorces contrôle à partir de tous les échantillons témoigne d'une relative bonne conservation du matériel génétique. Les délais entre la mort de l'animal (le cas échéant), la réalisation des prélèvements par les cliniques vétérinaires, leur acheminement jusqu'à l'Institut de Génétique et Développement de Rennes et leur traitement dans le *RNAlater*® ainsi que la durée de conservation dans la solution tampon à +4°C avant extraction de l'ADN ne sont pas connus et variables d'un échantillon à l'autre. Plus ces délais sont importants, plus la qualité du tissu prélevé est altérée. De même, la durée de conservation dans le *RNAlater*® à +4°C est susceptible d'affecter la qualité de l'ADN si elle prolongée. Les laboratoires commercialisant la solution affirment qu'un stockage à +4°C limite la dégradation de l'ARN et de l'ADN (dans une moindre mesure) pendant un mois, après quoi la qualité du matériel génétique peut être insuffisante pour une analyse PCR.

Les résultats de PARR sont équivoques dans un certain nombre de cas à partir des échantillons conservés dans le *RNAlater*, et plus particulièrement pour les couples d'amorces IgH Tamura et TCR Vγa-Jγb. En effet, une bande de 160 paires de bases apparaît à l'issue de la PARR pour la quasi-totalité des échantillons. L'absence de bandes similaires à partir du contrôle négatif exclut la possibilité d'une contamination de l'échantillon. Il est possible de considérer cette bande comme étant parasite en ce qui concerne le couple TCR Vγa-Jγb étant donné que les fragments cibles normalement amplifiés sont de taille comprise entre 55 et 90 paires de base. En revanche, la taille des fragments normalement amplifiés avec le couple d'amorces IgH Tamura est comprise entre 80 et 150 paires de base. Il est donc impossible de conclure avec certitude à une bande polyclonale, ou à une bande monoclonale correspondant à un fragment d'ADN génomique de cellules non lymphocytaires (faux-positif) ou à un réarrangement long. Le séquençage de l'une de ces bandes aurait pu permettre d'identifier la nature de cette bande. Nous avons considéré que cette bande était un faux-positif pour l'analyse statistique (en faveur de la spécificité et au détriment de la sensibilité), conscients que cela représente une difficulté à l'interprétation.

Une analyse statistique a permis d'évaluer la sensibilité et la spécificité du protocole "PARR AMaROC". Celles-ci sont du même ordre que celles obtenues lors de certaines précédentes études vétérinaires (Yagihara et al., 2009) voire légèrement supérieures (Avery et al., 2009; CSU Dlab, 2011; Thalheim et al., 2013). Elles demeurent néanmoins inférieures aux valeurs qualitatives obtenues par Burnett et al., 2003 et Gentilini et al., 2009. Il est à noter que ces

valeurs ne peuvent être comparées entre elles indépendamment de la nature des lymphomes analysés. Ainsi, Fukushima et al., 2009 et Chaubert et al., 2010 dont les sensibilités et spécificités du test sont inférieures, ont étudié les lymphomes alimentaires et cutanés, respectivement, autrement plus difficiles à diagnostiquer. Dans le cadre de notre étude, les résultats de la PARR ont été comparés à ceux de l'immunohistochimie réalisée au sein du Laboratoire d'Histopathologie Animale d'Oniris et considérée comme étant la technique gold standard pour le diagnostic du lymphome canin. Il ne peut cependant pas être exclu que des faux-positifs ou des faux-négatifs existent avec cet examen.

Il existe des éléments qu'il serait intéressant d'ajuster ou d'intégrer au protocole afin d'en améliorer sa fiabilité. En effet, devant les difficultés rencontrées pour différencier un smear d'une bande faible dans certains cas, la double réalisation de l'analyse d'un échantillon, extraction d'ADN comprise, telle que pratiquée par le laboratoire diagnostique vétérinaire de l'Université d'Etat du Colorado, pourrait être utile (CSU Dlab, 2011). Cela permettrait de limiter le plus possible ces situations lorsqu'elles sont dues à des approximations de manipulation. La distinction entre un smear et une bande étant partiellement dépendante de la résolution de la technique d'analyse des produits de PCR, il serait également intéressant de réaliser une électrophorèse capillaire afin de comparer les résultats avec ceux de l'électrophorèse sur gel d'agarose. Cela permettrait d'incriminer ou non la résolution de la technique d'électrophorèse employée dans le protocole "PARR AMaROC". Enfin, en raison de la suspicion de l'origine non lymphocytaire des bandes de 160 paires de bases, il pourrait être nécessaire d'inclure un ADN génomique témoin de cellules non lymphocytaires (ex: prélèvement cutané non inflammatoire).

CONCLUSION

La PARR (Polymerase chain reaction for Antigen Receptor Rearrangement) est une technique de biologie moléculaire diagnostique des lymphomes, fondée sur la mise en évidence de la clonalité des réarrangements des gènes codant pour les récepteurs antigéniques des lymphocytes néoplasiques.

Cet outil diagnostique présente un intérêt majeur pour le diagnostic des lymphomes canins pour lesquels l'analyse histologique est difficilement interprétable et équivoque ou pour lesquels peu de cellules lymphocytaires néoplasiques sont disponibles (stade précoce de lymphome, lymphome alimentaire, lymphome en phase de rémission, analyse à partir de liquide d'épanchement, etc). Son seuil de détection très faible, de l'ordre d'1 cellule néoplasique parmi 10 000, en fait également une technique de choix pour l'évaluation des réponses aux chimiothérapies, le suivi des lymphomes en rémission et la prévention des rechutes.

L'objectif de cette étude était de mettre au point et de valider un protocole de PARR optimal réalisable dans les conditions expérimentales du laboratoire de recherche d'AMaROC à Oniris. Plusieurs paramètres de PCR ont été adaptés à la PARR et huit couples d'amorces spécifiques des lymphomes canins B et T ont été sélectionnés pour leur utilisation simultanée. Pour des raisons de coût, devant rester compatible avec un usage diagnostique de routine, l'analyse des produits de PARR est réalisée par simple électrophorèse sur gel d'agarose. La technique a été testée à partir de vingt échantillons de lymphomes B et T fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine, seize échantillons frais de lymphomes B et T prélevés par cytoponction, neuf échantillons témoins fixés au formaldéhyde et inclus en paraffine et trois échantillons témoins de sang périphérique.

Les résultats obtenus sont satisfaisants et prometteurs avec des sensibilité et spécificité de la technique similaires voire supérieures à celles obtenues lors de précédentes études. Ce travail a ainsi contribué à doter Oniris d'un nouveau test diagnostique et de suivi thérapeutique des lymphomes du chien.

