

2m11.2555.3

Université de Montréal

Quantification de cellules de lymphome non-Hodgkinien par une
méthode de PCR compétitive

par
Brigitte Léonard
Département d'hématologie-immunologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences biomédicales (M.sc.)

10 juin, 1997

© Brigitte Léonard, 1997



W
4
U58
1998
V.001

L'Université de Montréal

Qualification de celles de graphisme non-étudiants par une
méthode de L'IK comparative

par
Brigitte Lévesque
Département d'immunologie-immunologie
Faculté de médecine

Présenté devant la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en sciences biomédicales (M.Sc.)

10 juin 1997

Dr. Brigitte Lévesque, 1997



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Quantification de cellules de lymphome non-Hodgkinien
par une méthode de PCR compétitive

Présenté par:
Brigitte Léonard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président rapporteur:
Dr Pierre Laneuville

Membre du jury
Dr Edouard Kouassi

Directeur de recherche
Dr Denis-Claude Roy

Mémoire accepté le:.....17.11.1997.....

Sommaire

Afin d'augmenter l'efficacité de la chimiothérapie et de contrer le phénomène de rechute observé chez les patients atteints de lymphome non-Hodgkinien (LNH), de nouvelles voies thérapeutiques telles que les greffes de moelle osseuse (GMO) et de cellules souches périphériques (GCSP) ont été explorées. Grâce au développement de technologies aussi sensibles que la cytométrie en flux, l'expansion cellulaire *in vitro* et l'amplification élective (PCR), il a été démontré que les greffons étaient contaminés par les cellules néoplasiques lors des autogreffes.¹ Or, des études de marquage génique semblent démontrer que les cellules néoplasiques provenant du greffon sont, bel et bien, impliquées dans la rechute.^{2,3}

Aujourd'hui, les cliniciens s'intéressent davantage aux GCSP qu'aux GMO, car les prélèvements en périphérie s'effectuent avec plus d'aisance et la prise du greffon est plus rapide diminuant ainsi les complications post-opératoires.^{4,5} De plus, certaines études suggèrent que les taux d'infiltration de cellules lymphomateuses seraient inférieurs dans les greffons de cellules souches périphériques (CSP) que dans la MO.^{6,7} Cependant, cette hypothèse n'est pas appuyée par plusieurs études moléculaires qui démontrent que les taux d'infiltration du sang et de la MO sont similaires.⁸⁻¹⁰ D'ailleurs, les traitements de mobilisation nécessaires à l'exportation massive des cellules souches en périphérie pourraient, par le fait même, permettre la mobilisation des cellules lymphomateuses en périphérie. Ce dernier point n'a pas été évalué précisément.

Nous avons développé une méthode de PCR nichée compétitive (nQC-PCR) afin de mesurer le nombre de cellules ayant la translocation t(14;18). Cette translocation est présente chez plus de 50% des patients atteints de LNH et, plus spécifiquement, dans les cas de lymphome folliculaire (LF). Quatre

contrôles internes (C.I.) ont été générés en clonant dans des vecteurs pSK(+) des amplicons provenant de l'ADN ganglionnaire de patients présentant une des deux formes principales de cette translocation : MBR et mcr. Des études de cinétique d'amplification ont démontré que les conditions de PCR dans lesquelles nous oeuvrons ne sont pas saturantes et que les C.I. se comportent de façon similaire à l'ADN génomique des cellules RL (lignée cellulaire caractérisée par la t(14;18)). Des essais de compétition démontrent une excellente corrélation entre le nombre prédit et le nombre réel de cellules tumorales contenues dans un échantillon ($R=0.991$).

À l'aide de la méthode de nQC-PCR, nous avons effectué des analyses quantitatives sur des échantillons de MO, de sang et de sang mobilisé à l'aide du G-CSF et de la chimiothérapie. Cette étude a permis d'observer que les taux d'infiltration des échantillons de MO et de sang mobilisé sont similaires, alors que l'infiltration du sang qui est significativement plus faible que celle de la MO. Ainsi, les traitements administrés aux patients semblent induire la mobilisation des cellules lymphomateuses. Contrairement à la GMO, les GCSP permettent un prélèvement facile et une prise du greffon plus rapide. Cependant, comme plus de cellules sont habituellement infusées avec les greffons de CSP que ceux de MO, les greffons de CSP ont probablement un plus haut niveau d'infiltration par des cellules lymphomateuses. Cette étude souligne l'importance d'une évaluation étroite des risques de rechute chez les patients recevant des greffons de CSP versus de MO. De plus, elle indique le besoin de développer des méthodes pour purger les cellules lymphomateuses des greffons de cellules souches.

Ainsi, grâce à sa rapidité, sa sensibilité et sa grande précision, la méthode de nQC-PCR se révèle un outil exceptionnel dans l'analyse comparative des taux d'infiltration des échantillons de sang, de MO et de CSP de divers patients. De plus, elle permet d'évaluer précocément l'efficacité *in vivo* de nouveaux protocoles de traitement.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire	III
Liste des tableaux	VII
Liste des figures.....	VIII
Liste des sigles et des abréviations.....	IX
Avant-propos	X
1. Introduction.....	11
1.1 Les lymphomes non-Hodgkiniens.....	11
1.1.1. Épidémiologie.....	11
1.1.2. Classification	12
1.1.3. Traitements.....	17
1.1.3.1. Les greffes de MO.....	18
1.1.3.2. Les greffes de cellules souches périphériques	25
1.2. Les translocations impliquées dans les lymphomes	28
1.2.2. Le rôle de la t(14;18) dans le développement de la maladie.....	31
1.3. BCL-2.....	34
1.3.1 BCL-2 : structure et fonction.....	34
1.3.1. BCL-2 serait un inhibiteur de l'apoptose.....	35
1.3.2. BCL-2 serait un promoteur de la résistance cellulaire.....	36
1.4. La technologie au service de la recherche clinique.....	36
1.4.1. La cinétique d'une réaction de PCR	37
1.4.2. Diverses stratégies de PCR quantitative.....	40
2. Méthodologie et résultats.....	46
2.1. Lymphoma cell burden in progenitor cell grafts measured by competitive PCR: Less than one log differences between bone marrow and peripheral blood sources.....	46
3. Discussion	75

3.1. Développement de la PCR compétitive nichée (nQC-PCR)	75
3.1.1. Construction du contrôle interne (CI).....	75
3.1.2. L'analyse de cinétique.....	77
3.1.3. Étude de coamplification.....	78
3.1.4. Les analyses de reproductibilité.....	78
3.2. Analyse des patients atteints de LNH éligibles à la GCSP.....	82
3.2.1. Quantification des cellules ayant la t(14;18) dans le sang et la MO	82
3.2.2. Comparaison des greffons de MO et de CSP	83
3.2.3. Signification biologique de la MMR et son rôle lors de la récurrence	84
4. Conclusion.....	86
5. Remerciements	87
6. Bibliographie	88

Liste des tableaux*Tableau I:*

Listes des néoplasies reconnues dans la formulation REAL et celle de 1982..... 15

Tableau II:

Listes de quelques agents utilisés pour la purge médullaire 22

Tableau III:

Représentation de diverses translocations 29

Liste des figures

Figure 1:	
<i>Courbe de survie pour chaque groupe de LNH</i>	<i>13</i>
Figure 2:	
<i>Protocole de greffe de MO pour les patients atteints de lymphome ..</i>	<i>20</i>
Figure 3:	
<i>Procédure de la greffe de cellules souches périphériques effectué à l'hôpital Maisonneuve-Rosemont</i>	<i>26</i>
Figure 4:	
<i>Schématisation de la formation de la t(14;18).</i>	<i>32</i>
Figure 5:	
<i>Schématisation du principe de la PCR nichée</i>	<i>38</i>
Figure 6:	
<i>Schématisation de la nSQ-PCR</i>	<i>41</i>
Figure 7:	
<i>Analyse de la variabilité induite par l'utilisation de substrats de migration différents.....</i>	<i>80</i>

Liste des sigles et des abréviations

aa	acides aminés
Ac	anticorps
Ag	antigène
an	acides nucléiques
amplicon	produit de la réaction de PCR
C.I.	contrôle interne
CICs	Chlorure de césium
CSP	cellules souches périphériques
CMV	cytomégalo virus
GCSP	greffe de cellules souches périphériques
G-CSF	Facteur de croissance pour les colonies granulocytaires
GMO	greffe de moelle osseuse
HMR	Hôpital Maisonneuve-Rosemont
Kb	mille (kilo) paires de base
Kd	Kilodalton
LF	lymphome folliculaire
LNH	lymphome non-Hodgkinien
MCP	mort cellulaire programmée
MMR	maladie minimale résiduelle
MO	moelle osseuse
nQC-PCR	PCR compétitive nichée
nSQ-PCR	PCR semi-quantitative nichée
pb	paire de bases
PCR	amplification élective (« polymerase chain reaction »)
PCR nichée	«nested PCR»
RT-PCR	«reverse transcriptase» - PCR
SOR	système d'oxydoréduction
SNC	système nerveux central
SSM	survie sans maladie («disease free survival»)
t(14;18)	translocation du chromosome 14 et 18
VIH	virus de l'immuno-déficience humain

Avant-propos

La méthode de PCR offre des avantages marqués sur les techniques usuelles de diagnostic tels que sa rapidité, sa sensibilité et sa spécificité. Cette approche nous permet de détecter une cellule transloquée parmi un million de cellules normales soit 0.0001%; alors que le seuil de sensibilité des techniques de "Southern blot" est de l'ordre de 1%. Plus de 50% des patients atteints de LNH présentent la translocation t(14;18), c'est pourquoi nous l'avons choisi comme marqueur.

Le développement d'une méthodologie permettant d'effectuer le suivi quantitatif de la population de cellules malignes avant, durant et après les traitements pourrait s'avérer très utile afin de répondre à certaines questions cruciales. De plus, l'avènement de la GMO autologue et de la GCSP pour traiter les patients soulèvent, elles aussi, beaucoup de questions et de controverses. Le sang est-il une meilleure source de cellules souches hématopoïétiques que la MO? Les traitements de mobilisation ont-ils un effet sur le passage des cellules de LNH en périphérie? Les greffons de CSP sont-ils contaminés par les cellules lymphomateuses? Si oui, ces cellules sont-elles capables d'induire les rechutes? Plusieurs techniques de purge sont disponibles afin de diminuer la charge de cellules néoplasiques dans les greffons de MO, est-il possible de les appliquer pour le traitement des greffons de CSP?

Ce sont quelques-unes des questions qui ont motivé notre équipe à mettre au point une technique de PCR quantitative qui fait l'objet, aujourd'hui, de ce mémoire de maîtrise.

1. Introduction

1.1 Les lymphomes non-Hodgkiniens

1.1.1. Épidémiologie

Les lymphomes non-Hodgkinien (LNH) regroupent, de façon hétéroclite, près d'une douzaine de néoplasies lymphocytaires d'origine T ou B.¹¹ Ils ont un patron histologique, des comportements cliniques et un pronostic disparates. Il y a des formes plus indolentes telles que les lymphomes folliculaires où les personnes peuvent avoir une espérance de vie de 10 à 20 ans. Cependant, il y a des formes plus agressives telles que les lymphomes de Burkitt où les gens survivent moins d'un an. Les meilleures indications cliniques pour déterminer la biopathologie et le pronostic sont l'origine cellulaire et le patron de croissance dans les ganglions lymphatiques. La plupart des LNH proviennent d'un tissu lymphoïde et les cellules malignes ont déjà infiltré les ganglions lymphatiques, la MO et le sang lors de l'apparition des signes cliniques.

Une étude américaine de 1992 révélait que l'incidence des LNH et la mortalité reliée à cette maladie avaient augmenté de 60% au cours des années de 1973 à 1989.¹² Cette augmentation est similaire à celle des taux de cancer du poumon et de la peau. Elle semble atteindre davantage les hommes que les femmes, les blancs que les noirs et sa fréquence augmente avec l'âge.¹³ En 1995, des études américaines estimaient que 50 000 personnes ont été diagnostiquées et que 20 000 en sont mortes. Il a été proposé que cette hausse soit due aux infections par le VIH.¹⁴ Cependant, l'augmentation de la fréquence de nouveaux cas chez les individus d'âges murs (65 ans et plus) séronégatifs est importante et de cause inconnue.¹²

1.1.2. Classification

Plusieurs systèmes de classification de LNH ont été proposés, la plupart d'entre eux reposaient sur des principes physiopathologiques variés. En 1982, une formulation clinique a été établie à partir d'une étude basée sur 1175 cas.¹⁵ Cette formulation tient compte des systèmes de classification antérieurs tel que celui de Dorfman, Kiel, Luke-Collins, Rappaport et WHO. Même si la classification de Kiel révisée est fréquemment utilisée en Europe, la formulation établie en 1982 semble la plus citée et utilisée en Amérique.¹⁶ Elle comprend plusieurs niveaux de classification. Le premier niveau est basé sur le pronostic du patient, il y a trois stades: les lymphomes de bas grade (25 à 35% des cas), de grade intermédiaire et de haut grade (Figure 1). Le second est basé sur le patron architectural de l'infiltration: folliculaire ou diffus. La forme des inclusions et la morphologie cellulaire constituent le troisième niveau de classification. Ceci ramène à dix, les formes principales de lymphome chacune symbolisée par une lettre alphabétique (Tableau I).

En 1994, le groupe international d'étude des lymphomes a proposé une nouvelle formule de classification qui corrigerait certaines faiblesses des autres formulations: REAL pour «Revised European-American classification of Lymphoid neoplasms» (Tableau II). Cette formule tente de distinguer certains types de lymphome en utilisant conjointement des données morphologiques, immunophénotypiques et génétiques.¹⁷ L'analyse de certaines lésions chromosomiques peuvent servir de complément lors du diagnostic histologique, fournir un outil pronostic et permettre l'évaluation de la maladie minimale résiduelle (MMR) à l'aide de techniques moléculaires hautement sensibles et spécifiques. Ainsi, des lésions incriminant des oncogènes tels que bcl-1, bcl-2, bcl-6 et c-myc seraient les marqueurs des leucémies lymphoïdes chroniques, de lymphomes folliculaires, diffus à larges cellules et de Burkitt.¹⁸ D'ailleurs, une étude a démontré que les taux de

Figure 1: Courbe de survie pour chaque groupe de LNH

Courbe de survie actuarielle pour les dix sous-groupes (A) et pour les trois groupes majeurs (B) établis par le «Classification Non-Hodgkin's Lymphoma Project» en 1982. Il y a d'indiqué, entre parenthèse, le nombre de patients évalués pour chacun des dix sous-groupes représentés par une lettre alphabétique allant de A à J. Chaque sous-groupe est grossièrement décrit dans le tableau I. *Ceci est tiré d'une figure de l'article qui a paru dans Cancer, volume 49, page 2112, en 1982.*¹⁵

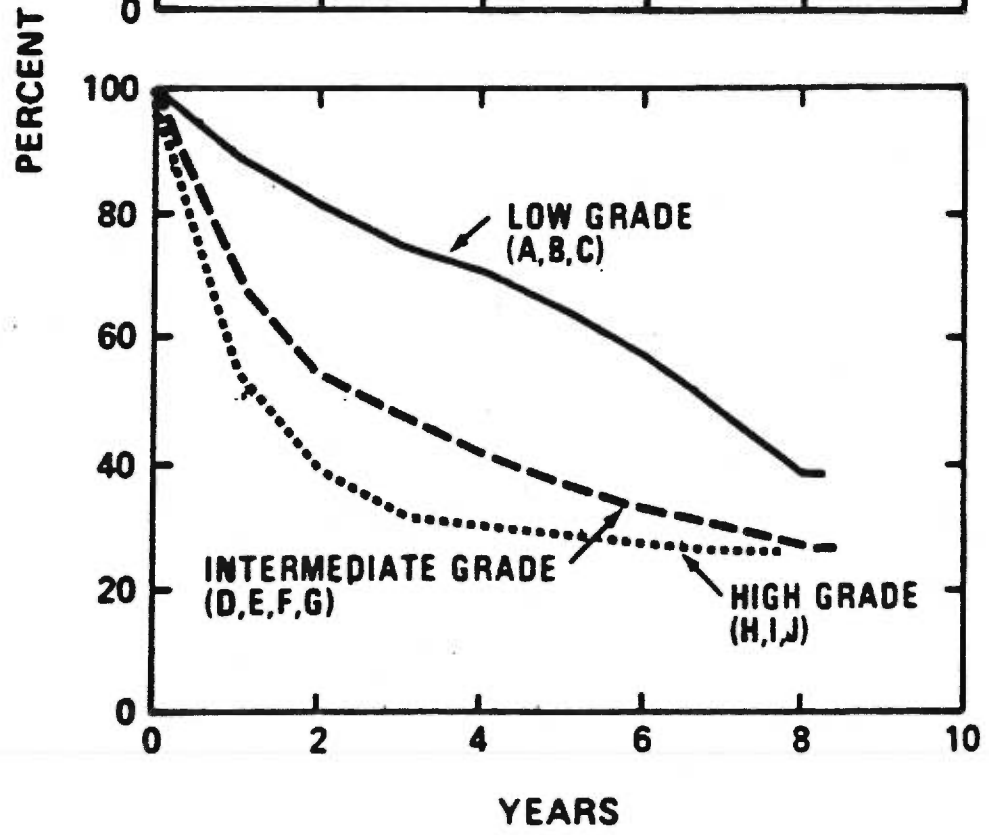
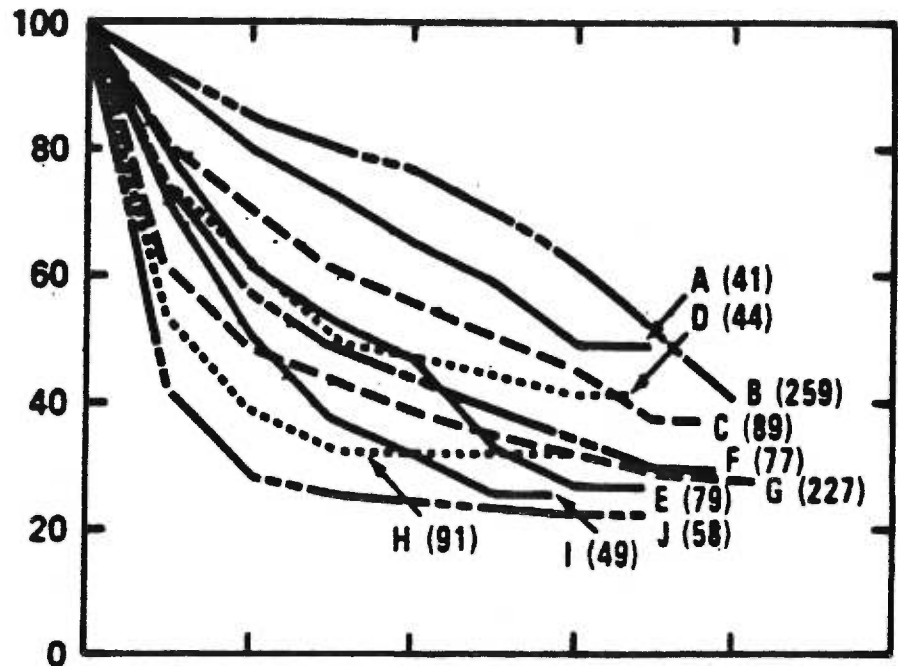


