



**HAL**  
open science

**Étude des pratiques concernant la recherche de réarrangements TCR par PCR hors AMM dans la population de patients hospitalisés et/ou suivis en Médecine Interne au CHU de Rouen entre 2017 et 2020**

Anissa Sadki

► **To cite this version:**

Anissa Sadki. Étude des pratiques concernant la recherche de réarrangements TCR par PCR hors AMM dans la population de patients hospitalisés et/ou suivis en Médecine Interne au CHU de Rouen entre 2017 et 2020. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03398705

**HAL Id: dumas-03398705**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03398705v1>**

Submitted on 23 Oct 2021

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE**

*Diplôme d'Etat*

Par

SADKI ANISSA

Née le 30/04/1991 à Montfermeil (93)

Présentée et soutenue publiquement le 14 Octobre 2021

**Etude des pratiques concernant la recherche de réarrangements TCR par PCR hors  
AMM dans la population de patients hospitalisés et/ou suivis en Médecine Interne au  
CHU de Rouen entre 2017 et 2020**

**Président de thèse : Pr LEVESQUE Hervé**

**Directeur(s) de thèse : Dr SAUVETRE Gaëtan**

**Membres du jury : Pr JARDIN, Dr BUCHONNET, Dr ETANCELIN**

**ANNEE UNIVERSITAIRE 2020 - 2021**

**U.F.R. SANTÉ DE ROUEN**

-----

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Loïc FAVENNEC**  
**Professeur Agnès LIARD**  
**Professeur Guillaume SAVOYE**

<b>I - MEDECINE</b>
---------------------

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mr Frédéric <b>ANSELME</b>	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle <b>APTER</b>	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle <b>AUQUIT AUCKBUR</b>	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc <b>BASTE</b>	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice <b>BAUER</b>	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya <b>BEKRI</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal <b>BENHAMOU</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jacques <b>BENICHOU</b>	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier <b>BOYER</b>	UFR	Immunologie
Mme Sophie <b>CANDON</b>	HCN	Immunologie
Mr François <b>CARON</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe <b>CHASSAGNE</b>	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
Mr Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas <b>CORNU</b>	HCN	Urologie
Mr Antoine <b>CUVELIER</b>	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et imagerie médicale

Mr Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mr Stéphane <b>DERREY</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric <b>DI FIORE</b>	CHB	Cancérologie
Mr Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean <b>DOUCET</b>	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard <b>DUBRAY</b>	CHB	Radiothérapie
Mr Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric <b>DURAND</b>	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
Mr Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
Mr Pierre <b>FREGER</b> ( <i>sumombre</i> )	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mr Dominique <b>GUERROT</b>	HCN	Néphrologie
Mme Julie <b>GUEUDRY</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Olivier <b>GUILLIN</b>	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude <b>HOUDAYER</b>	HCN	Génétique
Mr Fabrice <b>JARDIN</b>	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra <b>LAMIA</b>	Havre	Pneumologie
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry <b>LEQUERRE</b>	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
Mr Hervé <b>LEVESQUE</b>	HCN	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile

Mr Pierre Yves <b>LITZLER</b>	HCN	Chirurgie cardiaque
M. David <b>MALTETE</b>	HCN	Neurologie
Mr Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle <b>MARIE</b>	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique <b>MERLE</b>	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Benoit <b>MISSET</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
Mr Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan <b>PREVOST</b>	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace <b>ROMAN</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu <b>SALAUN</b>	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatogastrologie
Mme Céline <b>SAVOYE-COLLET</b>	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale <b>SCHNEIDER</b>	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian <b>SCHWARZ</b>	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive
Mr Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mr Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
Mr Hervé <b>TILLY</b> ( <i>urnombre</i> )	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles <b>TOURNEL</b>	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier <b>TROST</b>	HCN	Anatomie -Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre <b>VERA</b>	CHB	Biophysique et traitement de l'image

Mr Eric <b>VERIN</b>	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier <b>VITTECOQ</b>	HCN	Rhumatologie
Mr David <b>WALLON</b>	HCN	Neurologie
Mme Marie-Laure <b>WELTER</b>	HCN	Physiologie

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate <b>ACHAMRAH</b>	HCN	Nutrition
Mme Elodie <b>ALESSANDRI-GRADT</b>	HCN	Virologie
Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel <b>BESNIER</b>	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Valérie <b>BRIDOUX HUYBRECHTS</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Neurophysiologie
M. Vianney <b>GILARD</b>	HCN	Neurochirurgie
Mr Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
Mr Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent <b>MARGUET</b>	HCN	Histologie
Mme Chloé <b>MELCHIOR</b>	HCN	Gastroentérologie
M. Sébastien <b>MIRANDA</b>	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Thomas <b>MOUREZ</b> ( <i>détachement</i> )	HCN	Virologie
Mr Gaël <b>NICOLAS</b>	UFR	Génétique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia <b>ROLLIN</b>	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique

M. Abdellah <b>TEBANI</b>	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
Mr Julien <b>WILS</b>	HCN	Pharmacologie

#### **PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

Mr Thierry <b>WABLE</b>	UFR	Communication
Mme Mélanie <b>AUVRAY-HAMEL</b>	UFR	Anglais

#### **ATTACHE TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE à MI-TEMPS**

Mme Justine <b>SAULNIER</b>	UFR	Biologie
-----------------------------	-----	----------

## II - PHARMACIE

#### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Mr Jérémy <b>BELLIEN</b> (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
Mr Jean <b>COSTENTIN</b> (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>	Pharmacognosie
Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre <b>GOULLE</b> (Professeur émérite)	Toxicologie
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b> (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi <b>VARIN</b> (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mr Thomas <b>CASTANHEIRO MATIAS</b>	Chimie Organique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Camille <b>CHARBONNIER (LE CLEZIO)</b>	Statistiques
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b> santé	Législation pharmaceutique et économie de la
Mme Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Dominique <b>DUTERTE- BOUCHER</b>	Pharmacologie
Mr Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL <b>GHARBI-HAMZA</b>	Chimie analytique
Mme Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
Mr Chervin <b>HASSEL</b>	Biochimie et Biologie Moléculaire
Mme Maryline <b>LECOINTRE</b>	Physiologie
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Marine <b>MALLETER</b>	Toxicologie
M. Jérémie <b>MARTINET</b> (MCU-PH)	Immunologie
M. Romy <b>RAZAKANDRAINIBÉ</b>	Parasitologie
Mme Tiphaine <b>ROGEZ-FLORENT</b>	Chimie analytique
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

## PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile <b>GUERARD-DETUNCQ</b>	Pharmacie officinale
Mme Caroline <b>BERTOUX</b>	Pharmacie



**PAU-PH**

M. Mikaël **DAOUPHARS**

**PROFESSEUR CERTIFIE**

Mme Mathilde **GUERIN** Anglais

**ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES**

Mme Alice **MOISAN** Virologie

M. Henri **GONDÉ** Pharmacie

**ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

Mme Soukaina **GUAOUA-ELJADDI** Informatique

Mme Clémence **MEAUSSONE** Toxicologie

**ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT**

Mme Ramla **SALHI** Pharmacognosie

<p><b>LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES</b></p>
--

Mme Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
Mme Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
Mr Abdelhakim <b>EL OMRI</b>	Pharmacognosie

Mr François <b>ESTOUR</b>	Chimie organique
Mr Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
Mr Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
Mr Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie galénique
Mr Rémi <b>VARIN</b>	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b>	Pharmacologie
Mr Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

### III – MEDECINE GENERALE

#### PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

#### PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Pascal **BOULET** UFR Médecine générale

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine Générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

Mme Yveline **SEVRIN** UFR Médecine générale

#### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mme Laëtitia **BOURDON** UFR Médecine Générale

Mme Elsa **FAGOT-GRIFFIN** UFR Médecine Générale

Mr Emmanuel **HAZARD** UFR Médecine Générale

Mme Lucile **PELLERIN** UFR Médecine générale

## ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

### PROFESSEURS

Mr Paul **MULDER** (phar)

Sciences du Médicament

Mme Su **RUAN** (med)

Génie Informatique

### MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** (med)  
905)

Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** (med)

Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** (med)

Neurosciences (Néovasc)

M. Sylvain **FRAINEAU** (med)

Physiologie (Inserm U 1096)

Mme Pascaline **GAILDRAT** (med)

Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Nicolas **GUEROUT** (med)

Chirurgie Expérimentale

Mme Rachel **LETELLIER** (med)

Physiologie

Mr Antoine **OUVRARD-PASCAUD** (med)

Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mr Frédéric **PASQUET**

Sciences du langage, orthophonie

Mme Anne-Sophie **PEZZINO**

Orthophonie

Mme Christine **RONDANINO** (med)

Physiologie de la reproduction

Mr Youssan Var **TAN**

Immunologie

Mme Isabelle **TOURNIER** (med)

Biochimie (UMR 1079)

**DIRECTEUR ADMINISTRATIF : M. Jean-Sébastien VALET**

*HCN - Hôpital Charles Nicolle*

*HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME*

*CB - Centre Henri Becquerel*

*CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray*

*CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation*    *SJ – Saint Julien Rouen*

Par délibération en date du 3 Mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

# TABLE DES MATIERES

ABEVIATIONS.....	19
INTRODUCTION.....	22
1. PHYSIOPATHOLOGIE ET GENERALITES.....	24
1.1.RAPPELS SUR L'IMMUNITE.....	24
1.1.1.Immunité innée et adaptative.....	24
1.1.2.Présentation des antigènes.....	25
1.1.3.Activation lymphocytaire.....	25
1.2.MATURATION LYMPHOCYTAIRE.....	27
1.2.1.Différenciation lymphocytaire.....	27
1.2.2.Mécanismes génétiques de sélection.....	29
1.2.3.Recombinaison VDJ: Mécanismes moléculaires.....	30
1.2.4.Notions de clonalité et d'expansions clonales.....	32
1.3.DIAGNOSTIC DE REARRANGEMENT TCR.....	33
1.3.1.Indications validées et intérêt du diagnostic de clonalité en pratique courante.....	33
1.3.2.Cibles de la recherche des réarrangements TCR.....	33
1.3.3.Diagnostic de clonalité.....	35
1.3.3.1.Etude indirecte par le biais du CDR3.....	35
1.3.3.2.Southern Blot.....	36
1.3.3.3.Cytométrie en flux.....	37
1.3.3.4.PCR.....	38
1.3.3.5.Perspectives : NGS.....	47
1.4.RESTRICTION "PHYSIOLOGIQUE" DE CLONALITE DU TCR.....	47
1.4.1.Influence de l'âge sur le répertoire TCR.....	47
1.4.2.TCUS : entité équivalente à la MGUS?.....	48
1.4.3.Lien entre auto-immunité et sujet âgé.....	49
1.5.RESTRICTION DE CLONALITE DU TCR ET MALADIES AUTO-IMMUNES.....	49
1.5.1.Généralités.....	49

<u>1.5.2.Polyarthrite rhumatoïde (PR)</u> .....	50
<u>1.5.3.Lupus érythémateux disséminé (LED)</u> .....	51
<u>1.5.4.Syndrome de Gougerot-Sjogren</u> .....	52
<u>1.5.5.Pseudo-polyarthrite Rhizomélique et Artérite à cellules géantes</u> .....	54
<u>1.5.6.Anémie hémolytique auto-immune (AHAI)</u> .....	55
<u>1.5.7.Purpura thrombopénique immunologique (PTI)</u> .....	56
1.6.RESTRICTION DE CLONALITE DU TCR ET MALADIES	
HEMATOLOGIQUE.....	57
<u>1.6.1.Leucémies à grands lymphocytes (LGL)</u> .....	57
<u>1.6.2.Syndromes myélodysplasiques (SMD)</u> .....	57
<u>1.6.3.Hyperéosinophilie</u> .....	58
<u>1.6.4.Myélome multiple et Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)</u> .....	60
<u>1.6.5.Lymphomes et leucémies</u> .....	61
1.7.RESTRICTION DE CLONALITE DU TCR ET DEFICITS	
IMMUNITAIRES.....	63
<u>1.7.1.Déficit immunitaire commun variable (DICV)</u> .....	63
<u>1.7.2.Déficit immunitaire combiné sévère (DICS)</u> .....	64
<u>1.7.3.Syndrome ataxie-télangiectasie</u> .....	65
<u>1.7.4.Syndromes liés à l'X: agammaglobulinémie liée à l'X (XLA) et Wiskott-</u>	
<u>Aldrich</u> .....	66
1.8.RESTRICTION DE CLONALITE DU TCR ET INFECTIONS	
VIRALES CHRONIQUES.....	67
<u>1.8.1.Généralités</u> .....	67
<u>1.8.2.VIH</u> .....	68
<u>1.8.3.EBV</u> .....	68
<u>1.8.4.CMV</u> .....	69
<u>1.8.5.Virus des hépatites B et C (VHB et VHC)</u> .....	70
2.OBJECTIFS.....	72
3.MATERIEL ET METHODES.....	73
3.1.POPULATION.....	73
<u>3.1.1.Recrutement des effectifs</u> .....	73
<u>3.1.2.Critères d'inclusion</u> .....	73



3.1.3.Critères d'exclusion.....	74
3.2.RECUEIL DE DONNEES .....	74
3.2.1.Caractéristiques générales de la population.....	75
3.1.1.1.Données démographiques.....	75
3.1.1.2.Antécédents.....	75
3.1.1.3.Motifs de prise en charge.....	76
3.2.2.Anomalies biologiques hors TCR.....	77
3.2.2.1.Anomalies de la Numération formule sanguine (NFS).....	77
3.2.2.2.Anomalies de l'immunophénotypage (IP).....	77
3.2.2.3.Autres données recueillies.....	77
3.2.3.Explorations complémentaires.....	78
3.2.3.1.Explorations médullaires.....	78
3.2.3.2.Explorations d'imagerie.....	79
3.2.4.Réarrangement TCR.....	80
3.2.4.1.Technique.....	80
3.2.4.2.Milieus de prélèvements.....	81
3.2.4.3.TCR+ et TCR-.....	81
3.2.4.4.Prise en compte d'un TCR+.....	82
3.2.5.Diagnostics.....	83
3.3.STATISTIQUES.....	85
4.RESULTATS.....	86
4.1.FLOW CHART .....	86
4.2.CARACTERISTIQUES GENERALES DE LA POPULATION .....	87
4.2.1. <u>Données démographiques, antécédents, motifs de prise en charge.....</u>	87
4.2.2. <u>Anomalies biologiques.....</u>	92
4.2.3. <u>Résultats de la recherche de réarrangement TCR, anomalies morphologiques et diagnostics.....</u>	94
4.3.VALEURS PREDICTIVES POSITIVE ET NEGATIVE DU TCR SANGUIN CONCERNANT LES HEMOPATHIES LYMPHOÏDES.....	96
4.3.1. <u>Diagnostics d'hémopathie retrouvés en fonction du TCR sanguin.....</u>	96
4.3.1.1. <u>Diagnostics d'hémopathie TCR sanguin (tout âge) .....</u>	96
4.3.1.2. <u>VPP et VPN TCR sang (tout âge).....</u>	97
4.4.PRISE EN COMPTE DU TCR+.....	98

5.DISCUSSION.....	99
5.1.POPULATION.....	99
5.2.PRISE EN COMPTE DE L'EXAMEN ET APPORT A LA DEMARCHE DIAGNOSTIQUE.....	101
5.3.PERSPECTIVES.....	103
CONCLUSION.....	105
ANNEXE.....	106
BIBLIOGRAPHIE.....	108
ABSTRACT.....	116

# ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
Ag : Antigène  
ANCA : Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires  
AREB : Anémie réfractaire avec excès de blastes  
ARN : Acide ribonucléique  
ATLL : Leucémie-lymphome T de l'adulte  
BAT : Biopsie de l'artère temporale  
BOM : Biopsie ostéo-médullaire  
CCP : Peptides citrullinés  
CD : Cluster de Différenciation  
CD40-L : Cluster de Différenciation 40 Ligand  
CDR3 : Régions déterminant la complémentarité 3  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité  
CMV : Cytomégalovirus  
CPA : Cellule présentatrice d'antigène  
CTLA-4 : Protéine T-lymphocyte-associée cytotoxique 4  
DICS : Déficit immunitaire combiné sévère  
DICV : Déficit immunitaire commun variable  
DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules B  
DN 1/2 : Doubles négatifs 1/2  
DNA-PKcs : *DNA-dependent protein kinase*  
DILS : Syndrome d'infiltration lymphocytaire diffus  
EBV : Epstein-Barr Virus  
FAN : Facteurs anti-nucléaires  
FR : Facteur rhumatoïde  
HLA : *Human Leucocyte Antigen*  
ICAM-1 : *InterCellular Adhesion Molecule*

IgH : *Immunoglobulin Heavy Chain*  
IP : Immunophénotypage  
LAL : Leucémies aiguës lymphoblastiques  
LAM : Leucémie aiguë myéloblastique  
LB : Lymphocyte B  
LFA-1 : *Lymphocyte function-associated antigen 1*  
LH : Lymphome de Hodgkin  
LIP : Prolifération induite par la lymphopénie  
LGL T : Leucémies à Grands Lymphocytes T  
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique  
LNH : Lymphomes Non Hodgkinien  
LT : Lymphocyte T  
MALT : Tissu lymphoïde associé aux muqueuses  
MGUS : Gammopathie monoclonale de signification indéterminée  
MRD : Maladie résiduelle  
NFS : Numération formule sanguine  
NHEJ : *Non -Homologous End-Joining*  
NK : Natural Killer  
PAMPS : *Pathogens Associated Molecular Patterns*  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*  
PR : Polyarthrite rhumatoïde  
PPR : Pseudo-Polyarthrite Rhizomélique  
RSS : *Recombination signal sequences*  
SA-T cells : *Scenescence associated T cells*  
SB : *Southern Blot*  
SMD : Syndrome myélodysplasique  
SMG : Splénomégalie  
TCR : *T Cell Receptor*  
TCUS : *T Clone of Unknown Significance*  
T-PLL : *T Cell Pro Lymphocytic Leukemia*  
TEP Scanner : Tomographie par émission de positrons avec scanner  
TREC : *TCR excision circles*

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VPN : Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

XLA : Agammaglobulinémie liée à l'X

# INTRODUCTION

La recherche du réarrangement du *T Cell Receptor* (TCR) par *PCR* est une technique permettant de rechercher dans le sang, dans les tissus et dans la moelle un clone lymphocytaire T. Elle est utilisée en hématologie et en anatomo-pathologie dans le cadre du diagnostic et du suivi d'hémopathies lymphoïdes. La recherche du réarrangement TCR est entre autre utilisée, lorsqu'elle est concordante dans le sang et dans la peau, pour le diagnostic de lymphomes cutanés<sup>(1)</sup>. Par ailleurs, de nombreux cas d'anatomopathologie font l'objet d'une étude complémentaire avec recherche de clonalité lorsque le phénotypage et les éléments anatomopathologiques ne permettent pas de caractériser formellement l'hémopathie<sup>(2)(3)</sup>. Enfin, le réarrangement TCR peut être utilisé dans l'évaluation de la maladie résiduelle lorsqu'un clone T est mis en évidence au diagnostic, de façon à évaluer la réponse au traitement et la rechute précoce le cas échéant, comme dans le cas de la LAL-T par exemple<sup>(2)</sup>. Ces recherches de réarrangement TCR en hématologie se font principalement sur les pièces d'anatomopathologie et dans la moelle osseuse, mais peuvent également se faire dans le sang. Les recherches de réarrangement TCR dans le cadre des hémopathies, en particulier sur les pièces de biopsies, ont fait l'objet de recommandations internationales pour l'harmonisation et le perfectionnement des pratiques. Il n'y a pas, à notre connaissance, de recommandations quant à l'utilisation de cet examen en dehors de ce cadre. Il n'y a pas non plus de précision quant à la place du réarrangement TCR dans le dépistage d'éventuelles hémopathies, notamment en ce qui concerne le TCR sanguin. Par ailleurs, la présence de TCR clonaux pourrait avoir un impact péjoratif dans la prise en charge de certaines pathologies auto-immunes : c'est le cas par exemple pour l'anémie hémolytique auto-immune (AHAI) pour laquelle il pourrait y avoir une maladie plus sévère en cas de TCR/IgH clonal chez les patients<sup>(4)</sup>. Un lien semble également exister entre TCR clonal et PTI<sup>(5)</sup> : il semblerait que la présence d'un TCR clonal puisse être associé à une non réponse à la splénectomie dans les cas de PTI réfractaires.

Cette technique est utilisée en dehors des indications habituelles dans le service de Médecine Interne du CHU de Rouen depuis environ 2013. Elle est utilisée comme aide diagnostique en cas de suspicion d'hémopathie lymphoïde. Les examens biologiques sanguins sont peu invasifs, et il nous est apparu que le réarrangement TCR, au même titre que la Numération Formule Sanguine (NFS), l'électrophorèse des protides sériques (EPS) et l'immunophénotypage et la

recherche de réarrangement (IgH), pourrait avoir une place dans notre arsenal diagnostique. Son accessibilité par cette technique de prélèvement a conduit à une augmentation progressive des prescriptions sur les dernières années. Par ailleurs, des réarrangements TCR peuvent également être demandés lors de la réalisation de biopsies tissulaires et de prélèvements médullaires dans des contextes où il y a suffisamment d'éléments cliniques ou paracliniques orientant vers une hémopathie lymphoïde clonale.

Notre avons réalisé une étude rétrospective monocentrique avec pour objectif principal de faire un état des lieux des pratiques concernant les demandes de réarrangements TCR qui ont été faites dans le service de Médecine Interne du CHU de Rouen entre 2017 et 2020.

Nos objectifs sont : la description de la population chez laquelle un réarrangement TCR est demandé, l'évaluation rétrospective de l'intérêt de cet examen (en particulier dans le sang) dans le cadre du diagnostic d'hémopathies lymphoïdes ainsi que son impact sur la prise en charge des patients. Nous avons cherché à savoir dans combien de cas cet examen était positif lorsqu'il a été demandé, dans quels contextes il a été demandé, et si cet examen a permis de poser plus facilement des diagnostics d'hémopathies lymphoïdes, en particulier les lymphomes T.

# 1. PHYSIOPATHOLOGIE ET GENERALITES

## 1.1. Rappels sur l'immunité

### 1.1.1. Immunité innée et adaptative

Il existe chez l'homme deux types d'immunité : l'immunité innée qui est immédiate, et l'immunité adaptative, qui est acquise. L'immunité immédiate est non dépendante de l'antigène, et fonctionne par reconnaissance des *Pathogens Associated Molecular Patterns* (PAMPS). L'immunité adaptative est spécifique et s'articule autour de la présentation de l'antigène via le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH).

Plusieurs types de cellules font partie du système immunitaire, parmi lesquelles les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB). Ces cellules font partie de l'immunité adaptative. Les lymphocytes T composent l'immunité cellulaire, tandis que les lymphocytes B composent l'immunité humorale.

Le lien entre l'immunité adaptative et l'immunité innée dépend des cellules présentatrices d'antigènes (CPA).

Cette thèse concernant plus particulièrement les TCR, nous nous concentrerons sur l'immunité adaptative et son fonctionnement dont nous ferons quelques rappels ci-après.

Les lymphocytes T sont issus du thymus. Il s'agit d'un organe du médiastin antérieur où a lieu la différenciation des lymphocytes T. Cette différenciation aboutit à la formation du TCR, récepteur du lymphocyte T et acteur essentiel de la reconnaissance par la présentation de l'antigène.

Le thymus et la moelle osseuse sont des organes lymphoïdes primaires. La moelle osseuse, à l'instar du thymus pour les LT, est le lieu de différenciation des LB. Les organes lymphoïdes secondaires sont : la rate, les nœuds lymphatiques, le tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT). Ce sont des lieux privilégiés de la coopération cellulaire pour aboutir à une réponse immunitaire spécifique.



### 1.1.2. Présentation des antigènes

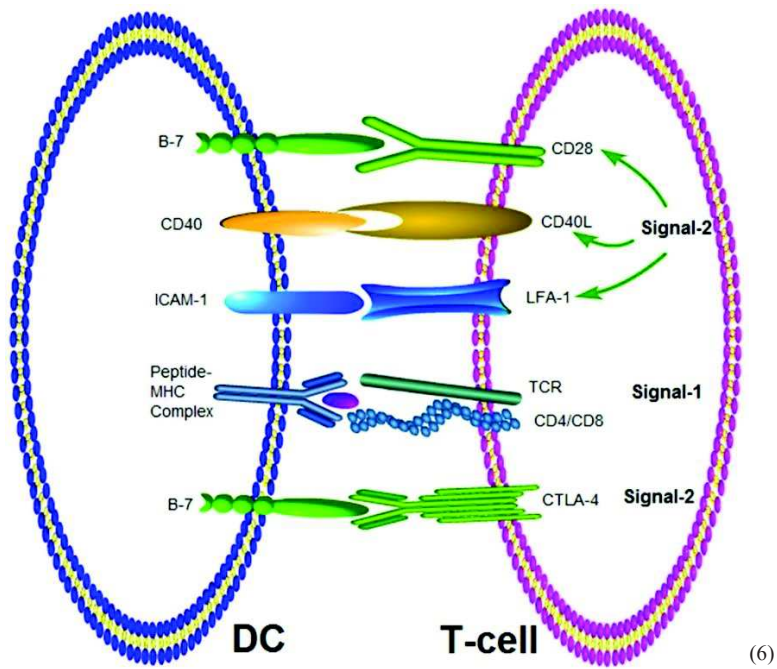
La reconnaissance antigénique par les lymphocytes T se fait par le biais de la présentation des antigènes par le CMH (ou *Human Leucocyte Antigen*-HLA chez l'homme).

Deux types de CMH sont présents dans le système immunitaire humain : le CMH de classe I et le CMH de classe II. Le CMH de classe I est ubiquitaire, présent de manière plus ou moins importante sur toutes les cellules de l'organisme. Le CMH de classe II est présent uniquement sur les cellules professionnelles présentatrices d'antigène (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, lymphocytes B). Le CMH de classe II est également présent sur les lymphocytes T mais uniquement lorsque ceux-ci sont activés. Les lymphocytes T CD8 reconnaissent le CMH de classe I, alors que les lymphocytes T CD4 reconnaissent le CMH de classe II.

### 1.1.3. Activation lymphocytaire

Les lymphocytes T naïfs issus du thymus sont mis en contact avec les cellules présentatrices d'antigènes dans les organes lymphoïdes secondaires après leur différenciation. Les deux types de cellules sont attirées par chimiotactisme dans la zone lymphocytaire T des ganglions. C'est dans cette zone qu'a lieu la présentation de l'antigène par la cellule présentatrice, via le CMH.

La reconnaissance de l'antigène par le TCR du lymphocyte aboutit au premier signal d'activation lymphocytaire, signal de spécificité. Il y a alors liaison forte entre les deux cellules, puis renforcement de cette liaison par les molécules Cluster de Différenciation 2 (CD2), *Lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1), le corécepteur Cluster de Différenciation 4/8 (CD4/CD8), *InterCellular Adhesion Molecule* (ICAM-1), Clusters de Différenciation 45 (CD45) et 43 (CD43). Ceci qui aboutit à la formation de la synapse immunologique.



*Schéma représentant les différents acteurs de la synapse immunologique avec les acteurs participants au renforcement des signaux de prolifération : CD40L, CD28 et le CTLA-4 responsable du rétrocontrôle.*

Débutent alors une stimulation en cascade qui entraîne, entre autre, la formation du transcrit NF- $\kappa$ B, puis celle d'IL-2, facteur de croissance des lymphocytes T.

Un deuxième signal est nécessaire à l'expansion des lymphocytes T spécifiques d'un antigène : la costimulation. Sans ce deuxième signal, les lymphocytes T subissent une apoptose ou une anergie. Ce deuxième signal passe principalement par le biais de l'expression de Cluster de Différenciation 40 Ligand (CD40-L) sur le lymphocyte T : cette molécule se lie au Cluster de Différenciation 40 (CD40) de la cellule présentatrice d'antigène, grâce au signal induit par le TCR et le Cluster de Différenciation 28 (CD28). Ceci conduit à l'activation d'une boucle de renforcement de signal (par le biais des molécules Cluster de Différenciation 80 (CD80), Clusters de Différenciation 86 (CD86) et CD28 dont l'expression est augmentée). Cette boucle de renforcement conduit à une plus forte prolifération lymphocytaire et elle est sous le rétrocontrôle de la protéine T-lymphocyte-associée cytotoxique 4 (CTLA-4).

## 1.2. Maturation lymphocytaire

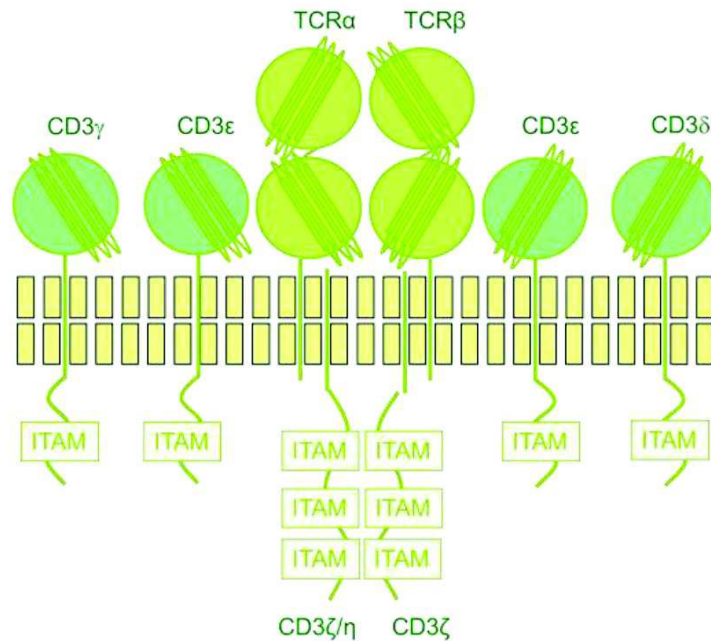
### 1.2.1. Différenciation lymphocytaire T

Le lieu de différenciation des lymphocytes T est le thymus.

Les lymphocytes T subissent une sélection positive et une sélection négative. Ces étapes successives de sélections aboutissent à la formation d'un TCR fonctionnel et diversifié.

Sa structure est comparable à la structure d'une immunoglobuline, mais il existe également une partie intra-cytoplasmique C-terminale composée de molécules Récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAM)..

La partie *immunoglobulin like* est composée de deux chaînes,  $\alpha$  et  $\beta$  dans la grande majorité des cas (il existe également des lymphocytes T  $\gamma\delta$ , qui représentent moins de 10% des lymphocytes T circulants). Elle possède un domaine constant et un domaine N-terminal variable. Ce domaine variable est à l'origine de la singularité de chaque récepteur TCR.



*Schéma représentant le détail de la structure du TCR αβ avec sa partie Ig like variable et son domaine intracellulaire composé de protéines ITAM (figure extraite du Collège des Enseignants d'Immunologie (ASSIM). Immunologie fondamentale et Immunopathologie. Elsevier Masson 2013)*

Les cellules amenées à devenir des lymphocytes T sont d'abord des thymocytes multipotents doubles négatifs (DN1) CD4-/CD8-. Ces cellules doubles négatives peuvent se différencier en lymphocytes T mais aussi en cellules NK ou en cellules dendritiques.

Viennent ensuite les thymocytes pro T (DN2), puis des thymocytes doubles positifs CD4+/CD8+ qui ont alors une expression complète du TCR et de CD3. La sélection β se fait en parallèle : le réarrangement de la chaîne β du TCR aboutit tout d'abord à un pré-TCR (chaîne β et pré-chaîne α). Dans un deuxième temps, le réarrangement du locus α a lieu ce qui permet d'obtenir un thymocyte double positif.

L'étape suivante est la sélection positive : ne sont alors sélectionnés que les thymocytes interagissant avec le complexe « CMH + antigène du soi » avec une avidité intermédiaire.

La sélection négative intervient dans un deuxième temps. Elle consiste en l'élimination des thymocytes dont le TCR réagit trop fortement avec les antigènes du soi. Différents antigènes du soi sont présentés aux thymocytes via les cellules dendritiques et les cellules épithéliales médullaires grâce à l'action du facteur de transcription AIRE. Ce facteur de transcription permet la présentation ectopique dans le thymus d'antigènes tissulaires variés.

A l'issue de cette ultime étape de sélection, les thymocytes deviennent simples positifs CD4 ou CD8 puis quittent du thymus pour la périphérie en tant que lymphocytes T matures naïfs.