BIBLIOGRAPHIE

ABBAL M.: 2012 (1), La réponse immunitaire et sa régulation [On line]. Toulouse (France): Facultés de Médecine de Toulouse. URL: <http://www.medecine.upstlse.fr/pcem2/immunologie/Reponse%20humorale.pdf>

ABBAL M.: 2012 (2), Polycopié national d'immunologie [On line]. Toulouse (France): Facultés de Médecine de Toulouse. URL: <http://www.medecine.upstlse.fr/pcem2/immunologie/polycopie%20national%20d%20immunologie.pdf>

AFFOLTER V.K., GROSS T.L., MOORE P.F.: 2009, Indolent cutaneous T-cell lymphoma presenting as cutaneous lymphocytosis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 20:577-585.

ARUN S, BREUER W, HERMANN S W.: 1996, Immunohistochemical examination of light-chain expression (lambda/kappa ratio) in canine, feline, equine, bovine, and porcine plasma cells. *Zentralbl Veterinarmed A*, 43:573-576.

AVERY P.R., AVERY A.C.: 2004, Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Veterinary Clinical Pathology*, 33:196-207.

AVERY A.C.: 2012, Molecular diagnostics of hematologic malignancies in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 42:97-110.

BAGG A., BRAZIEL R.M., ARBER D.A., BIJWAARD K.E., CHU A.Y.: 2002, Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Diagnostics*, 4:81-89.

BAGG A.: 2006, Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements: minding your B's and T's in assessing lineage and clonality in neoplastic lymphoproliferative disorders. *Journal of Molecular Diagnostics*, 8:426-429.

BAGG A.: 2008, Malleable immunoglobulin genes and hematopathology – The good, the bad, and the ugly: a paper from the 2007 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *Journal of Molecular Diagnostics*, 5:396-410.

BALLEGEER E.A., HOLLINGER C., KUNST C.M.: 2013, Imaging diagnosis-multicentric lymphoma of granular lymphocytes imaged with FDG PET/CT in a dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 54:75-80.

BAO Y., GUO Y., XIAO S., ZHAO Z.: 2010, Molecular characterization of the VH repertoire in *Canis familiaris*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137:64-75.

BEAVER L.M., STROTTNER G., KLEIN M.K.: 2010, Response rate after administration of a single dose of doxorubicin in dogs with B-cell or T-cell lymphoma: 41 cases (2006-2008). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 237:1052-1055.

BLACKWOOD L., SULLIVAN M., LAWSON H.: 1997, Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases. *Journal of small Animal Practice*, 38:62-69.

BLACKWOOD L., GERMAN A.J., STELL A.J., O'NEILL T.: 2004, Multicentric lymphoma in a dog after cyclosporine therapy, *Journal of Small Animal Practice*, 45:259-262.

BLESSUM C., JEPPSSON J.O., AGUZZI F., BERNON H., BIENVENU J.: 1999, L'électrophorèse capillaire : principe et applications au laboratoire de biologie clinique. *Annales de Biologie Clinique*, 57:643-57.

BOOTH M.J.: 1996, Single-strand conformation polymorphism mutation analysis of the p53 gene. In : COTTER F.E. *Molecular diagnosis of cancer*, Humana Press ed., 151-159.

BORDE I.: 2006, La PCR [On line]. Jussieu (France) : Biologie et Multimédia - Université pierre et Marie Curie - UFR de Biologie. URL : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/PCR/>

BOURGUIN A., TUNG R., GALILI N., SKLAR J.: 1990. Rapid, nonradioactive detection of clonal T-cell receptor gene rearrangements in lymphoid neoplasms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 87:8536-8540.

BREITSCHWERDT E.B., WALTMAN C., HAGASTAD H.V., OCHOA R., MCCLURE J., BARTA O.: 1982, Clinical and epidemiological characterization of a diarrheal syndrome in basenji dog. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 180:914-920.

BROOKS M.B., MATUS R.E., LEIFER C.E., ALFIERI A., PATNAIK A.: 1987, Use of splenectomy in the management of lymphoma in dogs: 16 cases (1976-1985). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 191:1008-1010.

BRODSKY E.M., MAUDLIN G.N., LACHOWICZ J.L., POST G.S.: 2009, Asparaginase and MOPP treatment of dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23:578-584.

BURNETT R.C., VERNAU W., MODIANO J.F., OLVER C.S., MOORE P.F., AVERY A.C.: 2003, Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology*, 40:32-41.

BURNETT R.C., BLAKE M.K., THOMPSON L.J., AVERY P.R., AVERY A.C.: 2004, Evolution of a B-cell lymphoma to multiple myeloma after chemotherapy . *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18:768-771.

CALLAN M.F.C., TAN L., ANNELS N., OGG G.S., WILSON J.D.K., O'CALLAGHAN C.A., STEVEN N., MCMICHAEL A.J., RICKINSON A.B.: 1998, Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cell during the primary immune response to Epstein-Barr Virus in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 187:1395-1402.

CAMPANA D., PUI C.H.: 1995, The role of immunophenotypic markers in the classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*, 85:1416-1434.

CARTER R.F., HARRIS C.K., WITHROW S.J., VALLI V.E.O., SUSANECK S.J.: 1987, Chemotherapy of canine lymphoma with histopathological correlation: Doxorubicin alone compared to COP as first treatment regimen. *Journal of American Animal Hospital Association*, 23:587-596.

CAVROIS M., WAIN-HOBSON S., GESSAIN A., PLUMELLE Y., WATTEL E.: 1996, Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. *Blood*, 88:4646-4650.

CHAUBERT P., BAUR CHAUBERT A.S., SATTLER U., FORSTER U., BORNAND V., SUTER M., WELLE M.: 2010, Improved polymerase chain reaction-based method to detect early-stage epitheliotropic T-cell lymphoma (mycosis fungoides) in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens of the dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22:20-9.

CHOI Y., GREENBERG S.J., DU T.L., WARD P.M., OVERTURF P.M., BRECHER M.L., BALLOW M.: 1996, Clonal evolution in B-lineage acute lymphoblastic leukemia by contemporaneous VH-VH gene replacements and VH-DJH gene rearrangements. *Blood*, 87:2506-2512.

CLEARY M.L., CHAO J., WARNKE R., SKLAR J.: 1984, Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell Lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 81:593-597.

COMAZZI S., GELAIN M.E.: 2011, Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. *The Veterinary Journal*, 188:149-15

COUTO C.G., RUTGERS H.C., SHERDING R.G., ROJKO J.: 1989, Gastrointestinal lymphoma in 20 dogs: a retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 3:73-78.

COZON G.: 2009, Réarrangement génomique au cours de la différenciation B et T [On line]. Lyon (France): Master 1 Immunologie. URL: http://allergo.lyon.inserm.fr/M1_2009-2010/11-%20Rearrangement_Ig_M1_2009.pdf

CSU Dlab : 2011, Submitting samples for PARR [On line]. Fort Collins (Colorado, USA), Colorado State University, 7 p. Submission Guidelines. URL : <http://csu-cvmb.colostate.edu/Documents/cilab-form-instructions.pdf>

DAVIS T.A., GRILLO-LOPEZ A.J., WHITE C.A., McLAUGHLIN P., CZUCZMAN M.S., LINK B.K., MALONEY D.G., WEAVER R.L., ROSENBERG J., LEVY R.: 2000, Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *Journal of Clinical Oncology*, 18:3135-3143.