Tableau I:***Listes des néoplasies reconnues dans la formulation REAL et celle de 1982***

Cette figure regroupe deux systèmes de classification pour les LNH qui ont permis de simplifier et d'uniformiser le diagnostic. En 1982, une étude composée de 1145 fut présentée par le «Classification of Non-Hodgkin's Lymphomas Project». En 1994, la formulation REAL, présentée par le «International Lymphoma Study Group», tente de regrouper, en fonction de leur comportement, plus de néoplasies telles que les lymphomes Hodgkinien, les lymphomes T (périphériques, intestinaux,...) et certains lymphome B. *Ceci est inspiré d'une figure de des articles parus dans Blood, volume 84, aux pages 1361-1392 en 1994 et dans Cancer, volume 49, page 2112, en 1982.*^{15,17}

REAL FORMULATION***WORKING FORMULATION*****Indolent lymphomas**

B cell Chronic lymphocytique lymphoma
 small lymphocytic lymphoma
 Immunocytoma
 Follicular center lymphoma
 Follicular (grades 1 et 2)
 Marginal zone B-cell lymphoma
 Hairy cell leukemia
 Plasmacytoma and myeloma

T cell Large granular lymphocyte leukemia
 Adulte T-cell lymphoma or leukemia

Moderately aggressive lymphomas

B-cell prolymphocytique leukemia
 Mantle cell lymphoma
 Follicular center, Follicular grade III

T-cell prolymphocytique leukemia
 chronic lymphocytic leukemia
 Adult T-cell leukemia, lymphoma
 Angiocentric lymphoma
 Angio-immunoblastic lymphoma

Aggressive lymphomas

B-cell Diffus large lymphoma

T-cell Peripheral or Intestinal lymphoma
 Anaplastic large-cell lymphoma
 Adult lymphoma or leukemia

Highly aggressive lymphomas

B-cell Precursor lymphoblastic lymphoma,
 High-grade , Burkitt's lymphoma

T-cell Precursor lymphoblastic lymphoma

Hodgkin's disease

lymphocyte predominance, others

Low grade

A. **Small lymphocytic**
 consistent with CLL, plasmacytoid

B. **Follicular Predominantly small
 cleaved cell**
 diffus areas, sclerosis

C. **Follicular mixed, small cleaved and
 large cell**
 diffuse areas, sclerosis

Intermediate grade

D. **Follicular, predominantly large cell**
 diffuse areas, sclerosis

E. **Diffuse, mixed small cleaved cell**
 sclerosis

F. **Diffus, mixed small cleaved and large
 cell**
 sclerosis, epithelioid cell component

G. **diffuse large cell**
 cleaved cell, non cleaved cell, sclerosis

High grade

H. **Large cell, immunoblastic**
 plasmacytoid, clear cell, polymorphous
 epithelioid cell component

I. **Lymphoblastic**
 convoluted cell, nonconvoluted cell

J. **Small noncleaved cell**
 Burkitt's, follicular areas

survie sans maladie (SSM) sont meilleurs chez les patients qui ne surexpriment pas la protéine BCL-2.¹⁹ Désormais, l'application de la formulation REAL en clinique est acceptée.^{20,21}

Afin de mieux déterminer la gravité de chaque cas et de choisir les traitements adéquats, il faut analyser l'étendue de la maladie. Le système d'Ann Arbor développé pour les lymphomes Hodgkiniens permet d'incorporer le patron d'infiltration et les sites atteints au diagnostic.²² De plus, il est possible de tenir compte de divers critères qui semblent critiques pour le devenir du patient soit: l'âge, la réponse au traitement, un taux de LDH élevé, un stade avancé de la maladie et plus d'un site d'infiltration.^{20,23,24}

Le lymphome folliculaire (LF) est la forme qui nous intéresse plus particulièrement, car il est fréquemment associé à la translocation chromosomique t(14;18)(q32;q21).²⁵⁻²⁷ Ce type de lymphome est caractérisé par une prolifération nodulaire des lymphocytes B provenant des centres folliculaires du ganglion lymphatique.²⁸ Malgré le fait que les patients atteints de LF répondent bien à la chimiothérapie et à la radiothérapie, ce lymphome à un stade avancé semblent incurable et ce, indépendamment, de la présence de transformation histologique.²⁹ Ce phénomène s'expliquerait par l'incapacité des traitements actuels d'éliminer complètement les cellules malignes. Néanmoins, la période de SSM des patients atteints de lymphome folliculaire est relativement longue soit de 8 à 10 ans.³⁰

1.1.3. Traitements

Les lymphomes de bas grade sont réputés pour être les plus faciles à traiter. Néanmoins, ils peuvent présenter une réponse sous-optimale aux traitements conventionnels tels que le chlorambucil ou encore, d'une combinaison de cyclophosphamide, de vincristine et de prednisone (CVP).²⁹ Avec ce type de

thérapie, les taux de rémission sont de l'ordre de 80%. Cependant, le nombre de rechutes reste élevé et constant, ce qui n'améliore pas le temps de survie de ces patients.³⁰

Les taux de rémission et de survie des patients atteints de lymphome de grade intermédiaire sont meilleurs, lorsque les patients sont traités avec des combinaisons de chimiothérapie incluant la doxorubicine comme le traitement CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone).³⁰ Plusieurs combinaisons de chimiothérapie ont été développées et testées jusqu'à la phase clinique III. Malheureusement, aucune différence significative a été observée sur la SSM entre ces divers traitements.^{31,32}

Il est impératif de développer des thérapies plus puissantes, car un phénomène de résistance cellulaire peut s'installer dès les premiers traitements. Par exemple, dans les cas de LF, les taux de rémission complète passent de 80% , lors d'un premier traitement, à 28% suite à une première rechute.²³ Si les patients réagissent mal au premier traitement ou s'ils rechutent, ils sont automatiquement considérés comme étant à plus haut risque.

1.1.3.1. Les greffes de MO

Un nombre important de patients atteints de LNH échappent aux traitements conventionnels. En absence de rémission complète ou lors de la rechute, il est préférable d'administrer un traitement myéloablatif (hautes doses de chimiothérapie et de radiothérapie) et de procéder à la l'infusion de cellules souches allogéniques ou autologues. Comme les agents de chimiothérapie sont peu spécifiques, les doses maximales ont été établies en fonction de la sensibilité des cellules progénitrices de la MO. Or, l'augmentation de doses de chimiothérapie au-delà des limites habituellement tolérées par ces progéniteurs permettrait une meilleure élimination des cellules lymphomateuses.³³ Pour

bénéficier d'un tel avantage, il est nécessaire d'élaborer une stratégie afin d'épargner ces progéniteurs normaux; la greffe de cellules souches serait une telle alternative.³⁴

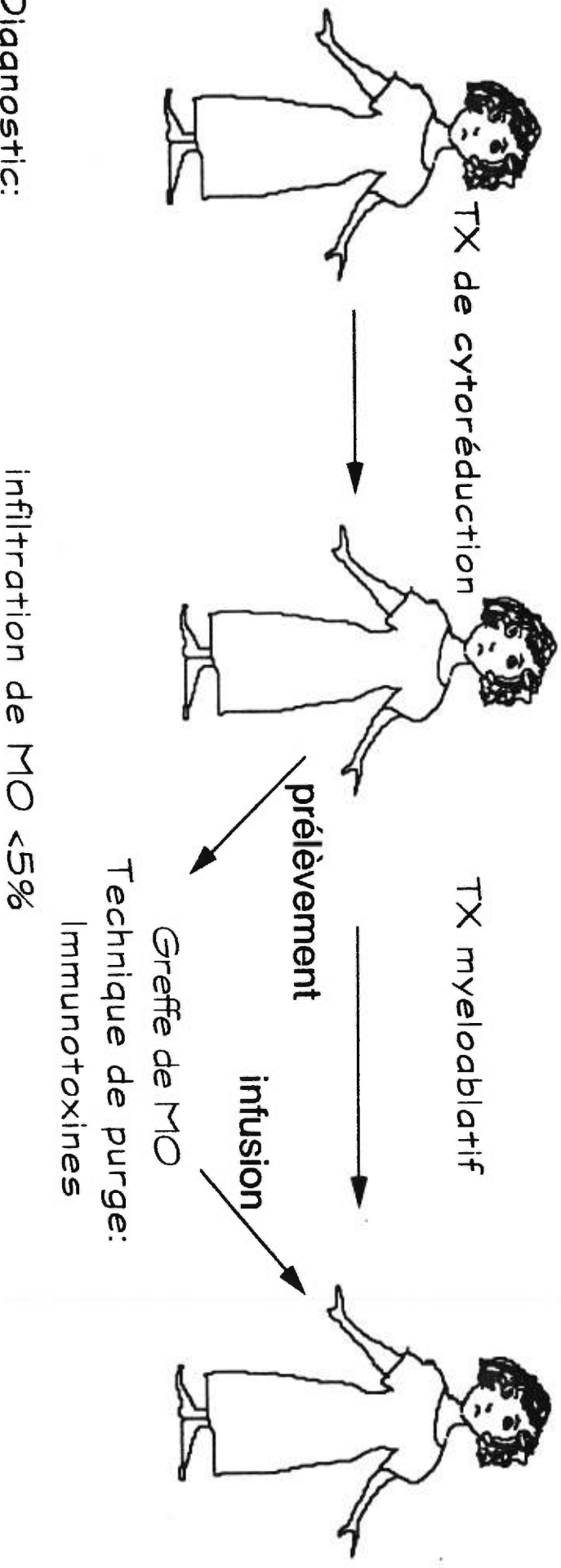
En effet, cette approche consiste à prélever des cellules souches hématopoïétiques du patient et à les congeler avant les traitements intensifs de radiothérapie et/ou de chimiothérapie. Ces doses permettraient d'éliminer plus de cellules malignes et contourneraient le phénomène de résistance cellulaire. Suite aux traitements myéloablatifs, les cellules souches hématopoïétiques conservées sont décongelées et infusées au patient afin d'assurer la reconstitution hématologique (figure 2).

Néanmoins, devant la montée de l'utilisation des GMO autologues, plusieurs questions ont été soulevées, car malgré l'administration des traitements de cytoréduction, il a été fréquemment démontré que les greffons de GMO autologues étaient infiltrés par les cellules lymphomateuses.^{1,7,35,36} De plus, des études récentes de marquage génique démontraient que les cellules malignes impliquées dans la rechute peuvent provenir du greffon.^{2,3} D'autres études indirectes viennent confirmer cette observation.^{35,37} Ces études justifient le développement de techniques de purge adéquates qui permettraient de pallier à ce problème.

Au fil des ans, plusieurs équipes ont développé des techniques de purge qui permettent d'éliminer *in vitro* la grande majorité de cellules contaminant les greffons, avant de les infuser. Ces procédures sont surtout basées sur l'action d'agents chimiques, biologiques ou immunologiques (Tableau II). De plus, elles doivent permettre l'élimination des cellules malignes tout en

Figure 2: Protocole de greffe de MO pour les patients atteints de lymphome

Transplantation autologue de moelle osseuse



Diagnostic:
LNH en rechute ou
réfractaire

Tableau II:

Listes de quelques agents utilisés pour la purge médullaire

méthodes	principe actif	sélection
biologiques	Culture in vitro	positive
immunologiques		
cellulaires	cellules T cytotoxiques	négative
	NK* ou LAK** (Interleukine-2)	négative
	Interféron γ	négative
Ac monoclonaux	conjugué aux toxines (ricine)	négative
	avec complément	négative
	séparation à l'aide de billes magnétiques	négative
	anti-CD34, thy-1	positive
chimiques	4-hydroperoxy-cyclophosphamide (4-HC)	négative
	mafosfamide	négative
	chimiothérapie avec du 4-HC	négative

*NK= natural killer cell

**LAK= lymphocyte activated killer

préservant les progéniteurs normaux qui amènent la reconstitution hématologique.³⁸

Les techniques de purge chimique impliquent des agents tel que des métabolites actifs de la cyclophosphamide, le mafosfamide et des agents phototoxiques tels que le BPD-MA.^{39,40} Les méthodes de purge biologiques consistent à maintenir le greffon en culture durant plusieurs semaines. Les cellules normales peuvent survivre à ce traitement mais non les cellules néoplasiques.⁴¹⁻⁴³

Suite à l'identification d'Ag de surface exprimés sur des cellules malignes, il a été possible de développer des techniques de purge immunologiques utilisant des Ac monoclonaux. Comme la majorité des Ac monoclonaux ne sont pas toxiques, l'élimination des cellules cibles implique l'utilisation soit de complément de lapin, de billes magnétiques, de colonnes d'immunoabsorption ou d'immunotoxines.⁴⁴⁻⁴⁶

L'infiltration de la MO par les cellules lymphomateuses reste un problème, car l'utilisation de techniques de purge ne fait pas l'unanimité: elles sont coûteuses, elles nécessitent l'emploi d'un personnel qualifié ainsi qu'une installation élaborée et qu'aucune étude clinique prospective randomisée n'a été effectuée pour évaluer le rôle de la purge médullaire.⁴⁷ En effet, la majorité des études cliniques ont été effectuées chez des patients atteints de leucémie aiguë et non de LNH. De plus, aucune étude n'a définitivement démontré qu'une thérapie agressive suivie d'une GMO permet de prolonger la survie des patients atteints de lymphome folliculaire.²⁰ Il est difficile d'évaluer la réussite d'un traitement pour cette néoplasie, car l'histoire du développement de la maladie nécessite des analyses à longue échéance (10 ans). Cependant, des études prospectives randomisées ont démontré qu'il

s'agit d'un traitement intéressant pour les patients atteints de LNH à haut risque de rechute.^{48,49}

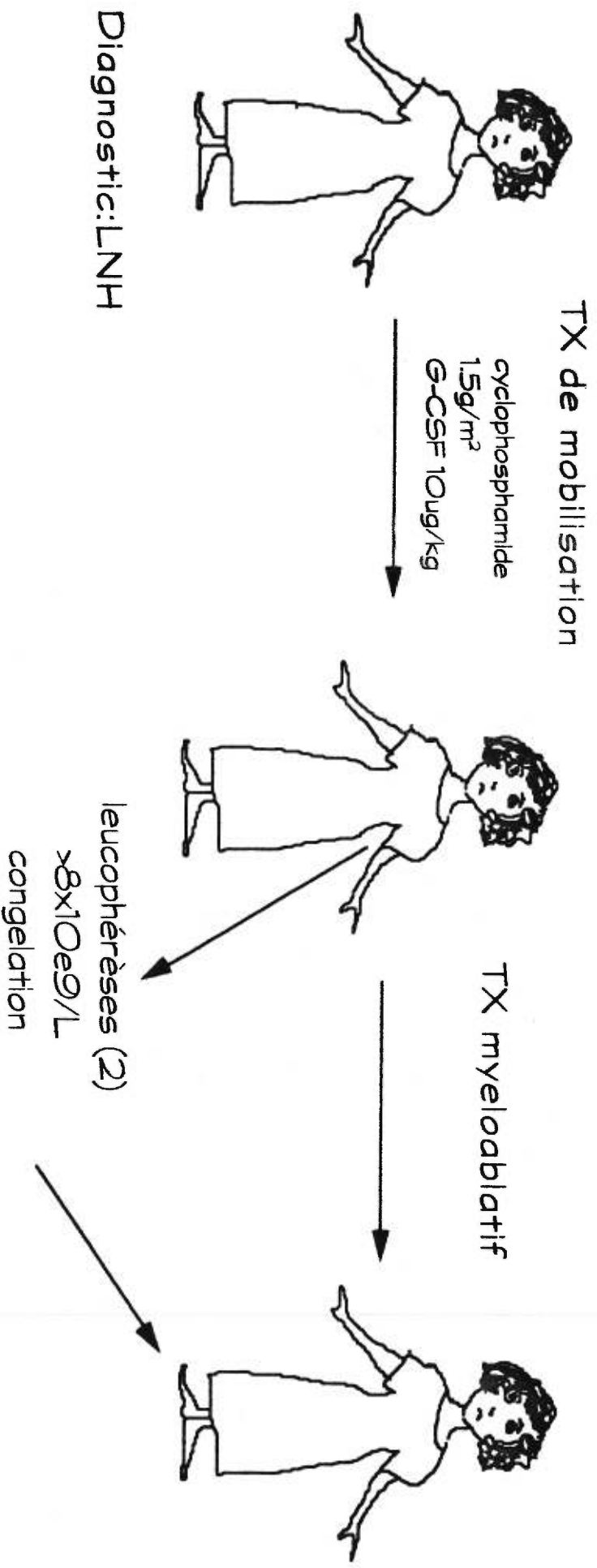
1.1.3.2. Les greffes de cellules souches périphériques