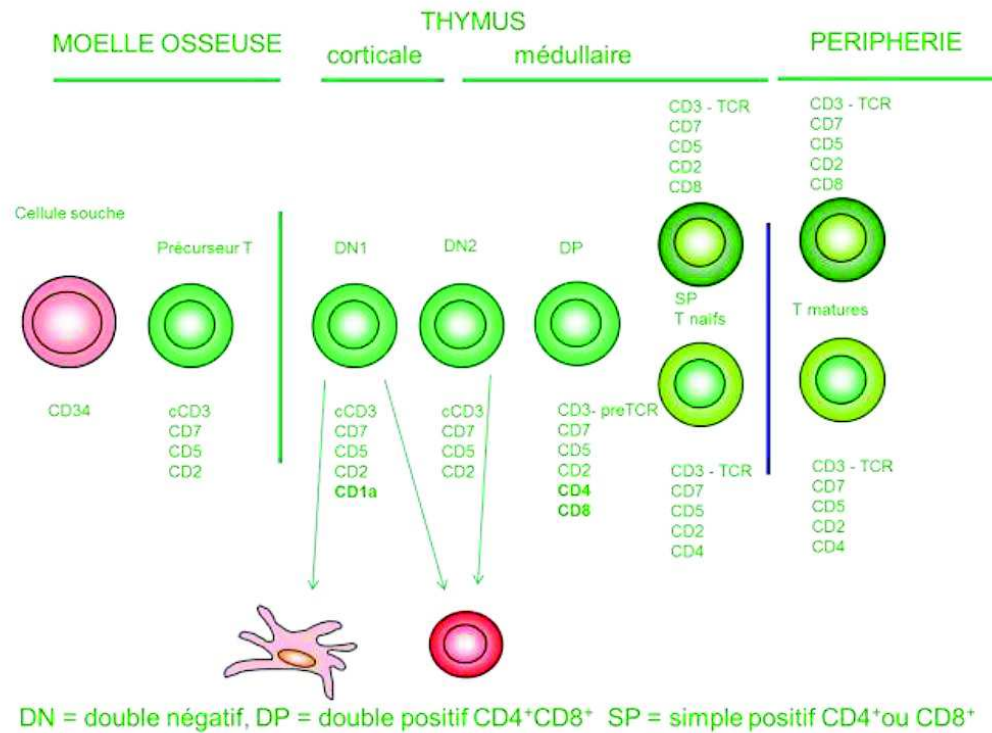


Schéma reprenant les différentes étapes de la différenciation lymphocytaires T dans les organes lymphoïdes primaires : DN, DP, sélection positive, sélection négative (figure extraite du Collège des Enseignants d'Immunologie)

### 1.2.2. Mécanismes génétiques de sélection

Les gènes participant à la formation du TCR se trouvent sur 2 chromosomes : le chromosome 14 pour les chaînes  $\alpha$  et  $\delta$  et le chromosome 7 pour les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$ .

Les *loci* génétiques des chaînes  $\delta$  et  $\beta$  comportent 3 segments génétiques : V (variable) D (diversité) J (jonction). Les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  ne comportent que les segments V et J.

Le réarrangement génétique lors de la constitution des chaînes d'immunoglobulines se fait selon un ordre précis : réarrangement VJ ou DJ puis VDJ.

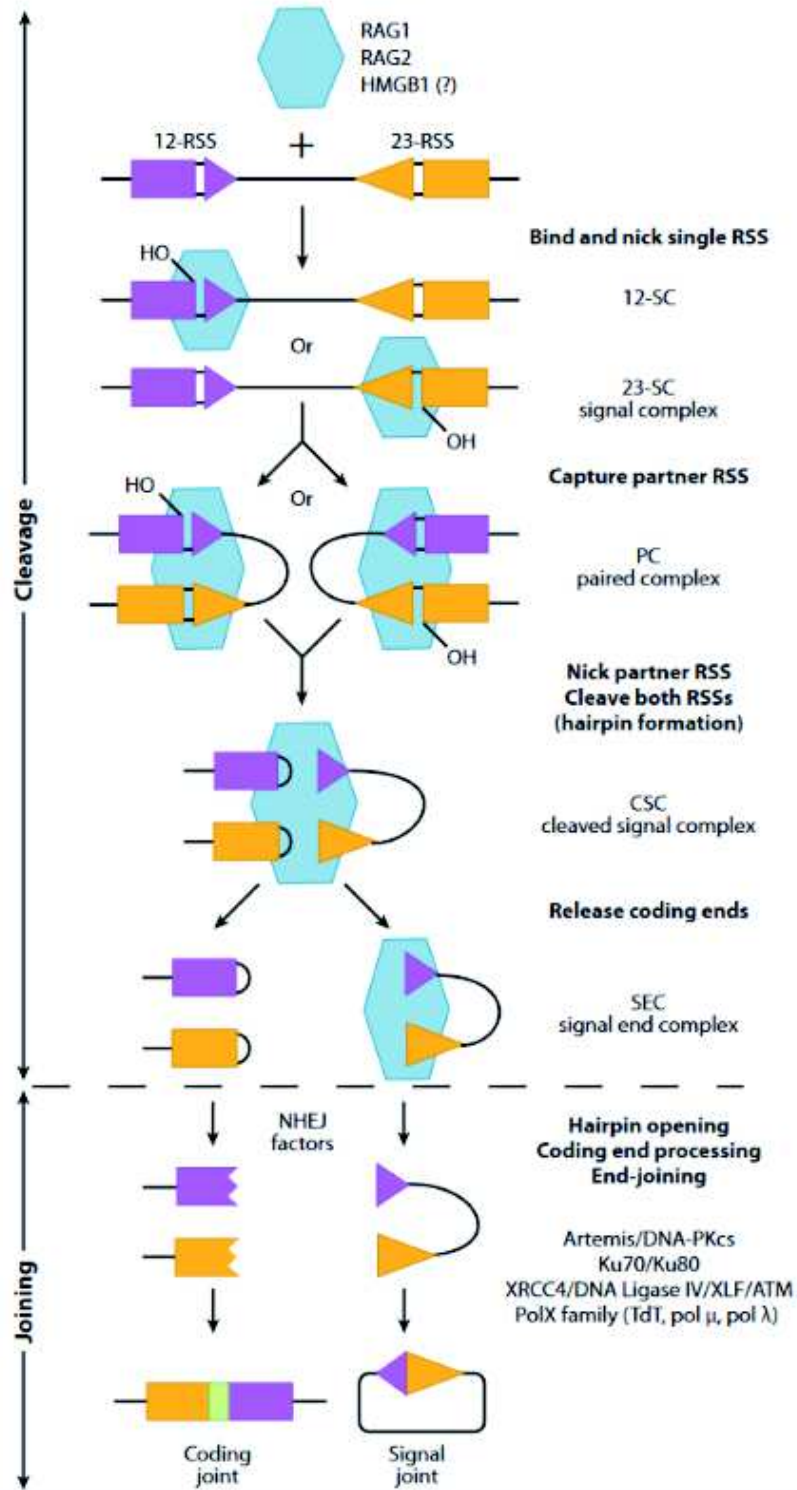
Il existe entre les segments génétiques d'intérêt des « signaux de recombinaison », les *Recombination Signal Sequences* (RSS), qui encadrent les séquences VDJ. Ces RSS sont reconnus par les protéines *Recombination Activation Gene* (RAG). Les protéines RAG sont effectrices de l'excision (par une nucléase) des segments génétiques pour le réarrangement. Ces recombinaisons suivent également un ordre strict :  $\delta$ , puis  $\gamma$ , puis  $\beta$  et enfin  $\alpha$ .

Les zones de jonction entre les segments V, D et J correspondent aux boucles Régions déterminant la complémentarité 3 (CDR3), boucles hypervariables et diversifiées qui sont le témoin de la diversité des TCR. Leur variabilité est notamment en lien avec la délétion et l'insertion au hasard de plusieurs nucléotides durant les processus de réarrangement. Le nombre théorique de répertoires TCR différents, dont l'existence est liée aux recombinaisons au hasard, est de  $10^{15}$  ; mais dans la réalité, la mesure de la diversité des TCR donne un nombre plus proche de  $10^8$ .

### 1.2.3. Recombinaison VDJ : mécanismes moléculaires

La recombinaison entre les différents gènes VDJ est rendue possible par la reconnaissance des régions RSS et par l'intervention de deux gènes, desquels dérivent des protéines du même nom, RAG1 et RAG2. Nous allons détailler ci-après quelques-uns des mécanismes moléculaires en jeu lors de l'initiation de la recombinaison, tels qu'expliqués, principalement, dans la *review* de Schatz *et al* <sup>(7)</sup>. Lorsque des mutations surviennent dans ces gènes, elles peuvent être à l'origine de l'émergence d'un dysfonctionnement important dans la genèse de la diversité du répertoire TCR.

La recombinaison VDJ est principalement composée d'une phase de clivage et d'une phase de raccordement. Il y a tout d'abord formation d'un complexe entre un premier motif RSS et les protéines RAG, excision, puis incorporation d'un second motif RSS complémentaire du premier pour former une synapse. Les deux segments RSS sont alors sectionnés et l'ADN est arrangé sous forme de structure en épingle à cheveux en guise de terminaison. Pendant la seconde phase, la phase de raccordement, l'ADN est réorganisé et réparé, notamment via une sous unité composée de la *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PKcs) et de la protéine ARTEMIS : la réparation produit un segment de jonction codant et un segment signal.



(7)

Détails des étapes d'excision et de réparation dans le cadre de la recombinaison VDJ avec rôle des protéines RAG1/RAG2

La figure ci-dessus résume les premières étapes décrites avec les deux phases de clivage et de raccordement : on constate le rôle primordial de RAG dans la recombinaison. Des mutations de ces protéines entraînent, chez l'humain, une perte partielle ou complète de la recombinaison



physiologique V(D)J. Ceci s'exprime sur le plan clinique par des déficits immunitaires plus ou moins sévères. Etant donné la grande diversité de répertoire existant dans l'espèce humaine, un raccordement avec une réparation d'une grande fidélité est nécessaire pour éviter les translocations chromosomiques. Les protéines RAG participeraient à contraindre l'utilisation exclusive d'une réparation par la voie *Non -Homologous End-Joining* (NHEJ). Cette voie de réparation de l'ADN, qui n'est pas la seule voie possible, est plus fiable que d'autres pour éviter des produits de jonctions avec aberrations et translocations. L'importance des protéines RAG et de leurs co-effecteurs se retrouve également dans ce maintien d'une recombinaison V(D)J fidèle.

#### 1.2.4. Notions de clonalité et d'expansions clonales

Lors d'un contact avec un antigène particulier, le lymphocyte dont le récepteur TCR correspond à l'antigène rencontré va subir des signaux de prolifération et va émettre des « cellules filles » qui possèdent le même récepteur TCR. Le récepteur en question va devenir prépondérant au milieu de l'ensemble des récepteurs lymphocytaires : on parle alors de clonalité et d'expansion clonale. Normalement, le nombre de réarrangements TCR possibles fait qu'il n'y a pas d'émergence d'un clone ou d'un groupe de clones particuliers dans le sang des individus. Chez la majorité des personnes saines, la distribution des TCR est dite « polyclonale ». Lorsqu'un groupe de clones (ou clonotypes, lorsqu'il s'agit de clones fréquemment rencontrés) émerge chez un individu, on parle d'oligoclonalité. Il s'agit déjà à ce stade d'un particularisme qui peut être lié à une situation pathologique. On commence alors à parler de restriction du répertoire TCR, par opposition à une diversité TCR polyclonale.

A noter que les différents clonotypes qui composent un répertoire oligoclonal peuvent eux-mêmes être amplifiés, c'est-à-dire que chaque clone peut donner un grand nombre de cellules filles. C'est une situation qui, en général, témoigne d'une rencontre ou d'une réactivation face à un antigène particulier. On appelle cette amplification l'« expansion clonale ».

Il est également possible de voir (suite à une première restriction oligoclonale ou d'emblée sur un fond polyclonal) apparaître l'émergence d'un (ou de deux) clone(s) prédominant(s) : on parle alors de monoclonalité (ou d'une clonalité bi-allélique).

La notion de clonalité qui va nous intéresser dans ce travail couvre ces différents aspects.



## 1.3. Diagnostic de réarrangement TCR

### 1.3.1. Indications validées et intérêt du diagnostic de clonalité en pratique courante

La recherche de réarrangement TCR est principalement utilisée dans le cadre du diagnostic et de la caractérisation des hémopathies lymphoïdes, en particulier dans les examens de moelle ou sur les pièces histologiques. Dans la plupart des cas, le diagnostic et la caractérisation d'une hémopathie sont basés sur les éléments d'anatomo-pathologie, d'immunophénotypage et d'immunohistochimie. Cependant, dans certains cas litigieux, les réarrangements TCR ou IgH peuvent permettre la caractérisation précise et l'évaluation de la malignité dans une situation clinique suspecte d'hémopathie. Les hémopathies malignes sont des maladies clonales, la mise en évidence de cette clonalité peut étayer un diagnostic de malignité ou permettre de caractériser plus précisément quel précurseur lymphoïde est en cause. En effet, plus de 98% des hémopathies malignes possèdent un réarrangement IGH ou TCR sur un prélèvement anatomo-pathologique. Elles présentent également une aberration chromosomique dans 25 à 30% des cas<sup>(2)</sup>.

Pour ce qui est du réarrangement clonal dans les syndromes lymphoprolifératifs malins, le second intérêt, au-delà du stade diagnostique, réside dans le suivi de la maladie résiduelle (MRD)<sup>(2)(8)</sup>. En effet, une fois la clonalité du syndrome lymphoprolifératif mise en évidence, il est possible de la rechercher à différents stades d'avancement du traitement afin de mettre en évidence une éventuelle rechute moléculaire, avant qu'une rechute morphologique ne soit visible.

### 1.3.2. Cibles de la recherche des réarrangements TCR

Le rationnel du choix des cibles pour la recherche des réarrangements TCR repose sur le processus physiologique d'enchaînement des réarrangements des loci T:

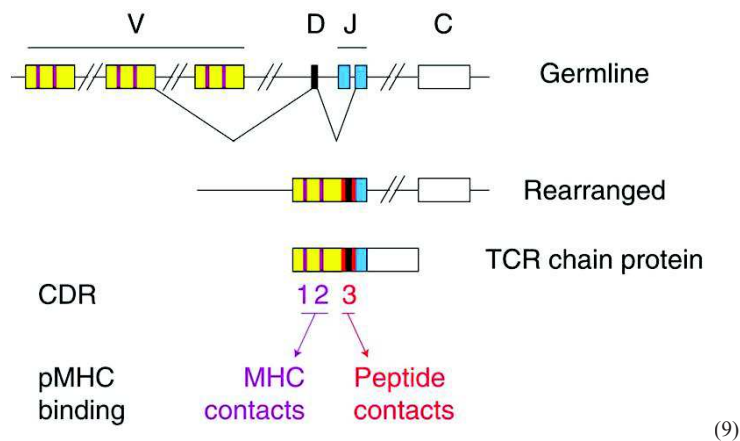


Figure représentant les régions génomiques des domaines TCR avant et après le réarrangement, ainsi que les domaines CDR 1, 2, 3.

Ce processus commence pour les gènes  $TCR\beta$  et  $TCR\delta$  de D à J puis de V à D-J et pour les gènes  $TCR\alpha$  et  $TCR\gamma$  par D à J puis V à J.

Les gènes  $TCR\delta$  se réarrangent en premier, puis les gènes  $TCR\gamma$ , puis les gènes  $TCR\beta$  et enfin les  $TCR\alpha$  (entre le réarrangement  $TCR\beta$  et le réarrangement  $TCR\alpha$ , il y a une délétion du gène  $TCR\delta$ ).

L'étude des gènes  $TCR\beta$  est intéressante car ils sont présents à la fois dans les hémopathies à  $TCR\alpha\beta$  et dans la majorité des hémopathies à  $TCR\gamma\delta$ . L'étude des gènes  $TCR\gamma$  est classiquement utilisée pour le dépistage des hémopathies à  $TCR\alpha\beta$  et des hémopathies à  $TCR\gamma\delta$  : le répertoire des gènes  $TCR\gamma$  est limité, ce qui en facilite l'étude. A contrario, l'étude des gènes  $TCR\delta$  est peu utilisée pour le dépistage d'hémopathies excepté dans des cas particuliers (certaines hémopathies immatures et hémopathies hépatospléniques  $TCR\gamma\delta$ ). Les gènes  $TCR\alpha$  sont trop complexes pour être étudiés à la recherche de clonalité en pratique routinière.

### 1.3.3. Diagnostic de clonalité

#### 1.3.3.1. *Etude indirecte par le biais du CDR3*

Le fragment CDR3 de la chaîne  $\alpha$  ou  $\beta$  du TCR est composé de la partie terminale du fragment de gène AV ou BV, du fragment de gène AD ou BD, du tout début du fragment de gène AJ ou BJ et d'une séquence de nucléotides insérée entre V-D et D-J.

Ce fragment CDR3 est unique dans sa composition et, surtout, dans sa taille pour chaque TCR différent. L'analyse par spectrométrie du CDR3 est ainsi utilisée pour l'étude des répertoires TCR avec mise en évidence principalement de profils polyclonaux ou d'expansions oligoclonales. La technique consiste en une étude sur gel d'agarose après dénaturation, extraction ARN et amplification par *reverse transcriptase* des fragments CDR3 des familles  $\alpha\beta$  étudiées. L'analyse de la taille du CDR3 est ensuite réalisée par immunofluorescence et interprétée par logiciel (GeneScan).

Une taille spécifique de CDR3 correspond à un TCR spécifique.

La distribution de la taille des CDR3 chez les patients sains a été étudiée<sup>(10)</sup>: les tailles des CDR3 sont réparties selon une courbe gaussienne.

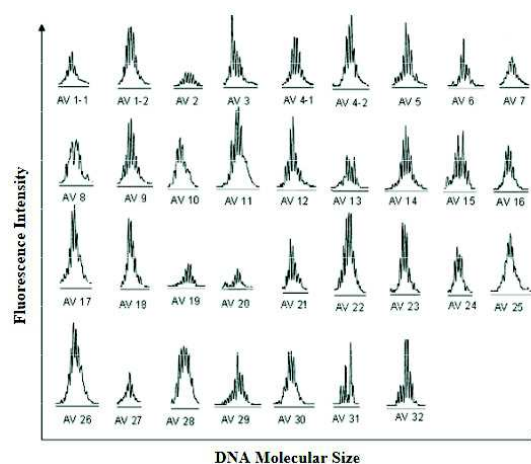


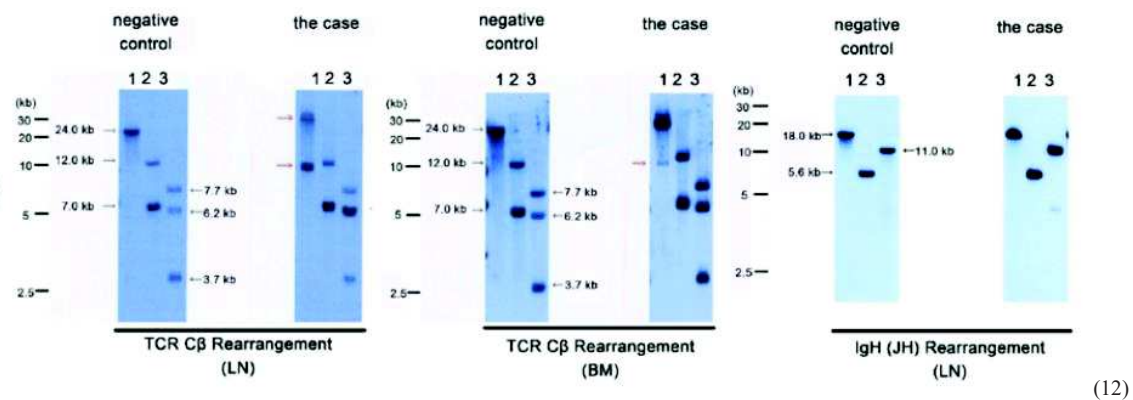
Figure représentant la répartition normale des CDR3

En ce qui concerne l'étude du CDR3 en pathologie<sup>(11)</sup>: cette technique est utilisée notamment dans l'étude de maladies auto-immunes/auto-inflammatoires, dans l'étude des syndromes

d'immunodéficience génétiques, dans celle des infections chroniques et enfin dans l'étude des hémopathies malignes.

### 1.3.3.2. Southern Blot

La technique du Southern Blot (SB) est le gold standard lorsque du tissu frais est disponible <sup>(8)(2)</sup>. La technique repose sur les points suivants : digestion de l'ADN cible par des enzymes de restriction, séparation des fragments obtenus sur un gel d'agarose par électrophorèse, incubation avec des amorces complémentaires des gènes recherchés, lavage des amorces non appariées puis révélations des fragments appariés par écran radio luminescent.



*Exemple de recherche de réarrangement TCR dans le cadre de la caractérisation initiale pour un lymphome T périphérique, réalisation à partir d'une biopsie ganglionnaire et sur moelle : réarrangement TCR VB présent, absence de réarrangement IgH- case report d'un patient avec PTCL-NOS CD20+CCR4+.*

La clonalité est présente lorsqu'une bande clairement définie se détache du fond. Un aspect polyclonal, à l'inverse, donne un aspect avec plusieurs bandes faibles ou une trace sans bande individualisation (appelée « smear »). Des enzymes de restriction bien sélectionnées et des amorces bien ciblées par rapport aux gènes cibles permettent une détection de tous les types de réarrangements.

Les gènes étudiés par le Southern Blot sont les gènes *TCRβ* exclusivement (répertoires des gènes *TCRγ* et *TCRδ* trop limités et répertoire du *TCRα* trop complexe).

Le Southern Blot est cependant peu utilisé en pratique pour plusieurs raisons. Tout d'abord elle nécessite une grande quantité d'ADN de bonne qualité ; ensuite il s'agit d'une technique demandeuse en temps et en compétences techniques. Enfin, sa sensibilité est relativement limitée (5%).

#### *1.3.3.3. Cytométrie en flux*

La technique de la cytométrie en flux est une technique d'étude plus récente que plusieurs auteurs<sup>(13)(12)</sup> proposent d'utiliser comme méthode rapide et sûre de dépistage de clonalité, notamment en ce qui concerne l'examen des LT du sang périphérique.

Cette technique s'intéresse à l'expression des sous-familles de la chaîne  $\beta$ , et donc du TCR  $\alpha\beta$ , qui sont exprimées par la majorité des lymphocytes circulants. Il est également possible d'utiliser la cytométrie en flux dans le cas de biopsies, mais le mélange entre lymphoprolifération pathologique et lymphocytes réactionnels rend la mise en évidence de clonalité plus difficile dans ce type de prélèvement.

L'étude de Van Den Beemd *et al*<sup>(14)</sup> portant sur des sujets sains a permis d'établir une référence pour l'expression de 22 sous-familles V $\beta$  dans la population générale. Le panel obtenu des 22 anticorps est sensé couvrir 67% des TCR $\alpha\beta$  présentés par la population générale. Une expression polyclonale consiste en une réactivité avec plusieurs de ces anticorps. L'absence de réactivité souligne en creux l'expression monoclonale, donc exclusive ou quasi-exclusive, d'une autre sous famille V $\beta$  non couverte par le panel proposé. Dans ce dernier cas, une étude complémentaire par une autre technique de biologie moléculaire est cependant conseillée par les auteurs pour identifier et confirmer la clonalité en question.

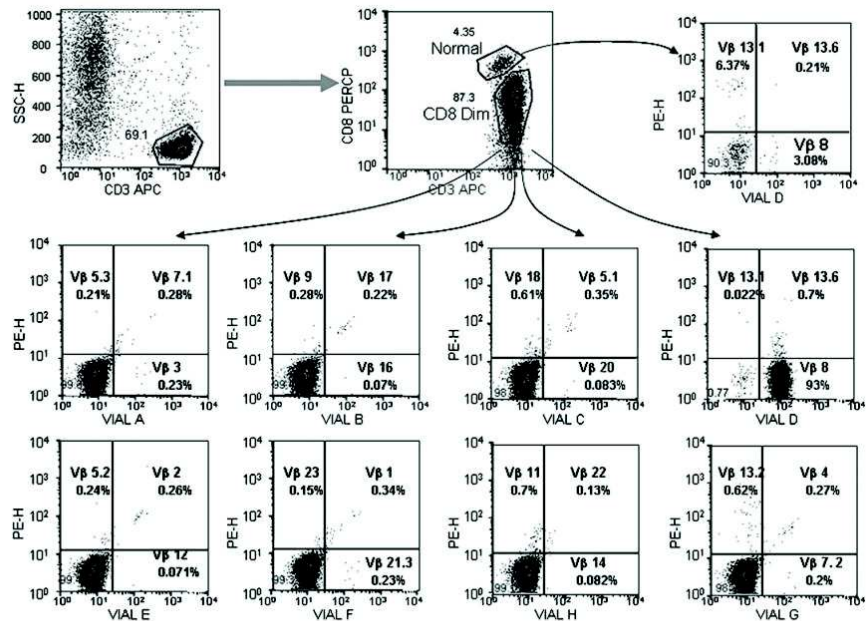


Figure 2 Flow cytometric analysis of Vβ repertoire for T-LGL leukaemia patients. In this example, the T-LGL clone shows dim CD8 expression. As shown in the histogram for vial D, 93% of the gated CD3+ CD8 dim+ cells are positive for Vβ 8.

(13)

*Exemple de résultats de cytométrie de flux pour la recherche d'expression de sous-familles Vβ : les cellules cibles ici ont réagi avec les anticorps anti Vβ 8 dans le tube D de manière spécifique (pas de réaction dans les autres tubes ou pour les autres anticorps de ce même tube).*

Langerak *et al*<sup>(12)</sup> se sont basés sur cette expression chez les individus sains pour étudier la fiabilité de la technique dans la détermination de la clonalité lymphocytaire en pathologie, étude concluante. Ils proposent d'utiliser la cytométrie en flux comme méthode de *screening* quantitative pour la détection des populations aberrantes, lorsque cette population concerne plus de 20% des lymphocytes T périphériques ou plus de  $2 \cdot 10^9$  cellules/L. Feng *et al*<sup>(13)</sup> proposent également d'utiliser cette technique pour une quantification de la masse clonale.

#### 1.3.3.4. PCR

La recherche de réarrangement du locus TCR par *PCR* est rapide, précise, nécessite peu d'ADN et peut être utilisée même quand l'ADN est partiellement dégradé (dans le cas de biopsies de petites tailles à l'aiguille ou de biopsies cutanées, mais également en cas de tissu extraits de bloc de paraffine). La technique consiste principalement en l'hybridation d'amorce avec l'ADN cible, puis en l'amplification des fragments isolés par l'hybridation.

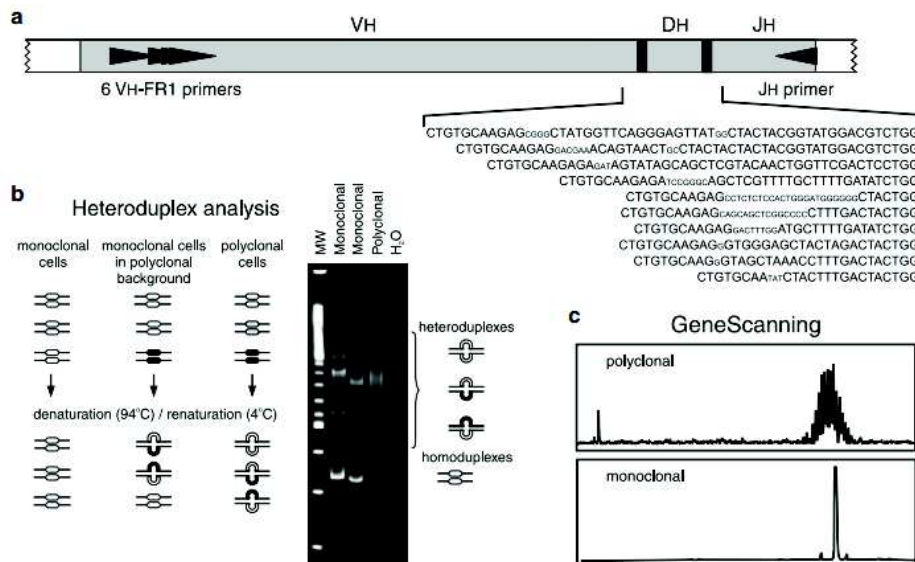
Il existe 2 principales études internationales qui visent à codifier et à harmoniser les pratiques de biologie moléculaire dans le cadre de l'étude des réarrangements *TCR* et *IGH*, *IGK*, et ce au niveau international : le rapport BIOMED-2<sup>(2)</sup> de Dongen *et al*, qui s'intéresse au design d'amorces et aux protocoles pour la réalisation optimale de recherche de réarrangement TCR par PCR, et les guidelines EuroClonality/BIOMED-2<sup>(3)</sup>, qui est complémentaire du rapport précédent, et qui s'intéresse dans un second temps à établir des protocoles d'interprétation des résultats obtenus par protocole BIOMED-2.

Le rapport BIOMED-2 préconise l'utilisation de choix d'amorces complémentaires des sous-familles V, D, J, afin d'obtenir une homologie maximale avec les cibles à partir d'un nombre limité d'amorces, ce qui permettrait d'éviter les faux négatifs par alignement non optimal. Les auteurs proposent de suivre plusieurs recommandations afin de bien choisir les amorces à utiliser pour la recherche de réarrangement TCR/Ig :

- la position des amorces par rapport au gène étudié doit être choisi de telle manière à ce que la taille du produit *PCR* soit inférieure à 300bp (100-300bp de manière idéale) afin que même l'ADN dégradé puisse être utilisé
- la distance minimale à prendre en compte pour éviter les erreurs d'alignement par rapport au gène étudié doit être supérieure à 10-15bp
- les amorces doivent faire moins de 25 nucléotides
- une amorce commune doit être prioritairement utilisée dans les régions consensuelles et des amorces individualisées doivent être préférées dans les zones moins consensuelles.

Une fois les produits de *PCR* obtenus, 2 techniques sont proposées pour la lecture des résultats ; on peut utiliser l'une, l'autre ou les 2 afin d'éviter les faux positifs, c'est-à-dire de conclure à l'amplification d'un TCR clonal alors que la distribution est en fait polyclonale : l'hétéroduplex et le *GeneScanning*.





**Figure 3** Schematic diagram of heteroduplex analysis and GeneScanning of PCR products, obtained from rearranged Ig and TCR genes. (a) Rearranged Ig and TCR genes (*IGH* in the example) show heterogeneous junctional regions with respect to size and nucleotide composition. Germline nucleotides of V, D, and J gene segments are given in large capitals and randomly inserted nucleotides in small capitals. The junctional region heterogeneity is employed in heteroduplex analysis (size and composition) and GeneScanning (size only) to discriminate between products derived from monoclonal and polyclonal lymphoid cell populations. (b) In heteroduplex analysis, PCR products are heat denatured (5 min, 94°C) and subsequently rapidly cooled (1 h, 4°C) to induce duplex (homo- or heteroduplex) formation. In cell samples consisting of clonal lymphoid cells, the PCR products of rearranged *IGH* genes give rise to homoduplexes after denaturation and renaturation, whereas in samples that contain polyclonal lymphoid cell populations the single-strand PCR fragments will mainly form heteroduplexes, which result in a background smear of slowly migrating fragments upon electrophoresis. (c) In GeneScanning fluorochrome-labeled PCR products of rearranged *IGH* genes are denatured prior to high-resolution fragment analysis of the resulting single-stranded fragments. Monoclonal cell samples will give rise to PCR products of identical size (single peak), whereas in polyclonal samples many different *IGH* PCR products will be formed, which show a characteristic Gaussian size distribution.

L'hétéroduplex sépare les produits de PCR sur la base de la taille puis sur la base de la différence de diversité jonctionnelle : la séquence complémentaire de la séquence clonale recherchée est hybridée avec les produits de PCR afin de confirmer que ces produits sont bien identiques dans leur séquence et non juste identiques par la taille. Une complémentarité de séquence se traduit par la formation d'homoduplex qui migrent en bande de taille attendue, tandis que les hétéroduplex ne sont retrouvés que sous la forme de traces.