DAY M.J.: 2008, Immune system neoplasia. In: *Clinical immunology of the dog and cat Haematopoietic system*, 2nd ed., Manson publishing Ltd, 315-356.

DELVERDIER M., BOURGES-ABELLA N., RAYMOND-LETRON I., TRUMEL C., DEGORGES-RUBIALES F., POUJADE A., FREICHE V.: 2010, Immunohistochimie des lymphomes gastro-intestinaux du chat. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 161:225-232.

DOBSON J.M., BLACKWOOD L.B., MCINNES E.F., BOSTOCK D.E., NICHOLLS P., HOATHER T. M., TOM B.D.M.: 2001, Prognostic variables in canine multicentric lymphosarcoma. *Journal of Small Animal Practice*, 42:377-384.

DOBSON J.M., SAMUEL S., MILSTEIN H., ROGERS K., WOOD J.L.: 2007, Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 43:240-246.

DORN C.R., TAYLOR D.O.N., SCHNEIDER R.: 1970, The epidemiology of canine leukemia and lymphoma. *Bibliotheca Haematologica*, 36:403-415.

DREITZ M.J., OGILVIE G., SIM G.K.: 1999, Rearranged T lymphocyte antigen receptor genes as markers of malignant T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69:113-119.

EDWARDS D.S., HENLEY W.E., HARDING E.F., DOBSON J.M., WOOD J.L.N.: 2003, Breed incidence of lymphoma in a UK population of insured dogs, *Veterinary Comparative Oncology*, 1:200-206.

EKSTROM-SMEDBY K.: 2006, Epidemiology and etiology of non-Hodgkin lymphoma - a review. *Acta Oncologica*, 45:258-271.

ETTINGER S.N.: 2003, Principles of treatment for canine lymphoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18:92-97.

ESCOBAR C., GRINDEM C., NEEL J.A., SUTER S.E.: 2012, Hematologic changes after total body irradiation and autologous transplantation of hematopoietic peripheral blood progenitor cells in dogs with lymphoma. *Veterinary Pathology*, 49:341-343.

FEND F., QUINTANILLA-MARTINEZ L., KUMAR S., BEATY M.W., BLUM L., SORBARA L., JAFFE E.S., RAFFELD M.: 1999, Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true biclonal lymphomas. *American Journal of Pathology*, 154:1857-1866.

FEUILLARD J., RAPHAËL M.: 2000, Différenciation lymphocytaire B et lymphomes B périphériques. *Hématologie*, 6:345-359.

FIVENSON D.P., SAED G.M., BECK E.R., DUNSTAN R.W., MOORE P.F.: 1994, T-cell receptor gene rearrangement in canine mycosis fungoides: further support for a canine model of cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 102:227-230.

FLORY A.B., RASSNICK K.M., STOKOL T., SCRIVANI P.V., ERB H.N.: 2007, Stage migration in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21:1041-1047.

FLORY A.B., RASSNICK K.M., ERB H.N., GARRETT L.D., NORTHRUP N.C., SELTING K.A., PHILLIPS B.S., LOCKE J.E., CHRETIN J.D.: 2011, Evaluation of factors associated with second remission in dogs with lymphoma undergoing retreatment with a cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone chemotherapy protocol: 95 cases (2000-2007). *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 238:501-6.

FOURNEL-FLEURY C., MAGNOL J.P., BRICAIRE P., MARCHAL T., CHABANNE L., DELVERDIER A., BRYON P.A., FELMAN P.: 1997, Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodkin's lymphomas. *Journal of Comparative Pathology*, 117:35-59.

FRIMBERGER, A.E., MOORE, A.S., RASSNICK, K.M., COTTER, S.M., O'SULLIVAN, J.L., QUESENBERRY, P.J.: 2006, A combination chemotherapy protocol with dose intensification and autologous bone marrow transplant (VELCAP-HDC) for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20:355-364.

FRY M.M., VERNAU W., PESAVENTO P.A., BRÖMEL C., MOORE P.F.: 2003, Hepatosplenic lymphoma in a dog. *Veterinary Pathology*, 40:556-562.

GAVAZZA A., PRESCIUTTINI S., BARALE R., LUBAS G., GUGLIUCCI B.: 2001, Association between canine malignant lymphoma, living in industrial areas, and use of chemicals by dog owners. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2001, 15:190-195.

GELAIN M.E., MAZZILLI M., RIONDATO F., MARCONATO L., COMAZZI S.: 2008, Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121:179-188.

GENTILINI F., CALZOLAR C., TURBA M.E., BETTINI G., FAMIGLI-BERGAMINI P. : 2009, GeneScanning analysis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127:47-56.

GRA O.A., SIDOROVA J.V., NIKITIN E.A., TURYGIN A.Y., SURZHIKOV S.A., MELIKYAN A.L., SUDARIKOV A.B., ZASEDATELEV A.S., NASEDKINA T.V.: 2007, Analysis of T-cell receptor- γ gene rearrangements using oligonucleotide microchip: a novel approach for the determination of T-cell clonality. *Journal of Molecular Diagnostics*, 9:249-257.

GREENLEE P.G., FILIPPA D.A., QUIMBY F.W., PATNAIK A.K., CALVANO S.E., MATUS R.E., KIMMEL M., HURVITZ A.I., LIEBERMAN P.H.: 1990, Lymphomas in dogs a morphologic, immunologic, and clinical study. *Cancer*, 66:480-490.

GREINER T.C., RAFFELD M., LUTZ C., DICK F., JAFFE E.S.: 1995, Analysis of T cell receptor-gamma gene rearrangements by denaturing gradient gel electrophoresis of GC-clamped polymerase chain reaction products. Correlation with tumor-specific sequences. *American Journal of Pathology*, 146:46-55.

GRIESSER H., TKACHUK D., REIS M.D., MAK T.W.: 1989, Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases. *Blood*, 73:1402-141.

GROSS T.L., IHRKE P.J., WALDER E.J., AFFOLTER V.K.: 2005, lymphocytic neoplasms. In: GROSS T.L., IHRKE P.J., WALDER E.J., AFFOLTER V.K., *Skin diseases of the dog and cat*, 2nd ed.. Oxford, Blackwell, 866-893.

HAN X.Q., HE L., SHONG L.Y., JIANG H.Y., ZHU M.G., ZHAO T.: 2004, Investigation of T-cell receptor- γ gene rearrangement in gastrointestinal lymphomas by PCR-SSCP analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 10:995-999.

HAYES H.M., TARONE R.E., CANTOR K.P., JESSEN C.R., MCCURNIN D.M., RICHARDSON R.C.: 1991, Case-control study of canine malignant lymphoma : positive association with dog owner's use of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicides. *Journal of National Cancer Institute*, 83:1226-1231.

HENRIQUES J., FELISBERTO R., ALVES M.: 2014, Hematologic abnormalities in canine diffuse large B cell lymphoma: what we have found in a group of 37 dogs. In: *European Society of Veterinary Oncology, Annual Congress, Vienna (Austria)*.