Quoique la GMO constitue une technologie accessible, la ponction de MO est une procédure chirurgicale. Depuis des années, des efforts ont été générés pour simplifier la cueillette de cellules hématopoïétiques normales.⁵⁰ Il est maintenant possible d'obtenir un nombre appréciable de cellules souches en périphérie (CSP) suite à l'administration de chimiothérapie et de facteur de croissance tel que le G-CSF (Figure 3).⁵¹⁻⁵³ Ainsi, les prélèvements sont plus rapides et faciles à exécuter. De plus, la greffe de CSP (GCSP) permet une prise du greffon plus rapide et aussi durable que la GMO, diminuant ainsi les problèmes d'infections et le temps d'hospitalisation.^{4,54}

Dans un deuxième temps, la GCSP permettrait d'éviter l'emploi de technique de purge, car elle jouirait d'un faible taux de contamination de cellules malignes. Cette supposition découle de certaines études qui affirment que le sang ou les prélèvements de CSP sont moins infiltrés que la MO.^{6,55} Néanmoins, plusieurs chercheurs se sont déjà prononcés en faveur de la purge des échantillons de CSP. En effet, des études effectuées sur diverses néoplasies ont démontré que les échantillons de CSP étaient infiltrés par les cellules malignes.⁵⁶⁻⁶⁰ De plus, une étude sur le cancer du sein révélait que les traitements de mobilisation semblent favoriser la mobilisation des cellules tumorales et que ce phénomène dépend du niveau d'infiltration de la MO.⁵⁸ Les études effectuées à ce sujet sont généralement qualitatives et peu d'entre elles concernent les LNH. Il est alors impératif de trouver une approche fiable pour entreprendre des analyses quantitatives sur les taux d'infiltration de divers sites hématologiques et la mobilisation des cellules lymphomateuses en périphérie. Dans un premier temps, il faudra déterminer quelle est

*Figure 3: Procédure de la greffe de cellules souches
périphériques effectué à l'hôpital Maisonneuve-Rosemont*

Transplantation autologue de cellules souches périphériques



l'importance de l'infiltration des greffons de patients atteints de LNH. Il faudra ensuite comparer les niveaux d'infiltration du sang et de la MO et analyser si les traitements de mobilisation influencent le passage des cellules lymphomateuses en périphérie.

1.2. Les translocations impliquées dans les lymphomes

Depuis une dizaine d'années, la compréhension des bases moléculaires de la pathologie de certains lymphomes et leucémies s'est grandement améliorée. Un nombre impressionnant de translocations ont été identifiées et caractérisées (Tableau III).⁶¹ Ces translocations ont permis d'isoler les oncogènes impliqués dans la genèse des lymphomes.⁶² L'avènement de puissantes techniques moléculaires tel que la PCR a permis l'exploitation accrue de ces translocations comme marqueurs génétiques pour les leucémies et les lymphomes.

1.2.1 La translocation (14;18): sa fréquence et sa structure

Ainsi, dans les lymphomes de type cellulaire B, l'exemple classique est l'activation d'un proto-oncogène cellulaire suite à sa juxtaposition au niveau du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (Ig H), sur le chromosome 14. Ainsi les t(8;14), t(11;14) et t(14;18) sont impliquées, respectivement, dans les lymphomes de Burkitt, leucémie lymphoïde chronique et les lymphomes folliculaires (LF).^{25,63}

La translocation réciproque entre les chromosomes 14 et 18 est l'aberration chromosomique la plus répandue chez les patients atteints de LNH de type B. Sa présence est prédominante (85%) dans les LF, mais plus de 30% des patients atteints de lymphome de type diffus la possèdent.^{63,64} En développant une méthode de diagnostic basée sur la détection de cette translocation, il est possible d'analyser plus de 50% des patients atteints de LNH.⁶⁴ De plus, des études démontraient qu'un certain pourcentage de patients souffrant de lymphome Hodgkinien présentaient aussi la t(14;18).^{65,66}

Tableau III:***Représentation de diverses translocations***

Représentation de quelques translocations identifiées dans les lymphomes et leucémies, et des proto-oncogènes activés par cette lésion. *Ce tableau est inspiré d'une revue de la littérature de Dr TH Rabbitts, qui a paru dans Nature, volume 372, aux pages 143 à 149, en 1994.*⁶¹

Pathologie	type de translocation	oncogène impliqué
LNH	t(3;14)(q27;q32)	bcl-6
	t(3;4)(q27;p11)	bcl-6
LF	t(14;18)(q32;q21)	bcl-2
lymphome B	t(8;14)(q24;q32)	c-myc
	t(2;8)(p12;q24)	c-myc
	t(8;22)(q24;q11)	c-myc
	t(10;14)(q24;q32)	lyt-10
LLC- B	t(8;12)(q24;q22)	c-myc
	t(14;19)(q32;q13.1)	bcl-3
LNH du manteau	t(11;14)(q13;q32)	bcl-1
LMC/LLA	t(9;22)(q34;q11)	bcr/abl
LMC	t(3;21)(q26;q22)	aml-1/evi-1

LLC leucémie lymphoïde chronique, LLC-B : leucémie lymphoïde chronique de type B, LMC :leucémie myeloïde chronique, LLA : leucémie lymphoïde aiguë, LPA : leucémie promyeloïde aiguë

Cette translocation juxtapose le proto-oncogène BCL-2 situé au niveau du segment chromosomique 18q21, et l'exon J6 du gène des Ig H sur le chromosome 14. Lorsqu'il y a une translocation, la région promotrice de BCL-2 est à plus de 200 kb de l'activateur du gène Ig H; ce phénomène entraîne une surexpression fonctionnelle de BCL-2.⁶⁷ Le point de cassure peut avoir lieu dans deux régions localisées à 20 kb l'une de l'autre (Figure 4). Celle que l'on nomme MBR pour «major breakpoint region» est impliquée dans plus de 75% des cas. Elle couvre une région de 150 pb située à l'intérieur de la région 3' non traduite du gène BCL-2.^{68,69} La deuxième région nommée mcr pour «minor cluster region» couvre une région de plus de 500 pb située toujours dans la partie 3' du gène.⁷⁰

Cette translocation résulterait d'une recombinaison illégitime entre le chromosomes 14 et 18 lors du réarrangement des régions génomiques V, D et J du gène des Ig H (Figure 4).⁷¹ Cet événement se produirait dans les précurseurs B de la MO, ou durant le changement d'isotype dans les centres folliculaires des ganglions lors d'une réaction immunitaire.^{71,72}

1.2.2. Le rôle de la t(14;18) dans le développement de la maladie

Il a été soulevé que la t(14;18) serait un événement précoce dans le développement de la maladie, car il est possible de la détecter dans des populations purifiées de cellules B d'individus normaux ou encore dans les hyperplasies folliculaires.^{73,74} L'acquisition d'aberrations chromosomiques supplémentaires serait nécessaire afin de permettre cette progression vers un lymphome de plus en plus agressif.^{75,76} Les propriétés biologiques de BCL-2 semblent corrélées avec les caractéristiques peu agressives des lymphomes folliculaires.

Figure 4: Schématisation de la formation de la t(14;18).

A) Mécanismes d'appariement

Cette figure démontre l'implication, lors de la formation de la translocation, des séquences sollicitées au cours de la recombinaison des segments V, D et J du gène Ig H sur le chromosome 14. Démonstration du processus normal de recombinaison génique nécessaire à l'obtention d'une chaîne lourde d'immunoglobuline fonctionnelle. La recombinase permet l'assemblage du gène Ig H par les complexes de recombinaison composés de séquences d'heptamère et de nonamère séparées par 12 ou 23 nucléotides, ces complexes sont flanqués des loci D et J. Les extrémités des gènes D et J sont modifiées sous l'action d'exonucléases et par l'addition de quelques nucléotides (1 à 20). Sur le chromosome 18, les régions homologues et appariées au chromosome 14 seraient impliquées au niveau du point de cassure de la translocation. Ces régions homologues sont un heptamère et un nonamère et ils sont séparées par un nombre de nucléotide qui respecte la norme observée lors du processus de recombinaison (12/23).

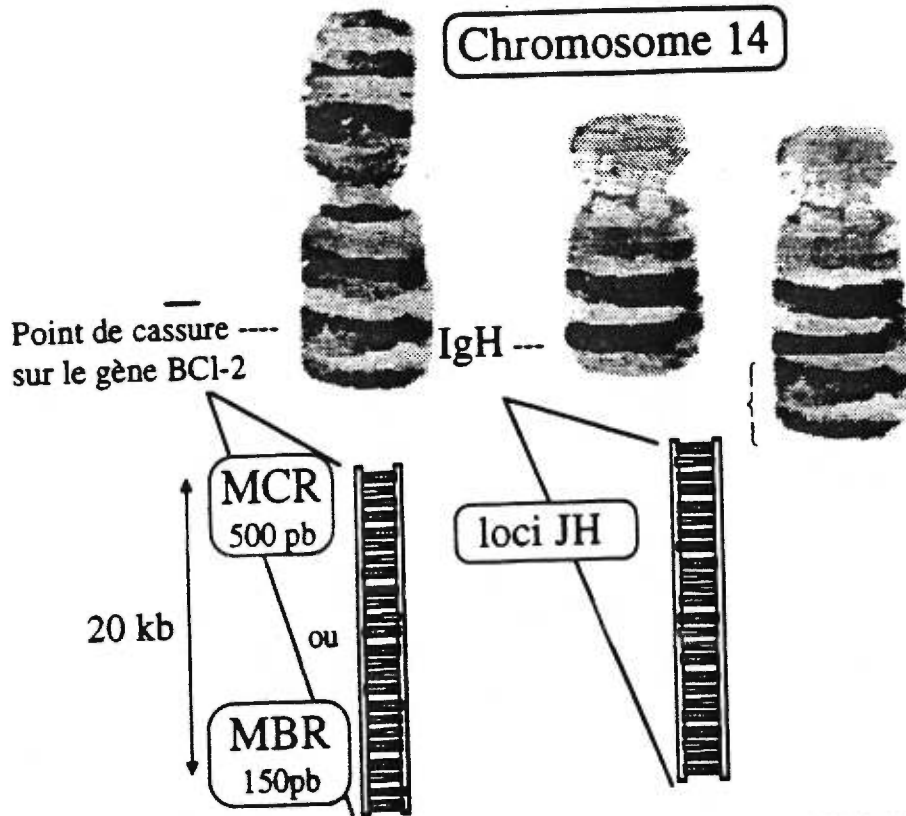
B) Les chromosomes 14 et 18 et la localisation schématique des points de cassure

Cette figure schématise l'organisation des régions MBR et mcr impliquées dans la translocation t(14;18) sur le gène BCL-2

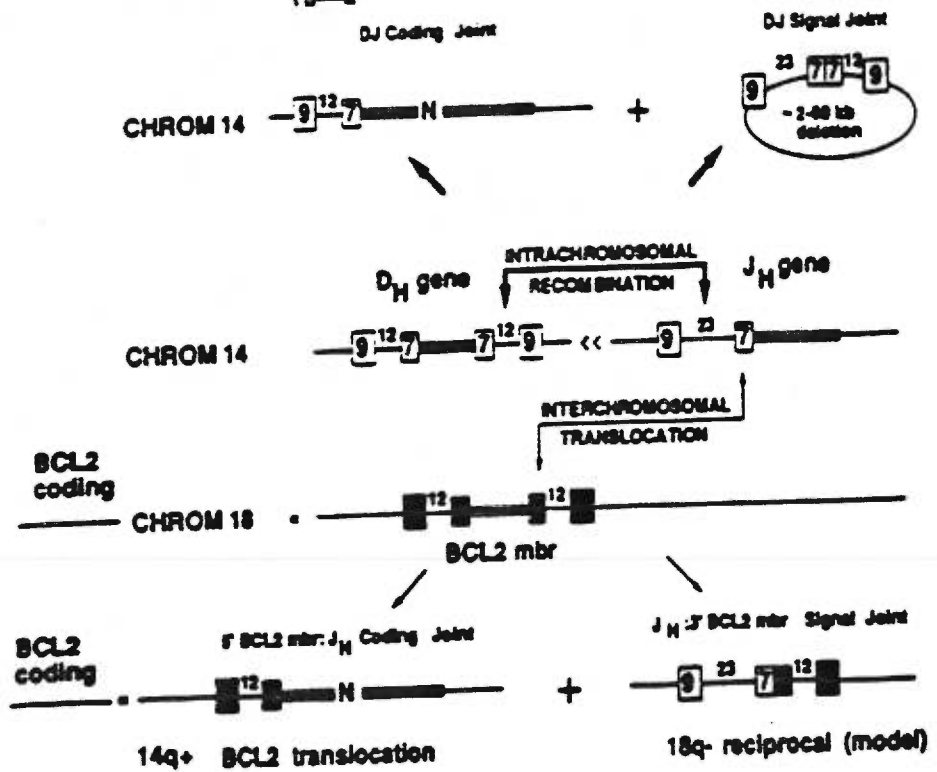
Chromosome 18

A

Chromosome 14



B



Afin de mettre en évidence les effets physiologiques de la t(14;18), un modèle transgénique murin de la translocation bcl-2/IgH fut développé.^{77,78} Ce modèle permet de reproduire la majorité des événements cliniques observés chez les patients atteints de LF. L'expression de ce transgène est localisée dans les organes lymphoïdes primaires ou secondaires tel que la rate et le thymus. Dans ces organes, une expansion polyclonale des progéniteurs et des cellules B matures est observée ainsi qu'une hyperplasie des follicules spléniques.⁷⁷ À noter que la maturation des lymphocytes B persiste malgré l'expression de ce transgène. *In vitro*, les splénocytes exprimant ce transgène survivent mieux par rapport aux autres.⁷⁷ Ce modèle indique que les conséquences pathologiques de la t(14;18) sont dues à une prolongation de la survie des lymphocytes B et à une expansion clonale des cellules B matures.⁷⁷ De plus, ce modèle transgénique a permis de démontrer un fort synergisme entre les oncogènes MYC et BCL-2 lors de la progression maligne. Après une longue période de latence, une bonne proportion d'hyperplasies folliculaires observées développent des caractéristiques histologiques de lymphome de haut-grade et progressent vers une expansion clonale suite à l'acquisition de mutations au niveau du gène c-myc. L'expression du gène c-myc favoriserait la prolifération cellulaire, alors que l'expression de bcl-2 prolongerait la survie cellulaire.⁷⁹⁻⁸³ D'ailleurs, plusieurs pathologies telles que les cancers, les maladies autoimmunes et virales sont associées à l'inhibition d'une des voies menant à l'apoptose.⁸⁴

1.3. BCL-2

1.3.1 BCL-2 : structure et fonction

Le gène bcl-2 est composé de 2 exons séparés par un intron de plus de 200 Kb. Ce gène peut engendrer, par épissage alternatif, des ARNm de trois tailles différentes, soit 3.5, 5.5 et 8.5 kb.^{63,85} Ces ARNm codent pour des protéines de 22 Kd (BCL-2-β) et 26 kd (BCL-2-α).^{63,85} Le gène bcl-2 est normalement

exprimé dans les progéniteurs, les cellules B mémoires quiescentes, dans les cellules B proliférant dans les ganglions lymphatiques centrales et périphériques. Mais, il est faiblement exprimé dans les cellules B différenciées.⁸⁶⁻⁸⁸ Le gène *bcl-2* semble être hautement contrôlé au niveau de la transcription plutôt qu'au niveau post-transcriptionnel.⁸⁹ Par exemple, il a été démontré que la stimulation des lymphocytes B via l'IL-2 induit l'expression du gène *bcl-2* et de quelques autres membres de la famille de BCL-2, tels que BAX et BCL-XL.⁹⁰

BCL-2- α est une protéine essentiellement membranaire. Des études de microscopie électronique ont démontré qu'elle est préférentiellement localisée à la membrane interne des mitochondries.⁹¹ Toutefois, d'autres études ont démontré qu'elle est aussi présente aux niveaux des membranes nucléaires et du réticulum endoplasmique.⁹²⁻⁹⁴ Sa localisation semble, d'ailleurs, déterminer sa fonction cellulaire.⁹⁵ La protéine BCL-2 est l'équivalent chez les mammifères du produit du gène anti-apoptotique *ced 9 de Caenorhaditis elegans*; *ced 9* jouerait un rôle essentiel dans le contrôle négatif de l'apoptose.^{84,96}

1.3.1. BCL-2 serait un inhibiteur de l'apoptose

En effet, il a été démontré *in vitro*, que l'expression de BCL-2 prévient la mort cellule programmée (MCP) dans diverses conditions telles que les radiations γ , l'hyperthermie, l'absence de facteurs de croissance essentiels, la présence de glucocorticoïdes et de divers agents thérapeutiques.^{81,97-103} L'inactivation du gène *bcl-2*, par recombinaison homologue, n'empêche pas le développement embryonnaire et hématopoïétique normal.¹⁰⁴ Cependant, ces souris accusent un retard de croissance et une mort postnatale précoce suite à une involution rapide de la rate et du thymus. Ce phénomène résulte d'une apoptose massive des cellules lymphoïdes. Les cellules T et B seraient

éliminées de la MO et de la périphérie en 4 semaines.¹⁰⁵ Les thymocytes ont une sensibilité largement augmentée aux radicaux libres et aux glucocorticoïdes. Ainsi, BCL-2 semblerait indispensable pour la survie du système immunitaire, mais non pour sa maturation.