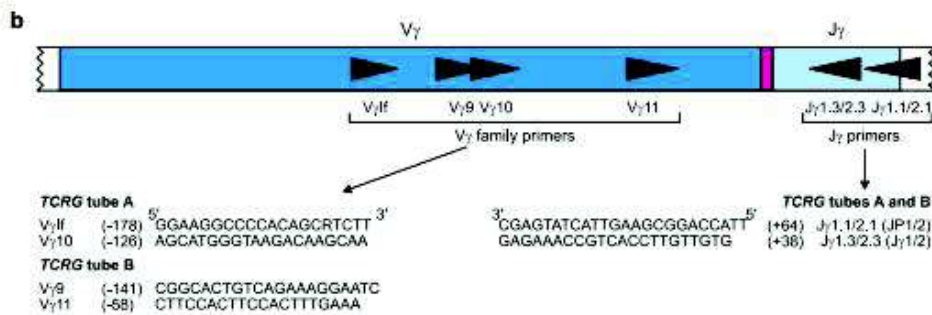
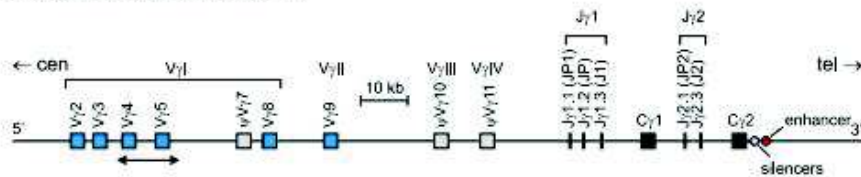
Le GeneScanning sépare les produits de PCR dans un gel de haute résolution en fonction de leur taille après dénaturation et la détection de la répartition se fait au laser : on obtient une distribution Gaussienne avec pics multiples dans le cas d'une polyclonalité, et un pic unique en cas de monoclonalité. Cette technique est plus sensible que l'hétéroduplex, et on n'utilise plus actuellement la technique d'hétéroduplex seule en raison de sa moindre sensibilité.

Notre sujet nous amène tout particulièrement à nous intéresser aux gènes *TCRγ* : le locus du *TCRγ* se situe sur le chromosome 7 et sa séquence génomique complète est connue. Comme évoqué précédemment, il s'agit d'une cible préférentielle pour étudier la clonalité car il est réarrangé tôt dans la genèse lymphocytaire et est présent dans les précurseurs *TCRαβ* et *TCRγδ*.

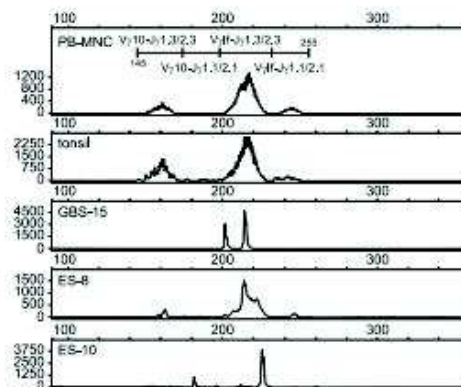
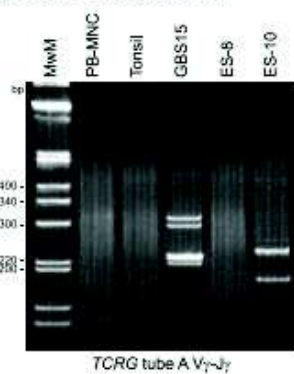


Sa diversité jonctionnelle est limitée : ceci permet une amplification plus facile, mais peut rendre la différence entre produits de *PCR* clonaux et produits polyclonaux plus compliquée.

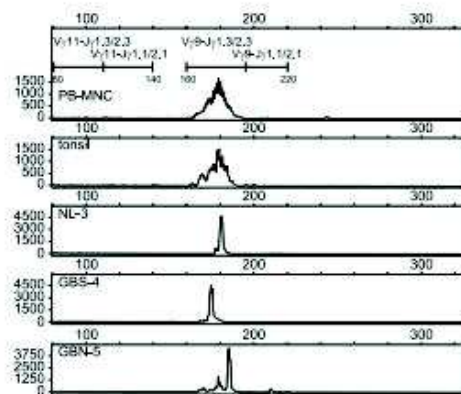
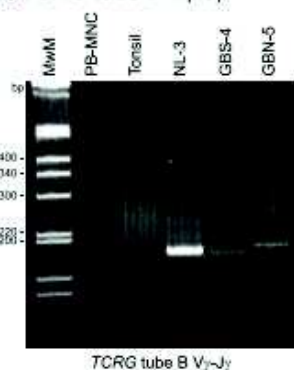
**a. TCRG gene complex (#7p14)**



**c. TCRG tube A V<sub>γ</sub>-J<sub>γ</sub>**



**d. TCRG tube B V<sub>γ</sub>-J<sub>γ</sub>**



**Figure 9** PCR analysis of TCRG gene rearrangements. (a) Schematic diagram of the human TCRG locus on chromosome band 7p14. Only the rearrangeable V<sub>γ</sub> gene segments are depicted in blue (functional V<sub>γ</sub>) or in gray (nonfunctional V<sub>γ</sub>). For the J<sub>γ</sub> gene segments, both nomenclatures are used.<sup>62,63,108</sup> (b) Schematic diagram of TCRG V<sub>γ</sub>-J<sub>γ</sub> rearrangement with four V<sub>γ</sub> primers and two J<sub>γ</sub> primers, which are divided over two tubes. The relative position of the V<sub>γ</sub> and J<sub>γ</sub> primers is indicated according to their most 5' nucleotide upstream (-) or downstream (+) of the involved RSS. (c and d) Heteroduplex analysis and GeneScanning of the same polyclonal and monoclonal cell populations, showing the typical heteroduplex smears and homoduplex bands (left panels) and the typical polyclonal Gaussian curves and monoclonal peaks (right panels). The approximate distribution of the polyclonal Gaussian curves is indicated in nt (see also Table 18).

Figure résumant les différentes étapes de l'étude du gène TCRγ

Etant donné la faible diversité jonctionnelle des gènes *TCR $\gamma$* , les auteurs du rapport BIOMED-2 recommandent une analyse systématique par hétéroduplex et *GeneScanning* : des séquences de tailles identiques en lien avec la faible variabilité jonctionnelle ont d'autant plus de risque de migrer dans un même pic clonal en *GeneScanning*, alors que leur caractère non clonal sera démasqué par la formation d'hétéroduplex.

Concernant l'étude de la clonalité dans des conditions d'ADN partiellement dégradé, des analyses sur ADN extraits de tissus fixés en paraffine ont montré des résultats relativement concluant (en comparant avec des cas de clonalité reconnus par d'autres techniques), en adaptant les dilutions d'ADN pour éluer les inhibiteurs de *PCR* et pour des produits obtenus d'au moins 300bp.

**Table 22** Number of clonal rearrangements detected in paraffin samples compared with number of clonal rearrangements detected in matched fresh/frozen sample

Maximal size of control gene PCR product	No. of clonal rearrangements in paraffin samples per no. of clonal rearrangements in fresh or frozen samples									
	<i>IGH V-J</i>	<i>IGH D-J</i>	<i>IGK</i>	<i>IGL</i>	<i>TCRB</i>	<i>TCRG</i>	<i>TCRD</i>	<i>t(11;14) BCL1-IGH</i>	<i>t(14;18) BCL2-IGH</i>	All loci
100 or 200 bp	3/11 (27%)	2/5 (40%)	2/10 (20%)	1/3 (33%)	0/9 (0%)	1/9 (11%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/2 (0%)	9/55 (16%)
300 or 400 bp	9/12 (75%)	5/7 (71%)	12/15 (80%)	4/4 (100%)	4/5 (80%)	3/5 (60%)	1/2 (50%)	1/2 (50%)	3/3 (100%)	42/55 (76%)

**Table 23** Effect of amount of DNA on the maximal size of control gene PCR products in 45 samples

Maximal size of PCR products	Number of cases according to maximal size of PCR products			
	500 ng	100 ng	50 ng	5 ng
100 bp	20 (44%)	19 (42%)	5 (11%)	14 (31%)
200 bp	23 (51%)	2 (4%)	13 (29%)	7 (16%)
300 bp	2 (4%)	18 (40%)	12 (27%)	11 (24%)
400 bp	0 (0%)	6 (13%)	15 (33%)	13 (29%)

*Tableau regroupant les résultats obtenus en fonction des tailles des produits PCR en condition d'ADN dégradé*

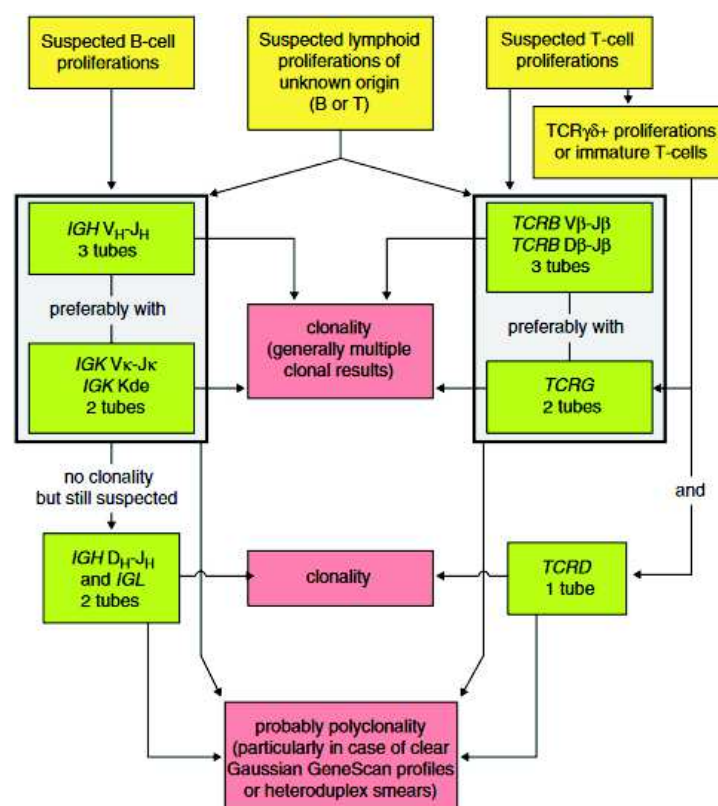
La comparaison entre la *PCR* et le Southern Blot dans le diagnostic de clonalité T ou B montre, au terme du rapport BIOMED-2, une grande concordance pour les cibles étudiées, permettant de valider l'utilisation des amorces et des protocoles en pratique de routine avec les amorces standardisées (*PCR* multiplex) mises au point au cours de l'étude.

Le deuxième rapport, complémentaire, s'attache à rendre l'interprétation des résultats obtenus la plus objective possible en proposant des guidelines : si les deux premiers écueils de la *PCR* sont le faux négatif par mauvais alignement des amorces et le risque de faux positifs par

distinction difficile entre monoclonalité et polyclonalité, les phases d'interprétation en pré et post analyses sont elles aussi soumises à des biais.

La première proposition du rapport concerne l'information sur la population cellulaire à tester : cette population doit être choisie en fonction des données histologiques ou immunohistochimiques ou à partir d'un immunophénotypage. Ces informations, importantes pour l'interprétation, sont à prendre en compte à la fois pour la détection des cellules mises en cause mais également pour la détection de celles composant le « bruit de fond ».

Vient ensuite le choix des cibles à étudier, pour lequel les auteurs proposent le diagramme de stratégie suivante :



**Figure 1.** Strategy for PCR-based clonality diagnostics in suspected lymphoproliferations with an inconclusive diagnosis or with unusual histology, immunophenotype or clinical presentation, using the EuroClonality/BIOMED-2 multiplex PCR protocols. In case of a suspected B-cell proliferation, IGH V<sub>H</sub>-J<sub>H</sub> multiplex PCR analysis is best performed first. As a second step, IGK PCR analysis (V<sub>K</sub>-J<sub>K</sub> and Kde rearrangements) can be chosen. Preferably, these two steps are combined to avoid delay in the diagnostic process. Finally, IGH D<sub>H</sub>1-6-J<sub>H</sub> PCR analysis (potentially combined with IGL analyses) can be reserved for remaining suspected cases, in which the preceding PCR assays have failed to detect monoclonality and have not shown clear signs of polyclonality either. For suspected T-cell proliferations, TCRB multiplex PCR is generally slightly more informative than TCRG PCR, but the order of analysis of these two loci can be changed as they provide complementary information; preferably both targets should be used in parallel. Only in case of suspected TCRγδ<sup>+</sup> T-cell proliferations and immature T-cell proliferations (suspicion of lymphoblastic malignancies), combined TCRG and TCRD PCR analysis is preferred. In case of suspected lymphoproliferations of unknown origin, both Ig and TCR genes should be used as PCR targets. It should be noted that in such cases the clonal Ig/TCR results cannot be used straightforwardly for B-/T-lineage assignment. A full-proof diagnosis of polyclonality remains difficult, but a high probability of polyclonality is supported by clear Gaussian GS curves or HD smears in the absence of clonal results.

En préanalyse, il est notamment conseillé en cas d'ADN en petite quantité ou de pauvre qualité, d'étudier le locus *TCRγ* plutôt que le locus *TCRBβ* (amplicons nécessaires plus grands). La

combinaison des études des *loci TCRβ* et *TCRγ* est préconisée pour rechercher un clone avec la plus grande sensibilité possible.

En post analyse, il se peut qu'une tentative de *PCR* ne donne pas d'amplification ; cela concerne principalement les études des lymphocytes B (pour plusieurs raisons notamment hyper mutations empêchant l'hybridation, absence de cellules suite à un traitement anti-CD20...), mais un ADN de mauvaise qualité ou trop peu d'ADN peut également être un problème pour une étude du locus *TCRγ*.

Le principal écueil en post analyse est surtout l'interprétation des résultats, qui dépend en partie des informations déjà connues sur l'échantillon étudié, mais est également dépendant de l'opérateur qui interprète le rendu de la *PCR*. Il convient de faire plus particulièrement attention dans les conditions d'amplification suivantes :

-La quantité peu importante de lymphocytes dans l'échantillon (par exemple tissu contenant peu de lymphocytes comme la peau) : s'il y a peu de lymphocytes, on peut être confronté à une amplification préférentielle avec une fausse impression de clonalité ; les auteurs du rapport EuroClonality désigne cela par le terme de « pseudoclonalité ».

-Les situations d'infection ou d'inflammation : on peut alors retrouver l'émergence de plusieurs pics clonaux liés à une réponse immunitaires exagérée, qui ne sont pas à mettre en lien de manière systématique avec une suspicion de malignité.

-Concernant les sujets âgés, les patients immunodéprimés et les patients transplantés : leur système immunitaire étant plus ou moins défectueux, la production de lymphocytes T est réduite et peut alors prendre un aspect oligoclonal.

Ces différentes situations sont résumées dans le tableau suivant avec le profil de réaction *PCR* attendu en fonction de chaque situation :

<i>Immunobiological condition</i>	<i>Examples</i>	<i>Expected profile in PCR reaction</i>
No lymphocytes	Non-hematopoietic tissue	No peaks/bands (w/o background) <sup>d</sup>
Paucity of lymphocytes	Small infiltrate, small sample (for example, skin)	(Minor) peaks/bands, not reproducible
(Immune)activation with dominant clones	Dominant immune response (for example, infection, autoimmunity)	(Multiple) peaks/bands, reproducible
Reactive lymphocytes	Broad immune response	(Irregular) Gaussian curve/smear
Monoclonality (mono-/bi-allelic)	Leukemia, lymphoma, (clone of unknown significance) <sup>b</sup>	One or two peaks/bands <sup>c</sup>
Monoclonality + polyclonal background	Idem,(small) clone between normal/reactive lymphocytes <sup>b</sup>	One or two peaks/bands <sup>c</sup> + Gaussian curve/smear
Monoclonality (somatically mutated)	Idem, (post-)follicular B-cell process	No peaks/bands <sup>d</sup> (or Gaussian curve/smear from remaining normal lymphocytes) <sup>a</sup>

Abbreviations: Ig, immunoglobulin; IGK, IG kappa; TCR, T-cell receptor; TCRB, TCR beta. <sup>a</sup>Nonspecific peak(s)/band(s) might be observed. <sup>b</sup>Clone of unknown significance is mostly seen under conditions in which there is some residual background of polyclonal cells. <sup>c</sup>Number of peaks/bands is dependent upon competition in PCR reaction; for IGK and TCRB loci up to four clonal products may be compatible with one clone. <sup>d</sup>Represents false-negative result.



La solution proposée pour minimiser ces biais est le contrôle et la répétition des PCR qui devraient conduire, en cas de clonalité vraie, à une reproductibilité du résultat : ceci soit sur un même échantillon, soit sur plusieurs échantillons différents provenant d'un même cas. Les différents phénomènes observables et les écueils ou biais d'interprétation possibles, ainsi que les propositions de solution pour limiter les biais ou vérifier les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

2

<i>Phenomenon</i>	<i>Pitfall</i>	<i>Potential solution</i>
Lack of clonal signal and lack of polyclonal Gaussian curve	1. Poor DNA quality 2. Few T/B cells 3. Clonal signal not detected due to SHM in malignant cells	1. Check DNA quality in control PCR 2. Check T-/B-cell content by histology or flow cytometry 3. Evaluate other framework or Ig target
Bands/peaks outside size range	1. CDR3 regions/junctions outside 5–95% size interval 2. Nonspecific product	1. True rearrangement product; in case of doubt, sequence for confirmation 2. Check Table1 for sizes of nonspecific products
Undersized bands/peaks	For example, internal deletion in <i>VH/Vκ/Vλ</i> gene (SHM related)	Potential rearrangement product; sequence for confirmation
Oversized bands/peaks	For example, extended amplification from downstream <i>J</i> gene (for example, due to SHM in rearranged <i>JH</i> gene)	Potential rearrangement product; sequence for confirmation
Multiple clonal signals	Bi-allelic rearrangements Biclonality	Consider the number of potential rearrangements per allele/locus <sup>a</sup> and judge whether this fits with clonality (with biallelic rearrangements) or biclonality
Selective amplification and pseudo-clonality, due to low level of specific template	Few T/B cells in sample	Repeat multiple PCRs (same tissue, second independent DNA isolation and/or related tissue) → compare patterns for consistency
Oligo-/monoclonality in histologically reactive lesion	Exaggerated immune response with dominant specificity (for example, large germinal centers)	1. Repeat multiple PCRs (same tissue, second independent DNA isolation and/or related tissue) → compare patterns for consistency between samples and multiple targets 2. Re-evaluate histopathology
Oligoclonal T-/(B)-cell repertoire in peripheral blood of elderly individuals, immunodeficient patients or transplant patients	Incomplete immune system, for example, in case of immunosenescence or reduced/suppressed lymphocyte production	Repeat multiple PCRs (same tissue, second independent DNA isolation and/or related tissue) → compare patterns for consistency and compare with primary process (in case of staging)

Abbreviations: CDR, complementarity-determining region; HD, heteroduplex; Ig, immunoglobulin; IGK, IG kappa; SHM, somatic hypermutation; TCR, T-cell receptor; TCRB, TCR beta. <sup>a</sup>In TCRB and IGK loci multiple rearrangements can be detectable per allele, which influences the number of peaks/bands that is compatible with a single clone.<sup>35</sup> Complex patterns may be seen after HD analysis.

Afin d'aider à harmoniser les pratiques et les rendus de résultats, les auteurs proposent les conclusions suivantes en fonction des résultats des produits de PCR :

Table 5. The EuroClonality uniform system for molecular conclusion		
Overall technical description for all Ig or TCR targets	Molecular interpretation/conclusion	Optional: more detailed molecular interpretation <sup>a</sup>
No (specific) product, poor DNA quality No (specific) product	Not evaluable, due to poor DNA quality No rearrangement in Ig/TCR targets detected	
Clonal (... nt) <sup>f</sup>	Clonality detected	Clonality detected (biallelic products) Clonality detected (biclinality) Clonality detected (minor clonal product) Clonality detected (isolated rearrangement) clonality detected (with caution, plus advice for follow-up analysis/new sample) Clonality detected in addition to background of B/T cells
Pseudoclonal (one or more non-reproducible products)	No clonality detected, suggestive of low template amount	
Multiple reproducible products ( $n \geq 3$ ) <sup>b</sup>	Oligoclonality/multiple clones detected	Dominant clone in oligo/polyclonal background
Polyclonal (not clonal <sup>c</sup> )	Polyclonality detected (no clonality detected <sup>d</sup> )	Polyclonality detected plus minor clone of unknown significance <sup>e</sup>
Not evaluable	Not evaluable <sup>e</sup>	

Abbreviations: HD, heteroduplex; Ig, immunoglobulin; IGK, IG kappa; nt, nucleotide; TCR, T-cell receptor; TCRB, TCR beta. <sup>a</sup>Examples of more detailed molecular interpretation options that can be chosen by the user. <sup>b</sup>For IGK and TCRB loci up to four clonal products may be compatible with one clone. <sup>c</sup>In HD analysis a polyclonal smear may not always be clearly detectable, despite specific product in agarose gel; hence this is scored as 'not clonal'. <sup>d</sup>For those cases in which minor reproducible peaks/bands are detected in the polyclonal background. <sup>e</sup>In <5% of cases the molecular interpretation cannot be made. <sup>f</sup>Clonal peaks/bands are not necessarily seen for every Ig/TCR target analyzed to reach the molecular conclusion 'clonality detected'.

Le réarrangement TCR obtenu par *PCR*, bien que la pratique soit rapide, accessible et précise (sensibilité de 0,01%) reste donc à interpréter en fonction de tous ces éléments et, bien entendu, en fonction, du contexte clinique, dans une collaboration entre le clinicien et le biologiste moléculaire.

Une nouvelle étude<sup>(15)</sup> s'est basée sur ces précédents travaux pour améliorer encore l'efficacité de la technique, notamment concernant :

- la limitation des surinterprétations de pics mineurs
- le regroupement des amorces en un seul tube
- la génération de produits *PCR* de petite taille pour faciliter l'analyse de l'ADN issu de biopsies en paraffine

Cette étude a permis la mise en place d'un système de mix d'amorces unique avec mono fluorochrome, nucléotides spécifiques, permettant d'éviter les faux positifs et les discordances entre laboratoires. En effet, avec les deux mix initialement utilisés dans le protocole BIOMED-2, plus de pics étaient retrouvés de manière discordante entre différents laboratoires. Ceci pouvait notamment être en lien avec une large dispersion de taille des produits de *PCR*, en particulier lorsque le prélèvement d'origine n'offrait que peu de lymphocytes. Par ailleurs, une amorce particulière a été exclue du mix en raison de sa tendance à majorer le taux de faux-positif. La sensibilité avec ce nouveau mix est similaire aux techniques précédentes mais la

spécificité est améliorée et le rendement en cas d'ADN extraits de biopsies en paraffine est également amélioré.

#### 1.3.3.5. Perspectives : NGS

La NGS, *Next-generation sequencing*, ou séquençage à haut débit, a pour base la technique de séquençage, mais appliquée à un très grand nombre de molécules d'ADN de manière simultanée, afin d'étendre les cibles de recherche (le plus souvent, sous forme de « puce NGS »). Si cette technique prometteuse est encore difficile à appliquer en pratique de routine pour des raisons d'accessibilité notamment, un nouveau consortium, l'EuroClonality-NGS consortium<sup>(8)</sup> a été créé afin de produire des standards de techniques et d'application pour la NGS, dans le même esprit que les rapports BIOMED-2 et EuroClonality BIOMED-2 : recherche de clonalité, analyse de la maladie résiduelle et analyse du répertoire lymphocytaire.

## 1.4. Restriction « physiologique » de clonalité du TCR

### 1.4.1. Influence de l'âge sur le répertoire TCR

Une contraction du répertoire TCR avec l'âge a été observée par plusieurs équipes<sup>(16)(17)</sup>. La diversité TCR diminue de manière linéaire avec l'âge à partir de 55 ans. Après 75 ans, le compartiment des LT CD4 naïfs est peu différencié par rapport aux LT mémoires. Le maintien du compartiment LT CD4 chez ces sujets se fait par prolifération homéostatique à partir de mitose en périphérie (et non à partir du thymus, qui perd en fonctionnalité avec l'âge).

Cette contraction concerne aussi les LT CD8. Il existe également des expansions clonales en plus de la restriction de diversité<sup>(18)</sup>. Ces expansions sont plus fréquentes chez les sujets de plus de 65 ans. Des expansions TCR V $\beta$  des LT CD8 sont retrouvées chez 33,4% des sujets de plus de 65 ans. Ricalton *et al* proposent d'extrapoler ce pourcentage à 70% d'expansions LT CD8 dans la population générale.

Parfois, ces expansions présentent des caractéristiques phénotypiques proches des cellules grands lymphocytes granuleux (LGL). Ces expansions concerneraient 15,9% des sujets de plus de 75ans. Elles ne sont pour le moment pas considérées comme un état pré-leucémique étant donné la rareté de la leucémie LGL mais leur signification n'est pas encore déterminée.

#### 1.4.2. TCUS : entité équivalente à la MGUS ?

Certains auteurs<sup>(19)(20)</sup>, par équivalence avec la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), proposent de considérer ces expansions clonales LT CD8+ comme une nouvelle entité : le *T Clone of Unknown Significance* ou « TCUS ». Ce rapprochement avec la MGUS se fait le plus souvent à partir de *case reports*<sup>(21)</sup>. Il a en particulier été décrit une sous famille d'expansion clonale LT CD8+CD28- : la perte du CD28 est un marqueur de senescence et ce sous type d'expansion pourrait être mis en rapport avec les expansions LT CD8+ du sujet âgé. L'autre hypothèse est celle d'un clone authentique LT CD8 TCUS qui surviendrait chez des sujets sains de la même manière qu'une gammopathie monoclonale. La signification clinique du TCUS n'est pas définie à ce jour, mais il s'agirait de trouver à terme des facteurs de risques d'évolutivité éventuelle vers un clone malin.

La présence d'un clone ne signe pas toujours la malignité, comme le rappellent Delfau-Larue *et al*<sup>(1)</sup>: ces auteurs ont mis en évidence le fait qu'il pouvait exister un clone sanguin sans clone cutané dans un certain nombre de cas de lymphome cutané. La présence d'un clone ne paraît significative qu'en cas de concordance entre un clone sanguin et un clone cutané. Un clone sanguin LT CD8 ou CD4 isolé serait plutôt à mettre en lien avec l'âge du sujet (plus de 60 ans), en concordance avec les données précédentes.

Cette existence de clones de signification indéterminée a été retrouvée par d'autres auteurs<sup>(22)</sup>. Les caractéristiques phénotypiques de ces « TCUS » les rapprochent également des cellules des T-LGL, sans remplir les critères diagnostics des clones LGL.



### 1.4.3. Lien entre auto-immunité et sujet âgé

Il a été retrouvé dans des répertoires TCR chez des patients atteints de maladies auto-immunes le même profil d'expansions clonales LT CD28<sup>-</sup> que chez les sujets âgés. Des auteurs<sup>(23)</sup> suggèrent un lien entre la contraction du répertoire TCR, la perte du CD28 et l'augmentation des régulateurs pro-inflammatoires avec gain de fonction cytotoxique de LT CD4<sup>+</sup> (les expansions clonales du sujet âgé sont majoritairement CD8<sup>+</sup> mais dans le cadre de la restriction de clonalité, les LT CD4<sup>+</sup> sont prépondérants dans le compartiment lymphocytaire). L'ensemble de ces éléments serait à l'origine d'une « atmosphère » pro-inflammatoire et pro-auto-immune chez le sujet âgé.

## 1.5. Restriction de clonalité du TCR et maladies auto-immunes

### 1.5.1. Généralités

L'étude de modèles murins a permis de mettre en évidence deux mécanismes possibles liant auto-immunité et répertoire TCR :

-Lien entre sénescence et auto-immunité avec expression précoce chez les souris lupiques de *senescence associated T cells* (SA-T cells)<sup>(24)</sup>. Ces dernières apparaissent normalement à un âge plus tardif avec le vieillissement. Elles seraient directement impliquées dans la production d'un environnement pro-inflammatoire et, ainsi, à la production d'auto-anticorps.

- Lien entre lymphopénie et auto-immunité<sup>(25)</sup>: il existe dans des modèles murins un mécanisme de reconstitution du compartiment lymphocytaire appelée prolifération lymphocytaire induite par la lymphopénie (LIP). La LIP vise à reconstituer le compartiment lymphocytaire après une agression qui aurait déplété le réservoir de lymphocytes. La LIP est d'autant plus prépondérante que la participation thymique est faible. Ce mécanisme peut favoriser les contractions du répertoire TCR, l'oligoclonalité, et la sélection de lymphocytes T avec une avidité importante pour le CMH (ce d'autant plus que l'environnement est inflammatoire).

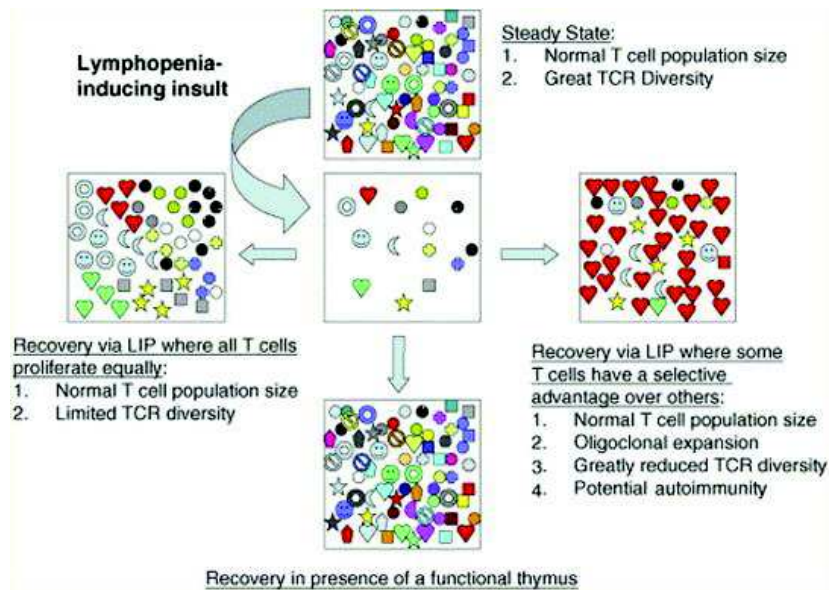


Figure expliquant les différentes évolutions possibles après agression du système immunitaire et lymphopénie dont la reconstitution via la LIP

Une grande partie des maladies auto-immunes chez l'humain s'accompagne d'une lymphopénie et l'étude du répertoire TCR retrouve également souvent une oligoclonalité chez ces malades.

Se pose la question de l'impact de cette oligoclonalité sur le développement d'éventuelles pathologies hématologiques, car on sait par exemple que les patients atteints de Gougerot-Sjogren ont un surrisque de développement de lymphome non Hodgkiniens (LNH) au cours de leur maladie<sup>(26)</sup>, avec un risque relatif jusqu'à 18,8 fois supérieur par rapport au lupus et à la polyarthrite (pas de surrisque significatif retrouvé pour ces maladies).

### 1.5.2. Polyarthrite rhumatoïde (PR)

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune caractérisée par une atteinte articulaire, en particulier des synovies. Les principaux symptômes sont des douleurs articulaires et des arthrites avec destruction progressive et déformation des articulations. Les anticorps en jeu sont le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-peptides citrullinés (anti-CCP). L'atteinte articulaire peut parfois être accompagnée d'atteinte systémique (pulmonaire, sérites et vascularite notamment). Cette pathologie présente une prédominance chez les femmes et après 40 ans.

On retrouve chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde une restriction de diversité des LT CD4+ sanguins par rapport aux contrôle sains<sup>(27)</sup>. Dans certaines études, des populations clonales LT CD4+ sont retrouvées dans les lésions synoviales en plus d'un fond oligoclonal<sup>(28)</sup>. On les retrouve également dans le sang et ces LT CD4+ sont CD28-. Ce profil paraît être associé à l'existence de manifestations extra-articulaires de la PR, comme la vascularite rhumatoïde, la kératite ou les nodules rhumatoïdes<sup>(29)</sup>. Les données sont contradictoires quant à une différence entre le répertoire sanguin et le répertoire synovial des LT CD4 ; Bröker *et al*<sup>(30)</sup> en particulier retrouvent une oligoclonalité intra-articulaire mais un répertoire polyclonal dans le sang ; cependant plusieurs équipes<sup>(27)(29)(31)</sup> retrouvent une restriction de clonalité et des expansions clonales dans plusieurs sites. Lim *et al*<sup>(31)</sup> retrouvent même des expansions clonales similaires dans des articulations différentes et dans le sang d'un même patient.

Des expansions clonales LT CD8+ sont également retrouvées dans le sang des patients atteints de PR<sup>(32)</sup>, notamment dans 33% des cas de Syndrome de Felty ; ces LT CD8+ peuvent également être CD28-.