IBISCH C., NGUYEN F., FOUREL J., ALBARIC O., LABRUT S., DA VODEAU F., ABADIE J.: 2014, Definition of a Ki67 threshold for canine B-cell lymphoma. In: *European Society of Veterinary Oncology, Annual Congress, Vienna (Austria)*.

IMPELLIZERI J.A., HOWELL K., MCKEEVER K.P., CROW S.E.: 2006, The role of rituximab in the treatment of canine lymphoma: an ex vivo evaluation. *Veterinary Journal*, 171:556–558.

INSERM: 2014, Cours de cytométrie [On line]. Montpellier (France): Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. URL: <http://cytobase.montp.inserm.fr/Cours/Cours.html#mozTocId929384>

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: 2003, Mécanismes du développement tumoral [On line]. *World Cancer Research*. URL: <http://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/wcr/2003/wcrf-3.pdf>

JAFFE E.S., HARRIS N.L., STEIN H., VARDIMAN J.W.: 2001, *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon, France, p. 351.

JAFFE E.S., LEE HARRIS N., STEIN H., ISAACSON P.G.: 2008, Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*, 112:4384-4399.

JAGIELSKI D., LECHOWSKI R., HOFFMANN-JAGIELSKA M., WINIARCZYK S.: 2002, A retrospective study of the incidence and prognostic factors of multicentric lymphoma in dogs (1998-2000). *Journal of veterinary medicine. A physiology, pathology, clinical medicine*, 49:419-24.

JEGLUM K.A.: 1996, Chemoimmunotherapy of canine lymphoma with adjuvant canine monoclonal antibody 231. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 26:73-85.

JEMAL A., TIWARI R.C., MURRAY T., GHAFOR A., SAMUELS A., WARD E., FEUER E.J., THUN M.J.: 2004, Cancer statistics, 2004. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 54:8.

JEON S., LEE M.J., PARK J., KANG S.H.: 2007, Fast molecular diagnostics of canine T-cell lymphoma by PCR and capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence detector. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 854:268-272.

JOETZKE A.E., EBERLE N., NOLTE I., MISCHKE R., SIMON D.: 2012, Flow cytometric evaluation of peripheral blood and bone marrow and fine-needle aspirate samples from multiple sites in dogs with multicentric lymphoma. *American Journal of Veterinary Research*, 73:884-893.

KAISER H.E.: 1981, Animal neoplasms: a systemic review. In KAISER H.E., editor, *Neoplasms: comparative pathology in animals, plants and man*. Baltimore, William & Wilkins.

KALEEM Z., WHITE G., VOLLMER R.T.: 2001, Critical analysis and diagnostic usefulness of limited immunophenotyping of B-cell non-Hodgkin lymphomas by flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology*, 115:136-142.

KANEKO N., TANIMOTO T., MORIMOTO M., HAYASHI T., SHIMOKAWA MIYAMA T., HIRAOKA H., ITAMOTO K., UNE S., MIZUNO T., OKUD M. : 2009 (1), Use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue and single-strand conformation polymorphism analysis for polymerase chain reaction of antigen receptor rearrangements in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71:535-538.

KANEKO N., YAMAMOTO Y., WADA Y., SHIMOKAWA MIYAMA T., HIRAOKA H., ITAMOTO K., MIZUNO T., NAKAICHI M., TAKAHASHI T., WATARI T., OKUDA M. : 2009 (2), Application of polymerase chain reaction to analysis of antigen receptor rearrangements to support endoscopic diagnosis of canine alimentary lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71:555-559.

KELLER E.T.: 1992, Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. *Cancer*, 70:2334-2337.

KELLER E.T., MACEWEN E.G., ROSENTHAL R.C., HELFAND S.C., FOX L.E.: 1993, Evaluation of prognostic factors and sequential combination chemotherapy with doxorubicin for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 7:289-95.

KELLER R.L., AVERY A.C., BURNETT R.C., WALTON J.A., OLVER C.S.: 2004, Detection of canine lymphoma in peripheral blood using polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement (PARR). *Veterinary Clinical Pathology*, 33:145-149.

KIUPEL M., TESKE E., BOSTOCK D.:1999, Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. *Veterinary Pathology*, 36:292-300.

KIUPEL M., SMEDLEY R. C., PFENT C., XIE Y., XUE Y., WISE A. G., DEVAUL J. M., MAES R. K.: 2011, Diagnostic algorithm to differentiate lymphoma from inflammation in feline small intestinal biopsy samples. *Veterinary Pathology*, 48:212-222.

KÖRKKÖ J., ANNUNEN S., PIHLAJAMAA T., PROCKOP D. J., ALA-KOKKO L.: 1998, Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95:1681-1685.

KREJCI O., PROUZOVA Z., HORVATH O., TRKA J., HRUSAK O.: 2003, Cutting edge: TCR δ gene is frequently rearranged in adult B lymphocytes. *The journal of Immunology*, 171:524-527.

KROHNE SDG, VESTRE WA, RICHARDSON RC et al: 1987, Ocular involvement in canine lymphosarcoma: a retrospective study of 94 cases. *American College of Veterinary Ophthalmology, Proceedings* 68-84.

LAFONT R. : 2005, Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des molécules [On line]. Jussieu (France) : Biologie et Multimédia - Université pierre et Marie Curie - UFR de Biologie. URL : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/electrophorese/E2.html> .

LAKHOTIA S., SOMASUNDARAM K.: 2003, Conformation-sensitive gel electrophoresis for detecting BRCA1 mutations. In : EL-DEIRY W.S. *Tumor Suppressor Genes : Volume 2 regulation, function, and medicinal applications*, Humana Press ed., 403-412.

LANA S.E, JACKSON T.L., BURNETT R.C., MORLEY P.S., AVERY A.C.: 2006 (1), Utility of Polymerase Chain Reaction for Analysis of Antigen Receptor Rearrangement in Staging and Predicting Prognosis in Dogs with Lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20:329-334.

LANA S., PLAZA S., HAMPE K., BURNETT R., AVERY A.C.: 2006 (2), Diagnosis of mediastinal masses in dogs by flow cytometry. *Journal of Veterinary Medicine*, 20:1161-1165.

LAWNICKI L.C., RUBOCKI R.J., CHAN W.C., LYTLE D.M., GREINER T.C.: 2003, The distribution of gene segments in T-cell receptor γ gene rearrangements demonstrates the need for multiple primer sets. *Journal of Molecular Diagnostics*, 5:82-87.

LAWRENCE J., VANDERHOEK M., BARBEE D., JERAJ R., TUMAS D., VAIL D.: 2009, Use of 3'-deoxy-3'-[18F]fluorothymidine PET/CT for evaluating response to cytotoxic chemotherapy in dogs with non-Hodgkin's lymphoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 50:660-668.

LEFRANC M.P, HURET J.L.: 2002, Gènes des Immunoglobulines : Notion de Réarrangement de l' ADN [On line]. In: *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. URL: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/PolyIgFr.html>

LEVINE A.M.: 1994, Lymphoma complicating immunodeficiency disorders. *Annals of Oncology*, 5 Suppl. 2:29-35.