1.3.2. BCL-2 serait un promoteur de la résistance cellulaire

L'induction de l'apoptose en créant de grands dommages à l'ADN semble le mécanisme d'action de la plupart des agents thérapeutiques. Ainsi, la surexpression du gène *bcl-2* impliqué dans l'inhibition de ce processus cellulaire est observée dans la quasi totalité des LF.^{67,111,112} D'ailleurs, des études d'immunohistochimie démontrent que BCL-2 est exprimée dans un large spectre de lymphomes et de leucémies B ou T ainsi que dans divers type de carcinomes.¹¹³⁻¹¹⁷ De plus, l'expression de BCL-2 corrélait avec un faible taux de SSM ou une faible réponse face aux traitements.^{19,101,102,118-120} Il a, aussi, été démontré que la surexpression de BCL-Xl induirait un phénotype de résistance multiple, car elle protégerait contre une variété d'agents de chimiothérapie agissant à divers stades du cycle cellulaire.^{121,122} Par conséquent, certains membres de la famille BCL-2 ainsi que la t(14;18) pourraient avoir un rôle dans le développement de résistance cellulaire

1.4. La technologie au service de la recherche clinique

La technique de PCR a été développée dans les années 80 et elle a généré des possibilités auparavant inimaginables dans le domaine du diagnostic.¹²³ Il s'agit d'une méthode rapide, sensible et très spécifique, car son principe consiste à l'amplification *in vitro* de millions de copie d'un gène préalablement sélectionné. Ainsi, s'il n'y a qu'une cellule ayant la t(14;18) sur un million de cellules analysées, nous la détectons. Alors que les méthodes de détection usuelles ont un seuil de sensibilité de 5%, la technique de PCR permet de

détecter de niveaux d'infiltration de 0.01% à 0.0001%. Pour utiliser cette approche, il faut identifier un gène étroitement relié à la maladie et connaître sa séquence afin de construire des amorces spécifiques.

Il est possible d'augmenter la sensibilité tout en conservant la spécificité de la PCR par le truchement de la PCR nichée. La PCR nichée est composée de deux réactions de PCR subséquentes. L'utilisation de deux couples d'amorces différents est préconisé: les amorces de la seconde réaction de PCR reconnaît des séquences internes aux premières amorces (Figure 5). Comme la reconnaissance de 4 séquences homologues aux amorces est nécessaire pour obtenir une amplification adéquate, cette stratégie permet d'augmenter la spécificité, tout en contournant les problèmes tels que la saturation de la réaction et la perte d'efficacité de l'enzyme Taq au abord de 35 cycles d'amplification.

La détection de cellules malignes est bien utile, mais son dénombrement l'est d'autant plus ; c'est pourquoi la transformation de la PCR en essai quantitatif est très recherchée. Ainsi, plusieurs méthodes ont été développées afin de déterminer avec précision une quantité d'ARN ou d'ADN d'un gène cible, tout en jouissant des seuils de sensibilité qu'offre la technique de PCR. Toutefois, le développement de ce type d'essais ne se fait pas sans heurtes et grincements de dents.

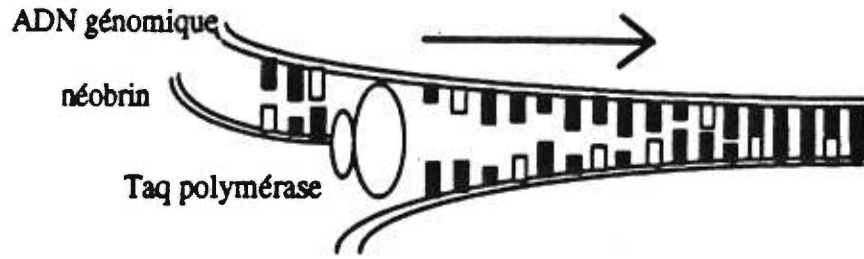
1.4.1. La cinétique d'une réaction de PCR

Théoriquement, les produits de PCR (amplicon) générés par cette réaction enzymatique doublent à chaque cycle d'amplification. Donc, la quantité d'amplicon est dépendante de la quantité d'ADN initiale et du nombre de cycle d'amplification:

$$\log N = \log N_0 + n \log (1+E)$$

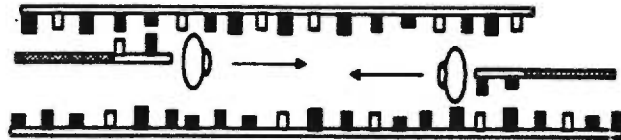
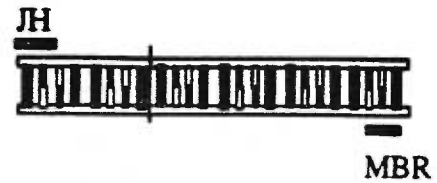
Figure 5: Schématisation du principe de la PCR nichée





Chromosome 14 ; Chromosome 18

Les amorces JH et MBR génèrent un produit d'environ 800 pb



Les amorces JH interne et MBR interne génèrent des produits d'environ 250 pb



$$\log N = \log N_0 + n \log (1+E)$$

N représente la quantité d'amplicon, N_0 la quantité initiale de gène cible et n le nombre de cycle de PCR. Nous devons tenir compte de l'efficacité d'amplification E . Or l'efficacité d'amplification de la PCR est variable; elle dépend de la nature des amorces, de la séquence et de la taille du gène cible, des composantes et des paramètres de la réaction, ainsi que des variations inhérentes aux manipulations.¹²⁴ Comme la réaction de PCR est exponentielle, de petites variations de l'efficacité peuvent entraîner une grande fluctuation au niveau de la quantité finale de produit. Il est donc difficile d'être reproductible dans ces conditions.

En réalité, le dédoublement des amplicons n'est observé que durant les premiers cycles de la réaction. Au bout d'un certain temps, la production ralentit et la quantité d'amplicons tend vers une limite ; c'est la phase plateau de la réaction enzymatique. La quantification est possible qu'au cours de la phase exponentielle, car la saturation de production d'amplicon entraîne inévitablement une sous-évaluation de la quantité initiale de gène cible.

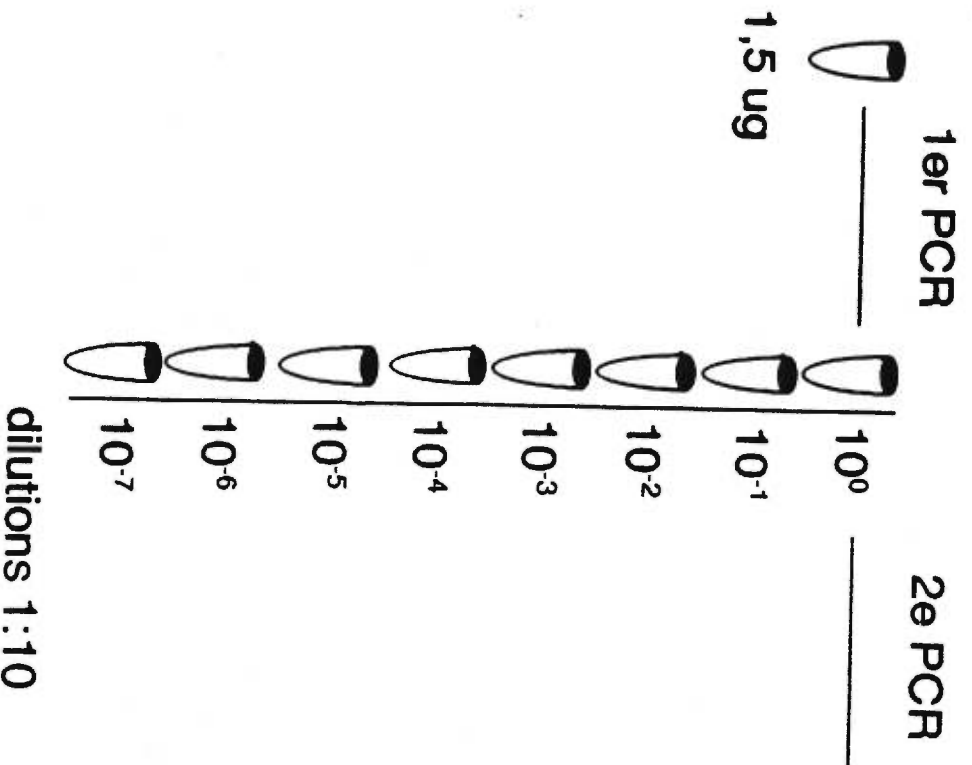
1.4.2. Diverses stratégies de PCR quantitative

Afin d'éliminer la variabilité de l'efficacité, diverses techniques ont été développées aux cours des années 90 ; j'expliquerai, brièvement, les principes de chacune.

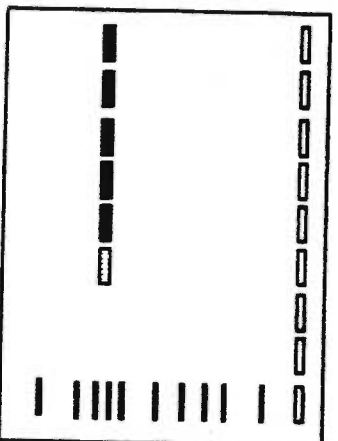
Dans un premier temps, il est possible d'évaluer la quantité de gène cible initial en effectuant une série de dilution de l'échantillon de départ.^{125,126} Pour utiliser cette technique, il faut avoir une bonne connaissance de la cinétique de la réaction de PCR, car si elle a lieu en phase plateau, il y aura une sous estimation de la quantité initiale de gène cible. Cette méthodologie est habituellement peu reproductible, car de petites erreurs lors de l'exécution des dilutions peuvent entraîner d'énormes fluctuations. Néanmoins, dans notre

Figure 6 : Schématisation de la nSQ-PCR

Cette méthode de mesure de la quantité de cellules avec une translocation 14;18 est basée sur une approche de PCR niché combinée à un essai de dilution-limite. Dans un premier temps, l'équivalent en ADN de 250 000 cellules de patients atteints de LNH et ayant la t(14 ;18) est amplifié à l'aide d'amorces externes. Par la suite, une série de dilutions 1 :10 du produit de la première amplification par PCR est effectuée. Ces dilutions ainsi que l'échantillon de départ (10^0) subissent une deuxième amplification à l'aide d'amorces internes. Une fois les deux amplifications terminées, nous analysons les produits de PCR par une migration sur gel d'agarose. Le nombre de dilutions pour lesquelles un produit de PCR est détectable après marquage au bromure d'éthidium nous permettent d'évaluer le pourcentage de cellules lymphomateuses contenu dans l'échantillon de départ, avec une précision d'un logarithme.



Électrophorèse



Taux d'infiltration:

50000/1x10⁶: 10⁻⁶ est positive
 5000/1x10⁶: 10⁻⁵ est positive
 500/1x10⁶: 10⁻⁴ est positive
 50/1x10⁶: 10⁻³ est positive
 5/1x10⁶ cellules: 10⁻² est positive

laboratoire, une méthode de PCR nichée semi-quantitative (nSQ-PCR), basée sur le principe de dilution-limite, a été développée (Figure 6).¹²⁷ Elle diffère des précédentes, car nous diluons le premier produit de PCR plutôt que l'échantillon de départ; cette stratégie assure une grande reproductibilité d'une expérience à l'autre. Cette méthode offre un seuil de sensibilité permettant de détecter une cellule ayant le t(14;18) sur un million de cellules normales. Relativement simple à utiliser, cette approche s'est avérée un outil intéressant. Cependant, elle permet une quantification où la marge d'erreur est d'un log, c'est-à-dire que nous pouvons distinguer entre 5, 50, 500, 5000 et 50000 cellules malignes sur un million de cellules dans d'un échantillon donné.

D'autre part, il est possible de quantifier un échantillon en prélevant une fraction de la réaction régulièrement au cours de l'amplification. La quantification repose alors sur la cinétique de l'amplification.¹²⁸ Des expériences préliminaires de calibration sont nécessaires, car encore une fois, atteindre la phase plateau peut entraîner des erreurs d'estimation. Lors de l'évaluation des échantillons, ces essais nécessitent l'amplification simultanée échantillons de quantité connue (standard externe) qui finissent par alourdir les analyses.

La notion de contrôle interne s'est imposée comme étant le seul outil permettant d'éliminer les variations dues à l'efficacité d'amplification. Deux types de contrôle interne (C.I.) ont été développés: les contrôles endogène et exogène. Le CI endogène est un gène autre que le gène cible et amplifié en multiplex avec le gène d'intérêt.^{129,130} Cette technique est relativement facile à développer et reproductible. Néanmoins, elle est peu précise, car le gène cible et le CI endogène sont amplifiés par des couples d'amorces différents qui ne présentent pas la même efficacité d'amplification.

Le principe de la PCR compétitive repose sur la coamplification d'une proportion inconnue du gène d'intérêt avec une quantité connue de C.I. exogène. Le C.I. exogène est souvent une construction vectorielle, où le plasmide possède l'amplicon du gène cible comme insert.^{124,131,132} Réagissant aux mêmes amorces de PCR que le gène cible et ayant une taille similaire, le C.I. constitue une reproduction assez fidèle du gène d'intérêt. Ainsi, une concentration fixe d'ADN génomique d'un échantillon quelconque où le gène cible est de proportion inconnue (G) est amplifié en présence de différentes concentrations connues de CI. Comme l'efficacité d'amplification est similaire pour chacun d'eux, la quantité d'amplicons obtenue dépendra de leur proportion initiale. Si un des types d'ADN est largement en excès, l'autre ne sera pas amplifié (modèle exponentiel par exclusion). Par contre, s'ils sont en proportion égale, le rapport des amplicons sera de 1. Par conséquent, proche de l'équimolarité, nous observons les deux types d'amplicon en proportion qui respecte leur concentration initiale respective. Ces amplicons seront comparés entre eux et des ratios seront mesurés de la façon suivante : intensité lumineuse de l'amplicon G / intensité lumineuse de l'amplicon C.I.. Lorsque le ratio G/C.I. est de 1, il y avait équimolarité des deux types d'ADN au début de la réaction. Une droite est tracée représentant ces ratio G/C.I. (log) en fonction des dilutions de C.I. (log). Il est possible de déterminer la quantité de gène cible en utilisant l'équation ($y=ax+b$) qui résulte de cette régression logarithmique. La quantité du gène d'intérêt (y) est égal à b, car le ratio est de 1 quand x est égal à 0 ($10^0=1$). L'utilisation de l'équation permet une évaluation plus exacte, car nous pouvons extrapoler la concentration de C.I. lorsque le ratio est égal à 1. De plus, son emploi permet de réduire l'influence des erreurs inhérentes aux manipulations. Ainsi, le ratio G/C.I. reflète fidèlement les concentrations initiales du gène cible et du CI, et ce indépendamment de la quantité finale d'amplicon produit, donc de l'efficacité de la PCR. La linéarité de cette régression logarithmique n'est possible qu'aux abords de l'équimolarité de gène cible et du CI.¹³³

Aujourd'hui, la technologie nous offre plusieurs possibilités pour la détection et la quantification des produits de PCR. Il est possible de quantifier des produits de PCR radioactifs, directement, à partir du gel à l'aide d'un système de documentation de gel pour le P^{32} (Phospho-Imager). Mieux encore, il existe des systèmes de documentation de gel où la densitométrie est réalisable à partir du bromure d'éthidium. De plus, les systèmes de gel de polyacrylamide en capillaire ou, encore, les séquenceurs automatiques combinés à l'utilisation d'amorces marquées à l'aide de fluorochromes permettent d'automatiser et d'améliorer le rendement des analyses. Ces technologies sont donc à notre disposition afin de faciliter l'établissement d'une méthode de PCR compétitive.

En somme, il faut accorder une plus grande importance aux données quantitatives. Plusieurs phénomènes tels que les voies de signalisation semblent dépasser la loi du tout ou rien. Ainsi, les niveaux d'expression d'un gène, le taux de traduction, la demi-vie des ARNm, l'affinité de divers isotypes de protéine pour leur substrat sont probablement la clef de bien des mystères. L'identification de facteurs cellulaires et de leurs interactions n'est qu'une première étape. La cueillette d'information quantitative et l'établissement de modèles théoriques devraient devenir des étapes courantes afin d'améliorer la compréhension de divers phénomènes.¹³⁴

2. Méthodologie et résultats

2.1. Lymphoma cell burden in progenitor cell grafts measured by competitive PCR: Less than one log differences between bone marrow and peripheral blood sources.

Brigitte M. Léonard, Francis Héту, Lambert Busque, Martin Gyger, Robert Bélanger, Claude Perreault and Denis Claude Roy.

Division of Hematology-Immunology, Maisonneuve-Rosemont Hospital;
Department of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada

Supported by the Cancer Research Society of Canada.