### 1.5.3. Lupus érythémateux disséminé (LED)

Le lupus érythémateux disséminé est une pathologie auto-immune systémique caractérisée par la présence d'auto-anticorps anti-nucléaire avec spécificité anti-DNA et une consommation du complément. Il s'agit d'une pathologie qui touche principalement les femmes en âge de procréer (20-30 ans) et en particulier dans les groupes ethniques africains et asiatiques (par rapport aux caucasiens). Les principales atteintes sont : cutanées, articulaire, rénale, hématologique, neurologique, atteinte des séreuses, atteinte vasculaire. Maladie longtemps considérée comme due à un dysfonctionnement B, ceci a été dernièrement remis en cause et un rôle du système lymphocytaire T est également étudié. Les LT pourraient avoir un rôle dans cette pathologie en tant que cellules régulatrices, mais aussi en tant que cellules effectrices.

Dans des modèles murins<sup>(33)</sup>, de même que dans le sang de patients lupiques, on retrouverait une tendance à l'oligoclonalité du répertoire TCR $\alpha\beta$  de cellules LT double négatifs. Le répertoire sanguin des patients lupiques est biaisé de manière significative<sup>(34)(35)</sup>, que les LT soient doubles négatifs ou non. Les clonotypes composant ce répertoire semblent stables en cas de lupus quiescent. Il apparaît cependant qu'en cas d'activité de la maladie, les clonotypes

changent et soient plus nombreux dans le sang. En cas d'activité rénale concomitante, on constate que la restriction du répertoire TCR est plus grande dans l'infiltrat rénal et les clonotypes sont différents de ceux retrouvés dans le sang. Ceci pourrait être dû à une clairance des LT plus rapide dans le sang que dans le rein ou à une expansion clonale *in situ* dans le rein.

Ces données semblent être confirmées par une étude plus récente<sup>(36)</sup> de Xiao Liu *et al* qui, sur des échantillons de patients plus importants, retrouve également un biais du répertoire avec l'existence de plusieurs clonotypes chez les patients lupiques et atteints de polyarthrite rhumatoïde par rapport aux contrôles sains. Des clonotypes publics (partagés par plusieurs individus, parmi lesquels des contrôles sains) ont également été mis en évidence mais avec une fréquence d'expansions plus importante chez les malades. Le grand échantillon de malades disponible a permis de mettre en évidence des clonotypes prédominants chez les malades que les auteurs qualifient de clones associés à la maladie (lupique et rhumatoïde respectivement). Dans le cas du lupus, 198 clones spécifiquement associés au lupus ont été mis en évidence : ces clones pourraient être utilisés pour le diagnostic de lupus, à la manière d'un marqueur diagnostique d'après les auteurs. Une association entre la présence d'un de ces clones et l'activité de la maladie a également été retrouvée de manière significative.

#### 1.5.4. Syndrome de Gougerot-Sjogren

Le syndrome de Gougerot-Sjogren est une maladie auto-immune systémique caractérisée par la présence d'anticorps antinucléaire avec spécificité anti-SSA ou anti-SSB. Ce syndrome peut être primaire ou secondaire. Il existe une prédominance féminine des patients. Les principaux symptômes cliniques comprennent : un syndrome sec buccal et ophtalmique, une asthénie, des polyarthralgies. Il peut également y avoir une atteinte systémique de la maladie avec atteintes neurologique et rénale notamment.

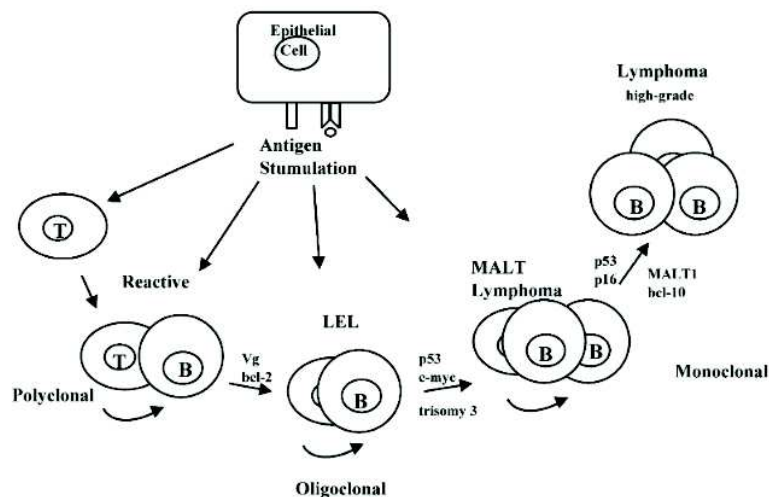
Il existe, chez les patients atteints de Gougerot-Sjogren, un surrisque d'hémopathie au cours du suivi : 5% des patients développent un lymphome au cours du suivi, principalement un lymphome du MALT ou un lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL). Concernant les lymphomes T chez les patients atteints de Gougerot-Sjogren, ils sont assez rares (5cas/110 de patients atteints de Gougerot avec LNH)<sup>(37)</sup>, et ce malgré la présence d'une restriction du répertoire TCR. Le LNH T le plus fréquent chez ces patients semble être le LAIT. Le délai de

survenue des hémopathies T dans le cours du suivi est en général de plusieurs années (2 à 10-20 ans).

Plusieurs facteurs de risques d'évolution vers un lymphome sont identifiés<sup>(38)(39)</sup> (dont la disparition du FR, la diminution des IgM sanguins, l'hypertrophie des glandes parotides, l'apparition de lymphadénopathies etc.).

Les mécanismes d'évolution vers un lymphome semblent comporter notamment la stimulation antigénique chronique (avec prolifération médiée par les lymphocytes T), l'inhibition de l'apoptose, la production de cytokines locales et la survenue d'évènements oncogénétiques (par exemple mutation p53). Localement, notamment au niveau des glandes salivaires, il semble que la monoclonalité IgH pourrait être un signe d'évolution vers un lymphome. Il existe des modèles murins ayant permis de formuler l'hypothèse que localement l'interaction entre les LB et les LT CD4 via le CD40 et le CD40L participerait à cette évolution. Cette interaction pourrait favoriser une diminution de l'apoptose (par le biais d'une hyper-expression de bcl-2 par exemple), et, ainsi participer à une transformation maligne avec émergence progressive d'un clone B. Une fois une mutation pro-oncogénique survenue chez un clone viendrait la transformation vers un lymphome du MALT.

Y. Masaki, S. Sugai / *Autoimmunity Reviews* 3 (2004) 175-182



*Schéma décrivant les étapes et les interactions des LT et LB dans le passage progressif d'un répertoire local polyclonal à un répertoire oligoclonal, puis transformation en lymphome du MALT chez les patients atteints de Gougerot-Sjogren*

Ces hypothèses posent la question du rôle des lymphocytes T dans la pathogénicité du syndrome de Gougerot-Sjogren mais aussi dans l'évolution vers une pathologie maligne.

Le répertoire TCR dans la maladie de Gougerot-Sjogren a été étudié en particulier dans les sites d'expression préférentiels de la maladie que sont les glandes salivaires/lacrymales et les reins. Il semble que le répertoire TCR au sein des glandes salivaires des patients atteints de Sjogren soit composé de LT CD4+  $\alpha\beta$  avec oligoclonalité *in situ*. De même, dans les glandes lacrymales sont retrouvés quelques lymphocytes T avec épitopes restreints<sup>(40)</sup>, et qui présentent quelques épitopes communs avec les LT des glandes salivaires. Concernant l'infiltrat rénal : il est composé lui aussi de LT CD4+ avec un répertoire TCR plus restreint que celui des glandes salivaires, mais aussi plus restreint que le répertoire sanguin. On retrouve globalement une restriction du répertoire TCR avec des expansions clonales au niveau des infiltrations locales. Ces expansions clonales ne sont pas les mêmes chez différents patients<sup>(41)</sup>.

La présence d'expansions clonales T dans les biopsies ne semble pas associée à une évolution vers un lymphome.

#### 1.5.5. Pseudo-polyarthrite rhizomélique et Artérite à cellules géantes

La pseudo-polyarthrite rhizomélique (PPR) est une pathologie inflammatoire rhumatismale qui touche principalement les sujets âgés (plus de 50 ans) et qui se caractérise cliniquement par des douleurs inflammatoires des ceintures, associées à un syndrome inflammatoire biologique. Cette pathologie peut être associée à une artérite à cellules géantes, vascularite des vaisseaux de moyens calibres. Cette dernière entité est caractérisée par des céphalées temporales, un syndrome inflammatoire biologique avec VS augmentée, des signes cliniques de vascularite des branches de la carotide externe, une possible atteinte ophtalmique. Histologiquement, on retrouve une artérite à cellule géante avec atteinte segmentaire et focale de la média du vaisseau par des cellules géantes sur biopsie de l'artère temporale (BAT).

Witzen *et al*<sup>(42)</sup> se sont intéressés à la détection des réarrangements TCR dans les hémopathies en les comparant notamment à la détection réalisée chez des patients atteints de maladies auto-immunes et inflammatoires, dont un cas de PPR. Des réarrangements monoclonaux ont été retrouvés dans 2 cas de maladies auto-immunes et/ou inflammatoires, dont chez le patient atteint de PPR. Les LT CD4+ sont les cellules prédominantes retrouvées dans les lésions histologiques. Pour un faible pourcentage de ces LT, plusieurs clonotypes particuliers sont

retrouvés dans certains sites inflammatoires des artères temporales. Ces clonotypes ne sont pas retrouvés comme étant sur-représentés dans le sang<sup>(43)</sup>.

Concernant le répertoire TCR sanguin, les études sont contradictoires<sup>(44)</sup> mais plusieurs<sup>(45)(46)</sup> retrouvent des LT CD8+ activés dans le sang périphérique des maladies et des LT CD8+ cytotoxiques dans l'infiltrat des artères temporales. Des expansions LT CD4+ sont aussi retrouvées sur l'histologie et dans le sang périphérique. Ces expansions CD4+ ont tendance à disparaître après traitement. Les expansions clonales LT CD8+ quant à elles persistent malgré le traitement. La comparaison des expansions clonales retrouvées dans les BAT avec les expansions sanguines<sup>(47)</sup> montre qu'il n'y a pas de concordance entre les expansions clonales retrouvées dans l'histologie et dans le sang périphérique chez un même patient.

#### 1.5.6. Anémie hémolytique auto-immune (AHAI)

A la frontière entre maladies auto-immunes et maladies hématologiques, on retrouve les cytopénies auto-immunes qui peuvent intéresser les internistes comme les hématologues en fonction du contexte de survenue : association avec un lupus ou association avec un lymphome par exemple. Le répertoire TCR chez les patients atteints d'AHAI a été étudié notamment afin de savoir si les patients porteur d'un clone évoluaient différemment les autres<sup>(4)</sup>: un réarrangement TCR a pu être retrouvé dans 15,91% des cas et un réarrangement IgH dans 18,18% des cas. L'étude de Zhu *et al* met en évidence le fait que les patients atteints d'AHAI avec un réarrangement TCR et/ou IgH (les deux réarrangements forment un même groupe) présentent une maladie plus sévère (taux d'hémoglobine plus bas, CRP plus élevée, délai plus long dans la réponse au traitement). En recherchant spécifiquement les expansions clonales CD8+ chez les patients atteints d'AHAI, on trouve un réarrangement TCR  $\gamma$  chez 48,5% des patients et un réarrangement TCR  $\beta$  chez 45,5% des patients, tandis qu'on ne retrouve pas de réarrangement monoclonal chez les patients contrôles atteints de lupus ou de polyarthrite rhumatoïde<sup>(48)</sup>. Contrairement à Zhu *et al*, on ne retrouve pas ici de corrélation entre la présence d'un réarrangement TCR et la sévérité de la maladie. Il se pourrait que la différence observée précédemment soit liée au regroupement des réarrangements TCR et IgH. Le rôle des clones T dans l'AHAI reste incertain, car pour le moment les études sont contradictoires quant à l'impact d'un clone T sur l'évolution de la maladie et il ne semble pas que le clone T soit lié à la survenue d'hémopathies T au cours du suivi.



### 1.5.7. Purpura thrombopénique immunologique (PTI)

Autre cytopénie auto-immune fréquemment rencontrée en Médecine Interne : le PTI, qui peut également être primaire ou secondaire. Concernant le PTI idiopathique, on note la présence d'une population oligoclonale de lymphocytes T dans le sang périphérique<sup>(49)(50)</sup>. Tous les patients avec PTI n'ont cependant pas une restriction de clonalité du répertoire TCR : on retrouve 60,6% de restriction de clonalité avec existence d'un réarrangement IgH dans 58,8% des PTI chroniques étudiés et une clonalité TCR dans 10,6% des PTI chroniques étudiés<sup>(51)</sup>. Le taux de réponse aux traitements, lorsqu'une escalade thérapeutique est requise, semble plus important en cas de restriction de clonalité.

Le répertoire TCR a également fait l'objet d'une étude particulière chez les patients splénectomisés dans le cadre d'un PTI réfractaire. Il semble qu'une non réponse à la splénectomie soit associée à l'existence d'une population T avec expansion clonale<sup>(5)</sup>. Cette expansion n'est pas présente chez les contrôles splénectomisés bon répondeurs. Le profil du répertoire TCR pré-splénectomie des patients n'est pas connu, on ne peut donc savoir si la population T est préexistante à la splénectomie. Un lien formel entre cette population T et l'échec du traitement par splénectomie ne peut être fait. Toutefois, dans la population pédiatrique de PTI<sup>(52)</sup>, on note une clairance des lymphocytes T  $\gamma\delta$  polyclonaux lors de la rémission du PTI. On peut alors faire deux hypothèses : la première est que la clairance des lymphocytes T  $\gamma\delta$  soit un simple stigmate ou marqueur de la fin de l'auto-immunité qui est à l'origine du PTI. La seconde hypothèse propose un lien entre clairance des lymphocytes T  $\gamma\delta$  et guérison du PTI. Ainsi, la question de la clairance des lymphocytes T clonaux en cas de non réponse à la splénectomie chez les adultes peut se poser : la persistance d'une population de lymphocyte T avec restriction du répertoire TCR serait-elle un stigmate d'une non clairance d'une auto-immunité persistante ou participe-t-elle au mécanisme pathologique de manière plus directe ? Il s'agit de considérations qui restent en suspens, malgré les quelques données disponibles sur le répertoire TCR dans cette pathologie.



## 1.6. Restriction de clonalité du TCR et maladies hématologiques

### 1.6.1. Leucémie à Grands Lymphocytes (LGL)

La leucémie à grands lymphocytes représente 2 à 5% des syndromes lymphoprolifératifs<sup>(53)</sup> avec une évolution le plus souvent indolente et chronique. Cependant, elle peut être à l'origine de complications, notamment infectieuses, en rapport avec des cytopénies. L'étude du locus TCR est utile dans le diagnostic des LGL<sup>(54)</sup>. Il existe deux types de LGL différentes : la LGL à cellules Natural Killer (NK) et la LGL à LT. Dans ce dernier type, on retrouve un clone LT de phénotype CD3+CD4-CD5dimCD8+CD16+CD27-CD28-CD45R0-CD45RA+CD57+ (phénotype de LT activé). La présence de LT clonaux avec ce phénotype particulier correspond à un des critères de la définition de la LGL. Ce clone peut être médullaire (>10% de cellules LGL au myélogramme) et/ou sanguin (en général seuil >2G/L de cellules LGL, mais seuil admis parfois plus bas <1G/L -pour une norme <0,3G/L). Un contexte de maladie auto-immune ou d'hémopathie autre peut être associé à ce diagnostic. Cependant, certains auteurs différencient la présence d'un TCR monoclonal dans le cadre d'une leucémie à grands lymphocytes et la présence d'un « petit clone » avec cellules à grand lymphocytes<sup>(55)</sup>. Ce « petit clone » serait différent car il ne serait pas en lien avec une hémopathie clinique de type LGL. Il n'y aurait ni symptômes, ni répercussions cliniques, et ce clone ne serait pas associé à une autre hémopathie ou une maladie dysimmunitaire. Ce « petit clone » présente tout de même également l'aspect de grand lymphocyte CD3+ CD8+ (dans la majorité des cas ; les cas de LGL CD4+/CD8+ou CD4+CD8- étant très rares), et reste à ce titre singulier par rapport aux autres clones TCR existants.

### 1.6.2. Syndromes myélodysplasiques (SMD)

La myélodysplasie est un groupe de pathologies hétérogènes caractérisées par une hématopoïèse clonale et une insuffisance médullaire. Elle peut être accompagnée de manifestations auto-immunes. Les syndromes myélodysplasiques sont classifiés en

stratification de risque de transformation en leucémie aiguë myéloïde (bas, intermédiaire et haut risque) et également divisés en six sous-groupes : anémie réfractaire, anémie réfractaire sidéroblastique, cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée, anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB), syndrome myélodysplasique inclassé, sous-type syndrome 5q-. Le taux de progression d'un syndrome myélodysplasique vers une leucémie aiguë myéloïde (LAM) est d'environ 30%<sup>(56)</sup>.

Un biais du répertoire TCR a été retrouvé chez les patients atteints de syndrome myélodysplasique (prélèvements médullaires) par rapport à des sujets sains<sup>(57)</sup>. Ce biais diminuerait après traitement, mais cela n'a pas été confirmé par les auteurs concernant les traitements par agents hypométhylants. Geng *et al*<sup>(56)</sup> confirment l'existence d'un répertoire TCR CD8+ avec expansions clonales dans les AREB et les AREB-LAM. Ces expansions sont plus souvent retrouvées chez les patients de 60 ans ou plus. Il n'y a pas d'association entre la présence des expansions et des facteurs autres (sexe, numération, sous-type de SMD, score pronostic).

Ces LT clonaux seraient retrouvés dans 50% des SMD<sup>(58)</sup>, là encore sans lien significatif avec des paramètres paracliniques ou des scores pronostics. Lorsqu'un examen médullaire est réalisé, les expansions clonales sont systématiquement quantitativement plus importantes dans la moelle que dans le sang. Le profil des LT CD8+ est CD28- CD57- avec marqueurs de cytotoxicité. Il y aurait un rôle supposé de ces expansions clonales dans la suppression hématopoïétique chez les patients avec un SMD mais ce lien n'a pu être prouvé à ce jour.

### 1.6.3. Hyperéosinophilie

L'hyperéosinophilie persistante est un motif de consultation relativement fréquent en Médecine Interne. La démarche diagnostique s'attache tout d'abord à rechercher des étiologies pour une éventuelle hyperéosinophilie réactionnelle ou s'intégrant à une autre pathologie (auto-immune ou hémopathie lymphoïde). Une fois ces causes exclues, on peut évoquer un syndrome lymphoprolifératif spécifique : l'hyperéosinophilie essentielle. C'est un syndrome qui est caractérisé par une prédominance masculine des patients, avec un âge compris entre 20 et 50 ans et on retrouve à l'étude moléculaire les mutations *PDGFRA*, *PDGFRB*, *FGFR1*.

Lorsque l'hyperéosinophilie essentielle est également exclue, l'hypothèse diagnostique principale reste l'hyperéosinophilie idiopathique, dont la définition est surtout une définition d'exclusion. Cette hyperéosinophilie peut être associée à un clone. Chez les enfants, ces syndromes idiopathiques peuvent évoluer<sup>(59)</sup> vers une leucémie ou un lymphome T lorsqu'une prolifération clonale est associée à l'hyperéosinophilie.

Il existe également le cas particulier de l'hyperéosinophilie associée à un clone lymphocytaire, nommée hyperéosinophilie lymphoïde (« *lymphocytic hypereosinophilia* »). Il s'agit d'une hyperéosinophilie en lien avec une population de lymphocytes T à l'immunophénotypage aberrant CD2+CD3-CD4+CD5bright+CD7-/partial+CD8- (plus rarement : CD3+CD4-CD8-) avec un profil Th2 (en lien avec l'IL5 et l'IL4)<sup>(60)(61)</sup>. La manifestation clinique la plus fréquemment observée est l'atteinte cutanée, mais d'autres manifestations peuvent se voir : adénopathies, prurit, urticaire, angioœdème intermittent<sup>(62)</sup>. Une forme clinique particulière peut émerger : le syndrome de Gleich<sup>(63)</sup>. Ce dernier regroupe un angioœdème épisodique avec hyperéosinophilie concomitante et augmentation des taux sanguins d'IgM. Les patients atteints présentent un réarrangement TCR dans 40% des cas et, le plus souvent, ces réarrangements se retrouvent en cas d'urticaire ou de lymphadénopathies.

Concernant plus largement la variante lymphocytaire du syndrome hyperéosinophilie, 5 à 20% des patients seraient à risque de développer un lymphome T lors du suivi (parfois au bout de plusieurs années). Il semble que la présence d'un marqueur CD10 (partiel ou positif) puisse être liée à l'évolution secondaire de cette population atypique vers un lymphome angio-immunoblastique (ce lymphome semblant être l'évolution maligne privilégiée dans cette configuration). La différenciation histologique en cas d'adénoprolifération n'est pas forcément aisée entre un syndrome lymphoprolifératif bénin tel que le syndrome hyperéosinophilique et un LAIT. Devant ce phénotype aberrant, il paraît légitime de rechercher un clone avec réarrangement TCR: il n'est pas toujours mis en évidence, notamment lorsque le pourcentage de lymphocytes sur le prélèvement est faible, mais on peut retrouver un réarrangement TCR  $\gamma\delta$  jusqu'à 76% des cas<sup>(64)(65)</sup>. A noter que ce clone peut se négativer au cours du suivi dans presque la moitié des cas. Lorsque l'évolution est défavorable et se fait vers une prolifération maligne, les clones TCR retrouvés sur les biopsies (ganglionnaires et/ou cutanées) sont les mêmes que ceux retrouvés dans le sang lors de l'évaluation initiale de la maladie. Sur la cohorte française, on retrouve, au cours du suivi, 10% des patients avec syndrome hyperéosinophilique et clone T qui développent un lymphome dans les 4 à 15 ans après la présentation initiale<sup>(66)</sup>. Il peut s'agir d'un lymphome anaplasique, d'un lymphome périphérique T ou d'un lymphome angio-

immunoblastique. Il n'a pas été mis en évidence de critères clairs d'évolution vers la malignité. Souvent on retrouve une majoration des adénopathies chez ces patients, motivant la proposition de surveillance par PET scanner de manière annuelle et la quantification du contingent LT CD3-CD4+ tous les 6 mois. Quant au monitoring du clone T, il est proposé que le réarrangement TCR soit contrôlé mais sans précision quant à la régularité.

#### 1.6.4. Myélome multiple et Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Le myélome multiple et la LLC sont deux types de lymphoproliférations différentes, mais dont la relation avec la clonalité TCR a parfois été étudiée ensemble dans les premiers articles à aborder le sujet<sup>(67)(68)</sup>. Le myélome est une hémopathie clonale avec clone plasmocytaire pathologique médullaire, dont le diagnostic repose sur l'étude de la plasmocytose médullaire. La LLC est une pathologie clonale avec clone B dont le diagnostic repose sur un profil d'immunophénotypage spécifique sanguin (score de Matutes).

Ces premières études retrouvent une tendance à la clonalité dans le répertoire T au sein de la LLC et du myélome multiple (en particulier myélome indolent). Ceci pourrait, selon les auteurs, être en lien avec la réponse des lymphocytes T à l'hémopathie. Le répertoire T dans le myélome multiple a fait l'objet de comparaisons avec les répertoires des sujets sains<sup>(69)</sup>: les patients atteints de myélome multiple (évolutif ou en rémission) présentent un biais des lymphocytes T régulateurs avec moins de lymphocytes  $\gamma\delta$  mais une tendance à l'expansion clonale de ces mêmes lymphocytes. Le lien entre la réponse immunitaire de l'hôte et la présence d'une population clonale T dans le cadre du myélome multiple n'est pas élucidé (inhibition de l'activité anti tumorale ?), mais il semble que leur présence accrue constitue un facteur de mauvais pronostic. Il a été suggéré, devant l'association de MGUS et de LGL que retrouver un clone T de type grand lymphocyte pourrait constituer une réponse spécifique au myélome<sup>(70)</sup>. Il ne s'agirait pas ici d'un contingent malin en soit ni d'un état pré-malin mais d'un stigmate de la réponse immunitaire de l'hôte.

### 1.6.5. Lymphomes et leucémies

Dans le cadre des lymphomes et des leucémies, l'intérêt diagnostique de l'étude du réarrangement TCR réside principalement dans le diagnostic des hémopathies présentant des atypies morphologiques ou phénotypiques<sup>(54)</sup>. Cet intérêt est surtout manifeste dans l'orientation diagnostique des lymphomes cutanés ou des LAIT. Il convient cependant de noter qu'une absence de clonalité n'exclut pas le diagnostic. Le contingent clonal peut en effet être sous le seuil de détection (notamment dans le cas de biopsies avec peu de lymphocytes, telles que les biopsies cutanées).

Les premières études sur le sujet proposaient une corrélation entre le type de lymphome et la présence ou non d'un réarrangement TCR/IgH. Carbose *et la*<sup>(71)</sup>, en 1989 ne retrouvent pas, dans les LNH B, de réarrangement clonal. Depuis, des études ont pu être réalisées sur de plus grands effectifs et deux situations particulières ont été mises en évidence concernant le réarrangement TCR dans les pathologies lymphoïdes<sup>(72)</sup>: les réarrangements « illégitimes » et les « trans-réarrangements ». Ces derniers concernent principalement le réarrangement entre le locus gène du TCR et un locus distinct (ou intra-génique) de pro-oncogène, soit par translocation chromosomique, soit par oncogénèse « médiée par la recombinaison » en générale. Les réarrangements « illégitimes » concernent les réarrangements B (IgH) dans les lymphomes T et les réarrangements T (TCR) dans les lymphomes B. Ils existent principalement dans les formes immatures de Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) mais se retrouvent tout de même, bien que beaucoup plus rarement, dans les syndromes lymphoprolifératifs plus matures. Ainsi, un réarrangement TCR avec hémopathie ne signe pas la présence d'une hémopathie T<sup>(73)</sup>, comme en témoigne les tableaux suivants :

**Table 2. Approximate incidence of clonal Ig/TCR rearrangement in lymphoid malignancies, as detected by PCR from DNA. Only diagnostic PCR targets are cited**

	IgH	IgK	Igλ	TCRδ	TCRγ	TCRβ
<b>B-Cell Proliferation</b>						
BCP-ALL	90	30	20	30	60	30
CLL	100	100	30	10	20	25
<b>Non-Hodgkin's Lymphoma</b>						
FL	90	85	20	5	5	5
MCL	100	100	45	5	10	10
BLBCL	85	80	30	15	15	20
MZL	95	80	30	10	15	20
<b>T-Cell Proliferation</b>						
T-ALL	5	0	0	50	90	90
T-LGL	0	5	5	30	95	95
AILT	30	30	5	35	90	90

Abbreviations: BCP-ALL: B-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia; CLL: Chronic Lymphocytic leukemia; FL: Follicular Lymphoma; MCL: Mantle Cell Lymphoma; BLBCL: Diffuse Large B-Cell Lymphoma; MZL: Marginal Zone Lymphoma; T-ALL: T-cell acute lymphoblastic leukaemia; T-LGL: T-Large Granular lymphocytic leukaemia; AILT: Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma.

(72)

**Table 2** Incidence of clonal gene rearrangements in T and B cell lymphomas and leukaemias

Disease	T cell receptor			Immunoglobulin		
	TCRB	TCRG	TCRD	IgH	IgK	IgL
Lymphoblastic T cell malignancies						
CD3- T ALL	84	85	76	16	0	0
CD3+ T ALL	96	100	58	6	0	0
Lymphoblastic T NHL	79	100		10	33	0
Mature T cell malignancies						
T CLL	84	97		3	0	0
T PLL	100	>90	25	7		
ATLL	100	100	0	3	0	0
Peripheral T NHL	80	80	20	4	12	0
CTLL/MF	100	100		7	0	0
Lymphoblastic B cell malignancies						
Null ALL	9	22	0	95	13	9
Common ALL	41	66	54	99	32	2
Pre B ALL	23	44	20	100	8	20
B ALL	0	0		100		
Mature B cell malignancies						
B CLL	7	0	0	100	100	30
HCL	0	0	0	100	100	70
B NHL	6	6		100	100	30
Multiple myeloma	5	0	0	100	100	30

Table adapted from van Dongen and Wolvers-Tettero<sup>77</sup> and Gill and Gulley<sup>75</sup>.

ALL, acute lymphoblastic leukaemia; ATLL, HTLV1 positive adult T cell leukaemia/lymphoma; CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CTLL, cutaneous T cell lymphoma; HCL, hairy cell leukaemia; MF, mycosis fungoides; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; PLL, prolymphocytic leukaemia.

(54)

*Tableaux : incidence des réarrangements clonaux IgH et TCR sur biopsie en fonction du type d'hémopathie*

La mise en évidence d'un réarrangement TCR, même dans le cas d'un lymphome T confirmé, n'est pas de 100% : selon les études, concernant les LNH T notamment, on peut retrouver un réarrangement TCR dans la biopsie dans 60 à 100%<sup>(74)</sup>. Il y a une moindre détection de clonalité dans le lymphome à grandes cellules anaplasique. A contrario, le taux de détection de réarrangement TCR les plus positifs sont retrouvés dans les lymphomes T cutanés et les lymphomes T périphériques. La présence d'un clone T en concordance des données immuno-morphologiques peut aider à aboutir à un diagnostic dans 76% des cas de diagnostics indéfinis. Pour les autres cas, c'est principalement l'évolution clinique qui a permis d'avancer le

diagnostic. L'étude de multiples biopsies avec suspicion initiale de lymphome a aussi permis de mettre en évidence que dans 9% des cas, un réarrangement TCR a été retrouvé sur la biopsie alors que le diagnostic posé final n'était pas celui d'un lymphome. Enfin on note également le cas particulier des LAIT où il semble y avoir le plus de cas de réarrangements TCR et IgH positifs (25% des cas contre 9% des cas dans les autres lymphomes T).

Ainsi, bien que dans la majorité des syndromes lymphoprolifératifs T on retrouve un réarrangement TCR, on ne peut présumer de la nature B ou T d'une lymphoprolifération seulement à partir de ces réarrangements. Dans certains cas particuliers de lymphomes B, il est même possible que les réarrangements TCR et les expansions clonales ne soient pas les mêmes dans le sang, la moelle et sur biopsie ganglionnaire<sup>(75)</sup>.

Concernant les leucémies, notamment les leucémies T de l'adulte (ATLL) liées à HTLV1<sup>(76)(77)</sup>, on constate qu'un plus grand nombre de patients présentant un réarrangement TCR monoclonal développent une leucémie aiguë. La restriction globale du répertoire TCR chez les patients semble être corrélée à la survenue d'une pathologie hématologique agressive. En effet, on estime que le risque de développer ATLL au cours d'une infection à HTLV est de 5% au cours de la vie du sujet (20% en cas de charge virale importante). Ce risque augmente à 42% dans les 20 années suivantes en cas de passage d'une oligoclonalité à une monoclonalité T. On différencie l'existence de multiples clonotypes T chez les patients infectés asymptomatiques, et la présence d'un seul et unique clone T lors du passage au stade de leucémie.

## 1.7. Restriction de clonalité du TCR et déficits immunitaires

### 1.7.1. Déficit immunitaire commun variable (DICV)

Le déficit immunitaire humoral le plus fréquent (1cas/30 000) est le déficit immunitaire commun variable, ou DICV. Contrairement à la plupart des déficits immunitaires, ce dernier peut être méconnu jusqu'à l'âge adulte et avoir des phénotypes cliniques plus ou moins sévères. Ce déficit immunitaire est caractérisé par une hypogammaglobulinémie marquée, plus ou moins associée à une lymphopénie B, à une atteinte des macrophages et des lymphocytes T



(notamment régulateurs). Les dysfonctionnements T dans le DICV consistent à la fois en une déficience numérique (lymphopénie T), une prolifération par activation antigénique défectueuse et une prolifération de LT naïfs moindre.

Ce dysfonctionnement de prolifération est accompagné d'une altération des séquences variables du CDR3, avec un nombre plus réduit de séquences et donc une moindre diversité jonctionnelle<sup>(78)</sup>: la diversité TCR est donc restreinte. Par ailleurs, on remarque également chez ces malades l'existence d'une clonalité TCR, et ceci indépendamment de la survenue de phénomènes auto-immuns, de l'existence ou non d'une hyperplasie lymphoïde, d'une atteinte pulmonaire lymphocytaire ou granulomateuse, d'un antécédent de lymphome B, d'une splénomégalie, d'une splénectomie ou d'une entéropathie. Cette restriction du répertoire TCR et l'expansion clonale du répertoire retrouvée chez les patients atteints de DICV semble être d'origine thymique et périphérique.