MACCARTHY, K.P., SLOANE, J.P., WIEDEMANN, L.M.: 1990, Rapid method for distinguishing clonal from polyclonal B cell populations in surgical biopsy specimens. *Journal of Clinical Pathology*, 43:429-432.

MACCARTHY K.P., SLOANE J.P., KABAROWSKI J.H., MATUTES E., WIEDEMANN L.M.: 1991, The rapid detection of clonal T-cell proliferations in patients with lymphoid disorders. *American Journal of Pathology*, 138:821-828.

MACEWEN E.G., PATNAIK A.K., WILKINS R.J.: 1977, Diagnosis and treatment of canine hematopoietic neoplasms. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 7:105-118.

MACY D.W.: 2013, Cancer-causing viruses. In : WITHDROW S.J., VAIL D.M., PAGE R., Withrow S.J. and MacEwen's E.C. eds, *Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed.. Philadelphia, WB Saunders, 19-30.

MADEWELL B.R., FELDMAN B.F.: 1980, Characterization of anemias associated with neoplasia in small animals. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 176:419-425.

MADEWELL B.R.: 1986, Hematological and bone marrow cytological abnormalities in 75 dogs with malignant lymphoma. *Journal of American Animal Hospital Association*, 22:235-240.

MADEWELL B.R., THEILEN G.H.: 1987, Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. Part IV: canine. In: MADEWELL B.R., THEILEN G.H., *Veterinary Cancer Medicine*, 2nd ed.. Philadelphia., Lea et Febiger, 392-407.

MANDIGERS C.M., MEIJERINK J.P., MENSINK E.J., TÖNNISSEN E.L., HEBEDA K.M., BOGMAN M.J., RAEMAEKERS J.M.: 2001, Lack of correlation between numbers of circulating t(14;18)-positive cells and response to first-line treatment in follicular lymphoma. *Blood*, 98:940-944.

MARCONATO L., MARTINI V., ARESU L., SAMPAOLO M., VALENTINI F., RINALDI V., COMAZZI S.: 2013, Assessment of bone marrow infiltration diagnosed by flow cytometry in canine large B cell lymphoma: Prognostic significance and proposal of a cut-off value. *The Veterinary Journal*, 197:776-781.

MARTIGNAT L.: 2009, Outils et techniques de génie génétique. Nantes: Département de Biologie et Pathologie d'Oniris, 10-11.

MERLO D.F., ROSSI L., PELLEGRINO C., CEPPI M., CARDELLINO U., CAPURRO C., RATTO A., SAMBUCCO P.L., SESTITO V., TANARA G., BOCCHINI V.: 2008, Cancer Incidence in Pet Dogs: Findings of the Animal Tumor Registry of Genoa, Italy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22:976-984.

MIESFELD R.L.: 2001, Biochemistry of the Polymerase Chain Reaction [On line]. Department of Biochemistry & Molecular Biophysics - University of Arizona. URL: <http://www.biochem.arizona.edu/miesfeld/teaching/Bioc471-2/pages/Lecture12/Lecture12.html>

MILMAN G., SMITH K.C., ERLES K.: 2011, Serological detection of Epstein-Barr virus infection in dogs and cats. *Veterinary Microbiology*, 150:15-20.

MITTERBAUER-HOHENDANNER G., MANNHALTER C., WINKLER K., MITTERBAUER M., SKRABS C., CHOTT A., SIMONITSCH-KLUPP I., GLEIß A., LECHNER K., JAEGER U.: 2004, Prognostic significance of molecular staging by PCR-amplification of immunoglobulin gene rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Leukemia*, 18:1102-1107.

MOMOI Y., NAGASE M., OKAMOTO Y., OKUDA M., SASAKI N., WATARI T., GOITSUKA R., TSUJIMOTO H., HASEGAWA A.: 1993, Rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in canine lymphoma/leukemia cells. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55:775-780.

MOORE P.F., ROSSITTO P.V., DANILENKO, D. M.: 1990, Canine leukocyte integrins: characterization of a CD 18 homologue. *Tissue Antigens*, 36:211-220.

MOORE P.F., WOO J.C., VERNAU W., KOSTEN S., GRAHAM P.S.: 2005, Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106:167-178.

MORRIS J., DOBSON J.: 2001, Haematopoietic system. In: *Small Animal Oncology*, 1st ed., Wiley-Blackwell science, 228-251.

MOULTON J.E., HARVEY J.W.: 1990, Tumors of lymphoid and hematopoietic tissue. In MOULTON J.E., editor, *Tumors of domestic animals*, 3rd ed.. Berkeley, California, University of California Press.

NCI (National Cancer Institute) sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage: 1982, The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project. *Cancer* 49:2112-2135.

NCSU Clinical Immunology Laboratory: 2009, NCSU Canine/Feline Flow cytometry/PARR assay Submission form [On line]. Raleigh (North Carolina, USA), North Carolina State University, 4 p. Submission Guidelines. URL: http://www.cvm.ncsu.edu/dphp/labs/documents/ncsu_flow_cytometry_sub_form.doc.

NGUYEN F., FOUREL J., MOREAU A., ABADIE J., LE GOUILL S., DAVODEAU F.: 2013, Prognostic value of Hans' algorithm and Bcl-2/c-MYC double hit score in canine diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). In: 1st Meeting of the European Canine Lymphoma Group, CH-Lugano (Switzerland).

NICOLAS J.F.: 2007, Immunologie médicale [On line]. Lyon (France): Service d'Immunologie et Allergologie Lyon Sud. URL: http://allergo.lyon.inserm.fr/affiches/Cours_DC1.pdf

OKAWA T., HIRAOKA H., WADA Y., BABA K., ITAMOTO K., MIZUNO T., OKUDA M.: 2012, Development of high-grade B-cell lymphoma concurrent with T-cell chronic lymphocytic leukemia in a dog. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74: 677-680

OSSOWSKA M., ZANDVLIET M., BEIRENS-VAN KUIJK L., TESKE E., DE VOS J.: 2014, Progression free survival of dogs with high-grade T-cell lymphoma, treated with L-CHOP or CCNU-L-CHOP-based protocols as first-line therapy. In: *European Society of Veterinary Oncology, Annual Congress*, Vienna (Austria).

PAI R.K., CHAKERIAN A.E., BINDER J.M., AMIN M., VISWANATHA D.S.: 2005, B-cell clonality determination using an immunoglobulin κ light chain polymerase chain reaction method. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7:300-307.

PAPAKONSTANTINO S., BERZINA I., LAWLOR A., NEILL E.J.O., BRIEN P.J.O.: 2013, Rapid, effective and user-friendly immunophenotyping of canine lymphoma using a personal flow cytometer. *Irish Veterinary Journal*, 66:6-19.

PARODI A.L.: 2001, Classification of malignant lymphoma in domestic animals: history and conceptual evolution. *European Journal of Veterinary Pathology*, 7:43-50.