L.B. and D.C.R. are Scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Running title: Number of lymphoma cells in progenitor cell grafts

ABSTRACT

A controversy persists in autologous transplantation as to which source of progenitor cells, bone marrow (BM) or peripheral blood (PB), contains the lowest numbers of contaminating lymphoma cells, and how mobilization procedures affect these numbers. In order to accurately measure the number of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cells harboring the bcl-2/immunoglobulin H (IgH) rearrangement in progenitor cell grafts, we developed a nested quantitative competitive polymerase chain reaction assay (QC-PCR). DNA from lymph nodes of four patients with NHL were cloned into the pSK(+) vectors to generate 4 internal controls (ICs) (2 with MBR and 2 with mcr rearrangements). The kinetics of amplification of ICs paralleled those of bcl-2/IgH rearranged genomic DNA. When used in a QC-PCR assay, these ICs were accurate at a 0.2 log level and provided reproducible results, as shown by low intrarun and interrune variability. An excellent correlation between predicted and observed lymphoma cell content ($r=0.99$) was observed over a range of at least 5 logs of rearranged cells. This approach was used to measure involvement by NHL cells at the time of progenitor cell harvest in 37 autologous transplant patients. The number of bcl-2/IgH rearranged cells in BM, PB and mobilized PB (mPB) was found to vary from 1 to 1.1×10^5 per million cells. The number of lymphoma cells present in BM was significantly higher than in PB ($p=.0001$), with a median difference in lymphoma cell content between BM and PB of 0.48 log of cells (range: -0.7 to 5 logs). In contrast, we found no difference in the concentration of bcl-2/IgH rearranged cells present in BM versus PB progenitor cells mobilized with cyclophosphamide and G-CSF (mPB) ($p=.57$). In conclusion, the QC-PCR assay described in this study could measure accurately and reproducibly the number of bcl-2/IgH rearranged cells among normal cells. Differences in levels of contamination by lymphoma cells between BM and PB were of less than one log (10-fold), and no differences in lymphoma cell concentrations were observed between BM and mobilized PB. As more cells are usually infused with mPB than with BM grafts, mPB progenitor cell grafts may actually be associated with higher levels of contamination by lymphoma cells. Furthermore, this QC-PCR assay should provide an important tool to assess the prognostic impact of lymphoma cell burden both in progenitor cell grafts and *in vivo*.

INTRODUCTION

The use of peripheral blood (PB) as a source of progenitor cells has been a major contributor to the rapid expansion of high dose therapy with autologous progenitor cell transplantation (PCT), because it facilitates progenitor cell collection, decreases the time to neutrophil and platelet engraftment, and is associated with decreased procedure-related toxicity.^{1,2} However, a major concern with autologous PB or bone marrow (BM)

transplantation is the risk associated with the reinfusion of occult malignant cells present in the progenitor cell graft.³⁻⁵ Indeed, previous studies have shown that non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cells are detectable in the BM of patients with high risk disease, even after intensive therapy.⁶⁻⁸ In addition, in patients with leukemia, gene-marking studies revealed that the progenitor cell graft could contain cells involved in disease relapse.^{9,10} Moreover, purging of NHL cells below levels detectable by the polymerase chain reaction (PCR) resulted in improved disease-free-survival, particularly in patients with low grade lymphoma.^{11,12} Interestingly, a few studies suggested that PB is less frequently infiltrated by lymphoma cells than BM, and may thus be a better source of progenitor cells than BM.^{13,14} In contrast, other groups showed that bcl-2/immunoglobulin H (IgH) rearranged cells could be found with similar frequencies in PB and BM.¹⁵⁻¹⁷ In patients with various solid tumors, it has been shown that mobilized PB (mPB) can contain neoplastic cells,^{3,4,18,19} and that mobilization regimens could enhance the release of tumor cells into the PB.¹⁹

In most previous studies, PCR has been the primary tool used to detect lymphoma cells by targeting the 14;18 translocation, which is present in the majority of follicular lymphomas, and approximately a third of NHL with diffuse histologies.^{20,21} PCR approaches are extremely sensitive, and enable the detection of as few as one lymphoma cell in a million normal cells.^{11,15,22} However, these assays are usually qualitative, and the number of rearranged cells in a PCR positive sample could vary by more than five logs of lymphoma cells. Such large differences in the number of PCR positive cells limit the interpretation of results, and their prognostic and therapeutic implications.

In this study, we developed a QC-PCR methodology to accurately measure small differences in the number of bcl-2/IgH rearranged cells in clinical samples from patients with NHL. Four internal controls (ICs) generating PCR amplification products of different lengths for both major breakpoint region (MBR) and minor cluster region (mcr) translocations were isolated and cloned. The kinetics of amplification, as well as reproducibility and sensitivity of the test were evaluated to optimize the assay, and to determine the reliability, and particularly the precision of this approach. This QC-PCR methodology was then used to measure the level of contamination by NHL cells in BM, PB and mobilized PB collections from patients undergoing autologous transplantation, in order to determine the optimal source of progenitor cells in terms of tumor cell contamination.

MATERIALS AND METHODS

Patient population. Clinical protocols were approved by the Human Subjects Protection Committee of the Maisonneuve-Rosemont Hospital and samples were obtained with the informed consent of the patients. Eighty-nine (89) patients with B cell NHL undergoing autologous BM (n=50) or PB (n=39) progenitor cell transplantation were evaluated for the presence of a t(14;18). Overall, 38 patients were retained for the analysis because they satisfied the following two conditions: (i) the presence of a bcl-2/IgH rearrangement in BM, PB, or mobilized PB (mPB) at the time of progenitor cell harvest, and (ii) both BM and corresponding PB samples (28 patients), or BM and mPB samples (17 patients), or samples from all 3 sources (7 patients) available for analysis. All patients had relapsed or failed to achieve a first complete remission after 8 cycles of “curative intent” chemotherapy, and reached either a minimal residual disease (MRD) status or a partial response (PR). All patients had 5% or less of the intratrabecular space infiltrated by lymphoma cells on pathological examination. Steady-state PB and BM samples were obtained at the time of marrow harvest or immediately before PB progenitor cell mobilization. Cyclophosphamide ($1.5\text{g}/\text{m}^2$) was administered on the first day of mobilization, followed by G-CSF ($10\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$) from days 1 to 12, and leukapheresis were performed on 2 consecutive days when the white blood cell count was above $8 \times 10^9/\text{L}$ (days 10-12).²³

Clinical samples. Lymph node biopsies were obtained from four patients with NHL presenting a t(14;18). The tissue was stored at -80°C before DNA extraction. Samples of PB and BM from patients undergoing PCT and healthy volunteer donors, used as controls, were collected with preservative-free heparin, and mononuclear cells (MC) isolated by ficoll-hypaque density gradient centrifugation (Ficoll-Paque; Pharmacia, Piscataway, NJ). All cell samples were cryopreserved in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) using standard techniques and stored in the vapor phase of liquid nitrogen.²⁴

Lymphoma cell lines. The cell lines RL and H2 were derived from patients with NHL and harbored a bcl-2 translocation involving MBR, while DHL-16 cells had an mcr translocation. RL cells were a kind gift from Dr. W. Urba (National Cancer Institute, Frederick, MD) and, H2 and DHL-16 cells were kind gifts from Dr. J.G. Gribben (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA).

DNA extraction. DNA was extracted by conventional cell lysis and proteinase K (Sigma, St-Louis, MO) digestion in 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7, 25 mM EDTA and 0.5%

SDS at 50°C overnight.^{22,25} DNA was purified by a phenol-chloroform extraction and precipitated with 3M sodium acetate and ethanol. The concentration and quality of DNA were measured by spectrophotometry at 260 and 280 nm wavelength.

Construction of internal controls. Internal controls (ICs) were generated by amplification of DNA from lymph nodes of patients with NHL. Patient DNA was PCR amplified with corresponding MBR or mcr outer primers,^{11,22} and amplification products were cloned into pSK(+) vectors (pCR-Script SK(+) Cloning Kits, Stratagene, La Jolla, CA). Four different plasmids were obtained: 2 with a MBR (MACM and GU1M) and 2 with a mcr (R11 and MD6) rearrangement. Large-scale preparation of the cloned ICs was performed by lysing bacteria with the alkali method and purifying by equilibrium centrifugation in cesium chloride-ethidium bromide gradients (Boehringer-Manheim, Manheim, Germany)²⁵. Inserts were sequenced to confirm that inner and outer primer binding regions were conserved (Sequenase 1.0, United States Biochemical Inc., Cleveland, OH). The plasmids were then linearized with EcoRI (LifeTechnologies, Inc., Gaithersburg, MD). Plasmid DNA concentration was determined spectrophotometrically and the copy number calculated. A precise series of dilutions of the ICs, ranging from 0.1ng to 0.05fg, were prepared for competition assays.

Nested competitive PCR amplification. Conditions for the nested competitive PCR reaction at the MBR translocation site were optimized using the ICs GU1M and MACM so that one copy of IC in 2.5×10^5 normal MCs was reproducibly detectable. Similar results were subsequently obtained with the other ICs.

For the first amplification, different amounts of IC were added to 1.5mg of purified sample DNA and were amplified in a 100ml reaction-volume containing 25 pmol of each oligonucleotide primer, 200mM each of dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 2.5U of Taq DNA polymerase (Boehringer-Manheim, Germany), 10mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5mM MgCl₂, 50mM KCl 0.1% gelatin.^{11,22} Oligonucleotides for the first amplification included MBR: 5'-CAGCCTTGAAACATTGATGG, or mcr 5'-CGTGCTGGTACCACTCC-TG, and JH: 5'-ACCTGAGGAGACGGTGACC.^{11,22} DNA was subjected to 27 cycles of amplification in a Perkin Elmer Cetus 9600 thermal cycler (Cetus, Emeryville, CA). Cycle conditions included a 94°C denaturation step (15 sec.), a 55°C annealing step (15 sec.), and a 72°C extension step (15 sec.). The initial denaturation step was prolonged to 2 minutes and the final extension step to 5 minutes. Upon completion of the first amplification round, 10 ml of the amplified mixture was then re-amplified for another 27 cycles using oligonucleotide primers

internal (i) to the original primers (nested PCR) MBR-i: 5'-TATGGTGGTTTGACCTTTAG, or mcr-i: 5'-GGACCTTCCTT-GGTGTGTTG, and JH-i: 5'-ACCAGGGTCCCTTGGCCCCA.^{11,22} This second PCR amplification was performed with the same parameters as described above, except for the addition of 3.5U of Taq polymerase and 50 pmol of each inner primer.

Aliquots of 20 ml from the first and the second PCR amplification were analyzed by electrophoresis in 6% acrylamide-7M urea or 2% agarose gels (Boehringer-Manheim, Germany) containing 0.5 mg/ml of ethidium bromide in Tris-borate buffer, and visualized under UV light. The intensity of fluorescence for each PCR product was measured with a gel documentation system (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Estimations derived from the QC-PCR assay were multiplied by a correction factor (size of IC's PCR product [bp]/ size of patient's PCR product [bp]).^{26,27}

In all instances, at least 4 aliquots of each sample were evaluated to determine PCR positivity for bcl-2/IgH rearrangement. With each experiment, one positive control consisting of IC only, and a negative control sample consisting of water instead of DNA were always used. In order to confirm that DNA was amplifiable, negative samples were amplified with commercial primers for the b-globin gene (Gene Amplimer, Cetus). PCR procedures included the following measures to avoid false-positive results due to contamination.^{22,28} Processing of samples was accomplished with disposable pipettes in a biological hood never exposed to post-PCR material. Reagents and samples were mixed in sterile tubes with dedicated pipettors and filter pipette tips (Molecular Bio-Products Inc., San Diego, CA), and all reagents aliquoted for single use. Post-PCR products were manipulated in a different laboratory.

Kinetics of IC. To determine the kinetics of amplification of the ICs, JH and JH-i primers were labeled by direct phosphorylation kinase reaction with ($g^{32}P$) ATP using T4 polynucleotide kinase (Boehringer-Manheim, Germany). Radiolabeled primers were added to unlabeled primers in a proportion of 1 in 10 to the PCR reaction. Thirty ml of each PCR product was migrated, in triplicate, on a 2.5% agarose gel, each band was excised, and radioactivity measured.²⁶

Statistical analysis. Although the distributions of log-transformed values were fairly normal, all data were analysed using non-parametric techniques, since many comparisons involved small subsamples. Comparisons between various measures of infiltration in BM, PB and

mobilized PB were performed using the Wilcoxon match-pairs rank test, with a Bonferroni-corrected alpha level of .05. Mann-Whitney U tests were used for between-groups comparisons. All analyses were considered significant when reaching the .05 alpha level.

RESULTS

Generation of internal controls. In order to precisely determine the number of target lymphoma cells, the amplification of target DNA templates is compared to that of known amounts of internal controls (ICs) in a competitive PCR assay. For optimal competitive PCR amplification, ICs should ideally be amplified by the same set of primers as the target template, and be of similar size.^{26,29} To satisfy these objectives: ICs were generated from lymph nodes heavily infiltrated with lymphoma cells harboring the bcl-2/IgH rearrangement. Taking advantage of the inherent diversity in the breakpoint of the t(14,18) between different patients, lymph nodes from 4 patients were selected to obtain PCR amplification products of various sizes. DNA was extracted, and amplified with the outer PCR primers. PCR products were purified, inserted into pSK(+) vectors, and cloned. Two ICs with MBR translocations were generated: GU1M and MACM, which, upon reamplification with internal primers, provided a second PCR product of 224 bp and 174 bp, respectively (Table 1). Similarly, two ICs with mcr rearrangements, MD6 and R11, provided second PCR products of 516 bp and 1045 bp, respectively. Sequence analysis at inner and outer primer homologous binding regions showed that no nucleotide was lost or modified during the cloning of ICs (data not shown).

Kinetics of amplification of the IC. The first round of PCR amplification should remain in the exponential phase in order to prevent a loss of sensitivity and specificity, and to avoid the formation of hybrid PCR products in the subsequent amplification with internal primers.²⁶ To define the kinetics of amplification of the IC during the first round of PCR, 5×10^4 copies of IC (GU1M) were amplified for an increasing number of cycles with ³²P-end labeled JH primers. This high number of rearranged cells was chosen to ensure that saturation of the amplification curve would not occur. PCR amplification products were electrophoresed, cut out of the gel, and levels of radioactivity were plotted against the number of cycles of amplification (Figure 1A). During the first round of PCR amplification, the exponential phase occurred between 20 and 30 cycles of amplification. To determine the kinetics of amplification of the total nested PCR reaction, ³²P-end-labeled inner JH primers were added to the second PCR reaction. In these experiments, the number of cycles of amplification was maintained identical for both rounds of PCR amplification. At these high

concentrations of DNA target template, a plateau was observed after 20 cycles of amplification, but a loss of efficiency occurred only after 35 cycles. Thus, we limited each round of PCR to 27 cycles. With this approach, one bcl-2/IgH rearranged cell among 250,000 normal cells was consistently detected and generated a signal one hundred-fold above the detection threshold of the gel (data not shown).²² Using this strategy, no bcl-2/IgH rearrangements were identified in PB mononuclear cells from 19 normal controls.

The kinetics of amplification of our plamid IC was then compared to that of genomic DNA (RL cells)(Figure 1B). The same number of copies (5×10^4) of IC and genomic rearranged DNA were PCR amplified with ³²P labeled outer primers and the amount of radioactivity was measured. The shape of the PCR amplification curve, as well as the level of PCR products measured, were identical for the IC and genomic DNA, confirming that the kinetics of amplification of plasmid IC and genomic rearranged DNA were identical.

Nested competitive PCR assay. We then evaluated the capacity of IC to measure the number of bcl-2/IgH rearranged cells in a nested competitive PCR assay. Increasing amounts of ICs were added to aliquots of a simulated patient sample, consisting of DNA from 500 H2 cells added to one million normal mononuclear PB cells. Following nested PCR and electrophoresis, the intensity of PCR products corresponding to GU1M IC and H2 cells were measured (Figure 2). For each concentration of IC, the ratio of H2/GU1M signals were calculated and plotted as a function of the number of copies of IC. The point where the ratio of patient and IC products was equal to 1 corresponded to the number of bcl-2/IgH rearranged copies in the sample.^{26,29}

Reproducibility. To assess the reproducibility of this test, we prepared a single sample of 500 H2 cells (enumerated in a counting chamber) in 10^6 normal mononuclear PB cells. Six aliquots of the initial mixture were amplified in the same PCR run using the QC-PCR approach described above. The mean number of rearranged cells evaluated by QC-PCR was 867 ± 90 (\pm S.D.) cells. Different aliquots of the same original cell mixture were then evaluated by QC-PCR in 6 different nested PCR runs, with different master mixes, over 6 different days and using 6 different preparations of the IC (GU1M). Even in these extreme conditions, the mean number of cells measured (829) was almost identical to that obtained in intrarun conditions, and the standard deviation (303) was only one third of the mean number of copies. Both agarose and polyacrylamide gels were also used to evaluate PCR products, and similar estimations were obtained with both types of gels (data not shown).

Coamplification of IC and NHL DNA. We then determined the linearity of our QC-PCR assay over the whole range of bcl-2/IgH cells that can be detected in patient samples. For this purpose, RL and H2 cells (harboring a MBR rearrangement), and DHL-16 cells (mcr rearrangement) were mixed with normal mononuclear PB cells at ratios varying from 5 to $5 \times 10^4/10^6$, the latter level of infiltration was selected to correspond to infiltration by 5% lymphoma cells. These samples were coamplified with the ICs: MACM, GU1M and MD6, respectively. When experimental results were plotted against those predicted, the slope of the regression curve was almost identical that of a theoretical line of identity (Figure 3). In addition, for each sample evaluated, only small variations were observed between different experiments, and for all ICs. Therefore, these experiments demonstrate that our ICs can be used in this QC-PCR assay to measure NHL cell content over a large range of cell concentrations, and with high levels of accuracy.