La restriction de clonalité TCR dans le DICV vient donc en partie d'une diminution de production de LT naïfs dans le thymus. Cependant il existe des études suggérant<sup>(79)</sup> une perte accélérée de la diversité du répertoire TCR dans le DICV, et ceci de manière hétérogène entre les différents sous-groupes de DICV. Le DICV est donc un état pathologique avec anomalies B prédominante mais qui s'accompagne d'une perte de la diversité TCR et d'une expansion clonale T.

### 1.7.2. Déficit immunitaire combiné sévère (DICS)

Les déficits immunitaires combinés sévères (ou DICS) sont des déficits immunitaires dont les symptômes débutent très tôt dans la vie (souvent dès la naissance). Ils consistent le plus souvent en une absence partielle ou totale de lymphocytes B et de lymphocytes T et donc en une absence d'immunité spécifique. Les DICS sont des maladies monogéniques avec expressions et phénotypes variables en fonction de l'anomalie génétique en cause. Ils comprennent un déficit immunitaire, des malformations d'organes, ainsi que, fréquemment, des maladies auto-immunes associées.

Le syndrome de DiGeorge est un syndrome polymalformatif en lien avec la délétion 22q11.2 : l'atteinte clinique est plus ou moins sévère et comprend notamment des malformations cardiaques congénitales, des malformations faciales/ORL et une aplasie ou une hypoplasie



thymique. Le syndrome d'Omenn (déficit en *RAG*) associe érythrodermie, hépatosplénomégalie, lymphadénopathies, pneumonite, diarrhées, taux d'IgE sanguins élevés avec éosinophilie, hypogamaglobulinémie et retard de croissance.

Des associations syndromiques existent comme un syndrome de DiGeorge associé à un syndrome d'Omenn<sup>(80)</sup>: le défaut thymique retrouvé dans le DiGeorge implique un défaut de recombinaison VDJ, de même que le défaut en *RAG* fonctionnel. Ceci a pour conséquence un défaut de réarrangement TCR. La population de lymphocytes oligoclonaux qui en découle présente des anomalies phénotypiques (double négatif CD4-/CD8-) et fonctionnelles. Ces lymphocytes participent à la survenue de symptômes auto-immuns.

Cette restriction TCR oligoclonale se retrouve également dans le cas<sup>(81)</sup> d'une mutation *ARTEMIS* avec syndrome d'Omenn. L'anomalie de la recombinaison VDJ est cette fois liée au dysfonctionnement dans la formation de la tête d'épingle, processus contrôlé en grande partie par les protéines *RAG*, mais dans laquelle participe également *ARTEMIS*. Ce déficit en recombinaison paraît être encore plus important en cas de mutation de *RAG1*<sup>(82)</sup>. Ceci suggère que *RAG1* pourrait avoir un rôle propre dans la diversité jonctionnelle, directement ou indirectement.

Les dysfonctions de recombinaison VDJ semblent impacter la diversité du répertoire TCR en permettant le développement d'une oligoclonalité LT avec lymphocytes déficients et auto-immunité associée. A noter qu'il n'apparaît pas ici évident que cette oligoclonalité puisse être mise en lien avec la survenue ultérieure de clonalité maligne.

### 1.7.3. Syndrome ataxie-télangiectasie

Le syndrome ataxie-télangiectasie est une maladie génétique rare, autosomique récessive, multi systémique, liée à l'atteinte du gène *ATM*. Ce gène code pour une Ser/Thr protéine kinase essentielle dans la réponse aux dommages de l'ADN. Ce syndrome est caractérisé par une neurodégénérescence, une instabilité chromosomique, une immunodépression et une prédisposition accrue aux cancers hématologiques (principalement leucémie lymphocytaire ou lymphome). Ce syndrome est également caractérisé par un déficit immunitaire B et T (défaut de production lymphocytaire). Le répertoire TCR V $\beta$  des malades est restreint, de manière anormale, avec différents niveaux d'oligoclonalité<sup>(83)(84)</sup>.

Lorsque les patients atteints du syndrome ataxie-télangiectasie ont une population clonale T, on retrouve plus fréquemment chez eux une anomalie chromosomique touchant l'oncogène *TCL1*. Cet oncogène se trouve sur le chromosome 14q32. On peut émettre l'hypothèse que la survenue d'un clone pathologique est en lien avec des erreurs de réparations de l'ADN lors des recombinaisons VDJ, car les gènes impliqués dans la recombinaison se trouvent en partie sur le chromosome 14. Une translocation entre le locus TCR et le locus *TCL1* est à l'origine d'un clone avec t(14 ; 14) ou t(X ; 14) ou inv(14). Cette translocation favoriserait alors l'expansion clonale jusqu'au développement de la leucémie.

#### 1.7.4. Syndromes liés à l'X : Agammaglobulinémie liée à l'X (XLA) et Wiskott-Aldrich

L'agammaglobulinémie liée à l'X est un déficit immunitaire rare touchant exclusivement les patients de sexe masculin, caractérisé par un déficit en immunoglobulines plus ou moins lymphopénie B. Il s'agit d'une maladie génétique liée à une mutation du gène *BTK*. Un cas clinique d'infiltration lymphocytaire cutanée avec un clone possédant un réarrangement TCR pathologique dans l'infiltrat cutané biopsié a été rapporté dans la littérature<sup>(85)</sup>. Il s'agissait d'un cas d'infiltration lymphocytaire acrale sans caractéristiques cliniques compatibles avec un lymphome cutané. Il n'a pas été décrit dans la littérature de cas de clonalité sanguine liée à l'agammaglobulinémie.

Le syndrome de Wiskott-Aldrich est une maladie génétique également liée à l'X (mutation du gène *WAS*). Le déficit immunitaire est un déficit T dans ce cas et il semble être associé à un répertoire TCR restreint<sup>(86)</sup>. Ce syndrome comprend, entre autres atteintes : une thrombocytopénie, un eczéma et un risque accru de maladies auto-immunes et de cancers lymphoïdes. Le répertoire TCR de ces patients est biaisé principalement dans le compartiment CD4 mémoire une répartition clonale ou oligoclonale. L'hypothèse d'une réaction à une infection virale chronique, notamment à CMV, chez ces patients immunodéprimés a été avancée pour expliquer ce biais dans la production des TCR.

## 1.8. Restriction de clonalité du TCR et infections virales chroniques

### 1.8.1. Généralités

Les infections sont des situations propres à mettre en action le système immunitaire de l'hôte infecté. Les lymphocytes T sont impliqués à la fois dans la régulation de la réponse immunitaire et dans l'action directe envers les pathogènes. La question de l'activation chronique du système immunitaire par des virus et son impact sur le répertoire TCR sont plusieurs fois évoqués dans différentes publications.

A travers les modèles murins et à travers l'étude de la réponse post vaccinale chez l'homme, il a été mis en évidence<sup>(87)</sup> que la réponse immunitaire aigüe implique une courte réponse de type expansion clonale CD4<sup>+</sup> et une réponse CD8<sup>+</sup> persistante. Les clones persistants au cours de la vie d'un individu sont principalement CD8<sup>+</sup>. Les clones CD8<sup>+</sup> identifiés concernent principalement des infections courantes telles que l'infection à Epstein-Barr Virus (EBV) ou à Cytomégalo virus (CMV), mais aussi des infections telles que les infections à Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) ou à influenza. Il semble que ces clones puissent persister *in vivo* de manière fréquente après une infection virale, avec un profil de cellules effectrices CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>. Les cellules CD4<sup>+</sup> liés à une stimulation infectieuse semblent principalement avoir un phénotype mémoire CD45RO<sup>+</sup>. Elles présentent plutôt un répertoire TCR polyclonal. Dans cet article, les proliférations clonales ne semblent pas être l'indicateur d'une transformation maligne des cellules LT.

L'autre biais par lequel pourrait émerger une restriction de clonalité post-infectieuse serait la lymphopénie post virale (ou chronique, dans le cas de certaines infections comme le VIH) : le maintien numérique du compartiment lymphocytaire se ferait alors via la LIP avec émergence de restriction du répertoire TCR.

### 1.8.2. VIH

Des études sur le cas particulier du récepteur TCR dans le cadre du VIH ont été réalisées à la fois chez l'enfant<sup>(88)</sup> et chez l'adulte. Ces études concernent à la fois les LT CD4+ et les LT CD8+ des patients séropositifs et des sujets à risque<sup>(89)</sup>. Le répertoire TCR des LT CD8+ des enfants infectés par le VIH présente un biais avec contingents oligoclonaux. Les enfants étant des sujets jeunes, l'étude de cette population permet de s'affranchir de la dérive oligoclonale physiologique du répertoire TCR liée à l'âge. Les auteurs concluent que, dans ce cas précis, l'exposition au VIH est donc très probablement responsable du biais observé dans le répertoire TCR. Chez les adultes, les populations séropositives et les populations à risque non séropositives présentent des biais similaires dans leur répertoire TCR. L'exposition au virus du VIH expliquerait une partie seulement de ce biais. Cette exposition expliquerait également en partie l'expansion clonale des TCR (27% d'augmentation du nombre d'expansions clonales CD8+ par rapport aux patients à risque) retrouvée chez les patients séropositifs. Une stimulation antigénique constante et similaire dans les deux groupes pourrait expliquer ces résultats. Ces observations de clonotypes dans les populations VIH sont également retrouvées dans une étude de McFarland *et al*<sup>(90)</sup>. Une partie des clonotypes observés chez les enfants et les adultes séropositifs auraient montré une activité anti-VIH *in vitro*, confirmant leur statut de clonotypes réactionnels à l'infection par le VIH. Les altérations du répertoire TCR concernent à la fois la phase initiale et la phase établie de l'infection VIH. Des expansions clonales CD4+ existent également mais plus rarement, et surtout lorsque la maladie est avancée. L'infection à VIH peut s'accompagner d'une expansion clonale CD8+ pathologique avec infiltration d'organes<sup>(91)(92)(93)</sup>: le syndrome d'infiltration lymphocytaire diffuse (DILS). Ce syndrome comprend : infiltration des glandes salivaires, des poumons, des reins avec une clinique évoquant un syndrome de Gougerot-Sjogren sans auto-anticorps. Ces DILS s'accompagnent d'une hyperlymphocytose et d'une expansion clonale ou d'un clone T.

### 1.8.3. EBV

L'EBV est un virus avec lequel la majorité de la population adulte a été en contact durant son enfance. On connaît plusieurs hémopathies associées à ce virus, notamment : le lymphome de

Burkitt, certains lymphomes non hodgkiniens, certains lymphomes de Hodgkin, le lymphome T nasal, le lymphome avec pyothorax, le lymphome naso-pharyngé, le lymphome thymique et certains lymphomes gastro-intestinaux.

Dans certains cas, l'infection se chronicise et il existe de (rares) cas d'infection active chronique à EBV : ceci se produit surtout en cas d'immunodépression. Cette infection chronique active se manifeste par une fièvre, des cytopénies et une hépato-splénomégalie entre autres symptômes. Une expression clonale des répertoires V $\beta$  chez des patients atteints d'EBV chronique actif a été retrouvée. L'hypothèse émise par les auteurs est qu'une expansion clonale des cellules infectées par EBV pourrait affecter la diversité TCR et contribuer au biais du répertoire TCR jusqu'à faire émerger une lymphoprolifération chez les patients atteints d'EBV chroniques actifs<sup>(94)</sup>.

Le répertoire TCR a aussi été étudié dans les cas d'infection aiguë à EBV. Chez les patients atteints de mononucléose, on retrouve une lymphocytose CD8 avec expansions oligoclonales des TCR sur un bruit de fond polyclonal<sup>(95)</sup>. Les sous-types oligoclonaux sont retrouvés chez ces mêmes patients à distance de l'infection dans le compartiment LT CD8+.

Comme il s'agit d'une infection très répandue dans la population générale, la question s'est également plusieurs fois posées du lien possible entre infection à EBV au cours de la vie et expansions clonales LT chez des sujets sains adultes. Ceci a été plusieurs fois suspecté, avec notamment une étude<sup>(96)</sup> retrouvant un possible lien entre distorsion du répertoire TCR et infection à EBV. La question n'est cependant pas résolue à ce jour bien que régulièrement évoquée dans la littérature.

#### 1.8.4. CMV

L'infection à CMV est une exposition virale également commune dans la population générale. Elle a été identifiée dans certaines études comme un facteur de risque de développer des expansions clonales CD8+ chez les sujets de plus de 65 ans, avec la lymphopénie et l'âge<sup>(97)</sup>. Des études contradictoires existent sur le sujet : Khan *et al*<sup>(98)</sup> notamment retrouvent, en comparant les sujets CMV+ et CMV- 30% de clonalité en plus chez les patients ayant rencontré le CMV dans leur vie avec impact sur les LT CD8+. Toutefois, les auteurs ne concluent pas à un lien entre ce phénomène et la diminution de diversité du répertoire TCR chez le sujet âgé.

Lindau *et al*<sup>(99)</sup> ont également étudié la question : ils retrouvent dans le compartiment des LT CD8+ mémoires des adultes une part importante de larges clones chez les patients CMV+ comparé aux CMV-. En dehors de la présence de ces clones dans le compartiment mémoire, ils ne retrouvent pas d'autres différences de diversité TCR entre les patients CMV+ et CMV-. Les auteurs proposent que le répertoire mémoire est augmenté de taille chez les patients CMV+ mais que, une fois ces clonotypes CMV+ excluent de l'analyse, les répertoires sous-jacents sont comparables entre sujets CMV+ et CMV-. Le répertoire des patients CMV+ « s'agrandirait » pour accommoder les larges clones CMV, mais ces clones ne seraient pas responsables de la diminution de diversité du répertoire TCR chez les sujets âgés.

#### 1.8.5. Virus des hépatites B et C (VHB et VHC)

Les virus des hépatites B et C peuvent conduire à une infection aiguë suivie d'une guérison ou à une infection chronique. Cette infection chronique entraîne une évolution lente vers la cirrhose et l'insuffisance hépato-cellulaire. Elle peut également favoriser le développement d'un carcinome hépato-cellulaire.

Une étude<sup>(100)</sup> s'est penchée sur le possible rôle des expansions clonales dans la pathogénèse de l'hépatite B chronique. Elle retrouve des expansions monoclonales ou oligoclonales CD4 et CD8 chez les patients atteints d'hépatite B chronique, avec une majorité d'expansions LT CD8. Ce biais plus important dans le compartiment CD8+ des LT est confirmé par Yang *et al*<sup>(101)</sup>, notamment dans un contexte d'épisodes inflammatoires de la maladie. Sing *et al*<sup>(102)</sup> a comparé les profils TCR des lymphocytes intra-hépatiques aux profils des lymphocytes du sang périphérique, chez des malades atteints d'une hépatite B chronique. Elle retrouve une restriction du répertoire TCR plus importante au niveau des lymphocytes infiltrant le foie par rapport au sang. Les populations lymphocytaires entre le sang et le foie de ces patients sont distinctes.

Concernant le VHC, l'étude du répertoire LT  $\gamma\delta$ <sup>(103)</sup> n'a pas permis de montrer de différences entre les répertoires TCR des sujets infectés par le VHC comparés à des contrôles sains dans le sang. Cette différence pourrait être mise en évidence chez des malades plus sévères. D'autres groupes de recherche<sup>(104)</sup> se sont posé la question d'un lien entre restriction de répertoire dans le cadre du VHC et infection persistante: il n'a pas été retrouvée de différence entre les répertoires TCR en fonction de l'évolution de la maladie. Il existe également des études

concernant le répertoire TCR intra-hépatique au cours de l'infection par VHC : les LT présents sur les biopsies de foie de patients infectés présentent des expansions clonales avec biais de répertoires. Ces répertoires changent au fil du temps chez un même individu, mais avec persistance d'expansions clonales<sup>(105)</sup>. La plupart des expansions détectées au niveau du foie n'ont pas été détectées dans le sang périphérique des sujets malades (dans 76% des cas) ; lorsque les expansions étaient retrouvées dans le sang périphérique, elles concernaient le compartiment LT CD8+.

## 2. OBJECTIFS

La recherche de réarrangement TCR dans le sang est un examen peu invasif qui pourrait être utile dans l'orientation diagnostique précoce vers des pathologies hématologiques lymphoïdes, en particulier les lymphomes.

Nous n'avons pas retrouvé dans la littérature de recommandations précises concernant l'utilisation de cet examen en aide diagnostique dans la population générale et en particulier dans une population de Médecine Interne. Les indications validées de cet examen sont les cas d'anatomopathologie litigieux et le suivi des maladies résiduelles chez les malades d'Hématologie pour surveillance.

La recherche de réarrangement TCR dans le service de Médecine Interne du Centre Hospitalier Universitaire de Rouen (CHU) est réalisée, en dehors de ces indications validées, pour étayer une suspicion de clonalité lymphoïde maligne. Elle peut être demandée soit directement par le clinicien, soit secondairement parce qu'un autre élément comme le phénotypage sanguin, oriente le diagnostic vers une clonalité, en particulier T. Or, les éléments à disposition dans la littérature ne nous permettent pas de conclure quant à la place de cet examen dans la démarche diagnostique du clinicien. La valeur prédictive du réarrangement TCR pour le diagnostic d'une hémopathie lymphoïde chez un patient non hématologique n'est pas connue non plus.

Notre étude a donc pour objectifs de décrire la population dans laquelle est prescrite la recherche de réarrangement TCR et de répondre aux questions suivantes :

- Dans quels contextes cliniques et sur quelle population la recherche de réarrangement TCR est-il prescrit en Médecine Interne au CHU de Rouen ?
- Quel est le taux de positivité de l'examen lorsqu'il est demandé (tous milieux confondus)?
- Lorsque l'examen est positif, dans combien de cas est-il pris en compte ?
- Chez les patients qui ont bénéficié de la recherche d'un réarrangement TCR sanguin, et lorsque celui-ci est positif dans le sang, combien ont un diagnostic d'hémopathie lymphoïde à la fin des explorations complémentaires ?
- Peut-on éliminer un diagnostic d'hémopathie lymphoïde lorsqu'un TCR sanguin est négatif ?



## 3. MATERIEL ET METHODES

### 3.1. Population

#### 3.1.1. Recrutement des effectifs

Notre travail est une étude des pratiques rétrospective monocentrique centrée sur le service de Médecine Interne du CHU de Rouen.

Les patients pour lesquels une recherche de réarrangement TCR a été demandée ont été identifiés à partir des demandes adressées par le service au Dr ETANCELIN (responsable du laboratoire de Biologie Moléculaire, Département de Biopathologie du Dr DALLEAC, Centre Henri Becquerel).

Le recrutement des effectifs a été réalisé à partir de la liste de l'ensemble des demandes faites entre le 29 Décembre 2016 et le 10 Mars 2020.

Les recherches de réarrangement TCR pouvaient concerner des patients suivis par un praticien du service dans une des unités suivantes : hôpital de jour (HDJ), hospitalisation traditionnelle, consultation.

Le choix d'arrêter le recueil à Mars 2020 est en lien avec la survenue de la pandémie COVID19.

#### 3.1.2. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion des patients sont les suivants :

- Patients suivis ou pris en charge par un praticien du service de Médecine Interne (HDJ, hospitalisation, consultation)
- Patients ayant bénéficié d'une recherche de réarrangement TCR alors qu'il était sous la responsabilité médicale d'un praticien du service de Médecine Interne

- Cette recherche de réarrangement TCR a pu être demandée :
  - Par le praticien de Médecine Interne directement
  - Sur demande motivée par les équipes d'anatomo-pathologie ou du laboratoire d'hématologie sur la base d'autres examens demandés par le praticien de Médecine Interne (exemple : en cas d'anatomo-pathologie suspecte ou d'immunophénotypage suspect)
- Patients ayant au moins eut 1 résultat de rendu sur l'ensemble des recherches de réarrangement TCR demandées le concernant (tous milieux biologiques confondus)

### 3.1.3. Critères d'exclusion

Les critères d'exclusion des patients sont les suivants :

- Patients non suivis/non pris en charge par les praticiens de Médecine Interne (erreur sur le prescripteur)
- Patients pris en charge par un praticien de Médecine Interne, mais exclusivement sur un autre site d'exercice ou hors du service (UHA, réanimation)
- Patients non retrouvés dans la base de données informatique du CHU
- Patients pour lesquels aucun résultat de recherche de réarrangement TCR dans le sang/la moelle/sur biopsie n'a pu être rendu (ADN trop endommagé, échec de technique)

## 3.2. Recueil de données

Les données ont été recueillies à partir des dossiers informatisés disponibles sur le logiciel CDP2.

Les dossiers papiers ont également été consultés en cas de réarrangement TCR positif pour complément d'information.

Nous avons considérés que les explorations réalisées dans un délai de 6 mois à 1-2 ans autour du prélèvement du TCR index pouvaient faire partie de la même prise en charge (si le motif de prise en charge restait lié à la prise en charge initiale/aux explorations déjà débutées). Ce délai a été choisi en prenant en compte les délais habituels concernant : examens spécialisés, consultation de suivi etc.

La prise en charge des patients est hétérogène, notamment concernant les examens complémentaires. Un examen non réalisé pour un patient donné sera considéré par défaut comme « négatif » ou la caractéristique sera notée « absente ».

### 3.2.1. Caractéristiques générales de la population

#### 3.2.1.1. *Données démographiques*

Nous avons étudié les données démographiques suivantes dans notre population: l'âge lors de la première prise en charge et le sexe des patients.

Le taux de décès a également été étudié. Nous avons recueillis les décès survenus pendant l'hospitalisation initiale ou lors d'une hospitalisation secondaire (en réanimation ou deuxième hospitalisation pour motif identique) dans un délai maximal de 3 mois autour de la prise en charge index.

#### 3.2.1.2. *Antécédents*

Tous les antécédents disponibles des patients ont été recueillis, de même que leur traitement habituel au début de la prise en charge. Les antécédents suivants ont particulièrement été étudiés :

- Antécédent d'hémopathie : hémopathies malignes (lymphoïdes ou autres), hémopathies indolentes, syndrome lymphoprolifératif, MGUS/myélomes, autres hémopathies.
- Antécédent de néoplasie solide (en cours de traitement ou guérie mais dont le diagnostic était antérieur à la première prise en charge).

- Antécédent de maladie auto-immune : pathologies médiées ou avec marqueurs de type auto-anticorps (PR, lupus...) y compris concernant un organe spécifique (Basedow...). A noter le cas particulier des vascularites : les vascularites associées à des auto-anticorps (ANCA) sont considérées ici comme des maladies auto-immunes, tandis que les vascularites non définies ou non médiées par des auto-anticorps (Vascularite à cellules géantes) sont considérées comme des pathologies inflammatoires
- Antécédent de déficit immunitaire (acquis ou congénital)
- Antécédent d'infection virale chronique (non guérie): VIH, VHC, VHB
- Antécédent de maladie inflammatoire : pathologies n'ayant pas de marqueurs de type auto-anticorps (uvéïte, granulomatose, maladie de Crohn, maladie de Still...).

Ces éléments nous paraissent intéressants car ils sont potentiellement en lien avec une restriction et/ou un biais du répertoire TCR. Certaines pathologies peuvent répondre à plusieurs critères.

### *3.2.1.3. Motifs de prise en charge*

Les motifs de prise en charge initiaux et l'anamnèse sont recueillis. L'étude de ces motifs de consultation présente un intérêt afin d'identifier les contextes de prescription d'une recherche de réarrangement TCR.

Le motif de prise en charge peut être composite.

On s'intéressera particulièrement à :

- Altération de l'état général (AEG)
- Sueurs nocturnes
- Adénopathies et/ou splénomégalie (SMG) : retrouvées à l'examen clinique ou sur un examen d'imagerie
- Anomalies de la NFS, en particulier : anémie, thrombopénie, thrombocytose, hyperéosinophilie, lymphopénie, hyperlymphocytose
- Autres motifs de prise en charge

### 3.2.2. Analyses biologiques hors TCR

#### 3.2.2.1. *Anomalies de la Numération formule sanguine (NFS)*

Nous nous sommes intéressés aux anomalies de la NFS présentées par la population de notre cohorte. Les seuils choisis pour définir ces différentes anomalies sont les suivants:

- Anémie : hémoglobine < 12g/dL
- Thrombopénie : plaquettes < 150G/L
- Thrombocytose : plaquettes > 450G/L
- Hyperéosinophilie : éosinophiles > 0,5G/L
- Hyperlymphocytose : lymphocytes > 3,5G/L
- Lymphopénie : lymphocytes < 1,5G/L
- Neutropénie : Polynucléaires neutrophiles < 1,5g/L
- Hyperleucocytose à Polynucléaires neutrophiles : Polynucléaires neutrophiles  $\geq$  7,5G/L
- Pancytopénie

#### 3.2.2.2. *Anomalies de l'immunophénotypage (IP)*

Nous avons recueilli le détail des anomalies de l'immunophénotypage à partir des conclusions des médecins biologistes du laboratoire d'hématologie. Les principales anomalies ou commentaires qui ont retenus notre attention pour le recueil des données sont les phénotypes : CD4+/CD8+, CD4 faible, CD4+/CD8+/- (faible), CD7 bas/absent, CD10+, mention «étude du TCR souhaitable », mention « LT activés », présence d'un clone B spécifiée. Plusieurs de ces spécificités ou de ces anomalies pouvaient être combinées dans une même conclusion.

#### 3.2.2.3. *Autres données recueillies*

En plus des données précédentes, nous avons étudié des résultats de biochimie concernant les patients de notre cohorte : taux d'IgE, tryptase (élevée ou non), électrophorèse des protéines

sériques (en particulier : présence d'une hypogammaglobulinémie ou d'un pic monoclonal), complément.

Les recherches d'auto-anticorps éventuellement réalisées ont également été recueillies (facteurs anti-nucléaires, Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (ANCA), facteur rhumatoïde, anticorps anti-CCP, cryoglobulinémie, anticorps du syndrome des anti-phospholipides). D'autres anticorps ont été relevés si mentionnés dans les dossiers (anticorps dot myosite...).

Nous avons également recueilli les demandes de recherche de clone IgH (dans le sang mais aussi au niveau de la moelle et de matériel de biopsies). Les recherches de mutations suivantes ont également été recueillies lorsqu'elles étaient demandées : *FIP1D1L1*, *JAK2*, *STAT3*, *cKIT*, *Bcr-Abl*.

Nous avons également relevé des éléments en rapport avec les statuts sérologiques des patients : sérologies VIH, VHB, VHC, EBV, CMV et, le cas échéant, charges virales pour ces mêmes virus. A défaut, un antécédent d'exposition virale était retenu.

Lorsqu'une biopsie a été réalisée au cours de la prise en charge, la nature et le résultat de cette biopsie ont également été recueillis lorsque ces données étaient disponibles : biopsie d'organe, de peau, d'adénopathie etc.

### 3.2.3. Explorations complémentaires

#### 3.2.3.1. *Explorations médullaires*

Les explorations de moelle réalisées ont également été recueillies, qu'il s'agisse de myélogramme et/ou de biopsie ostéo-médullaire (BOM).

Ces examens ont été considérés comme « anormaux » ou « pathologiques » s'ils présentaient des atypies significatives sur la lecture du frottis ou de la pièce d'anatomo-pathologie et/ou un immunophénotypage pathologique et/ou un caryotype pathologique.

Si on ne peut donner de conclusion définitive quant au caractère pathologique des résultats ou que les anomalies sont considérées comme « non significatives », l'examen n'est pas considéré comme pathologique (donc mis à défaut dans la catégorie « normal »).

Le caractère pathologique de ces différents éléments pouvait être apprécié par le médecin du laboratoire d'hématologie, par le médecin du laboratoire d'anatomo-pathologie, et enfin par le clinicien lorsque la confrontation aux données cliniques permettait de conclure au caractère pathologique du résultat en cas de doute.

Les examens réalisés dans d'autres services ont été pris en compte selon les délais évoqués précédemment s'ils étaient disponibles. Ces examens étaient en général réalisés lorsque les patients étaient adressés depuis des hôpitaux périphériques vers le CHU de Rouen, ou lorsque le service de Médecine Interne adressait secondairement les patients vers d'autres services (en particulier en hématologie au Centre Henri Becquerel).

#### *4.2.3.1. Explorations d'imagerie*

Recueil de toute imagerie en rapport avec la recherche d'un syndrome tumoral, en particulier : scanner et Tomographie par émission de positrons avec scanner (TEP scanner).

Nous prendrons en compte les hypermétabolismes de tout organe au TEP s'ils ne sont pas décrits comme « non significatifs ».

Concernant les adénopathies au scanner, la « charge ganglionnaire » sera évaluée comme suit :

- « charge ganglionnaire faible » : si 1 adénopathie unique dans 1 champ (sus ou sous diaphragmatique)
- « charge ganglionnaire forte » dans les autres cas : 1 adénopathies au moins dans chaque champ ou plusieurs adénopathies dans un même champ.

### 3.2.4. Réarrangement TCR

#### 3.2.4.1. *Technique*

La recherche de réarrangement TCR, lorsque la demande émane d'un service du CHU de Rouen, est réalisée dans le laboratoire de Biologie Moléculaire du Département de Biopathologie du Centre Henri Becquerel.

Il s'agit d'une étude du locus TCR $\gamma$ .

La recherche est effectuée par *PCR* à partir d'ADN issu de cellules mononuclées du sang périphérique, de la moelle ou de biopsies. La technique procède comme suit :

- Préparations dans des puits d'échantillons de 100ng pour les biopsies et de 500ng pour les échantillons de sang et moelle. Mélange dans les puits de l'ADN d'intérêt et d'un mix unique d'amorces TCR
- Il y a dénaturation de l'ADN extrait dans le thermocycleur Mastercycler<sup>®</sup> Eppendorf et hybridation avec les amorces puis amplification par *PCR* sur 35 cycles
- Dans un second temps lecture par l'un des deux séquenceurs capillaires 3130 et 3130XL Thermofisher<sup>®</sup> et analyse des résultats sur le logiciel GeneMapper<sup>®</sup>
- Première analyse par le technicien de laboratoire afin de vérifier la non contamination des mix, la conformité des témoins positifs et négatifs et la présence d'amplification dans chacun des puits. Une nouvelle analyse des échantillons a lieu en cas d'anomalie.
- Validation par le biologiste moléculaire avec rendu du profil : « polyclonal », « oligoclonal », « monoclonal », et spécification d'un fond « polyclonal » persistant le cas échéant.
- Un pic est considéré comme tel en général pour une augmentation de taille de plus de 20% par rapport à l'intensité maximale du profil. Le profil d'intensité est ensuite interprété en fonction de la hauteur du pic, des antécédents du patient et du contexte clinico-biologique.

Lors du suivi d'un même patient, la taille du fragment permet d'identifier le clone et de le comparer aux précédents résultats. On peut ainsi différencier chez un même patient des réarrangements différents survenant à différents moments du suivi.



Ce protocole est adapté à partir des recommandations BIOMED2 et EUROCLONALITY (cf 1.3.3.4 PCR)

#### *3.2.4.2. Milieux de prélèvements*

Les prélèvements pour recherche de réarrangement TCR ont eu lieu dans plusieurs milieux biologiques : le sang périphérique, la moelle osseuse et des fragments de biopsies. Les biopsies pouvaient provenir, dans la majorité des cas, de biopsie de tissus lymphoïdes (rate, adénopathies etc.) ou de biopsies cutanées. Parfois, il pouvait être question de biopsies de muqueuse (ORL notamment) pour étude du tissu lymphoïde de ces muqueuses.

Un patient pouvait bénéficier de plusieurs prélèvements dans plusieurs milieux différents (prélèvements synchrones ou asynchrones).

#### *3.2.4.3. TCR+ et TCR-*

Dans le cadre de l'étude de l'ensemble des résultats TCR, le cas index correspond au premier réarrangement TCR positif retrouvé chez un patient (en particulier si plusieurs prélèvements sont positifs chez un même patient, mais dans différents milieux biologiques).

Lorsqu'il n'existe pas de réarrangement TCR (absence de détection) ou que la répartition est oligoclonale, la recherche de réarrangement TCR est considérée comme étant négative.

Les réarrangements positifs peuvent être rendus en précisant le degré d'intensité du réarrangement : très faible intensité, faible intensité, intensité modérée, forte intensité et très forte intensité. Cette quantification de l'intensité n'est pas systématique, mais elle a été recueillie lorsqu'elle était précisée.