PONCE F., MAGNOL J.P., MARCHAL T., CHABANNE L., LEDIEU D., BONNEFONT C., FELMAN P., FOURNEL-FLEURY C.: 2003, High-grade canine T-cell lymphoma/leukemia with plasmacytoid morphology: a clinical pathological study of nine cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15:330-337.

POGGI A., MINISCALCO B., MORELLO E., COMAZZI S., GELAIN M.E., ARESU L., RIONDATO F.: 2013, Flow cytometric evaluation of ki67 for the determination of malignancy grade in canine lymphoma. *Veterinary Comparative Oncology*.

POGGI A., MINISCALCO B., MORELLO E., GATTINO F., ARESU L., GELAIN M.E., COMAZZI S., RIONDATO F.: 2014, Prognostic significance of Ki67 evaluated by flow cytometry in dogs with high grade B-cell lymphoma. In: *European Society of Veterinary Oncology, Annual Congress, Vienna (Austria)*.

PONCE F., MAGNOL J.P., LEDIEU D., MARCHAL T., TURINELLI V., CHALVET-MONFRAY K., FOURNEL-FLEURY C.: 2004, Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. *The Veterinary Journal*, 167:158-166.

POTT C., SCHRADER C., GESK S., HARDER L., TIEMANN M., RAFF T., BRÜGGEMANN M., RITGEN M., GAHN B., UNTERHALT M., DREYLING M., HIDDEMANN W., SIEBERT R., DREGER P., KNEBA M.: 2006, Quantitative assessment of molecular remission after high-dose therapy with autologous stem cell transplantation predicts long-term remission in mantle cell lymphoma. *Blood*, 107:2271-2278.

PRONOVOST M.: 2014, Chapitre 4: La génétique - Réaction en chaîne par la polymérase [On line]. Brébeuf (France), Collège Jean de Brébeuf. URL: http://mpronovost.ep.profweb.qc.ca/BIONP1/bionp1_biotechnologie.html.

PROVAN D., BARLETT-PANDITE L., ZWICKY C., NEUBERG D., MADDOCKS A., CORRADINI P., SOIFFER R., RITZ J., NADLER L.M., GRIBBEN J.G.: 1996, Eradication of polymerase chain reaction-detectable chronic lymphocytic leukemia cells is associated with improved outcome after bone marrow transplantation. *Blood*, 88:2228-2235.

RASSENTI L.Z., KIPPS T.J.: 1997, Lack of allelic exclusion in B cell chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of Experimental Medicine*, 185:1435-1445.

RIONDATO F.: 2013, Proliferation index (Ki67 and s-phase) in human and canine lymphoma. In: 1st Meeting of the European Canine Lymphoma Group, CH-Lugano (Switzerland).

RISSETTO K.: 2014, Canine Lymphoma: a candid and practical review [On line]. Charleston (South Carolina, USA): Charleston Veterinary Referral Center. URL: <http://www.charlestonvrc.com/canine-lymphoma-a-candid-and-practical-review/>.

ROCKMAN S.P.: 1997, Determination of clonality in patients who present with diagnostic dilemmas: a laboratory experience and review of the literature. *Leukemia*, 11:852-862.

ROSENBERG M.P., MATUS R.E., PATNAIK A.K.: 1991, Prognostic factors in dogs with lymphoma and associated hypercalcemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 5:268-271.

ROSSI G., ROSS M., VITALI C.G., FORTUNA D., BURRONI D., PANCOTTO L., CAPECCHI S., SOZZI S., RENZONI G., BRACA G., GIUDICE G., RAPPUOLI R., GHIARA P., TACCINI E.: 1999, A conventional beagle dog model for acute and chronic infection with *Helicobacter pylori*, *Infection and Immunity*, 67:3112-3120.

SAILASUTA A., PRACHASILCHAI W.: 2013, The role of *Helicobacter spp.* infection in domestic animals, Chapter 2. In: MÓZSIK G., Current topics in gastritis - 2012, InTech, 23-35.

SAMBROOK J., RUSSEL D.W.: 2001, Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed..Cold Spring Laboratory Press ed., 999p.

SANDBERG Y., VAN GASTEL-MOL E.J., VERHAAF B., LAM K.H., VAN DONGEN J.M., LANGERAK A.W.: 2005, BIOMED-2 multiplex immunoglobulin/T-cell receptor polymerase chain reaction protocols can reliably replace southern blot analysis in routine clonality diagnostics. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7:495-503.

SANGLE N.A., AGARWAL A.M., SMOCK K.J., LEAVITT M.O., WARNKE R., BAHLER D., PERKINS S.L.: 2011, Diffuse Large B-cell Lymphoma With Aberrant Expression of the T-cell Antigens CD2 and CD. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 19:579-583.

SANTORO D., MARSELLA R., HERNANDEZ J.: 2007, Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. *Veterinary Dermatology*, 18:101-106.

SCHMIEDT C.W., GRIMES J.A., HOLZMAN G., MCANULTY J.F.: 2009, Incidence and risk factors for development of malignant neoplasia after feline renal transplantation and cyclosporine-based immunosuppression. *Veterinary Comparative Oncology*, 7:45-53.

SCOTT C.S., RICHARDS S.J., SIVAKUMARAN M.: 1994, Disorders of large granular lymphocytes and natural killer-associated cells. *Blood*, 83:301-303

SEMENTATO G., ZAMBELLO R., STARKEBAUM G., OSHIMI K., LOUGHRAN T.P.: 1997, The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood*, 89: 256-260.

SOCIETE CANADIENNE DU CANCER: 2014, Recherche et développement pour le lymphome non hodgkinien [On line]. Ontario (Canada). URL: <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/non-hodgkin-lymphoma/research/?region=on>

SPIRAL: 2009, Les cellules immunocompétentes [On line]. Lyon (France): Université de Lyon 1. URL: http://spiral.univ-lyon1.fr/files_m/M9105/Files/582899_1036.pdf

STANSFELD, A.G., , DIEBOLD J. , KAPINCI Y., KELÉNYI G., LENNERT K., MIODUSZEWSKA O., NOEL H., RILKE F., SUNDSTROM C., VAN UNNIK J.A.M., WRIGHT D.H.: 1988, Updated Kiel classification for lymphomas. *The Lancet*, 6:292-293.

STRANDSTROM, H.V., HIGGINS J.R., MOSSIE K., THEILEN G.H.: 1990, Studies with canine sera that contain antibodies which recognize human immunodeficiency virus structural proteins. *Cancer Research*, 50:5628S-5630S.

SWANSON J.F.: 1990, Ocular manifestations of systemic disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 20:849-867.

TAKANOSU M., TADIKA T., KOBAYASHI T.: 2010, Heteroduplex polymerase chain reaction is essential for canine receptor rearrangement analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22:760-763.

TAMURA K., YAGIHARA H., ISOTANI M., ONO K., WASHIZU T., BONKOBARA M.: 2006, Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 115:163-7.

TESKE E.: 1994, Prognostic factors for malignant lymphoma in the dog: an update. *The Veterinary quarterly*, 16:29S-31S.