Bcl-2/IgH rearranged cells in BM and PB samples. We used this QC-PCR approach to measure the number of lymphoma cells in BM and steady-state PB samples of patients with high risk NHL prior to autologous transplantation, at the time of progenitor cell harvest. Among the 28 patients where both BM and PB cells were available, all but 2 patients had at least one site with a bcl-2/IgH rearrangement detectable by PCR, and within this latter group, lymphoma cells were detectable in 69% of PB and 92% of BM specimens. When measured by QC-PCR, 11 patients (42%) had less than 5 bcl-2/IgH rearranged cells per million BM and PB cells evaluated, 5 patients (19%) had between 5 and 49 rearranged cells, 5 patients (19%) had between 50 and 499 rearranged cells, 3 patients (12%) had between 500 and 4,999 rearranged cells and 2 patients (8%) had more than 5,000 and 50,000 rearranged cells per million cells (Figure 4). We found no differences in the number of rearranged cells in patients with MBR or mcr rearrangements (data not shown).

Overall, the number of lymphoma cells detected in BM was significantly higher than in PB ($p=.0001$). The number of lymphoma cells in BM was higher than in PB in 21 patients, lower in 3 patients, and both results were equal in 2 patients. In individual patients, differences in the number of lymphoma cells between BM and PB samples were of one log (10-fold) or less in 23 patients, with a median difference of 0.48 log, corresponding to a 3-fold higher number of lymphoma cells in BM (range: -0.7 to 5 logs). Differences of more than one log of NHL cells (1.2, 2.6 and 5 logs) were observed in only 3 patients, and in each instance, lymphoma cells were more prominent in BM than in PB.

Numbers of NHL cells in the BM and mobilized PB grafts. The widespread use of PB progenitor cell mobilization prior to autologous progenitor cell transplantation warranted an evaluation of their lymphoma cell content, and a comparison with levels of BM infiltration. At the time of harvest, bcl-2/IgH rearrangements were documented in 71% of BM samples, and, 82% and 88% of mobilized PB samples collected on the first (mPB1) and second day (mPB2) of leukopheresis, respectively (Figure 5). From 0 to 98,608 rearranged cells per million cells were measured in BM, while 0 to 68,362 cells per million were observed in mPB products.

The distribution of the contamination level in this patient population (Figure 5) was similar to that observed in the previous group of patients (Figure 4). However, differences in lymphoma cell content between BM and mobilized PB were of only 0.06 log (0 log with mPB1, and 0.11 log with mPB2), without any significant difference ($p=0.570$).

Clinical parameters versus infiltration by NHL cells. In order to determine whether patient or disease characteristics were associated with the degree of infiltration by NHL cells, we compared the numbers of NHL cells measured by our QC-PCR assay to various clinical parameters (Table 2). We found no correlation between patient age, sex, stage of disease, remission status and number, and levels of rearranged cells. However, patients with follicular lymphoma had higher levels of infiltration by bcl-2/IgH rearranged cells in BM and mobilized PB than patients with lymphoma of diffuse histology ($p=.041$ and $.034$, respectively). This difference was not observed in steady-state PB. In addition, the presence of bone marrow infiltration by pathologic examination, at any time before transplantation, was associated with higher levels of NHL cells by QC-PCR in BM and PB ($p=.015$ and $.012$, respectively) than patients without detectable lymphoma cells on pathology. However, when only evaluated at the time of harvest, BM biopsy results did not correlate with the number of lymphoma cells measured by QC-PCR.

Effect of mobilization on NHL cells. Lymphoma cell content could be evaluated in BM, and sequentially in PB obtained before and after chemotherapy and G-CSF progenitor cell mobilization in 7 patients. The number of bcl-2/IgH rearranged cells in PB increased following mobilization in 6 out of 7 patients (Figure 6). Although increases were limited in most patients, the number of NHL cells in 2 patient's PB more than tripled after mobilization.

DISCUSSION

In order to accurately measure the number of NHL cells present in minimal residual disease states, we developed a non-radioactive competitive quantitative PCR approach. After generating appropriate internal controls, we defined the kinetics of amplification, as well as sensitivity, reproducibility and accuracy of this methodology. In order to identify which hematopoietic sampling site contains least NHL cells, and is the best source of progenitor cells in terms of tumor cell contamination, we used this QC-PCR to measure the number of bcl-2/IgH translocated cells in BM, PB and mobilized PB. Although extremely variable between patients, the concentration of NHL cells found in BM was higher than in steady-state PB, but identical to that in mobilized peripheral blood.

Competitive PCR determines the amount of target DNA by comparing its signal to that of known quantities of an exogenous template that is amplified in the same PCR reaction, and with the same primers.^{26,27,29} This approach, which is probably the most accurate quantitative PCR methodology, necessitates the synthesis of internal controls satisfying strict size and structure requirements. To satisfy these requirements, we cloned several bcl-2/IgH rearranged sequences directly from patient lymphoma cells. In contrast to previous studies that used cell lines as ICs,^{30,31} we could take advantage of the inherent diversity in the translocation sites of various NHL cells to obtain ICs of various sizes, that can be discriminated from patient PCR products for both MBR and mcr rearrangements, while remaining of similar size for accurate quantitative assessment. Moreover, the generation of such clones of ICs is simple, and, importantly, ensures the preservation of intact sequences complementary to both outer and inner primers.

In this study, efforts of optimization and standardization were especially important in order to develop a quantitative approach capable of detecting extremely small variations in lymphoma cell content, and to accurately determine the reliability and precision of such measures. We first ensured, by sequence analysis, that no nucleotides were lost or modified during the cloning of ICs, particularly in the outer primer homologous sequences since the primers used for cloning were the same as those used for quantification. The first round of amplification also occurred in the exponential phase, while the second round was stopped before reaching the saturation phase, even with high levels of initial target template. In addition, kinetic studies confirmed that amplification of plasmidic IC paralleled that of genomic DNA. In these conditions, lymphoma cells could be measured over a large range, at least 5 logs of cells, and for each IC, this relation was linear, accurate (within 0.2 log of cells), and reproducible. Since the competition phenomenon is log-log linear only when

DNA content is near equimolarity,²⁶ we narrowed the number of different concentrations of ICs within one log of the target value, an approach that enabled us to monitor differences of less than one log (10-fold) with unequalled precision and standardization.

In patients with NHL undergoing progenitor cell transplantation, it has been postulated that the level of infiltration of the progenitor cell graft by residual malignant cells plays an important role in disease relapse.^{11,14} A few studies have used sensitive detection methods to determine whether lymphoma cells were present in PB versus BM.^{13-15,30,32} Gribben et al. evaluated 45 patients with high risk NHL and found that bone marrow samples from all these patients were infiltrated by lymphoma cells, while corresponding PB samples were positive in only half of these patients.¹³ Similarly, Sharp et al, using an *in vitro* culture system, showed that lymphoma cells grew less frequently from PB than BM samples.¹⁴ In contrast, other investigators rather found similar numbers of PB and BM samples positive for bcl-2/IgH rearrangements.^{15-17,30,32} These studies provided important correlations between the presence of lymphoma cells in BM and or PB cells, yet only quantitative comparisons could clarify the issue. To our knowledge, this is the first large scale study to accurately measure the number of lymphoma cells present at these various sites, and also in mobilized PB.

Using the QC-PCR approach described in this study, we showed wide variations, ranging from 1 to 107,245 bcl-2/IgH rearranged cells per million mononuclear cells evaluated, in BM, PB and mPB of patients in complete or partial remission. With such large variations, an evaluation of lymphoma cell content in BM and PB could only be performed by comparing samples obtained from the same patient, and at the same time. We found that BM samples had a higher number of contaminating lymphoma cells than PB, but that differences in NHL cell mass between BM and PB were of one log or less in most (88%) patients. Such small (10-fold) differences in lymphoma cell numbers may explain why, in most qualitative PCR studies, similar frequencies of PCR positivity were detected in BM and PB samples.^{15-17,30,32} The lower frequency of infiltration by NHL cells in PB than in BM, identified by a few groups,^{13,14} could be attributable to the study of larger numbers of patients with threshold levels of lymphoma cells, where the 10-fold lower level of infiltration in PB identified in this study could result in a negative test in PB and a positive result in BM. This also suggests that PB should be a reliable sampling site to quantitatively evaluate lymphoma cell burden in a majority of patients. In contrast, we found no significant difference in the concentration of bcl-2/IgH rearranged cells present in BM and mobilized PB. Thus, although steady-state PB may offer an advantage in terms of the

proportion of lymphoma cells, this difference with BM is very slight, and completely abolished following mobilization with growth factor and chemotherapy. Moreover, as the total number of cells infused is usually larger with mPB than BM, mobilized PB grafts could actually contain higher numbers of lymphoma cells than conventional BM grafts. It is noteworthy that, in a few individuals, differences in the number of NHL cells found in BM versus PB could reach up to 5 logs (10^5 -fold differences). Such large differences again underline the critical importance of measuring the number of NHL cells, and not only PCR positivity, prior to stem cell harvesting, in order to identify the importance of lymphoma cell infiltration.

Immunohistochemical studies in patients with breast and lung carcinoma showed that the number of malignant cells can increase in PB following mobilization procedures, and that this phenomenon seems related to BM involvement.¹⁹ We analyzed levels of NHL cells before and after mobilization with chemotherapy and G-CSF, and found that lymphoma cell content in PB also increased with mobilization in a majority of patients. These preliminary results, along with results obtained by comparing lymphoma cell levels in BM and mPB suggest that *in vivo* progenitor cell mobilization may not be appropriate as a purging strategy unless differences in the kinetics of release of lymphoma and normal progenitor cells can be identified. This seems unlikely since, in this study, NHL cell levels were increased at the time when CD34+ cells are usually at optimum levels for collection. The fact that various types of tumor cells are mobilized into PB suggest that dissemination probably involves a common pathway related directly or indirectly to the mobilizing agents used. The monitoring of this effect should be important in the study of normal stem cell physiology as well as of mechanisms implicated in tumor cell release. In addition, different numbers of tumor cells in progenitor cell grafts may have a different impact on patient outcome. For example, Sharp et al showed that patients with detectable lymphoma cells in BM grafts had a lower disease-free-survival than patients without such colony growth.⁵ However, this lymphoma colony assay is less sensitive than nested PCR, and possibly identifies patients with higher levels of tumor cell infiltration. Our results clearly demonstrate that major variations in lymphoma cell content can be observed in different patients, and even in different harvest sites. The definition of clinically significant threshold levels of infiltration is thus clearly needed. Thus, it will be important to follow our patient population in order to prospectively determine whether the amount of lymphoma cells in progenitor cell grafts affects relapse, and if a minimum level of bcl-2/IgH rearranged cells could be transplanted without impairing patient prognosis.

We found that patients with NHL of follicular histology had higher levels of infiltration than patient with diffuse NHL, independently of disease stage. This finding could explain why purging strategies seem particularly beneficial in patients with follicular lymphomas.^{11,12} It also reinforces the importance of developing strategies to purge NHL cells from mobilized PB grafts, and not only BM grafts. Fortunately, various strategies using monoclonal antibodies, either with complement, immunomagnetic beads or immunotoxins, or other purging agents can eliminate several logs of malignant cell lines cells while sparing normal hematopoietic progenitors.^{11,31,33-35} This QC-PCR assay may be an appealing and easily reproducible approach to devise purging strategies to enhance the elimination of lymphoma cells.

The preponderance of lymphoma cells in BM versus PB is compatible with the existence of a blood-marrow barrier.^{36,37} In addition, the almost constant one log difference in lymphoma cells between these sites strongly suggests that a gradient rather than a threshold phenomenon is involved. The elimination of such a gradient following stem cell mobilization with chemotherapy and growth factors may be attributable to direct toxic effects from cytotoxic agents. Indeed, Tavassoli and al. showed that cyclophosphamide administration altered the permeability of murine sinusoidal cells in BM endothelium.³⁷ On the other hand, cytokines were also shown to modify the proliferation and regulation of cell adhesion molecules in normal hematopoietic progenitor cells following *in vivo* mobilization procedures.³⁸ Such alterations at the level of either lymphoma cells or marrow stromal cells could result in enhanced circulation between PB and BM compartments.

In this study, 50 percent of NHL patients had below 10 lymphoma cells detectable per million cells. As described in Patients and Methods, extremely rigorous methods were used to minimize the likelihood of false positive results. In addition, 19 healthy volunteer donors were tested at different times with our assay and, in all instances, these samples were PCR negative. Nevertheless, a few investigators have reported the presence of bcl-2/IgH rearranged cells in normal individuals^{39,40}. However, this rearrangement was only documented at very low levels, mostly in older individuals, and in highly enriched B cell populations with a frequency of 1 in 10⁵ or less circulating B cells. These findings raise numerous questions regarding the biological significance of low levels of bcl-2/IgH rearranged cells in normal individuals and NHL patients. The present QC-PCR assay may be useful to determine the evolution of these cells over time, their proliferation and

clonogenicity, and also help identify instances where additional oncogenic events are implicated.

In addition to the above applications, accurate measurements of lymphoma cell numbers should be useful for the evaluation and optimization of (i) chemotherapy and immunotherapy protocols, (ii) progenitor cell mobilisation regimens, and (iii) myeloablative regimens. Precise quantitative monitoring of lymphoma cells *in vivo* may also help to resolve one of the most crucial issues in lymphoma management: the impact of molecular detection of lymphoma cells on disease relapse.

ACKNOWLEDGMENT

The authors wish to thank Dr F. Coutlée for helpful discussions, Dr M. Dumont for statistical analysis, Dr S. Cousineau for his hematopathologic expertise, Ms. C. Le Houillier for technical assistance, and Ms. M.J. Guertin and O. Marchand for their help with patient samples.

REFERENCES

1. Kessinger A, Armitage JO: The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood* 77:211, 1991
2. To LB, Haylock DN, Simmons PJ, Juttner CA: The biology and clinical uses of blood stem cells. *Blood* 89:2233, 1997
3. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ: Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 10:936, 1992
4. Moss TJ, Cairo M, Santana VM, Weinthal J, Hurvitz C, Bostrom B: Clonogenicity of circulating neuroblastoma cells: implications regarding peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 83:3085, 1994
5. Sharp JG, Joshi SS, Armitage JO, Bierman P, Coccia PF, Harrington DS, Kessinger A, Crouse DA, Mann SL, Weisenburger DD: Significance of detection of occult non-Hodgkin's lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique. *Blood* 79:1074, 1992
6. Gribben JG, Freedman As, Woo SD, Blake K, Shu RS, Freeman G, Longtine JA, Pinkus GS, Nadler LM: All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood* 78:3275, 1991
7. Johnson PW, Price CG, Smith T, Cotter FE, Meerabux J, Rohatiner AZ, Young BD, Lister TA: Detection of cells bearing the t(14;18) translocation following myeloablative treatment and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 12:798, 1994
8. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS, Gimmi CD, Pesek KW, Barber M, Saporito L, Woo SD, Coral F, Spector N: Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 81:3449, 1993

9. Brenner MK, Rill DR, Holladay MS, Heslop HE, Moen RC, Buschle M, Krance RA, Santana VM, Anderson WF, Ihle JN: Gene marking to determine whether autologous marrow infusion restores long-term haemopoiesis in cancer patients. *Lancet* 342:1134, 1993
10. Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, Hanania EG, Fu S, Ellerson D, Goldberg L, Thomas M, Janicek K, Anderson WF: Genetic marking shows that Ph+ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 83:3068, 1994
11. Gribben JG, Freedman AS, Neuberg D, Roy DC, Blake KW, Woo SD, Grossbard ML, Rabinowe SN, Coral F, Freeman GJ, Ritz J, Nadler LM: Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 325:1525, 1991
12. Williams CD, Goldstone AH, Pearce RM, Philip T, Hartmann O, Colombat P, Santini G, Foulard L, Gorin NC: Purging of bone marrow in autologous bone marrow transplantation for non-Hodgkin's lymphoma: a case-matched comparison with unpurged cases by the European Blood and Marrow Transplant Lymphoma Registry. *J Clin Oncol* 14:2454, 1996
13. Gribben JG, Neuberg D, Barber M, Moore J, Pesek KW, Freedman AS, Nadler LM: Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow. *Blood* 83:3800, 1994
14. Sharp JG, Kessinger A, Mann S, Crouse DA, Armitage JO, Bierman P, Weisenburger DD: Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol* 14:214, 1996
15. Negrin RS, Pesando J: Detection of tumor cells in purged bone marrow and peripheral-blood mononuclear cells by polymerase chain reaction amplification of bcl-2 translocations. *J Clin Oncol* 12:1021, 1994
16. Berinstein NL, Reis MD, Ngan BY, Sawka CA, Jamal HH, Kuzniar B: Detection of occult lymphoma in the peripheral blood and bone marrow of patients with untreated early-stage and advanced-stage follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 11:1344, 1993

17. Yuan R, Dowling P, Zucca E, Diggelmann H, Cavalli F: Detection of *bcl-2/JH* rearrangement in follicular and diffuse lymphoma: concordant results of peripheral blood and bone marrow analysis at diagnosis. *Br J Cancer* 67:922, 1993
18. Macintyre EA, Belanger C, Debert C, Canioni D, Turhan AG, Azagury M, Hermine O, Varet B, Flandrin G, Schmitt C: Detection of clonal CD34(+)19(+) progenitors in bone marrow of *bcl-2-IgH*-positive follicular lymphoma patients. *Blood* 86:4691, 1995
19. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L: Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 83:636, 1994
20. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML: Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 317:1185, 1987
21. Lee MS, Blick MB, Pathak S, Trujillo JM, Butler JJ, Katz RL, McLaughlin P, Hagemester FB, Velasquez WS, Goodacre A: The gene located at chromosome 18 band q21 is rearranged in uncultured diffuse lymphomas as well as follicular lymphomas. *Blood* 70:90, 1987
22. Hetu F, Coutlee F, Roy DC: A non-isotopic nested polymerase chain reaction method to quantitate minimal residual disease in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Mol Cell Probes* 8:449, 1994
23. Jones HM, Jones SA, Watts MJ, Khwaja A, Mills W, Fielding A, Goldstone AH, Linch DC: Development of a simplified single-apheresis approach for peripheral-blood progenitor-cell transplantation in previously treated patients with lymphoma. *J Clin Oncol* 12:1693, 1994
24. Pichert G, Roy DC, Gonin R, Alyea EP, Belanger R, Gyger M, Perreault C, Bonny Y, Lerra I, Murray C, Soiffer RJ, Ritz J: Distinct patterns of minimal residual disease associated with graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 13:1704, 1995

25. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T: *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
26. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF: Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2725, 1990
27. Cross NC, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM: Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood* 82:1929, 1993
28. Kwok S, Higuchi R: Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237, 1989
29. Wang AM, Doyle MV, Mark DF: Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9717, 1989
30. Meijerink JP, Smetsers TF, Raemaekers JM, Bogman MJ, de Witte T, Mensink EJ: Quantitation of follicular non-Hodgkin's lymphoma cells carrying t(14;18) by competitive polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 84:250, 1993
31. Widmer L, Pichert G, Jost LM, Stahel RA: Fate of contaminating t(14; 18)+ lymphoma cells during ex vivo expansion of CD34-selected hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88:3166, 1996
32. McCann JC, Kanteti R, Shilepsky B, Miller KB, Sweet M, Schenkein DP: High degree of occult tumor contamination in bone marrow and peripheral blood stem cells of patients undergoing autologous transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood & Marrow Transplant* 2:37, 1996
33. Roy DC, Ouellet S, Le Houillier C, Ariniello PD, Perreault C, Lambert JM: Elimination of neuroblastoma and small cell lung cancer cells with an anti-neural cell adhesion molecule immunotoxin. *J Natl Cancer Inst* 88:1136, 1996
34. Straka C, Drexler E, Mitterer M, Langenmayer I, Pfefferkorn L, Stade B, Koll R, Emmerich B: Autotransplantation of B-cell purged peripheral blood progenitor cells in B-cell lymphoma. *Lancet* 345:797, 1995

35. Roy DC, Perreault C, Bélanger R, Gyger M, Le Houillier C, Blättler WA, Lambert JM, Ritz J: Elimination of B-lineage leukemia and lymphoma cells from bone marrow grafts using anti-B4-blocked-ricin immunotoxin. *J Clin Immunol* 15:51, 1995
36. Papayannopoulou T, Nakamoto B: Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9374, 1993
37. Shirota T, Tavassoli M: Cyclophosphamide-induced alterations of bone marrow endothelium: implications in homing of marrow cells after transplantation. *Exp Hematol* 19:369, 1991
38. Levesque JP, Haylock DN, Simmons PJ: Cytokine regulation of proliferation and cell adhesion are correlated events in human CD34+ hemopoietic progenitors. *Blood* 88:1168, 1996
39. Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, Schuurin E, Kluijn PM: Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 85:2528, 1995
40. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D., Cortopassi GA: BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8910, 1994

Table 1. Characteristics of Internal Controls

Internal Control	Breakpoint	Size of first PCR product (bp)	Size of second PCR product (bp)
GU1M	MBR	825	224
MACM	MBR	801	174
MD6	mcr	631	516
R11	mcr	1068	1045

Table 2. Impact of clinical and disease characteristics on lymphoma cell content in BM, PB and mPB

Clinical parameters	2-tailed p values		
	Versus the number of lymphoma cells (QC-PCR) in		
	Bone marrow (n=37)	Peripheral blood (n=26)	Mobilized PB (n=17)
Age: ≤ 45 vs > 45	.703	.271	.769
Sex: Male vs Female	.801	.783	.922
Stage: III vs IV	.208	.094	.460
Histology: Follicular vs Diffuse	.041	.929	.034
Remission status: CR vs PR	.964	.513	.207
Number of remissions: 1 [†] vs ≥ 2	.397	.126	.365
BM infiltration* at any time: Yes vs No	.015	.012	.148
BM infiltration* at harvest: Yes vs No	.082	.136	.30

Differences in the number of lymphoma cells, as measured by our QC-PCR assay, for each clinical parameter were analysed with Mann-Whitney U Test. Two-tailed p values were corrected for ties.

* Identified on pathological examination

† All patients in first remission failed to achieve a CR after completing the initial chemotherapy.

Legends to Figures

Figure 1. Kinetics of amplification of ICs. (A) Amounts of amplification products (cpm) of the IC MACM (5×10^4 copies per PCR reaction) were measured after the first round (■) and second round of nested PCR (○), and plotted against the number of PCR cycles. Results are means of 2 experiments in triplicate. (B) Products generated after PCR amplification of 5×10^4 copies of plasmid IC (MACM) (●) were compared to those generated after amplification of genomic DNA (5×10^4 RL cells) (□).

Figure 2. ICs were used in a nested competitive PCR assay to quantitate rearranged NHL cells. (A) The following number of copies of IC (GU1M): (1) 5000; (2) 3200; (3) 1600; (4) 800; (5) 500; (6) 320; (7) 160; (8) 50; (9) 0, were added to aliquots of H2 cells mixed with normal PBMC at a ratio of $5 \times 10^3/10^6$. Each aliquot, a positive (10: IC only) and a negative control (11: water only) were amplified by nested PCR, run on a 2.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. (B) Amounts of PCR products were measured by multi-densitometric analysis. (C) Fluorescence ratios (●) were plotted against the concentration of IC (corrected for differences in molecular weight). The estimated number of bcl-2/IgH rearranged cells in the sample corresponded to a ratio of 1 (correlation coefficient = -.945).

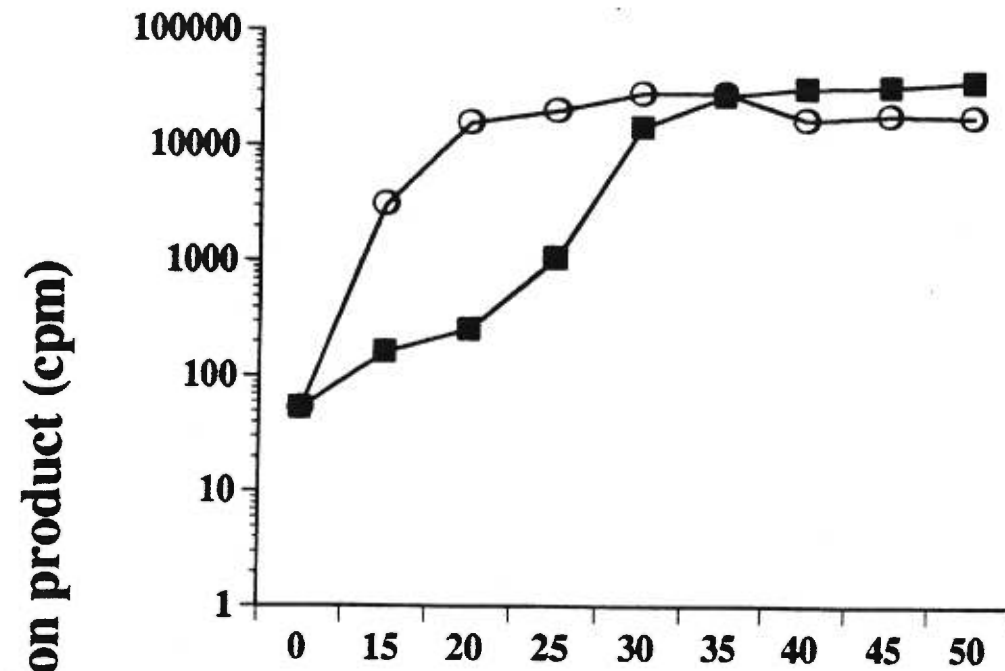
Figure 3. Correlation between the number of bcl-2/IgH rearranged cells predicted and observed. H2 (A), RL (B) and DHL-16 (C) cells, in concentrations ranging from 5 to 5×10^4 cells, were added to 10^6 normal PBMC, and then evaluated with the ICs (thick line): GU1M, MACM and MD6, respectively. Results, mean \pm s.d. of 3 experiments, are compared to an ideal line of identity (thin line). Correlation coefficients of observed versus predicted results were greater than .99 for all 3 ICs.

Figure 4. QC-PCR evaluation of the number of bcl-2/IgH rearranged cells measured in BM (◆) and PB(○) from 26 different patients at the time of progenitor cell harvest. Lymphoma cell numbers were significantly higher in BM than in PB ($p=.0001$).

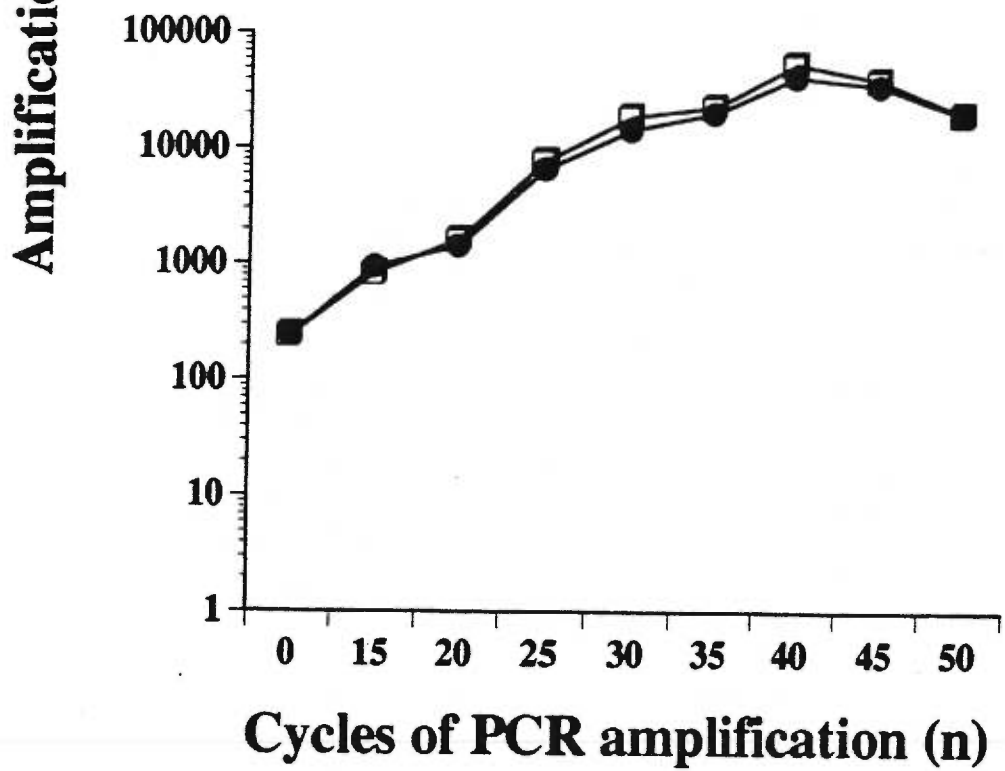
Figure 5. Quantification of lymphoma cells present in the BM (◆) and, the first (○) and second (□) mobilized PB collections from 17 different patients listed according to the number of rearranged cells detectable prior to autologous PBPC. No difference in lymphoma cell burden was identified ($p=.57$).

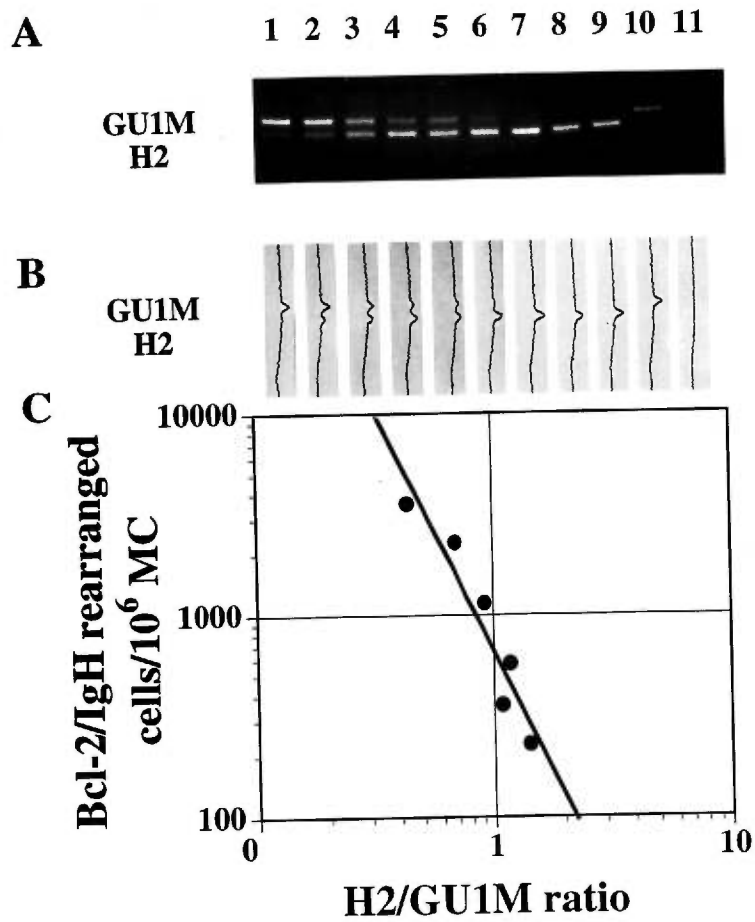
Figure 6. Effect of mobilization on lymphoma cell levels. The number of bcl-2/IgH rearranged cells detectable in BM and PB obtained immediately before mobilization, and in mobilized PB collections (1 and 2) are plotted for each of 7 individuals.