Un TCR monoclonal signifie qu'un seul pic clonal est retrouvé. Un TCR bi-allélique signifie que deux pics clonaux ont été retrouvés. Au-delà de deux pics, ils ne sont pas quantifiés spécifiquement et les profils sont décrits comme oligoclonaux.

Plusieurs contrôles ont pu être fait chez un même patient, notamment car des prélèvements de milieux différents ont pu être réalisés (contrôle de moelle si moelle positive mais aussi contrôle

sanguin si sang positif). Un seul cas de contrôle suffit à classer le patient comme ayant bénéficié au moins une fois d'un contrôle de son résultat TCR. Il s'agit de contrôle à distance (en général à plus de 3 mois) du TCR index.

Un patient TCR total+ est défini comme un patient présentant au moins 1 résultat positif de réarrangement TCR sur 1 des milieux biologiques prélevés.

Un patient TCRsang doit obligatoirement avoir bénéficié d'un prélèvement sanguin pour recherche de TCR. Un patient TCRsang+ est défini comme présentant un résultat positif de réarrangement de TCR sanguin (exemple : un patient ayant bénéficié d'un TCR dans le sang et dans la moelle avec TCRsang négatif et TCRmoelle positif sera TCRtotal + mais TCRsang-).

La désignation en « TCR+ » ou « TCR- » fait référence au prélèvement index. Ainsi, le « n » de la population représente le nombre de patients de la catégorie mentionnée, et non le nombre de prélèvements réalisés.

#### *3.2.4.4. Prise en compte d'un TCR+*

Lorsque le résultat d'un réarrangement TCR est revenu positif, une étude complémentaire des dossiers a été réalisée afin de savoir si ce résultat TCR avait été pris en compte dans la démarche diagnostique. Un TCR est considéré comme pris en compte dans les cas suivants :

- Si ce résultat est mentionné dans un compte-rendu de consultation, d'hospitalisation, ou une observation.
- S'il est mentionné dans une demande pour un autre examen (exemple : mention sur une demande de PET scanner)
- S'il est intégré dans la réflexion du clinicien par un autre biais ; nous avons donc considéré que les démarches suivantes relevaient de la prise en compte :
  - Contrôle d'un résultat positif, prise d'un avis auprès d'un hématologue et documentation de l'avis dans le dossier (avis téléphonique ou mention dans du résultat dans les fiches de RCP du Center Henri Becquerel)
  - Mention du TCR positif sur les comptes-rendus de TEP scanner, d'anatomo-pathologie (pour les biopsies) ou de moelle (pour les BOM notamment).

Lorsque ces conditions n'étaient pas remplies, nous avons considéré que le résultat n'avait pas été pris en compte dans la démarche diagnostique.

La prise en compte du résultat concerne principalement le praticien de Médecine Interne, mais aussi, les autres intervenants dans le dossier en aval de la recherche de réarrangement TCR index (courriers du Centre Henri Becquerel, courriers du laboratoire d'Anatomo-pathologie, courriers de médecins extérieurs au CHU). Ces données ont été recueillies lorsque ces courriers étaient disponibles dans les dossiers.

### 3.2.5. Diagnostics

Les diagnostics et conclusions des investigations conduites chez les patients de notre cohorte ont été recueillis. Tous les diagnostics disponibles ont été recueillis, et 6 groupes de diagnostics principaux ont été assemblés :

- Hémopathies lymphoïdes prouvées ou fortement suspectées (« totales ») : ce groupe comporte à la fois les diagnostics d'hémopathie confirmés à l'histologie et les fortes présomptions cliniques sans histologie ou éléments d'immunophénotypage suffisants pour affirmer le diagnostic.
  - Lorsque le diagnostic n'a pas pu être confirmé, cela pouvait être en raison du décès du patient, en raison d'une décision de limitation de soins/d'explorations, ou encore en raison d'une impossibilité/d'une contre-indication formelle à la biopsie (thrombopénie majeure, patient instable...).
  - Une « forte suspicion » de pathologie hématologique lymphoïde était en général mentionnée ainsi dans le compte-rendu d'hospitalisation ou dans d'autres sources.
- Hémopathies lymphoïdes prouvées
- Hémopathies autres : groupe regroupant les hémopathies non lymphoïdes dont myélome, MGUS, SMD, aplasie médullaire etc.
- Maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires : pathologies prouvées et fortes présomptions
  - Le diagnostic « fortement suspecté » de maladie auto-immune est intégré comme tel lorsqu'il est mentionné ainsi dans le compte-rendu médical ou que le

traitement est initié selon un protocole standard de maladie auto-immune/auto-inflammatoire.

- Lorsque le motif d'admission était le suivi d'une pathologie auto-immune connue et que le diagnostic retenu est celui d'une poussée ou d'une évolutivité de la pathologie, le diagnostic retenu est également la maladie auto-immune en question (exemple : poussée de dermatomyosite).
- Absence de conclusion diagnostique définitive :
  - Cette catégorie concerne des patients encore en cours d'investigation diagnostique pour lesquels aucun diagnostic précis n'a encore été posé.
  - Il peut également s'agir d'une situation d'exclusion diagnostique, c'est-à-dire un cas où un patient consulte par exemple pour hyperéosinophilie transitoire et où un syndrome lymphoprolifératif a été exclu, sans qu'un autre diagnostic n'ait pu être formellement posé.
- Diagnostic autre : cette catégorie regroupe tous les autres diagnostics retrouvés au cours du recueil de données.

Certains diagnostics étant composites, certains patients peuvent entrer dans plusieurs catégories.

### 3.3. Statistiques

Les statistiques de cette étude ont été réalisées à l'aide du logiciel InVivoStat<sup>®</sup>, version 4.2. Les groupes TCR+ et TCR- ont été comparés par test du Chi-deux (confirmation de la significativité par un test de Fischer automatique en fonction des effectifs) avec un seuil de significativité retenu de  $p < 0.05$ .

Le calcul de la Valeur Prédictive Positive (VPP) et de la Valeur Prédictive Négative (VPN) a été réalisé à l'aide d'un calculateur en ligne mis à disposition par le Dr Gillibert (Laboratoire de Biostatistiques, CHU Charles Nicolle) : <https://mail.gilibert.fr/stats/cpmidp.html>.

## 4. RESULTATS

### 4.1. Flow Chart

Le listing comprenait 114 patients. Parmi ceux-ci, 103 étaient incluables :

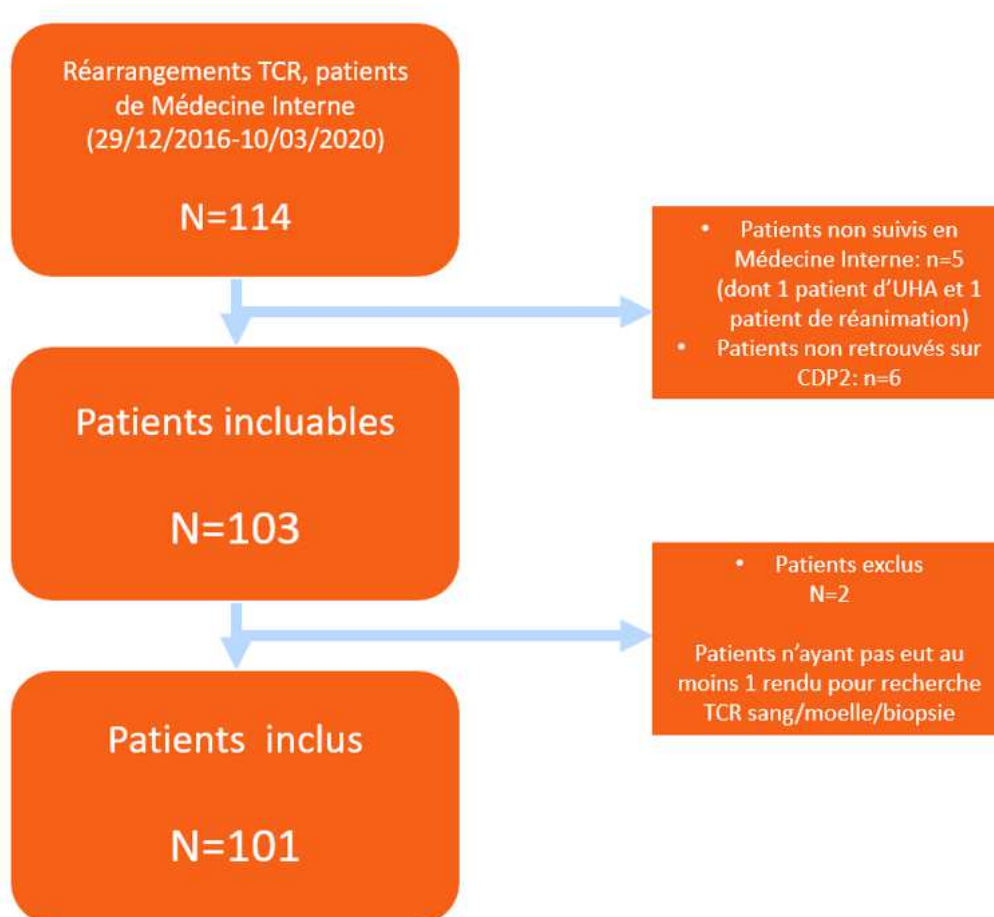
- 5 patients n'étaient en réalité pas issus du service de Médecine Interne. Ceci correspond à deux cas de figure : erreur sur le prescripteur, qui ne fait pas parti des praticiens de Médecine Interne ; ou erreur sur le service de rattachement
- Il n'a pas été retrouvé de dossier informatisé pour 6 des patients de la liste (recherche par nom, prénom, date de naissance).

Parmi ces 103 patients incluables, 2 patients ont été exclus car la recherche de réarrangement TCR n'a pu aboutir, empêchant l'analyse de leurs données.

La première demande répertoriée date du 29/12/2016, et la dernière du 10/03/2020 ; 101 patients ayant au moins 1 résultat de recherche de réarrangement TCR rendu et suivis en Médecine Interne ont donc été inclus.

Concernant les 101 patients inclus, 238 prélèvements à la recherche d'un réarrangement TCR ont été réalisés.

84 patients ont eu au moins un prélèvement dans le sang circulant.



## 4.2. Caractéristiques générales de la population

### 4.2.1. Données démographiques, antécédents et motifs de prise en charge

Le sexe ratio de notre cohorte est de 1,02. La médiane d'âge des patients est de 64 ans.

20 patients (soit 19,8%) ont une maladie auto-immune, 18 patients (soit 17,8%) ont un antécédent de néoplasie solide, 15 patients (soit 14,9%) ont une maladie inflammatoire, 13 patients (soit 12,9%) ont un antécédent d'hémopathie (dont 9 ont une hémopathie lymphoïde), 4 patients (soit 4%) ont un déficit immunitaire, et 2 patients (soit 2%) ont une infection virale chronique non guérie.

Ces antécédents sont détaillés dans les figures suivantes, avec une prédominance de lymphome de Hodgkin (LH) chez nos patients:

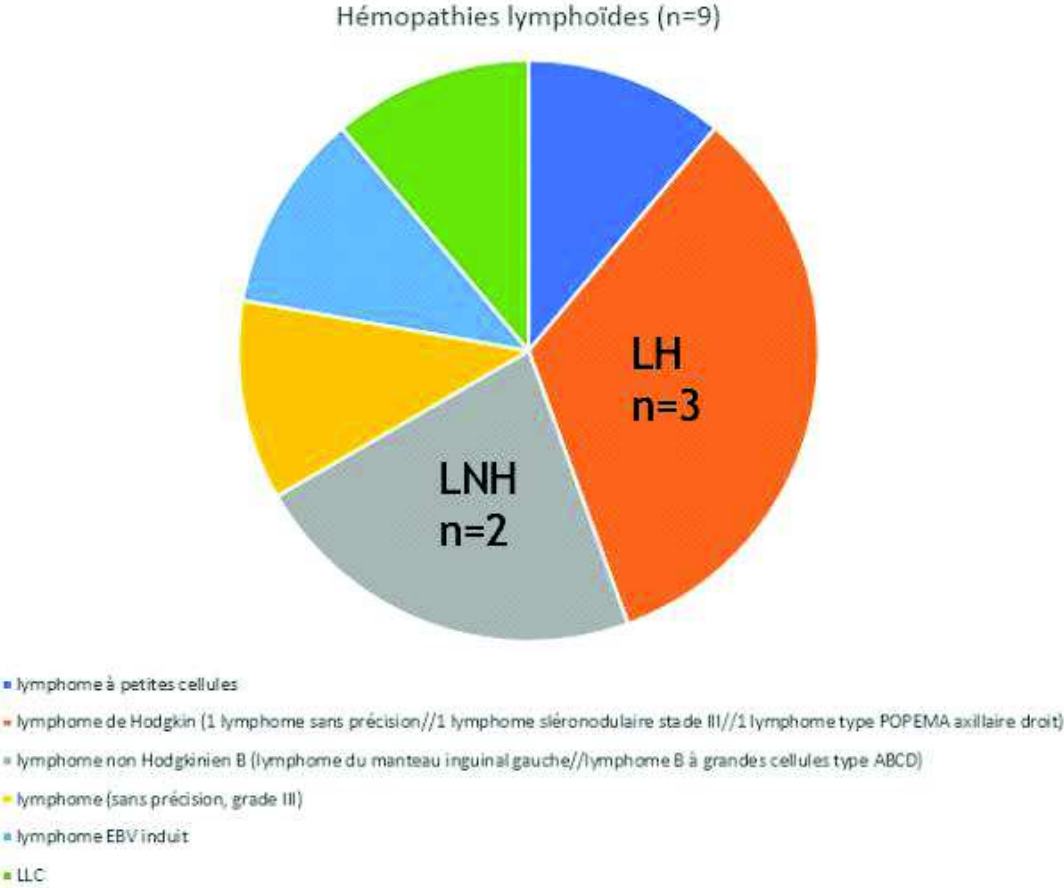


Figure 1 : répartition des antécédents d'hémopathies lymphoïdes (lymphome non hodgkinien (LNH), lymphome de Hodgkin (LH))



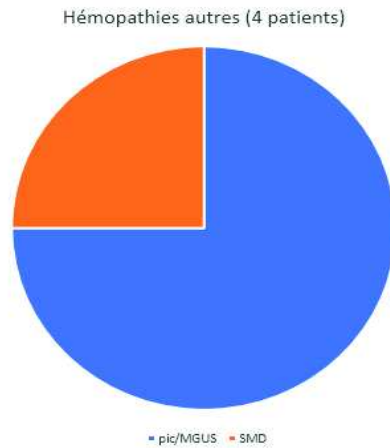
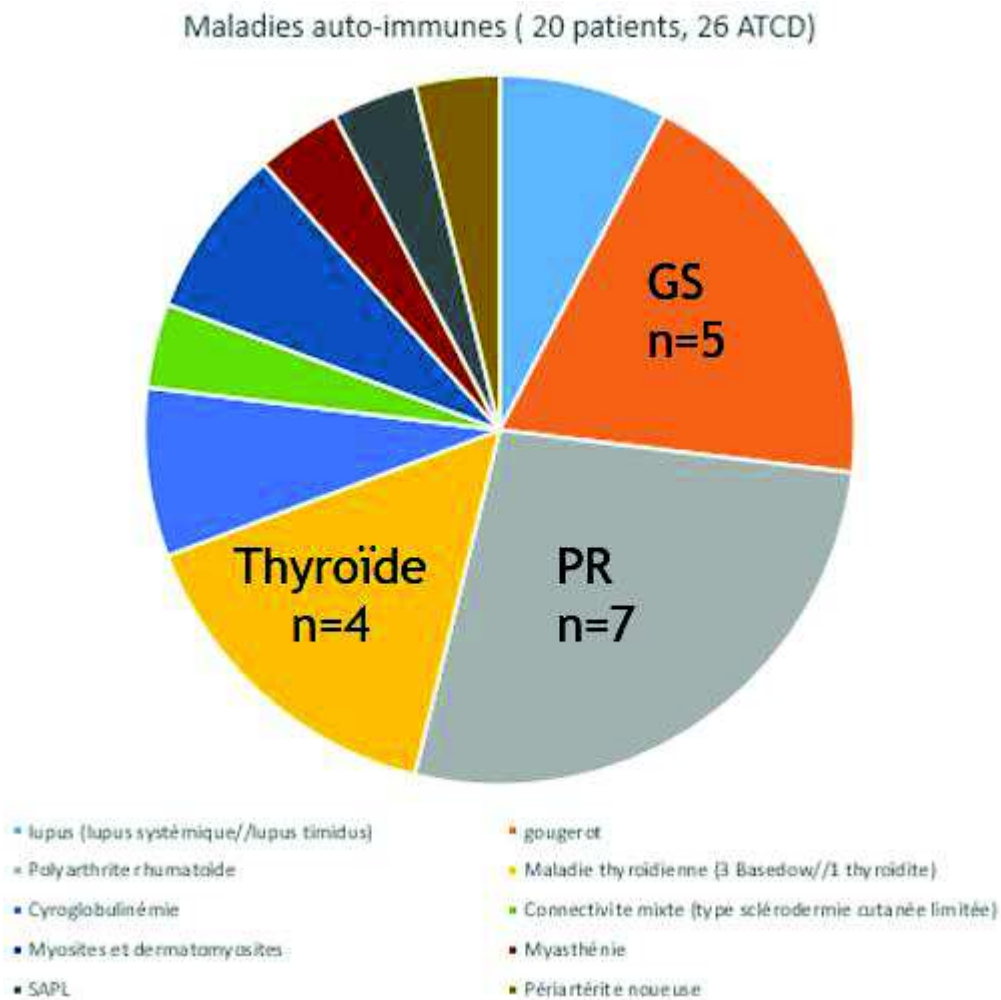
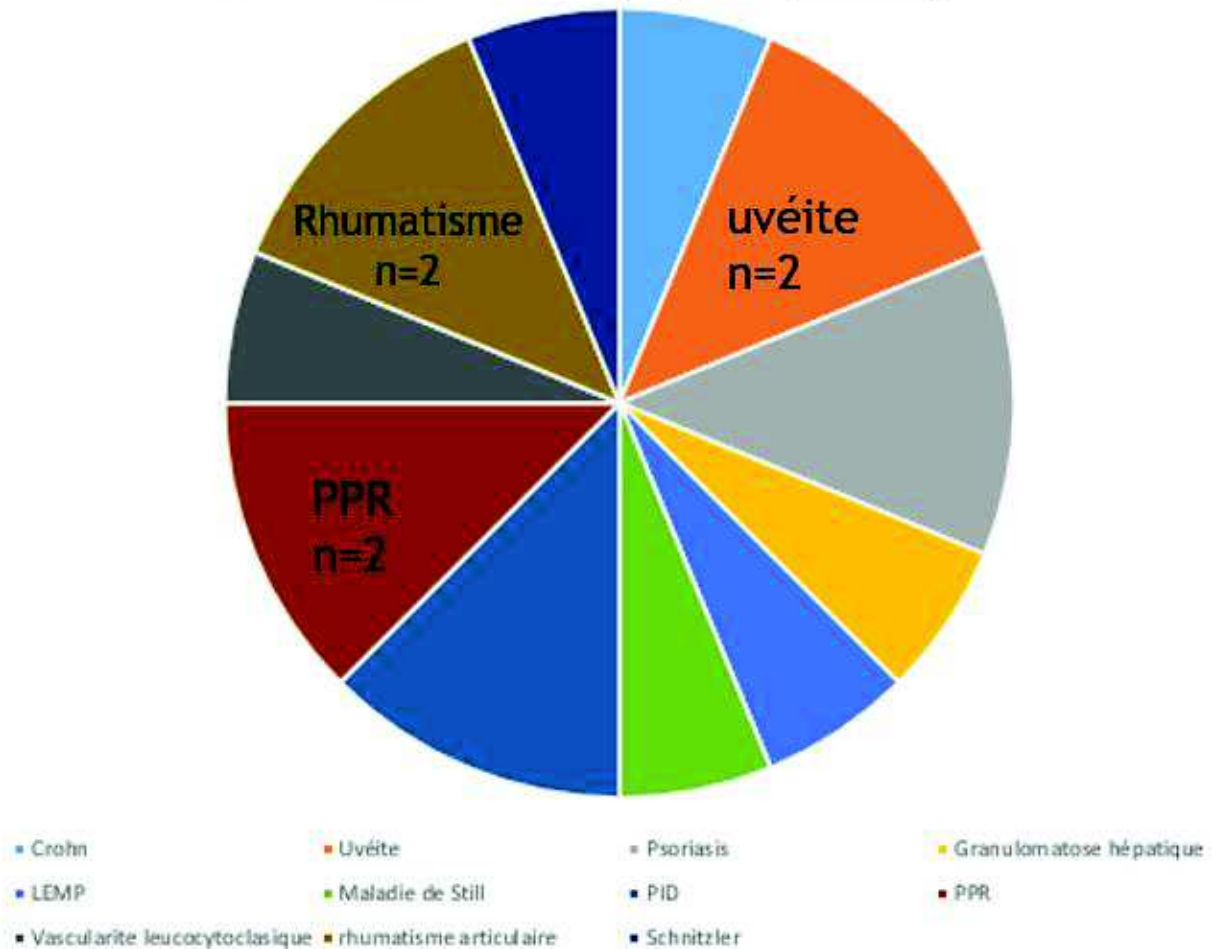


Figure 2 : répartition des antécédents d'hémopathies autres



Figures 3 : répartition des antécédents de maladies auto-immunes (Gougerot-Sjogren (GS), Polyarthrite rhumatoïde (PR))

Maladies inflammatoires (15 patients, 16 ATCD)



Figures 4 : répartition des antécédents de maladies inflammatoires (Pseudo-polyarthrite rhizomélique (PPR))

Les principaux motifs de prise en charge retrouvés sont : les anomalies de la NFS (40 patients soit 39,6% des cas), l'altération de l'état générale/sueurs (25 patients soit 24,8% des cas), la présence d'adénopathies et/ou de splénomégalie (17 patients soit 16,8% des cas) la fièvre (14 patients soit 13,9% des cas) et enfin la dyspnée (9 patients soit 10,4%). Les motifs de prise en charge sont souvent composites, avec un patient pouvant présenter plusieurs critères.

Les autres motifs de prise en charge (prurit, rash cutané/urticaire, syndrome inflammatoire, suspicion ou suivi de maladie auto-immune/inflammatoire, œdème/angio-œdème, anomalie de l'imagerie hors adénopathies, pic/hypogammaglobulinémie, troubles digestifs, douleurs diffuses, macroglossie et hyperpigmentation péri-orbitaire, syndrome d'activation

macrophagique, altération de la marche, hypercalcémie, hémiparésie et hypoesthésie, malaise, insuffisance rénale aigue...) représentent 62,3% des cas.

Les décès représentent 7,9% de la population, soit 8 patients. Sur ces 8 décès, 6 patients étaient atteints d'une hémopathie lymphoïde.

Parmi notre cohorte, nous avons retrouvé 55 patients TCR+ et 46 TCR-. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes TCR+ et TCR- pour ces caractéristiques.

En prenant les associations de signes cliniques suivantes parmi les motifs de prise en charge, on retrouve :

- AEG + Anomalie de la NFS (+/- fièvre +/- ADPs) : 2 diagnostics lymphomes/8 patients et 5TCR+/8 patients (les deux patients avec diagnostic de lymphome sont TCR+).
- AEG + ADPs (+/-fièvre +/-anomalie de la NFS) : 1 diagnostic/6 patients et 3TCR+/6 patients (le patient avec diagnostic de lymphome est TCR+).

Caractéristiques	TCR totaux			p
	Population n= 101	TCR+ n= 55	TCR- n= 46	
<b>Démographie</b>				
Âge médian (années)	64	64	67.5	.
Sexe ratio	1.02	.	.	.
<b>Antécédents</b>				
Néoplasie solide	18 (17.8%)	7 (12.7%)	11 (23.9%)	NS
Hémopathie	13 (12.9%)	9 (16.4%)	4 (8.7%)	NS
-Lymphoïde	9 (8.9%)	6 (10.9%)	3 (6.5%)	NS
-Autre	4 (4%)	3 (5.5%)	1 (2.2%)	NS
Déficit immunitaire	4 (4%)	2 (3.6%)	2 (4.3%)	NS
Infection virale chronique	2 (2%)	0	2 (4.3%)	NS
Maladie auto-immune	20 (19.8%)	10 (18.2%)	10 (21.7%)	NS
Maladie inflammatoire	15 (14.9%)	8 (14.5%)	7 (15.2%)	NS
<b>Motifs de prise en charge</b>				
Dyspnée/toux	9 (8.9%)	7 (12.7%)	2 (4.3%)	NS
AEG/sueurs	25 (24.8%)	15 (27.3%)	10 (21.7%)	NS
Adénopathie/SMG	17 (16.8%)	11 (20%)	6 (13%)	NS
Anomalie de la NFS	40 (39.6%)	19 (34.5%)	21 (45.7%)	NS
Fièvre	14 (13.9%)	7 (12.7%)	7 (15.2%)	NS
Autres	63 (62.4%)	35 (63.6%)	28 (60.9%)	NS

Tableau 1 : caractéristiques de la population, âge, sexe, antécédents, motifs de prise en charge

Parmi les patients ayant des antécédents de maladie auto-immune, on retrouve : 3TCR+/7 cas de polyarthrite rhumatoïde, 2TCR+/4 cas de maladie thyroïdienne, 2 TCR+/ 2 cas de myosite, 1 TCR+/2 cas de lupus, 1 TCR+/5 cas de Gougerot-Sjogren.

Dans les autres cas (cryoglobulinémie, connectivite mixte, myasthénie, SAPL, PAN), aucun TCR+ n'a été retrouvé.

Parmi les patients ayant des antécédents de maladie inflammatoire, on retrouve : 2 TCR+/2 cas de rhumatisme articulaire, 1TCR+/1 cas de Crohn, 1TCR+/1 cas de vascularite leucocytoclasique, 1 TCR+/2 cas d'uvéïte, 1 TCR+/2 cas de psoriasis, 1 TCR+/1 cas de granulomatose hépatique, 1 TCR+/2 cas de PPR, 1 TCR+/2 cas de PID.

Dans les autres cas (LEMP, maladie de Still, Schnitzler), aucun TCR+ n'a été retrouvé.

#### 4.2.2. Anomalies biologiques

Les anomalies de la NFS les plus fréquemment retrouvées dans notre cohorte sont : la lymphopénie (52 patients soit 51,5% des cas), l'anémie (43 patients, soit 42,6% des cas), la thrombopénie (23 patients, soit 22,8% des cas), l'hyperéosinophilie (19 patients, soit 18,8% des cas), l'hyperleucocytose (15,8% des cas) puis viennent l'hyperlymphocytose (16 patients, soit 10,9% des cas), la neutropénie (10 patients, soit 9,9%), la pancytopenie (8 patients soit 7,9% des cas) et la thrombocytose (7 patients, soit 6,9% des cas).

Il existe une différence significative entre les groupes TCR+ et TCR- concernant la thrombopénie avec plus de patients présentant une thrombopénie dans le groupe TCR+ (16 patients contre 6 dans le groupe TCR-).

Concernant la thrombopénie, la médiane sur la population totale est un taux plaquettaire à 61G/L, avec une médiane à 66G/L pour le groupe TCR+ et à 61G/L pour le groupe TCR-. Les écart-types respectifs (54,5 pour le groupe TCR+ avec une moyenne de 67,4G/L et 48,3 pour le groupe TCR- avec une moyenne de 58G/L) montrent une plus grande disparité des valeurs dans le groupe TCR+ (de 143G/L à 6G/L). Cependant il y a 6/17 patients dans le groupe TCR+ et 2/6 patients dans le groupe TCR- qui présentent une thrombopénie profonde ( $\leq 20$ G/L plaquettes).

L'immunophénotypage (IP) a été réalisé chez 90 patients et il est anormal sur le plan qualitatif chez 40 patients, soit 39,6% de la population. Les mentions anomalies B, ainsi que les doubles positifs et les doubles négatifs constituent les anomalies les plus fréquentes (respectivement : 25%, 25% et 22,5% des IP anormaux). Une étude TCR complémentaire est recommandée par

le biologiste dans 37,5% des cas d'anomalies. Les différentes anomalies décrites peuvent être combinées chez un même patient.

Parmi les TCR sang, 13 ont possiblement été demandés en raison d'un immunophénotypage sanguin anormal.

Il y a une différence significative au niveau des anomalies de l'immunophénotypage avec un plus grand nombre d'IP pathologique dans le groupe TCR+, et ceci concerne en particulier : les doubles négatifs, les anomalies du CD7, les demandes d'études TCR complémentaires.

Parmi les marqueurs d'exposition virale, des demandes de sérologies des hépatites ont été faites chez 63,4% (n= 64) des patients, une recherche VIH a été faite chez 62,4% (n=63) des patients, des recherches d'EBV ont été faites dans 43,6% (n=44) des cas et de CMV dans 42,6% (n=43) des cas.

1% (n=1) de la cohorte est positive pour le VIH, 3% (n=3) pour les virus des hépatites, 24,8% (n=25) pour le CMV et 40,6% (n=41) pour l'EBV. Il n'y a pas de différence significative concernant l'exposition virale entre les groupes TCR+ et TCR-.

Caractéristiques	TCR totaux			p
	Population n= 101	TCR+ n= 55	TCR- n= 46	
<b>Anomalies de la NFS</b>				
Anémie <12g/dl	43 (42.6%)	22 (40%)	21 (45.7%)	NS
Thrombopénie <150G/L	23 (22.8%)	17 (30.9%)	6 (13%)	<b>0.0218</b>
Thrombocytose >450G/L	7 (6.9%)	3 (5.5%)	4 (8.7%)	NS
Hyperéosinophilie >0.5G/L	19 (18.8%)	8 (14.5%)	11 (23.9%)	NS
Hyperlymphocytose >3.5G/L	11 (10.9%)	8 (14.5%)	3 (6.5%)	NS
Lymphopénie <1.5G/L	52 (51.5%)	25 (45.5%)	27 (58.7%)	NS
Neutropénie <1.5G/L	10 (9.9%)	6 (10.9%)	4 (8.7%)	NS
Hyperleucocytose, PNN≥7.5G/L	14 (13.9%)	10 (18.2%)	6 (13%)	NS
Pancytopénie	8 (7.9%)	6 (10.9%)	2 (4.3%)	NS
<b>Immunophénotypage sanguin</b>				
Anomalies de l'immunophénotypage	40 (39.6%)	29(52.7%)	11(23.9%)	<b>0.0044</b>
DP (CD4+/CD8+)	10/40	5 (9.1%)	5 (10.9%)	NS
CD4+/CD8+/- (faible)	2/40	2 (3.6%)	0	NS
DN (CD4-/CD8-)	9/40	9 (16.4%)	0	<b>0.0027</b>
CD4 faible	1/40	1 (1.8%)	0	NS
Anomalie du CD7	4/40	4 (7.3%)	0	<b>0.0455</b>
LT activés	5/40	4 (7.3%)	1 (2.2%)	NS
CD10+	3/40	2 (3.6%)	1 (2.2%)	NS
Clone B ou anomalie B	10/40	6 (10.9%)	4 (8.7%)	NS
Etude du TCR souhaitable	15/40	9 (16.4%)	6 (13%)	<b>0.0002</b>
<b>Exposition virale</b>				
VIH	63(62.4%)/1(1%)	32(58.2%)/0	31(67.4%)/1(2.2%)	NS//NS
VHB, VHC	64(63.4%)/3(3%)	33(60%)/2(3.6%)	31(67.4%)/1(2.2%)	NS//NS
CMV	43(42.6%)/25(24.8%)	23(41.8%)/15(27.3%)	20(43.5%)/10(21.7%)	NS//NS
EBV	44(43.6%)/41(40.6%)	24(43.6%)/22(40%)	20(43.5%)/19(41.3%)	NS//NS

Tableau 2 : Anomalies biologiques retrouvées dans la cohorte, notamment anomalies de la NFS, immunophénotypage pathologique, marqueurs d'exposition virale

#### 4.2.3. Résultats de la recherche de réarrangement TCR, anomalies morphologiques et diagnostics

Les recherches de réarrangement TCR concernent le sang, la moelle, et des pièces de biopsies. Les recherches de réarrangement TCR sanguins concernent 84 patients ; parmi ces derniers, 47 patients présentent un TCR sang positif. Les recherches de réarrangement TCR moelle concernent 25 patients, avec 10 positifs. Enfin pour les recherches de réarrangement TCR sur biopsie, ils concernent 18 patients, avec 10 positifs.

Les patients présentant au moins 1 réarrangement TCR positif sur un des milieux de prélèvement représentent 55 patients. Concernant les TCR négatifs, ils sont donc 46 patients.