TESKE E., WISMAN P., MOORE P.F., VAN HEERDE P.: 1994, Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas. *Experimental Hematology*, 22: 1179-1187.

THALHEIM L., WILLIAMS L.E., BORST L.B., FOGLE J.E., SUTER S.E.: 2013, Lymphoma immunophenotype of dogs determined by immunohistochemistry, flow cytometry, and polymerase chain reaction for antigen receptor rearrangements. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27:1509-1516.

THEILEN G.H., WORLEY M., BENJAMINI E.: 1977, Chemoimmunotherapy for canine lymphosarcoma. *Journal of American Veterinary Medicine Association*, 170: 607-610.

THEODOROU I., DELFAU-LARUE M.H., BIGORGNE C., LAHET C., COCHET G., BAGOT M., WECHSLER J., FARCET J.P.: 1995, Cutaneous T-cell infiltrates: analysis of T-cell receptor

gamma gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood*, 86:305-310.

TIPOLD A., SOMBERG R., HENTHORN P., RADUCHA M., FEESBURG P.: 1996, Restriction fragment length polymorphism of the T-cell receptor beta-chain gene in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51:225-23.

TIZARD I.R.: 2004, *Veterinary immunology - An introduction*, 7th ed.. Philadelphia, WB Saunders, 494 p.

TSAI P-C., BREEN M.: 2012, Array-based comparative genomic hybridization-guided identification of reference genes for normalization of real-time quantitative polymerase chain reaction assay data for lymphomas, histiocytic sarcomas, and osteosarcomas of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 73:1335-1343.

VAIL, D.M.: 1993, Recent advances in chemotherapy for lymphoma of dogs and cats. *Compendium of Continuing Education* 15, 1031.

VAIL D.M., PINKERTON M. E., YOUNG K.M.: 2013, Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In : WITHDRAW S.J., VAIL D.M., PAGE R., Withrow S.J. and MacEwen's E.C. eds, *Small Animal Clinical Oncology*, 5th ed.. Philadelphia, WB Saunders, 699-733.

VALLI V.E., JACOBS R.M., PARODI A.L., VERNAU W., MOORE P.F.: 2002, WHO Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals. Armed Forces Institute of Pathology and the World Health Organization. American Registry of Pathology, Washington, DC.

VALLI V.E., VERNAU W., DE LORIMIER L.-P., GRAHAM P.S., MOORE P.F.: 2006, Canine indolent nodular lymphoma. *Veterinary Pathology*, 43:241-56.

VALLI V.E., MYINT M.S., BARTHEL A., BIENZLE D., CASWELL J., COLBATZKY F., DURHAM A., EHRHART E.J., JOHNSON Y., JONES C., KIUPEL M., LABELLE P., LESTER S., MILLER M., MOORE P., MOROFF S., ROCCABIANCA P., RAMOS-VARA J., ROSS A., SCASE T., TVEDTEN H., VERNAU W.: 2011, Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria. *Veterinary Pathology*, 48:198-211.

VAN DER VELDEN V.H.J. , HOCHHAUS A. , CAZZANIGA G. , SZCZEPANSKI T. , GABERT J., VAN DONGEN J.J.M.: 2003, Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17:1013-1034.

VAN DONGEN J.J.M., LANGERAK A.W., BRUGGEMANN M., EVANS P.A.S., HUMMEL M., LAVENDER F.L., DELABESSE E., DAVI F., SCHUURING E., GARCIA-SANZ R., VAN KRIEKEN J.H.J.M., DROESE J., GOONZALEZ D., BASTARD C., WHITE H.E., SPAARGAREN M., GONZALEZ M., PARREIRA A., SMITH J.L., MORGAN G.J., KNEBA M., MACINTYRE E.A.: 2003, 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*, 17:2257-2317

VAN OERS M.H.J., TÖNNISSEN E., VAN GLABBEKE M., GIURGEA L., JANSEN J.H., KLASA R., MARCUS R.E., WOLF M., KIMBY E., VRANOVSKY A., HOLTE H., HAGENBEEK A., VAN DER REIJDEN B.A.: 2010, BCL-2/IgH polymerase chain reaction status at the end of induction treatment is not predictive for progression-free survival in relapsed/resistant follicular lymphoma: results of a prospective randomized EORTC 20981 phase III intergroup study. *Journal of Clinical Oncology*, 18:2246-2252.

VEGA F., MEDEIROS L.J., JONES D., ABRUZZO L.V., LAI R., MANNING J., DUNMIRE V., LUTHRA R.: 2001, A novel four-color PCR assay to assess T-cell receptor gamma gene rearrangements in lymphoproliferative lesions. *American Journal of Clinical Pathology*, 116:17-24.

VERNAU W., MOORE P.F.: 1999, An immunophenotypic study of canine leukemias and preliminary assessment of clonality by polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69:145-164.

VILLAMIL J.A., HENRY C.J., HAHN A.W., BRYAN J.N., TYLER J.W., CALDWELL C.W.: 2009, Hormonal and sex impact on the epidemiology of canine lymphoma. *Journal of Cancer Epidemiology*, article 591753.

WALLACE A.J.: 2002, PCR mutation detection protocols. *Methods in molecular biology*, 187: 151-163.

WEISS L.M., SPAGNOLO D.V.: 1993, Assessment of clonality in lymphoid proliferations. *American Journal of Pathology*, 142:1679-1682.

WILKERSON M.J., DOLCE K., KOOPMAN T., SHUMAN W., CHUN R., GARRETT L., BARBER L., AVERY A.C.: 2005. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 106:179-196.

WILLARD M.D., JERGENS A.E., DUNCAN R.B., LEIB M.S., MCCracken M.D., DeNovo R.C., HELMAN R.G., SLATER M.R., HARBISON J.L.: 2002, Interobserver variation among histopathologic evaluations of intestinal tissues from dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220:1177-1182.

WILLIAMS L.E., JOHNSON J.L., HAUCK M.L., RUSLANDER D.M., PRICE G.S., THRALL D.E.: 2004, Chemotherapy followed by half-body radiation therapy for canine lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 12:465-470.

WILLIAMS M.J., AVERY A.C., LANA S.E., HILLERS K.R., BACHAND A.M., AVERY P.R.: 2008, Canine lymphoproliferative disease characterized by lymphocytosis: immunophenotypic markers of prognosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22:596-601.

WOOD G.S., TUNG R.M., HAEFFNER A.C., CROOKS C.F., LIAO S., OROZCO R., VEELKEN H., KADIN M.E., KOH H., HEALD P.: 1994, Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in early mycosis fungoides/Sezary syndrome by polymerase chain reaction

and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *Journal of Investigative Dermatology*, 103:34-41.

YAGIHARA H., TAMURA K., ISOTANIA M., ONO K., WASHIZU T., BONKOBARA M.: 2007, Genomic organization of the T-cell receptor gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 115:375-82.

YAGIHARA H, UEMATSU Y, KOIKE A, TAMURA K., ISOTANI M., YAMAGUCHI T., ONO K., WASHIZU T., BONKOBARA M. : 2009, Immunophenotyping and gene rearrangement analysis in dogs with lymphoproliferative disorders characterized by small-cell lymphocytosis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21:197-202.

YANG X.Y., XU D., DU J., KAMINO H., RAKEMAN J., RATECH H.: 2005, Rapid detection of clonal T-cell receptor- β gene rearrangements in T-cell lymphomas using the LightCycler-polymerase chain reaction with DNA melting curve analysis. *Journal of Molecular Diagnostics*, 7:81-88.

YAMAZAKI J., BABA K., GOTO-KOSHINO Y., SETOGUCHI-MUKAI A., FUJINO Y., OHNA K., TSUJIMOTO H.: 2008, Quantitative assessment of minimal residual disease (MRD) in canine lymphoma by using real-time polymerase chain reaction. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 126:321-31.

ZHU D., KADIN M.E., SAMOSZUK M.: 2001, Detection of clonal T-cell receptor-gamma gene rearrangement by PCR/Temporal temperature gradient gel electrophoresis. *American Journal of Clinical Pathology*, 116:527-534.

ZUCCA E., BERTONI F., ROGGERO E., BOSSHARD G., CAZZANIGA G., PEDRINIS E., BIONDI A., CAVALLI F.: 1998, Molecular analysis of the progression from *Helicobacter Pylori*-associated chronic gastritis to mucosa-associated lymphoid-tissue lymphoma of the stomach. *The New England Journal of Medicine*, 338:804-810.

Vu: Le Professeur Rapporteur

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Nantes Atlantique ONIRIS

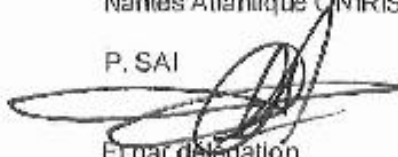
Docteur C. IBISCH



Vu: Le Directeur Général

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Nantes Atlantique ONIRIS

P. SAI



Et par délégation,
Professeur H. POULIQUEN
ONIRIS

Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire
et de l'Alimentation Nantes Atlantique

Dr Hervé POULIQUEN
Directeur du Service des Formations Vétérinaires

Nantes, le 13.06.2014

Vu: Le Président de thèse

Professeur S. LE GOULL



Vu: Le Doyen

De la faculté de Médecine
de Nantes

Professeur P. JOLLIET

Vu et permis d'imprimer

NOM: GAUTIER

Prénom: Anaïs, Thérèse Germaine Marie

Mise au point d'un protocole de PARR (PCR for Antigen Receptor Rearrangement) pour le diagnostic des lymphomes canins

RESUME

Les lymphomes représentent entre 7% et 24% des néoplasies canines. Leur diagnostic est couramment établi par l'analyse histologique ou cytologique des tissus lymphoïdes. Cependant, la distinction morphologique entre une lymphoprolifération maligne et une lymphoprolifération réactive est parfois ambiguë. La PARR est une technique de biologie moléculaire récente destinée à mettre en évidence la clonalité des réarrangements des gènes codant pour les récepteurs antigéniques des lymphocytes néoplasiques avec un seuil de détection très faible. L'objectif de cette étude est de mettre au point un protocole de PARR optimal réalisable dans les conditions expérimentales du laboratoire de recherche d'AMaROC. Pour cela, de nombreux paramètres de PCR ont été ajustés. Les sensibilité et spécificité du test mis au point sont satisfaisantes et permettent d'envisager une utilisation en médecine vétérinaire courante portée sur le diagnostic et le suivi thérapeutique des lymphomes canins.

SUMMARY

Canine lymphomas represent 7% to 24% of canine malignancies. Diagnostic commonly relies on the histologic or cytologic examination of the lymphoid tissue. Therefore, morphological distinction between a malignant lymphoproliferation and a benign reactive proliferation can be ambiguous. PARR is a recent molecular biology technique used to detect malignant lymphocytic receptor genetic rearrangements clonality, with a very low detection threshold. The aim of this study is to develop an optimal protocol in the AMaROC research laboratory experimental conditions. To achieve this, various PCR parameters were adjusted. The sensitivity and specificity of the assay are satisfying enough to consider offering its use in veterinary medicine practice for the canine lymphoma diagnosis and therapeutic follow-up.

MOTS CLES

Lymphome, Polymerase Chain Reaction, Clonalité, Diagnostic, Canin

JURY

Président :	Monsieur Steven LE GOUILL Professeur à la faculté de médecine de Nantes
Rapporteur:	Madame Catherine IBISCH Maître de conférences à ONIRIS
Assesseur:	Monsieur Jérôme ABADIE Maître de conférences à ONIRIS

ADRESSE DE L'AUTEUR

14, rue de hêtres
56800 TAUPONT

Imprimerie centrale
de la faculté des sciences de Nantes

Mise au point d'un protocole de PARR (PCR for Antigen Receptor Rearrangement) pour le diagnostic des lymphomes canins

RESUME

Les lymphomes représentent entre 7% et 24% des néoplasies canines. Leur diagnostic est couramment établi par l'analyse histologique ou cytologique des tissus lymphoïdes. Cependant, la distinction morphologique entre une lymphoprolifération maligne et une lymphoprolifération réactive est parfois ambiguë. La PARR est une technique de biologie moléculaire récente destinée à mettre en évidence la clonalité des réarrangements des gènes codant pour les récepteurs antigéniques des lymphocytes néoplasiques avec un seuil de détection très faible. L'objectif de cette étude est de mettre au point un protocole de PARR optimal réalisable dans les conditions expérimentales du laboratoire de recherche d'AMaROC. Pour cela, de nombreux paramètres de PCR ont été ajustés. Les sensibilité et spécificité du test mis au point sont satisfaisantes et permettent d'envisager une utilisation en médecine vétérinaire courante portée sur le diagnostic et le suivi thérapeutique des lymphomes canins.

SUMMARY

Canine lymphomas represent 7% to 24% of canine malignancies. Diagnostis commonly relies on the histologic or cytologic examination of the lymphoid tissue. Therefore, morphological distinction between a malignant lymphoproliferation and a benign reactive proliferation can be ambiguous. PARR is a recent molecular biology technique used to detect malignant lymphocytic receptor genetic rearrangements clonality, with a very low detection threshold. The aim of this study is to develop an optimal protocol in the AMaROC research laboratory experimental conditions. To achieve this, various PCR parameters were adjusted. The sensitivity and specificity of the assay are satisfying enough to consider offering its use in veterinary medicine practice for the canine lymphoma diagnosis and therapeutic follow-up.

MOTS CLES

Lymphome, Polymerase Chain Reaction, Clonalité, Diagnostic, Canin

JURY

Président :	Monsieur Steven LE GOUILL Professeur à la faculté de médecine de Nantes
Rapporteur:	Madame Catherine IBISCH Maître de conférences à ONIRIS
Assesseur:	Monsieur Jérôme ABADIE Maître de conférences à ONIRIS

ADRESSE DE L'AUTEUR

14, rue de hêtres
56800 TAUPONT

Imprimerie centrale
de la faculté des sciences de Nantes