13 recherches de réarrangement TCR ont été réalisées uniquement dans la moelle et 6 recherches de réarrangement TCR ont été réalisées uniquement sur des biopsies.

42,6% (n=43) des patients de la cohorte ont bénéficié d'un myélogramme et 28,7% (n=29) d'une biopsie ostéo-médullaire (BOM). 63,4% (n=64) des patients ont bénéficié d'un scanner et 38,6% (n=39) d'un TEP scanner. Il n'existe pas de différence significative entre les groupes TCR+ et TCR- concernant le nombre d'exams de moelle et d'exams d'imagerie réalisés, mais il y a une différence sur le nombre cas avec présence d'adénopathies retrouvées au scanner avec un plus grand nombre de patients porteurs d'adénopathies dans le groupe TCR+ (25 patientes contre 12).

Concernant la charge ganglionnaire, on note 30 cas de forte charge ganglionnaire et 7 cas de faible charge ganglionnaire sur les 37 patients présentant des adénopathies.

Concernant les anomalies au myélogramme, on retrouve un envahissement lymphocytaire ou cellules lymphomateuses dans 6/21 myélogrammes pathologiques et un IP médullaire pathologique également dans 6/21 myélogrammes dans le groupe TCR totaux. Parmi les myélogrammes normaux, 9/22 patients présentaient un TCR+. Il n'y a eu aucun cas de myélogramme normal chez un patient TCR+ avec une BOM pathologique (0/5). Par contre 1/6 des patients a présenté une BOM retrouvant un lymphome ou une infiltration lymphocytaire parmi les patients avec myélogramme normal TCR-.



Enfin, les principaux diagnostics retrouvés dans notre cohorte concernent les maladies auto-immunes et inflammatoires (n= 28, soit 27,7% des cas) et les hémopathies lymphoïdes (n= 22, soit 21,8% des cas). 34,7% des patients sont encore en cours d'investigation diagnostique ou n'ont pas de conclusion diagnostique définitive au moment de notre recueil.

Il y a une différence significative concernant le diagnostic d'hémopathies lymphoïdes entre les deux groupes avec 19 patients dans le groupe TCR+ et 3 patients dans le groupe TCR-.

Caractéristiques	Population n= 101	TCR totaux		p
		TCR+ n= 55	TCR- n= 46	
<b>Réarrangement TCR</b>				
Patients avec TCR sanguins	84 (83.2%)	.	.	.
Dont+	47/84			
Patients avec TCR moelle	25 (24.8%)	.	.	.
Dont+	10/25			
Patients avec TCR biopsie	18 (17.8%)	.	.	.
Dont+	10/18			
Patients TCR+ tous milieux (≥1+/tous milieux)	55 (54.5%)	.	.	.
Patients TCR- tous milieux (≥1+/tous milieux)	46 (45.5%)	.	.	.
<b>Autres explorations</b>				
Examen de moelle [Myélogramme-BOM]	[43(42,6%)-29(28,7%)]	26 (47,3%)	21 (45,7%)	NS
Myélogramme pathologique	.	14 (25.5%)	7 (15.2%)	NS
BOM pathologique	.	7 (12.7%)	6 (13%)	NS
Scanner	64(63,4%)	38 (69,1%)	26 (56,5%)	NS
TEP	39(38,6%)	27(49,1%)	15 (32,6%)	NS
Adénopathies	37/64	25/38	12/26	<b>0.0326</b>
Hyperfixation suspecte	18/39	13/27	5/15	NS
<b>Diagnostics</b>				
Hémopathies lymphoïdes totales	22 (21.8%)	19 (34.5%)	3 (6.5%)	<b>0.0006</b>
Hémopathies lymphoïdes confirmées	17 (16.8%)	15 (27.3%)	2 (4.3%)	<b>0.0016</b>
Hémopathies autres	7 (6.9%)	3(5.5%)	4 (8.7%)	NS
SAM hématologique	2 (2%)	2 (3.6%)	0	NS
Maladies AI/inflammatoires	28 (27.7%)	10 (18.2%)	18 (39.1%)	NS
Bilan en cours/pas de conclusion diagnostique définitive	35 (34.7%)	16 (29%)	19 (41.3%)	NS
Autres diagnostics	15 (14.9%)	9 (16.4%)	6 (13%)	NS

Tableau 3 : résultats de la recherche de réarrangement TCR, autres explorations et principaux diagnostics retrouvés dans la population d'étude

Il n'y a pas de différence significative dans la répartition des maladies auto-immunes et des maladies inflammatoires entre les groupes TCR+ et les TCR-. Les diagnostics sont détaillés dans le tableau ci-après en catégories « cytopénies », « poussée de maladie connue » et « maladie de novo » pour les maladies auto-immunes et en « poussée de maladie connue » et « maladie de novo » pour les maladies inflammatoires.

Maladies auto-immunes/inflammatoires	TCR totaux		p
	TCR+ n=55	TCR- n=46	
<b>Maladies auto-immunes</b>	<b>10 (18.1%)</b>	<b>10 (21.7%)</b>	NS
- <u>Cytopénies</u>	<u>7 (12.7%)</u>	<u>5 (10.9%)</u>	NS
• PTI	2 (3.6%)	2 (4.3%)	NS
• AHAI	0	3 (6.5%)	NS
• Maladie des agglutinines froides	1 (1.8%)	0	NS
• Cytopénies liées à une hémopathie lymphoïde	2 (3.6%)	0	NS
> <i>Sans cryoglobulinémie</i>	1 (1.8%)	0	NS
> <i>Avec cryoglobulinémie (type III)</i>	1 (1.8%)	0	NS
• Felty (sur PR connue)	2 (3.6%)	0	NS
- <u>Poussée/en lien avec une pathologie connue (hors cytopénies)</u>	<u>1 (1.8%)</u>	<u>4 (8.7%)</u>	NS
• SAM + poussée rénale + myocardite + myosite sur lupus connu	0	1 (2.2%)	NS
• Gougerot connu (suivi; adénopathies)	0	2 (4.3%)	NS
• Fièvre dans le cadre d'une poussée de la connectivite connue	0	1 (2.2%)	NS
• Poussée cutanée d'une dermatomyosite connue	1 (1.8%)	0	NS
- <u>Autres diagnostics (« de novo »)</u>	<u>2 (3.6%)</u>	<u>1 (2.2%)</u>	NS
• PR	1 (1.8%)	1 (2.2%)	NS
• Possible sclérodermie débutante	1 (1.8%)	0	NS
<b>Maladies inflammatoires</b>	<b>2 (3.6%)</b>	<b>7 (15.2%)</b>	NS
- <u>Poussée/en lien avec une pathologie connue</u>	<u>1 (1.8%)</u>	<u>3 (6.5%)</u>	NS
• Poussée de maladie auto-inflammatoire « Still like »	0	1 (2.2%)	NS
• PPR connue	1 (1.8%)	1 (2.2%)	NS
• Schnitzler connu	0	1 (2.2%)	NS
- <u>Autres diagnostics (« de novo »)</u>	<u>1 (1.8%)</u>	<u>4 (8.7%)</u>	NS
• Probable fièvre/syndrome auto-inflammatoire	0	2 (4.3%)	NS
• Sarcoidose	1 (1.8%)	1 (2.2%)	NS
• Spondylarthrite ankylosante	0	1 (2.2%)	NS

Tableau 4 : Répartition des diagnostics de maladies auto-immunes et des maladies auto-inflammatoire + détails de ces diagnostics

### 4.3. Valeurs prédictives positive et négative du TCR sanguin concernant les hémopathies lymphoïdes

#### 4.3.1. Diagnostics d'hémopathie retrouvés en fonction du TCR sanguin

##### 4.3.1.1. *Diagnostics d'hémopathie TCR sang (tout âge)*

Nous nous sommes ensuite intéressés plus particulièrement aux diagnostics d'hémopathies lymphoïdes chez les patients ayant bénéficiés d'un TCR sang. On note une différence significative entre les groupes TCR+ et TCR- concernant les diagnostics d'hémopathie lymphoïde au total (13 patients dans le groupe TCR+ et 4 dans le groupe TCR-). Il n'y a pas de



différence significative entre les groupes TCR+ et TCR- concernant les hémopathies T et les hémopathies B.

Diagnostics	TCR sang		p
	TCR+ n=47	TCR- n=37	
<b>Hémopathies lymphoïdes totales</b>	<b>13 (27.7%)</b>	<b>4 (10.8%)</b>	<b>0.0006</b>
<b>Hémopathies B</b>	<b>7 (14.9%)</b>	<b>2 (5.4%)</b>	NS
- <b>Lymphomes B</b>	<b>6 (12.8%)</b>	<b>2 (5.4%)</b>	NS
• Lymphome B diffus à grandes cellules	2 (4.2%)	0	NS
• Lymphome B à petites cellules	2 (4.2%)	0	NS
> <i>Sans précision</i>	1 (2.1%)	0	NS
> <i>Lymphome lymphocytaire</i>	1 (2.1%)	0	NS
• Lymphome folliculaire B	1 (2.1%)	0	NS
• Lymphome de Hodgkin EBV+	1 (2.1%)	0	NS
• Lymphome plasmablastique	0	1 (2.7%)	NS
• Lymphome B (sans précision)	0	1 (2.7%)	NS
- <b>LLC</b>	<b>1 (2.1%)</b>	<b>0</b>	NS
<b>Hémopathies T</b>	<b>5 (10.6%)</b>	<b>2 (5.4%)</b>	NS
- <b>Lymphomes T</b>	<b>4 (8.5%)</b>	<b>2 (5.4%)</b>	NS
• Lymphome T (sans précision)	0	1 (2.7%)	NS
• Lymphome de Sézary	1 (2.1%)	0	NS
• LAIT	2 (4.2%)	0	NS
• Probable lymphoprolifération T EBV induit	1 (2.1%)	0	NS
• Lymphome nasal EBV induit	0	1 (2.7%)	NS
- <b>LALT</b>	<b>1 (2.1%)</b>	<b>0</b>	NS
<b>Autres hémopathies lymphoïdes</b>	<b>1 (2.1%)</b>	<b>0</b>	NS
- <b>Lymphomes (sans précision)</b>	<b>1 (2.1%)</b>	<b>0</b>	NS
<b>Hémopathies lymphoïdes confirmées</b>	<b>11 (23.4%)</b>	<b>4 (10.8%)</b>	NS
<b>SAM hématologique</b>	<b>2 (4%)</b>	<b>0</b>	NS
<b>Hémopathies autres</b>	<b>3 (6.4%)</b>	<b>3 (8,1%)</b>	NS

Tableau 4 : comparaison du nombre de diagnostics d'hémopathies dans les groupes TCR sang+ et TCR sang-

#### 4.3.1.2. VPP et VPN TCR sang (tout âge)

A partir des données de ce tableau nous avons pu établir les valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) respectivement des TCR sang + et TCR sang – concernant le diagnostic d'hémopathie lymphoïde.

La VPP TCR sang + pour les diagnostics d'hémopathies lymphoïdes totales est de 0.28 [0.16, 0.42].

La VPN TCR sang – pour les diagnostics d'hémopathies lymphoïdes totales est de 0.89 [0.76, 0.97].

Nous avons analysé le sous-groupe des patients de moins de 65 ans : il n'y a pas de différences TCR+ et TCR- dans ce sous-groupe et les valeurs de VPP/VPN sont du même ordre que celles calculées précédemment, avec peut-être une VPN plus forte encore (0.94 [0.77, 0.997]).

## 4.4. Prise en compte du TCR+

La première étape pour évaluer l'impact d'un réarrangement TCR positif dans la pratique médicale est de savoir dans combien de cas ce résultat est pris en compte dans la démarche du clinicien.

Sur les 55 TCR+ de notre cohorte, tous milieux, on retrouve la trace d'une prise en compte de l'examen chez 24 patients (participation à la demande d'un examen morphologique, demande d'avis spécialisé, contrôle du résultat...).

Si on se limite à la prise en compte de TCRsang+, sur 47 patients présentant un TCR positif dans le sang, 20 ont été pris en compte.

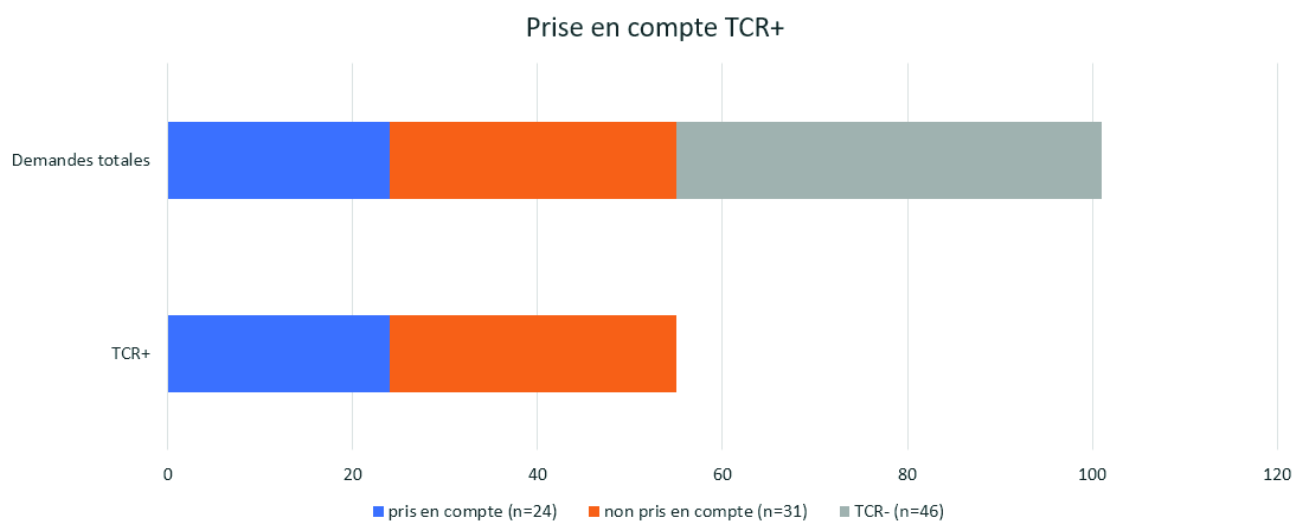


Figure 5 : représentation des TCR+ pris en compte par rapport aux TCR+ et par rapport au total des demandes

## 5. DISCUSSION

Les objectifs de notre étude concernent principalement la description de la population de Médecine Interne chez laquelle une demande de réarrangement TCR est réalisée, l'impact du réarrangement TCR dans la prise en charge des malades et l'estimation de la valeur de cet examen dans le sang en tant qu'aide au diagnostic des hémopathies lymphoïdes.

### 5.1. Population

Les principaux résultats de notre étude mettent en évidence que la population dans laquelle une recherche de réarrangement TCR est réalisée en Médecine Interne est relativement âgée avec une médiane de 64 ans.

L'âge de 65 ans est habituellement retenu dans la littérature comme étant le début d'une contraction significative du répertoire TCR dans la population générale avec apparition d'une ou plusieurs expansions clonales. Des expansions clonales sont retrouvées chez 30% des sujets de plus de 65 ans<sup>(18)</sup> avec une estimation allant jusqu'à 70% des patients âgés en extrapolant ces résultats à la population âgée en dehors de l'étude. Il est difficile de comparer ces résultats aux données de la littérature étant donné les différences de techniques utilisées, néanmoins l'âge des patients de notre cohorte constitue probablement un biais pour l'interprétation des résultats.

Un nombre conséquent de patients présentent un antécédent de maladie auto-immune et auto-inflammatoire. Ceci n'est pas surprenant pour une cohorte de Médecine Interne, cependant ces antécédents sont en soit des contextes de possibles apparitions de clonalité. Ces éléments pourraient en partie expliquer le taux de positivité du réarrangement TCR retrouvé dans notre cohorte.

Plus de la moitié de notre cohorte présente une lymphopénie : la lymphopénie, par le biais de la LIP<sup>(24)</sup> peut également être à l'origine d'une contraction du répertoire TCR dans la littérature, en particulier chez les patients avec terrain auto-immun.

Ces différents éléments tendent à montrer qu'il n'est pas surprenant de retrouver des clones T dans notre cohorte. Il y a quelques paramètres qui sont possiblement liés à la présence d'un clone T chez nos sujets : la thrombopénie, la présence d'une anomalie de l'immunophénotypage et en particulier la présence de lymphocytes doubles négatifs, de diminution du CD7 et la mention « étude TCR souhaitable ». Le phénotype double négatif, dans un contexte de restriction du répertoire TCR, se retrouve dans la littérature notamment<sup>(33)</sup> dans le cadre de modèles murins de lupus, faisant suspecter un lien avec l'auto-immunité. La perte du CD7 quant à elle se retrouve notamment dans plusieurs hémopathies T (telles que le LAIT, le lymphome de Sézary, le lymphome anaplasique, l'ATLL), en même temps que d'autres anomalies spécifiques. La mention « étude TCR souhaitable » révèle la forte suspicion de clonalité et il n'est donc pas surprenant qu'elle puisse être liée au TCR+.

On retrouve également une différence significative entre les groupes TCR+ et TCR- concernant la présence d'adénopathies à l'imagerie et le diagnostic d'hémopathies lymphoïdes au total et confirmés (avec plus grand nombre de patients dans le groupe TCR+). Il semble y avoir une association entre la présence d'un clone sur les examens de sang, moelle ou biopsie tissulaire et le diagnostic d'une hémopathie lymphoïde, ce qui est en accord avec le fait que nous retrouvons la présence d'adénopathies plus fréquemment chez ces patients.

Cependant, concernant l'ensemble de ces résultats, nous ne pouvons conclure quant à la présence d'un lien significatif entre le résultat positif d'une recherche de réarrangement TCR et la présence d'adénopathies, la présence d'une thrombopénie, la présence d'un immunophénotypage pathologique étant donné le caractère rétrospectif de l'étude et nos faibles effectifs.

Notre population est donc une population relativement âgée et qui présente des comorbidités pouvant être à l'origine d'une restriction du répertoire TCR, témoignant de la difficulté d'interpréter cet examen en Médecine Interne.

## 5.2. Prise en compte de l'examen et apport à la démarche diagnostique

La prise en compte des résultats de TCR+ est partielle. Cette prise en compte partielle peut être expliquée par plusieurs raisons :

-Arrêt des explorations/limitations de soins ou décès du patient en raison d'une altération trop importante de l'état clinique avant d'obtenir le résultat

-TCR demandé en même temps que d'autres examens (sur biopsie d'adénopathie par exemple ou en même temps qu'une BOM) avec diagnostic établi par un autre biais, sans nécessité d'intégrer le résultat du réarrangement dans la démarche diagnostique

-Perdus de vue

Le fait que le résultat ne soit pas directement disponible par voie informatique peut aussi limiter la prise en compte de l'examen.

Concernant les 24 cas pris en compte, dans 7 cas d'autres examens (examen de moelle, TCR sur moelle, biopsie de peau, TCR sur biopsie, PET scanner) ont été demandés en même temps que le TCR index (ou pendant que ce dernier était en cours). Dans 2 cas, des examens tels que PET scanner ou examen de moelle précèdent les demandes de TCR.

Il est possible que nous sous-estimions cette prise en compte. La démarche de prise en compte du résultat TCR peut n'avoir pas fait l'objet d'une mise à l'écrit.

Cependant, cette prise en compte partielle pose question quant à l'utilité de réaliser une recherche de réarrangement TCR notamment lorsque d'autres examens tels que la biopsie ou la BOM sont en cours. L'intérêt de cet examen, notamment dans le sang, lorsqu'un examen de référence pour étayer un diagnostic de certitude (en particulier une biopsie) est demandé reste limité. Il ne semble pas, dans ces cas-là apporter des éléments pour les conclusions diagnostiques car il s'agit de cas de forte suspicion d'hémopathie lymphoïde (le recours à la biopsie révélant une forte suspicion étant donné le caractère invasif de la chirurgie).

Toutefois il semble y avoir un possible intérêt de la recherche du réarrangement TCR sang dans le diagnostic d'hémopathies lymphoïdes étant donné qu'il existe dans notre cohorte une différence significative entre les TCR sang+ et les TCR sang- pour ce paramètre. On ne retrouve

pas en revanche de différence entre TCR sang+ et TCR sang- concernant les hémopathies B ou T et ce même chez les moins de 65 ans.

Nous avons donc également calculé la VPP du TCRsang+ et la VPN du TCRsang- concernant le diagnostic d'hémopathie lymphoïde : la VPP du paramètre TCRsang+ est médiocre, estimée à 30%, alors que la VPN du TCRsang- est forte, à 94%.

Concernant les 13 cas d'hémopathies lymphoïdes TCRsang+, l'intensité du réarrangement TCR est connu chez 6 patients : 1 patient présente un réarrangement de faible intensité et 5 patients présentent un réarrangement de forte à très forte intensité. 15 réarrangements parmi les réarrangements TCRsang+ sont de forte à très forte intensité : 5/15 de ces réarrangements avec forte intensité sont accompagnés d'un diagnostic d'hémopathie lymphoïde.

La présence d'un clone T ne permet pas de conclure quant à la nature T ou B de l'hémopathie. Dans des cas de réarrangement TCR positif dans le cadre d'une hémopathie, les données de la littérature montrent qu'il n'est pas possible de déterminer s'il s'agit d'une hémopathie T ou B sur la seule présence de ce réarrangement en raison de l'existence de réarrangements illégitimes(54) qui existent dans différents types d'hémopathies.

La faible VPP peut être liée au fait qu'un clone T n'est pas synonyme d'hémopathie, mais elle peut également être liée au fait que le délais de latence entre la survenue d'un clone et l'apparition d'une hémopathie peut être de plusieurs années<sup>(66)</sup>. Or le suivi est relativement court dans notre cohorte, avec un maximum de 2,5 années de suivi, ce qui n'est pas suffisant pour affirmer qu'il n'y a pas d'autres hémopathies de survenue ultérieure qui pourraient être en lien avec le clone T. Ceci, couplé au faible effectif de patients et au caractère rétrospectif de l'étude sont des biais qui limitent nos conclusions sur ce point.

Ces résultats suggèrent que le réarrangement TCR sang n'est pas un bon examen pour prédire le diagnostic d'hémopathie lymphoïde chez les patients de Médecine Interne, à tout âge et dans le sous-groupe des patients de moins de 65 ans. Ceci est d'autant plus vrai que dans la littérature, même en cas de lymphome avéré (cutané dans ce cas), des clones sanguins sans rapport avec l'hémopathie peuvent être retrouvés, sans différence significative avec les patients ne présentant pas de lymphome<sup>(1)</sup>. La présence d'un clone en contexte d'hémopathie n'a donc pas forcément de lien avec l'hémopathie sous-jacente. Néanmoins, un réarrangement TCR de forte intensité aurait un intérêt à être contrôlé et surveillé plus étroitement étant donné que parmi tous les réarrangements dont l'intensité est connue, un tiers des cas d'intensité forte à très forte sont accompagnés d'un diagnostic d'hémopathie lymphoïde.

En revanche, il peut présenter un intérêt pour des patients chez lesquels on souhaiterait limiter les explorations : la forte VPN du paramètre TCRsang- pourrait peut-être permettre d'exclure le diagnostic d'hémopathies lymphoïdes hors cas de forte suspicion. En effet, en cas de forte suspicion, le TCRsang n'a que peu d'intérêt et risque de ne pas être pris en compte. La valeur de la VPN est à modérer tout de même car certains types d'hémopathies<sup>(74)</sup> comme le lymphome T anaplasique, le réarrangement TCR n'est pas retrouvé sur la biopsie de manière systématique- on peut donc douter qu'un clone circulant soit retrouvé dans ces cas-là.

Ceci pourrait avoir un intérêt notamment dans le cadre du suivi de certains patients : nous avons notamment eu le cas dans notre cohorte d'un patient avec antécédent d'hémopathie lymphoïde et de dermatomyosite ; lors d'une poussée cutanée de sa maladie, la recherche d'un clone sanguin et d'un clone cutané de manière synchrone a permis d'écarter le diagnostic de lymphome cutané (1 premier TCR sang négatif avec TCR peau positif, contrôle à distance : TCR sang et TCR peau négatifs) et de conclure à une poussée de la dermatomyosite. Cela pourrait également être intéressant pour les suivis des patients atteints de Gougerot avec cependant une réserve : le surrisque d'hémopathie présent chez ces patients ne permettrait peut-être pas, en cas de poussée d'adénopathies par exemple, de les classer en « faible suspicion d'hémopathie »<sup>(38,39)</sup>. La VPN dans ce cas ne peut seule suffire à limiter les explorations, ce d'autant que la transformation maligne peut avoir lieu plusieurs années après le début de la maladie et que d'autres marqueurs prédictifs d'une évolution défavorable existent.

Etant donné l'ensemble de ces éléments, nous proposons donc de réserver le prélèvement de TCR sanguin aux patients n'ayant pas de forte suspicion d'hémopathie lymphoïde, et ce plus en vue de limiter les explorations plutôt qu'à visée de confirmation diagnostique. Là encore cependant, le faible délai de suivi dans notre cohorte nous invite à être prudents car les résultats de la VPN pourraient également être biaisés en raison des perdus de vue.

### 5.3. Perspectives

L'intérêt de l'utilisation de la recherche de réarrangement TCR comme aide au diagnostic des hémopathies lymphoïdes chez une population autre que les malades d'hématologie n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études à notre connaissance. Certaines études ont posé la question de la

transformation maligne dans le syndrome de Gougerot-Sjogren et la question du TCUS<sup>(21)</sup> chez la population âgée saine, mais le rôle du réarrangement TCR dans la démarche diagnostique n'y est pas abordé. A cet égard, notre étude prend acte des pratiques actuelles qui ont cours dans le service de Médecine Interne du CHU de Rouen et cela nous permet de proposer une restriction des prescriptions, en particulier concernant les TCR sanguins. Toutefois, notre étude est rétrospective et est soumise à de nombreux biais, parmi lesquels les perdus de vue, les biais d'information et le faible effectif de patients.

Une étude prospective étudiant plusieurs paramètres chez tout patient entrant en Médecine Interne et évaluant la survenue d'hémopathie lymphoïde au cours du suivi pourrait permettre de proposer un score diagnostic afin de limiter les explorations en fonction des résultats chez les patients ayant une suspicion d'hémopathie lymphoïde faible à modérée. Ce score regrouperait des examens tels que l'immunophénotypage sanguin, la NFS, le réarrangement TCR sanguin, le réarrangement IgH sanguin et l'électrophorèse des protides. Ceci serait intéressant en particulier les patients fragiles pour lesquels des explorations invasives sont à risque d'effets indésirables graves.

Afin d'évaluer plus finement la VPP d'un TCRsang +, le devenir de cette population pourrait être comparé à une population d'hématologie dans laquelle les mêmes examens initiaux seraient systématiquement réalisés. Cela nous permettrait de comparer les résultats obtenus avec les taux obtenus dans le sang chez des patients d'hématologie en appareillant éventuellement sur d'autres facteurs.

Une telle étude permettrait également d'évaluer l'impact médico-économique du réarrangement TCR, notamment dans la limitation des explorations (éviter la multiplication d'examens spécialisés et plus ou moins coûteux tels que des TEP scanner chez des patients à faible risque d'hémopathie par exemple).



## CONCLUSION

Le réarrangement TCR est un outil précieux dans l'aide au diagnostic histologique des cas litigieux d'hémopathies lymphoïdes, notamment pour les différencier de lymphoproliférations réactionnelles. Il s'interprète en concordance avec les données immunohistochimiques, cliniques et biologiques. Son utilisation hors AMM dans notre service a pour but d'aider au diagnostic d'hémopathies lymphoïdes chez des patients de Médecine Interne et cette pratique n'avait pas été évaluée jusqu'à présent à notre connaissance.

Nos résultats ont montré que la population de Médecine Interne dans laquelle le réarrangement TCR est demandé présente des caractéristiques qui pourraient orienter le résultat du réarrangement vers une positivité (âge, antécédents). Ces caractéristiques et les explorations faites dans les groupes TCR+ et TCR- ne présentent pas de différence significative.

En revanche, nous avons établi qu'il y a une différence significative entre les groupes TCRsang+ et TCRsang- concernant le diagnostic d'hémopathies lymphoïdes, avec plus de patients diagnostiqués dans le groupe TCRsang+. Cependant la VPP du TCRsang+ est médiocre. La VPN du TCRsang- est, elle, forte. L'ensemble des données recueillies nous font proposer de réaliser des TCR sanguins plutôt chez des patients pour lesquels il n'y a pas de forte suspicion d'hémopathie lymphoïde et ce afin de limiter les explorations. Le TCRsang+ ne doit pas à ce jour et d'après les données que nous possédons être réalisé afin d'affirmer un diagnostic d'hémopathie lymphoïde. Par ailleurs, il ne semble pas y avoir d'indication à le réaliser lorsque la suspicion d'hémopathie lymphoïde est forte car il ne serait probablement pas pris en compte dans l'évaluation diagnostique si un autre examen permet d'avoir un diagnostic précis d'emblée (exemple : biopsie). Il peut en revanche servir de complément comme c'est déjà le cas sur des prélèvements de moelle ou de biopsies, sans toutefois signer à lui seul le caractère malin du clone retrouvé.

# ANNEXE

Annexe 1 : profils d'immunophénotypage des principaux syndromes lymphoprolifératifs (laboratoire du CHU d'Anger, disponible sur le site internet [hematocell.fr](http://hematocell.fr), Document rédigé par Camille Ramirez, Interne en Biologie (septembre 2011))

	LLC	FL	SMZL/SLVL	L Tricho	L Tricho V	MCL	DLBCL	LB
CD19	+	+ [dim]	+	+	+	+	+	+
CD5	+	-	-/[+]	-	-	+	-/[+]	-
CD10	-	+	-	-/[+]	-	-	+/-	+
CD23	+	-	-	-	-	-	-/[+]	-
sig	Low/-	+	+ [IgM]	+ [IgM, IgG]	+ [IgG]	+	+/[+]	+
CD79b	Low/-	Low/-	+	+	Low/-	+	+	+
CD22	Low/-	+	+	+	+	+	+	+
CD103	-	-	-/[+]	+	±	-	-	-
CD25	-/[+]	-	±	+	-/[+]	-	-/[+]	-
CD20	+ [low]	+	+/[+]	+	+	+	+/[+]	+
CD11c	-/[+]	-	+/-	+	-/[+]	-	-	-
FMC7	-	+/-	+	+	+	+/[+]	+/-	-/[+]
CD43	+	-	-	+	+	+	-/[+]	-

LLC : leucémie lymphoïde chronique ; FL : lymphome folliculaire ; SMZL/SLVL : lymphome de la zone marginale splénique, lymphome splénique à lymphocytes villosités ; L Tricho : leucémie à tricholeucocytes ; L Tricho V : leucémie à tricholeucocytes variante ; MCL : lymphome du manteau ; DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules ; LB : lymphome de Burkitt.

CD11c, FMC7 et CD43 ne sont pas recommandés d'emblée dans le panel.

## 2- EN SECONDE INTENTION :

- Type de récepteur à l'Ag : expression du TCRab ou TCRgd
- Autres marqueurs également utiles : CD10, CD25, CD30, marqueurs NK...

	LAI-T	Syndrome de Sézary	Lymphome T anaplasique	ATLL	LPL-T	Expansions de LGL	
						T	NK
sCD3	Low	+		+	+	+	-
CD2	+	+	CD4+, absence fréquente d'expression des Ag CD2, CD3, CD5, CD7	+	+	+	+
CD4	+	+		+	+	-	-
CD5	+	+		+	+	Low	-
CD8	+/-	-		-	- [rarement CD4+ CD8+]	+	-/+
CD7	Low	-		-	+	Low	?
CD16					-	+/-	+
CD56		-	+/-	-	-	+/-	+
CD57		-		-	-	+/-	+
CD10	+				-		
CD25		+/- et intensité fluo hétérogène		+	-	-	-
CD26		Low/-					
CD30			+				
Mq granules cytotoxiques			+			+	+
			ALK-1 +/- +/- expression d'Ag myéloïdes		Le + svt pas de profil phéno aberrant		

LAI-T : lymphome T angio-immunoblastique ; ATLL : leucémie/lymphome à cellules T de l'adulte ; LPL-T : leucémie polyléucocytaire T ; LGL : large granular lymphocytes

Annexe 2 : classification OMS des tumeurs lymphoïdes (issu de : Bruneau, J., Canioni, D., & Jo Molina, T. (2017). Révision 2016/2017 de la classification OMS des hémopathies lymphoïdes matures : ce qui va changer dans la pratique quotidienne. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2017(488), 39–48. doi:10.1016/S1773-035X(16)30418-X)

Tableau I – Classification OMS révisée 2016 des tumeurs du tissu lymphoïde.	
<b>Néoplasies lymphoïdes B matures</b>	<b>Néoplasies lymphoïdes T et NK matures</b>
Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire	Leucémie prolymphocytaire T
Lymphocytose B monoclonale *	Leucémie T à grands lymphocytes à grains (LGL)
Leucémie pro-lymphocytaire B	<i>Syndrome lymphoprolifératif chronique à cellules NK</i>
Lymphome de la zone marginale splénique	Leucémie agressive à cellules NK
Leucémie à tricholeucocytes	Lymphome T EBV+ systémique de l'enfance*
<i>Lymphome / Leucémie B splénique, non classable</i>	Syndrome lymphoprolifératif de type hydroa vacciniforme-like*
<i>Lymphome B diffus à petites cellules de la pulpe rouge splénique</i>	Leucémie/Lymphome T de l'adulte
<i>Leucémie à tricholeucocytes - variant</i>	Lymphome NK/T extraganglionnaire, de type nasal
Lymphome lymphoplasmocytaire	Lymphome T associé à une entéropathie
Macroglobulinémie de Waldenström	Lymphome T monomorphe épithéliotrope intestinal*
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgM*	<i>Syndrome lymphoprolifératif T indolent du tube digestif*</i>
Maladie des chaînes lourdes Mu	Lymphome T hépatosplénique
Maladie des chaînes lourdes gamma	Lymphome T sous cutané de type panniculite
Maladie des chaînes lourdes alpha	Mycosis fungoides
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgG/IgA*	Syndrome de Sézary
Myélome multiple	Syndromes lymphoprolifératifs T CD30+ primitifs cutanés
Plasmocytome solitaire osseux	Papulose lymphomatoides
Plasmocytome extra-osseux	Lymphome à grandes cellules anaplasiques primitif cutané
<i>Maladie des dépôts d'immunoglobuline monoclonaux*</i>	Lymphome T gamma delta primitif cutané
Lymphome de la zone marginale extra-ganglionnaire du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT)	<i>Lymphome T CD8+ cytotoxique agressif épidermotrope, primitif cutané</i>
Lymphome de la zone marginale ganglionnaire	<i>Lymphome T CD8+ acral primitif cutané*</i>
<i>Lymphome de la zone marginale ganglionnaire de type pédiatrique</i>	<i>Syndrome lymphoprolifératif T CD4+ à cellules petites et moyennes primitif cutané*</i>
Lymphome folliculaire	Lymphome T périphérique, NOS
Néoplasie folliculaire <i>in situ</i> *	Lymphome T angioimmunoblastique
Lymphome folliculaire de type duodénal*	<i>Lymphome T folliculaire*</i>
Lymphome folliculaire de type pédiatrique*	<i>Lymphome T périphérique ganglionnaire de phénotype TFH*</i>
<i>Lymphome à grandes cellules B avec réarrangement de IRF4*</i>	Lymphome à grandes cellules anaplasiques, ALK+
Lymphome centro-folliculaire cutané primitif	Lymphome à grandes cellules anaplasiques, ALK-
Lymphome à cellules du manteau	<i>Lymphome à grandes cellules anaplasique, associé à un implant mammaire*</i>
Néoplasie à cellules du manteau <i>in situ</i> *	
Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), sans autre spécificité (NOS)	<b>Lymphomes de Hodgkin</b>
de type B du Centre germinatif*	Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire
de type Activé B*	Lymphome de Hodgkin classique
Lymphome à grandes cellules B riche en lymphocytes T/histiocytes	Lymphome de Hodgkin classique scléro-nodulaire
DLBCL primitif du système nerveux central	Lymphome de Hodgkin classique riche en lymphocytes
DLBCL primitif cutané, de type jambe	Lymphome de Hodgkin classique à cellularité mixte
DLBCL EBV+, NOS*	Lymphome de Hodgkin classique en déplétion lymphoïde
<i>Ulcère cutanéomuqueux EBV+*</i>	
DLBCL associé à une inflammation chronique	<b>Syndromes lymphoprolifératifs post transplantation (PTLD)</b>
Granulomatose lymphomatoides	PTLD de type hyperplasie plasmocytaire
Lymphome à grandes cellules B primitif du médiastin (thymique)	PTLD de type mononucléose infectieuse
Lymphome à grandes cellules B intravasculaire	PTLD de type hyperplasie lymphoïde folliculaire floride*
Lymphome à grandes cellules B ALK positif	PTLD de type polymorphe
Lymphome plasmablastique	PTLD de type monomorphe (de type lymphoïde B, T ou NK)
Lymphome des séreuses	PTLD de type lymphome de Hodgkin classique
<i>DLBCL HHV8+, sans autre spécificité*</i>	
Lymphome de Burkitt	
<i>Lymphome Burkitt-like avec aberration 11q</i>	
Lymphome B de haut grade avec réarrangement de MYC et BCL2 et/ou BCL6*	
Lymphome B de haut grade, NOS*	
Lymphome B inclassable, avec des aspects intermédiaires entre un DLBCL et un lymphome de Hodgkin classique	
	Les Entités primaires sont en italique; les modifications par rapport à la classification OMS 2008 comportent un astérisque (*).

# BIBLIOGRAPHIE

1. Delfau-Larue MH, Laroche L, Wechsler J, Lepage E, Lahet C, Asso-Bonnet M, et al. Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood*. 1 nov 2000;96(9):2987-92.
2. van Dongen JJM, Langerak AW, Brüggemann M, Evans P a. S, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. déc 2003;17(12):2257-317.
3. Langerak AW, Groenen PJTA, Brüggemann M, Beldjord K, Bellan C, Bonello L, et al. EuroClonality/BIOMED-2 guidelines for interpretation and reporting of Ig/TCR clonality testing in suspected lymphoproliferations. *Leukemia*. oct 2012;26(10):2159-71.
4. Zhu H, Zhao M, Cao Z, Yang J, Li Y, Xing L. The clinical characteristics of autoimmune haemolytic anaemia/Evans syndrome patients with clonal immunoglobulin/T cell receptor gene rearrangement. *Autoimmunity*. nov 2020;53(7):394-9.
5. Fogarty PF, Rick ME, Zeng W, Risitano AM, Dunbar CE, Bussel JB. T cell receptor VB repertoire diversity in patients with immune thrombocytopenia following splenectomy. *Clin Exp Immunol*. sept 2003;133(3):461-6.
6. Tai Y, Wang Q, Korner H, Zhang L, Wei W. Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Front Pharmacol*. 2018;9:642.
7. Schatz DG, Swanson PC. V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu Rev Genet*. 2011;45:167-202.
8. Gazzola A, Mannu C, Rossi M, Laginestra MA, Sapienza MR, Fuligni F, et al. The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Ther Adv Hematol*. avr 2014;5(2):35-47.
9. Bosselut R. T cell antigen recognition: Evolution-driven affinities. *Proc Natl Acad Sci*. 29 oct 2019;116(44):21969-71.
10. Yao XS, Diao Y, Sun WB, Luo JM, Qin M, Tang XY. Analysis of the CDR3 length repertoire and the diversity of TCR alpha chain in human peripheral blood T lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. juin 2007;4(3):215-20.
11. Fozza C, Barraqueddu F, Corda G, Contini S, Viridis P, Dore F, et al. Study of the T-cell receptor repertoire by CDR3 spectratyping. *J Immunol Methods*. janv 2017;440:1-11.
12. Langerak AW, van Den Beemd R, Wolvers-Tettero IL, Boor PP, van Lochem EG, Hooijkaas H, et al. Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha beta T-cell proliferations. *Blood*. 1 juill 2001;98(1):165-73.



13. Feng B, Jorgensen JL, Hu Y, Medeiros LJ, Wang SA. TCR-Vbeta flow cytometric analysis of peripheral blood for assessing clonality and disease burden in patients with T cell large granular lymphocyte leukaemia. *J Clin Pathol.* févr 2010;63(2):141-6.
14. van den Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, Hop WC, Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, et al. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry.* 1 août 2000;40(4):336-45.
15. Armand M, Derrioux C, Beldjord K, Wabeke T, Lenze D, Boone E, et al. A New and Simple TRG Multiplex PCR Assay for Assessment of T-cell Clonality: A Comparative Study from the EuroClonality Consortium. *HemaSphere.* juin 2019;3(3):e255.
16. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee W-W, Koetz K, Bryl E, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juin 2005;174(11):7446-52.
17. Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 mars 2014;192(6):2689-98.
18. Ricalton NS, Robertson C, Norris JM, Rewers M, Hamman RF, Kotzin BL. Prevalence of CD8+ T-cell expansions in relation to age in healthy individuals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* mai 1998;53(3):B196-203.
19. Dippel E, Klemke D, Hummel M, Stein H, Goerdts S. T-cell clonality of undetermined significance. *Blood.* 1 juill 2001;98(1):247-8.
20. Posnett DN, Sinha R, Kabak S, Russo C. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to « benign monoclonal gammopathy ». *J Exp Med.* 1 févr 1994;179(2):609-18.
21. Grunewald J, Jeddi-Tehrani M, Dersimonian H, Andersson R, Wigzell H. A persistent T cell expansion in the peripheral blood of a normal adult male: a new clinical entity? *Clin Exp Immunol.* août 1992;89(2):279-84.
22. Shi M, Olteanu H, Jevremovic D, He R, Viswanatha D, Corley H, et al. T-cell clones of uncertain significance are highly prevalent and show close resemblance to T-cell large granular lymphocytic leukemia. Implications for laboratory diagnostics. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* oct 2020;33(10):2046-57.
23. Goronzy JJ, Weyand CM. Aging, autoimmunity and arthritis: T-cell senescence and contraction of T-cell repertoire diversity - catalysts of autoimmunity and chronic inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):225-34.
24. Minato N. T Cell Senescence and Autoimmunity. In: Nakao K, Minato N, Uemoto S, éditeurs. *Innovative Medicine: Basic Research and Development* [Internet]. Tokyo: Springer; 2015 [cité 25 sept 2021]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500331/>
25. Khoruts A, Fraser JM. A causal link between lymphopenia and autoimmunity. *Immunol Lett.* 15 avr 2005;98(1):23-31.
26. Zintzaras E, Voulgarelis M, Moutsopoulos HM. The risk of lymphoma development in autoimmune diseases: a meta-analysis. *Arch Intern Med.* 14 nov 2005;165(20):2337-44.

27. Jiang X, Wang S, Zhou C, Wu J, Jiao Y, Lin L, et al. Comprehensive TCR repertoire analysis of CD4+ T-cell subsets in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* mai 2020;109:102432.
28. Goronzy JJ, Zettl A, Weyand CM. T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Int Rev Immunol.* 1998;17(5-6):339-63.
29. Wagner U, Pierer M, Kaltenhäuser S, Wilke B, Seidel W, Arnold S, et al. Clonally expanded CD4+CD28null T cells in rheumatoid arthritis use distinct combinations of T cell receptor BV and BJ elements. *Eur J Immunol.* janv 2003;33(1):79-84.
30. Bröker BM, Korthäuer U, Heppt P, Weseloh G, de la Camp R, Kroczeck RA, et al. Biased T cell receptor V gene usage in rheumatoid arthritis. Oligoclonal expansion of T cells expressing V alpha 2 genes in synovial fluid but not in peripheral blood. *Arthritis Rheum.* sept 1993;36(9):1234-43.
31. Lim A, Toubert A, Pannetier C, Dougados M, Charron D, Kourilsky P, et al. Spread of clonal T-cell expansions in rheumatoid arthritis patients. *Hum Immunol.* juill 1996;48(1-2):77-83.
32. Hall FC, Thomson K, Procter J, McMichael AJ, Wordsworth BP. TCR beta spectratyping in RA: evidence of clonal expansions in peripheral blood lymphocytes. *Ann Rheum Dis.* mai 1998;57(5):319-22.
33. Li H, Adamopoulos IE, Moulton VR, Stillman IE, Herbert Z, Moon JJ, et al. Systemic lupus erythematosus favors the generation of IL-17 producing double negative T cells. *Nat Commun.* 5 juin 2020;11(1):2859.
34. Masuko-Hongo K, Kato T, Suzuki S, Sekine T, Kurokawa M, Ueda S, et al. Frequent clonal expansion of peripheral T cells in patients with autoimmune diseases: a novel detecting system possibly applicable to laboratory examination. *J Clin Lab Anal.* 1998;12(3):162-7.
35. Holbrook MR, Tighe PJ, Powell RJ. Restrictions of T cell receptor beta chain repertoire in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* sept 1996;55(9):627-31.
36. Liu X, Zhang W, Zhao M, Fu L, Liu L, Wu J, et al. T cell receptor  $\beta$  repertoires as novel diagnostic markers for systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* août 2019;78(8):1070-8.
37. Stergiou IE, Papageorgiou A, Chatzis LG, Tzioufas AG, Voulgarelis M, Goules A. T cell lymphoma in the setting of Sjögren's syndrome: T cells gone bad? Report of five cases from a single centre cohort. *Clin Exp Rheumatol.* août 2020;38 Suppl 126(4):125-9.
38. Masaki Y, Sugai S. Lymphoproliferative disorders in Sjögren's syndrome. *Autoimmun Rev.* mars 2004;3(3):175-82.
39. Voulgarelis M, Skopouli FN. Clinical, immunologic, and molecular factors predicting lymphoma development in Sjögren's syndrome patients. *Clin Rev Allergy Immunol.* juin 2007;32(3):265-74.
40. Sumida T, Matsumoto I, Maeda T, Nishioka K. T-cell receptor in Sjögren's syndrome. *Br J Rheumatol.* juin 1997;36(6):622-9.
41. Matsumoto I, Tsubota K, Satake Y, Kita Y, Matsumura R, Murata H, et al. Common T cell receptor clonotype in lacrimal glands and labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *J Clin Invest.* 15 avr 1996;97(8):1969-77.

42. Witzens M, Möhler T, Willhauck M, Scheibenbogen C, Lee KH, Keilholz U. Detection of clonally rearranged T-cell-receptor gamma chain genes from T-cell malignancies and acute inflammatory rheumatic disease using PCR amplification, PAGE, and automated analysis. *Ann Hematol.* mars 1997;74(3):123-30.
43. Weyand CM, Schönberger J, Oppitz U, Hunder NN, Hicok KC, Goronzy JJ. Distinct vascular lesions in giant cell arteritis share identical T cell clonotypes. *J Exp Med.* 1 mars 1994;179(3):951-60.
44. Lopez-Hoyos M, Bartolome-Pacheco MJ, Blanco R, Rodriguez-Valverde V, Martinez-Taboada VM. Selective T cell receptor decrease in peripheral blood T lymphocytes of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis.* janv 2004;63(1):54-60.
45. Samson M, Ly KH, Tournier B, Janikashvili N, Trad M, Ciudad M, et al. Involvement and prognosis value of CD8(+) T cells in giant cell arteritis. *J Autoimmun.* août 2016;72:73-83.
46. Grunewald J, Andersson R, Rydberg L, Gigliotti D, Schaufelberger C, Hansson GK, et al. CD4+ and CD8+ T cell expansions using selected TCR V and J gene segments at the onset of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum.* août 1994;37(8):1221-7.
47. Schaufelberger C, Andersson R, Nordborg E, Hansson GK, Nordborg C, Wahlström J. An uneven expression of T cell receptor V genes in the arterial wall and peripheral blood in giant cell arteritis. *Inflammation.* déc 2008;31(6):372-83.
48. Smirnova SJ, Sidorova JV, Tsvetaeva NV, Nikulina OF, Biderman BV, Nikulina EE, et al. Expansion of CD8+ cells in autoimmune hemolytic anemia. *Autoimmunity.* 2016;49(3):147-54.
49. Shimomura T, Fujimura K, Takafuta T, Fujii T, Katsutani S, Noda M, et al. Oligoclonal accumulation of T cells in peripheral blood from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* déc 1996;95(4):732-7.
50. Zhang XL, Li YQ, Chen SH, Yang LJ, Chen S, Wu XL, et al. The feature of clonal expansion of TCR Vbeta repertoire, thymic recent output function and TCRzeta chain expression in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Int J Lab Hematol.* déc 2009;31(6):639-48.
51. Kim J, Park CJ, Chi HS, Kim MJ, Seo JJ, Moon HN, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: better therapeutic responses of patients with B- or T-cell clonality than patients without clonality. *Int J Hematol.* déc 2003;78(5):461-6.
52. Ware RE, Howard TA. Elevated numbers of gamma-delta (gamma delta+) T lymphocytes in children with immune thrombocytopenic purpura. *J Clin Immunol.* juill 1994;14(4):237-47.
53. Lamy T, Moignet A, Loughran TP. LGL leukemia: from pathogenesis to treatment. *Blood.* 2 mars 2017;129(9):1082-94.
54. Hodges E, Krishna MT, Pickard C, Smith JL. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *J Clin Pathol.* janv 2003;56(1):1-11.
55. Singleton TP, Yin B, Teferra A, Mao JZ. Spectrum of Clonal Large Granular Lymphocytes (LGLs) of  $\alpha\beta$  T Cells: T-Cell Clones of Undetermined Significance, T-Cell LGL Leukemias, and T-Cell Immunoclonal. *Am J Clin Pathol.* juill 2015;144(1):137-44.

56. Geng S, Weng J, Du X, Lai P, Huang X, Chen S, et al. Comparison of the distribution and clonal expansion features of the T-cell  $\gamma\delta$  repertoire in myelodysplastic syndrome-RAEB and RAEB with progression to AML. *DNA Cell Biol.* oct 2012;31(10):1563-70.
57. Abbas HA, Reville PK, Jiang X, Yang H, Reuben A, Im JS, et al. Response to Hypomethylating Agents in Myelodysplastic Syndrome Is Associated With Emergence of Novel TCR Clonotypes. *Front Immunol.* 2021;12:659625.
58. Epling-Burnette PK, Painter JS, Rollison DE, Ku E, Vendron D, Widen R, et al. Prevalence and clinical association of clonal T-cell expansions in Myelodysplastic Syndrome. *Leukemia.* avr 2007;21(4):659-67.
59. Rapanotti MC, Caruso R, Ammatuna E, Zaza S, Trotta L, Divona M, et al. Molecular characterization of paediatric idiopathic hypereosinophilia. *Br J Haematol.* déc 2010;151(5):440-6.
60. Hu Z, Wang W, Thakral B, Chen Z, Estrov Z, Bueso-Ramos CE, et al. Lymphocytic variant of hypereosinophilic syndrome: A report of seven cases from a single institution. *Cytometry B Clin Cytom.* mai 2021;100(3):352-60.
61. Roufosse F, Schandené L, Sibille C, Willard-Gallo K, Kennes B, Efir A, et al. Clonal Th2 lymphocytes in patients with the idiopathic hypereosinophilic syndrome. *Br J Haematol.* juin 2000;109(3):540-8.
62. González Delgado P, de la Sen Fernández ML, Soriano Gomis V, Pérez Crespo M, Muñoz Ruiz C, Hernández Niveiro E. Cyclical hypereosinophilia with skin manifestations and a clonal T cell population. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2008;18(5):401-3.
63. Abisror N, Mekinian A, Dechartres A, Groh M, Berezne A, Noel N, et al. Abnormal T-cell phenotype in episodic angioedema with hypereosinophilia (Gleich's syndrome): frequency, clinical implication and prognosis. *J Am Acad Dermatol.* 6 févr 2019;S0190-9622(19)30196-3.
64. Lefèvre G, Copin M-C, Staumont-Sallé D, Avenel-Audran M, Aubert H, Taieb A, et al. The lymphoid variant of hypereosinophilic syndrome: study of 21 patients with CD3-CD4+ aberrant T-cell phenotype. *Medicine (Baltimore).* oct 2014;93(17):255-66.
65. Lefèvre G, Copin M-C, Roumier C, Aubert H, Avenel-Audran M, Grardel N, et al. CD3-CD4+ lymphoid variant of hypereosinophilic syndrome: nodal and extranodal histopathological and immunophenotypic features of a peripheral indolent clonal T-cell lymphoproliferative disorder. *Haematologica.* août 2015;100(8):1086-95.
66. Carpentier C, Verbanck S, Schandené L, Heimann P, Trépant A-L, Cogan E, et al. Eosinophilia Associated With CD3-CD4+ T Cells: Characterization and Outcome of a Single-Center Cohort of 26 Patients. *Front Immunol.* 2020;11:1765.
67. Janson CH, Grunewald J, Osterborg A, DerSimonian H, Brenner MB, Mellstedt H, et al. Predominant T cell receptor V gene usage in patients with abnormal clones of B cells. *Blood.* 15 avr 1991;77(8):1776-80.
68. Wen T, Mellstedt H, Jondal M. Presence of clonal T cell populations in chronic B lymphocytic leukemia and smoldering myeloma. *J Exp Med.* 1 mars 1990;171(3):659-66.



69. Ma Y, Lei H, Tan J, Xuan L, Wu X, Liu Q. Characterization of  $\gamma\delta$  regulatory T cells from peripheral blood in patients with multiple myeloma. *Biochem Biophys Res Commun*. 25 nov 2016;480(4):594-601.
70. Soliman D, Sallam S, Akiki S, Mudawi D, Ibrahim F. T-Cell Large Granular Lymphocytic Leukemia with Extremely Rare Immunophenotype (CD4/CD8 Double-Positive) Followed by Multiple Myeloma Diagnosis. *Case Rep Hematol*. 2020;2020:8839144.
71. Carbone A, De Re V, Gloghini A, Volpe R, Tavian M, Tirelli U, et al. Immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and in situ immunophenotyping in lymphoproliferative disorders. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1989;414(3):223-30.
72. Dadi S, Le Noir S, Asnafi V, Beldjord K, Macintyre EA. Normal and pathological V(D)J recombination: contribution to the understanding of human lymphoid malignancies. *Adv Exp Med Biol*. 2009;650:180-94.
73. Alatrakchi N, Farace F, Frau E, Carde P, Munck JN, Triebel F. T-cell clonal expansion in patients with B-cell lymphoproliferative disorders. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. sept 1998;21(5):363-70.
74. Thériault C, Galoin S, Valmary S, Selves J, Lamant L, Roda D, et al. PCR analysis of immunoglobulin heavy chain (IgH) and TcR-gamma chain gene rearrangements in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. déc 2000;13(12):1269-79.
75. Wang L, Xu M, Wang C, Zhu L, Hu J, Chen S, et al. The feature of distribution and clonality of TCR  $\gamma/\delta$  subfamilies T cells in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunol Res*. 2014;2014:241246.
76. Wolf SN, Haddow J, Greiller C, Taylor GP, Cook LBM, Rowan AG. Quantification of T cell clonality in human T cell leukaemia virus type-1 carriers can detect the development of adult T cell leukaemia early. *Blood Cancer J*. 26 mars 2021;11(3):66.
77. Imaizumi Y, Iwanaga M, Tsukasaki K, Hata T, Tomonaga M, Ikeda S. Natural course of HTLV-1 carriers with monoclonal proliferation of T lymphocytes (« pre-ATL ») in a 20-year follow-up study. *Blood*. 15 janv 2005;105(2):903-4.
78. Ramesh M, Hamm D, Simchoni N, Cunningham-Rundles C. Clonal and constricted T cell repertoire in Common Variable Immune Deficiency. *Clin Immunol Orlando Fla*. mai 2017;178:1-9.
79. Wong GK, Millar D, Penny S, Heather JM, Mistry P, Buettner N, et al. Accelerated Loss of TCR Repertoire Diversity in Common Variable Immunodeficiency. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1 sept 2016;197(5):1642-9.
80. Brooks EG, Filipovich AH, Padgett JW, Mamlock R, Goldblum RM. T-cell receptor analysis in Omenn's syndrome: evidence for defects in gene rearrangement and assembly. *Blood*. 1 janv 1999;93(1):242-50.
81. Rieux-Laucat F, Bahadoran P, Brousse N, Selz F, Fischer A, Le Deist F, et al. Highly restricted human T cell repertoire in peripheral blood and tissue-infiltrating lymphocytes in Omenn's syndrome. *J Clin Invest*. 15 juill 1998;102(2):312-21.

82. Yu X, Almeida JR, Darko S, van der Burg M, DeRavin SS, Malech H, et al. Human syndromes of immunodeficiency and dysregulation are characterized by distinct defects in T-cell receptor repertoire development. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2014;133(4):1109-15.
83. Narducci MG, Virgilio L, Isobe M, Stoppacciaro A, Elli R, Fiorilli M, et al. TCL1 oncogene activation in preleukemic T cells from a case of ataxia-telangiectasia. *Blood.* 15 sept 1995;86(6):2358-64.
84. Kraus M, Lev A, Simon AJ, Levran I, Nissenkorn A, Levi YB, et al. Disturbed B and T cell homeostasis and neogenesis in patients with ataxia telangiectasia. *J Clin Immunol.* juill 2014;34(5):561-72.
85. Gualdi G, Lorenzi L, Arisi M, Maffei M, Soresina A, Marocolo D, et al. Acral lympho-histiocytic dermatitis in X-linked agammaglobulinemia: a case report showing clonal CD8(+) T cells with indolent clinical behaviour. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* mars 2016;30(3):461-3.
86. Wu J, Liu D, Tu W, Song W, Zhao X. T-cell receptor diversity is selectively skewed in T-cell populations of patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* janv 2015;135(1):209-16.
87. Maini MK, Casorati G, Dellabona P, Wack A, Beverley PC. T-cell clonality in immune responses. *Immunol Today.* 1 juin 1999;20(6):262-6.
88. Kharbanda M, McCloskey TW, Pahwa R, Sun M, Pahwa S. Alterations in T-cell receptor Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Diagn Lab Immunol.* janv 2003;10(1):53-8.
89. Killian MS, Monteiro J, Matud J, Hultin LE, Hausner MA, Yang OO, et al. Persistent alterations in the T-cell repertoires of HIV-1-infected and at-risk uninfected men. *AIDS Lond Engl.* 23 janv 2004;18(2):161-70.
90. McFarland EJ, Harding PA, Striebich CC, MaWhinney S, Kuritzkes DR, Kotzin BL. Clonal CD8+ T cell expansions in peripheral blood from human immunodeficiency virus type 1-infected children. *J Infect Dis.* 15 août 2002;186(4):477-85.
91. Basu D, Williams FM, Ahn CW, Reveille JD. Changing spectrum of the diffuse infiltrative lymphocytosis syndrome. *Arthritis Rheum.* 15 juin 2006;55(3):466-72.
92. Smith PR, Cavenagh JD, Milne T, Howe D, Wilkes SJ, Sinnott P, et al. Benign monoclonal expansion of CD8+ lymphocytes in HIV infection. *J Clin Pathol.* mars 2000;53(3):177-81.
93. Rose A, Isenalumhe L, Van den Bergh M, Sokol L. Clonal T-cell Large Granular Lymphocytic Disorders Manifesting in Patients with HIV-1 Infection: Case Series and Review of the Literature. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2018;10(1):e2018036.
94. Ohga S, Kimura N, Takada H, Nagano M, Ohshima K, Nomura A, et al. Restricted diversification of T-cells in chronic active Epstein-Barr virus infection: potential inclination to T-lymphoproliferative disease. *Am J Hematol.* mai 1999;61(1):26-33.
95. Maini MK, Gudgeon N, Wedderburn LR, Rickinson AB, Beverley PC. Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 nov 2000;165(10):5729-37.

96. Silins SL, Cross SM, Krauer KG, Moss DJ, Schmidt CW, Misko IS. A functional link for major TCR expansions in healthy adults caused by persistent Epstein-Barr virus infection. *J Clin Invest.* 15 oct 1998;102(8):1551-8.
97. Clambey ET, Kappler JW, Marrack P. CD8 T cell clonal expansions & aging: a heterogeneous phenomenon with a common outcome. *Exp Gerontol.* mai 2007;42(5):407-11.
98. Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, et al. Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 août 2002;169(4):1984-92.
99. Lindau P, Mukherjee R, Gutschow MV, Vignali M, Warren EH, Riddell SR, et al. Cytomegalovirus Exposure in the Elderly Does Not Reduce CD8 T Cell Repertoire Diversity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 janv 2019;202(2):476-83.
100. Xiong Y, Tan Y, Song YG. Analysis of T Cell Receptor V $\beta$  Diversity in Peripheral CD4+ and CD8+ T Lymphocytes Obtained From Patients With Chronic Severe Hepatitis B. *Hepat Mon.* févr 2014;14(2):e15900.
101. Yang J, He J, Lu H, Wei L, Li S, Wang B, et al. Molecular features of the complementarity determining region 3 motif of the T cell population and subsets in the blood of patients with chronic severe hepatitis B. *J Transl Med.* 8 déc 2011;9:210.
102. Sing GK, Li D, Chen X, Macnaughton T, Lichanska AM, Butterworth L, et al. A molecular comparison of T lymphocyte populations infiltrating the liver and circulating in the blood of patients with chronic hepatitis B: evidence for antigen-driven selection of a public complementarity-determining region 3 (CDR3) motif. *Hepatol Baltim Md.* mai 2001;33(5):1288-98.
103. Ravens S, Hengst J, Schlapphoff V, Deterding K, Dhingra A, Schultze-Florey C, et al. Human  $\gamma\delta$  T Cell Receptor Repertoires in Peripheral Blood Remain Stable Despite Clearance of Persistent Hepatitis C Virus Infection by Direct-Acting Antiviral Drug Therapy. *Front Immunol.* 2018;9:510.
104. Miles JJ, Thammanichanond D, Moneer S, Nivarthi UK, Kjer-Nielsen L, Tracy SL, et al. Antigen-driven patterns of TCR bias are shared across diverse outcomes of human hepatitis C virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 janv 2011;186(2):901-12.
105. Giuggio VM, Bonkovsky HL, Rothman AL. Evolution of the intrahepatic T cell repertoire during chronic hepatitis C virus infection. *Viral Immunol.* 2005;18(1):179-89.

## ABSTRACT

Introduction : Le réarrangement TCR permet de détecter la clonalité T dans les prélèvements étudiés (sang, moelle, biopsies). C'est un outil d'aide au diagnostic des hémopathies lymphoïdes dans des cas de caractérisation anatomo-pathologique litigieux et cet examen permet également de pouvoir suivre la maladie résiduelle chez des malades traités pour hémopathies. La recherche de réarrangement TCR est prescrite dans le service de Médecine Interne du CHU de Rouen dans des cas de suspicions d'hémopathie mais son impact sur la prise en charge des malades n'a pas été évalué à ce jour.

Objectifs : Notre objectif en réalisant cette étude a été d'évaluer les pratiques quant à la prescription des réarrangements TCR dans la population de Médecine Interne et évaluer l'impact de cet examen sur la prise en charge des patients. Nous avons notamment cherché à évaluer l'impact d'un TCR sanguin positif sur le diagnostic d'hémopathie lymphoïde et l'impact d'un TCR sanguin négatif sur l'exclusion d'un tel diagnostic.

Matériel et méthodes : Etude rétrospective qui concerne les patients pour lesquels un réarrangement TCR a été demandé alors qu'ils étaient sous la responsabilité médicale d'un praticien de Médecine interne entre 2017 et 2020. Tous les patients ayant eu au moins un réarrangement TCR (sang, moelle, biopsie) ont été inclus, soit 101 patients. Les données ont été analysées par comparaison des groupes TCR+ (présence d'un réarrangement) et TCR- (absence de réarrangement) avec une attention particulière concernant les TCR sanguins. Les statistiques ont été réalisées par un test de Chi-deux ou test de Fischer en fonction des effectifs.

Résultats : Nous avons retrouvés une différence significative concernant nos groupes TCR+ et TCR- pour les paramètres tels que la présence d'une thrombopénie, la présence d'anomalie de l'immunophénotypage, la présence d'adénopathies au scanner et le diagnostic d'hémopathie lymphoïde. L'ensemble de ces différences retrouvaient un nombre plus important de patients dans le groupe TCR+. L'analyse de l'impact du TCR sang dans la prise en charge des patients a permis de retrouver une différence significative entre les groupes TCR+ et TCR- concernant le diagnostic des hémopathies lymphoïdes avec une valeur prédictive positive du TCR+ de 28% et une valeur prédictive négative du TCR- de 89%.

Conclusion : La recherche de réarrangement TCR sanguin dans la population de Médecine Interne présente une VPP médiocre et une VPN forte ; cet examen pourrait avoir un intérêt pour exclure un diagnostic d'hémopathie lymphoïde chez des patients qui ne présentent une forte suspicion clinique d'hémopathie.

Mots clés : clonalité TCR ; hémopathies lymphoïdes ; réarrangement TCR ; clonalité T