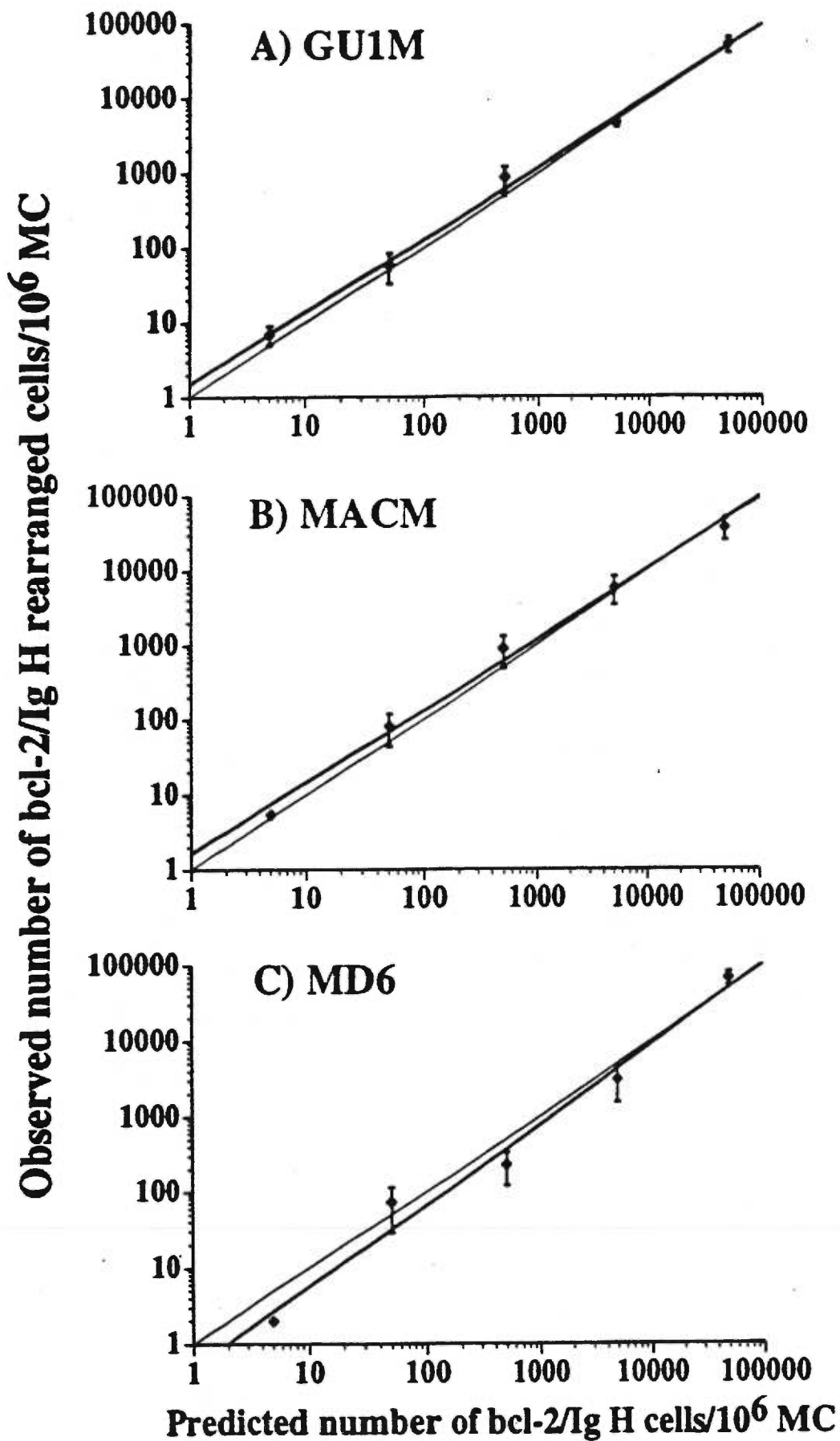
A



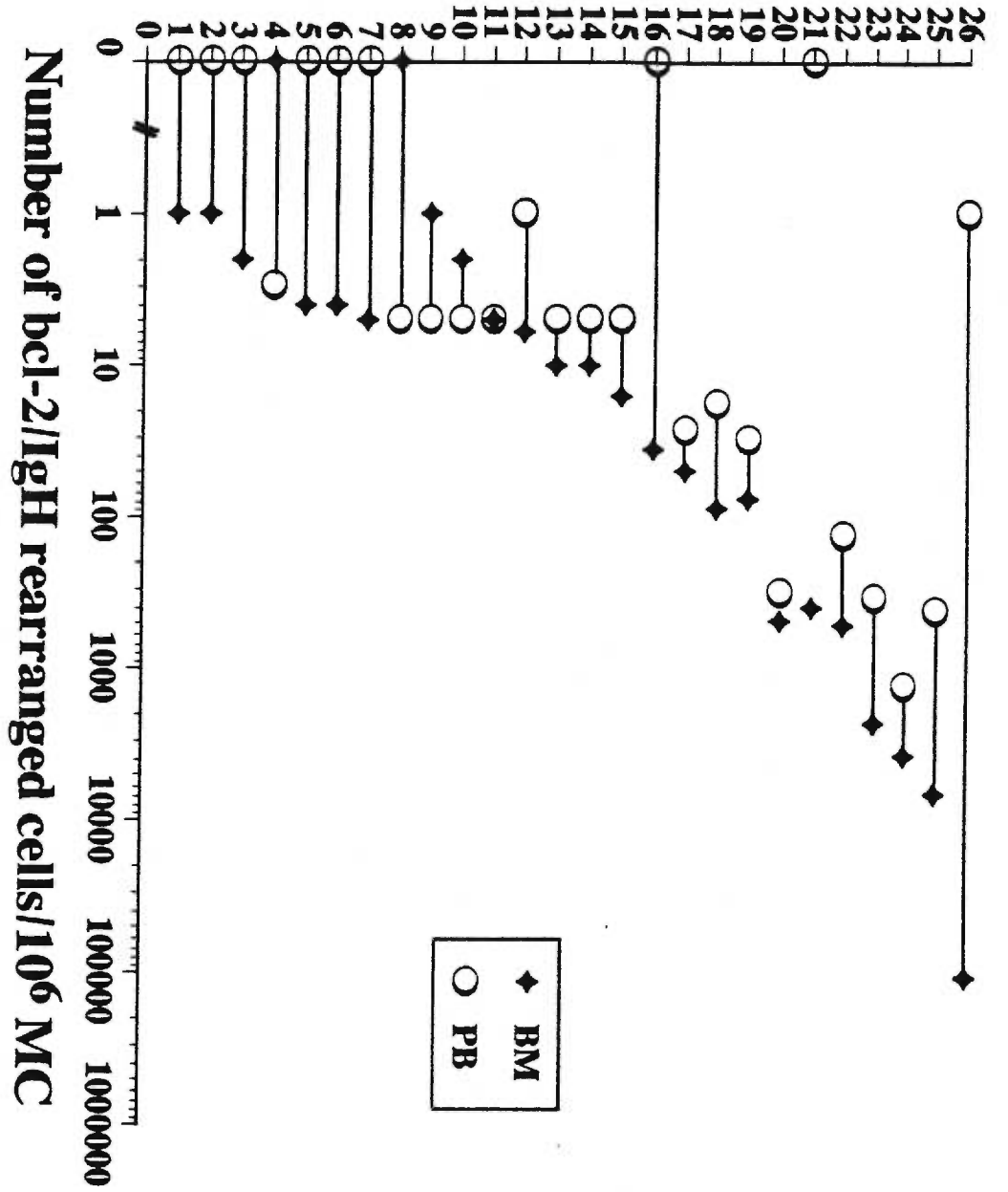
B

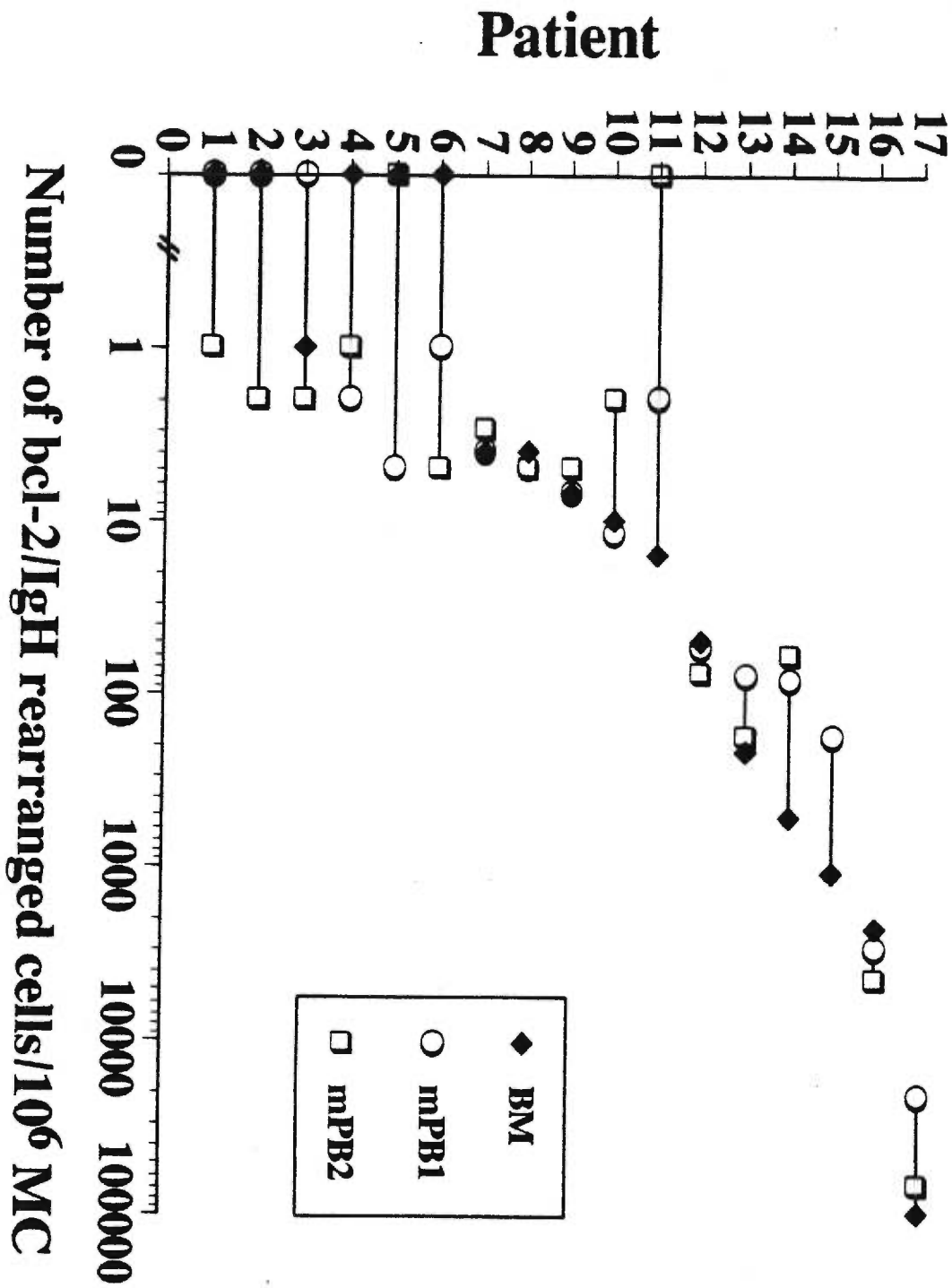


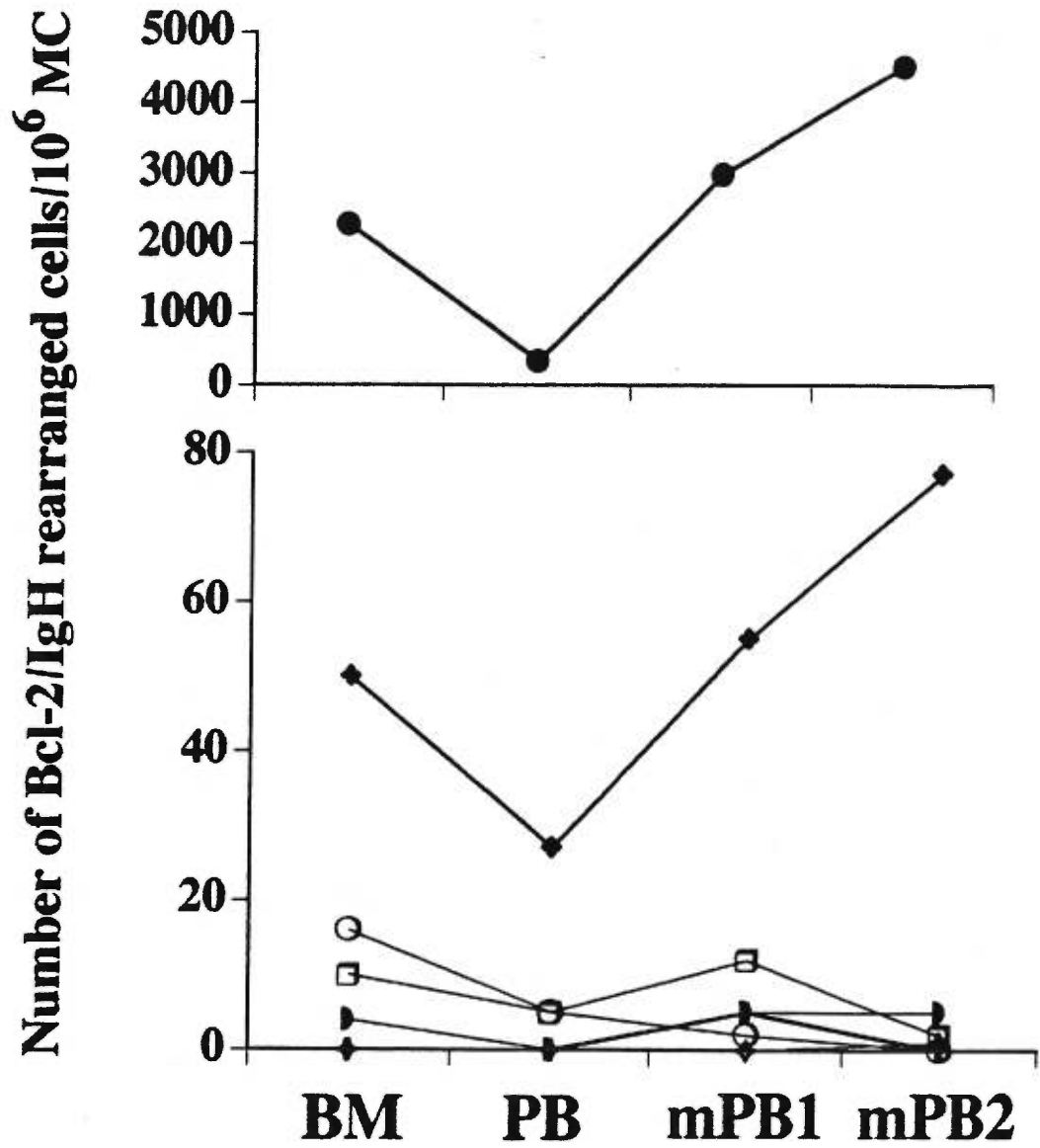




Patients







3. Discussion

3.1. Développement de la PCR compétitive nichée (nQC-PCR)

La PCR compétitive a été grandement utilisée dans l'analyse de la charge virale cellulaire ou encore pour l'analyse quantitative de l'expression d'un gène. Nous l'avons adapté pour l'analyse de l'ADN en PCR nichée afin de pouvoir estimer le nombre de cellules qui possèdent la t(14;18) dans les échantillons de patient atteint de LNH. Le développement de ce type de technique a plusieurs points critiques: la construction d'un CI, sa quantification et l'analyse de son efficacité d'amplification. De plus, nous avons voulu nous assurer de son acuité et de sa reproductibilité avant de l'utiliser pour l'analyse exhaustive des patients traités à l'hôpital Maisonneuve-Rosemont.

3.1.1. Construction du contrôle interne (CI)

Afin de discriminer sur gel les amplicons provenant du CI et de l'échantillon, certaines équipes construisent un CI et le modifient en ajoutant ou en éliminant un site de restriction par mutagénèse dirigée.¹³² Une digestion enzymatique doit donc précéder la détection sur gel. L'utilisation d'un CI, de taille identique au produit de PCR à quantifier, élimine l'influence de la taille des amplicons sur l'efficacité d'amplification. Mais, la digestion peut-être incomplète; il est donc nécessaire d'effectuer une correction lors de la quantification des produits de PCR.¹³⁵

La taille des amplicons de la t(14;18) varie légèrement d'un patient à l'autre, cette particularité est reliée à la nature du gène Ig H et aux mécanismes entourant la formation de la translocation.¹³⁶ Nous avons bénéficié de la nature de la t(14;18) dans l'élaboration d'une méthode de nQC-PCR, car nous avons développé une banque de CIs qui génèrent des amplicons

de taille variée et ce pour les deux types de translocation soit MBR et mcr. Nous utilisons un facteur de correction afin d'ajuster les variations engendrées par les différences de la taille des amplicons du CI et du patient.¹³²

En somme, cette stratégie facilite l'analyse des patients, car nous avons éliminé l'étape de la digestion avant la mise sur gel des réactions de PCR. La construction de plusieurs CI, nous permet d'éliminer toutes modifications subséquentes au clonage qui compliquent la mise au point de cette méthode. Nous avons donc créé un système de quantification simple et versatile où le choix du CI s'effectue en fonction de la taille de l'amplicon du patient, et ce avant l'essai de compétition.

La purification et la quantification des CI est une des difficultés majeures lors du développement de la méthode de PCR compétitive. La purification par un gradient de chlorure de césium s'est avérée essentielle afin d'éliminer toute trace d'ADN bactérien et d'oligoribonucléotides de l'ADN plasmidique. Effectivement, la dégradation de toute forme d'ARN entraîne une surestimation de la quantité de plasmide dans l'échantillon. La concentration d'ADN du vecteur est premièrement déterminée à l'aide du spectrophotomètre.¹³⁷ Par la suite, ces poids moléculaires, de l'ordre du μg , ont été convertie successivement en moles et en nombre de copies de la t(14;18). C'est sous cette forme, nombre de copies de la t(14;18)/ μl , que nous utilisons le vecteur recombinant comme CI. Ces mesures et ces calculs constituent une étape cruciale dans l'établissement de cette méthodologie, car une série de dilutions en dérivent. Ces différentes dilutions ont été effectuées à partir de ces solutions originales avec une méthodologie soignée et rigoureuse.

Il aurait été possible d'éviter l'utilisation d'un gradient de CICs afin de purifier l'ADN plasmidique, en recueillant l'ADN sur une membrane de

nitrocellulose lors de la migration sur gel d'agarose. D'autre part des techniques de quantification spécifique à l'ADN utilisant des flurochromes tel que le H33258 aurait permis une quantification précise malgré la présence de ces contaminants.¹³⁷ Mais, nous préférons travailler avec des solutions pures d'ADN plasmidique.

Par la suite, les dilutions de CI ont été analysées en PCR nichée et les patrons d'amplification ont été comparés à ceux obtenus avec des standards cellulaires. De façon similaire aux lignées cellulaires caractérisées par la t(14;18), le signal disparaît aux dilutions de CI représentant moins d'une copie de la t(14;18) par réaction. Bien qu'imprécises, ces premières observations nous confirmaient que les dilutions effectuées de CI correspondaient aux ordres de grandeur prévus.

Une analyse par PCR effectuée avec les couples d'amorces externes et internes utilisés séparément, nous a permis d'analyser si les clones sélectionnés étaient fonctionnels au cours des deux étapes de la PCR nichée. Comme les amorces externes reconnaissent les extrémités de l'insert, nous avons séquencé chaque clone afin de s'assurer qu'il n'y ait aucune perte de base lors du clonage. Il faut éviter la perte d'une paire de base qui pourrait réduire l'efficacité d'amplification.

3.1.2. L'analyse de cinétique

En effectuant ces études de cinétique, nous avons pu expérimenter l'emploi de la radioactivité afin de quantifier les produits de PCR. Il ne semble y avoir aucun avantage à utiliser des amorces kinasées et le P³². Comme l'utilisation d'autoradiogramme est moins efficace et que les temps d'exposition sont difficiles à standardiser, il est préférable de découper les amplicons sur gel et de les faire analyser à l'aide d'un compteur à scintillation. Cette procédure est

longue et difficile à exporter en clinique. De plus, l'utilisation du P^{32} ne nous permet pas d'augmenter les seuils de sensibilité atteints par la révélation au bromure d'éthidium. Ce système alourdit l'utilisation de cette technique, contrairement à la révélation sur gel via le bromure d'éthidium et l'utilisation d'un système de documentation de gel pour faire les analyses de densitométrie.

Une étude a démontré que le CI peut perdre jusqu'à 20% de son efficacité une fois mis en présence de l'ADN génomique. Un phénomène stérique pourrait en être la cause.¹³⁸ Nous avons effectué des essais de compétition simulés grâce à l'emploi de standards cellulaires qui nous permettaient d'analyser, non seulement ce phénomène, mais aussi l'acuité de notre nQC-PCR. Les essais de compétition avec les standards cellulaires nous permettent de simuler une quantification et de bien déterminer le comportement du CI et ce sur une vaste échelle de concentration.

3.1.3. Étude de coamplification

Vous pouvez consulter la figure 3 et les explications qui s'y rattachent dans la section 2. Dans l'ensemble, cette étude nous a permis de bien développer la procédure de quantification et d'établir des intervalles de concentration de CI à utiliser en fonction de chaque concentration établie par une PCR semi-quantitative. Ces données ont grandement simplifié la procédure de quantification des patients. De plus, grâce à ces standards cellulaires, nous pouvons vérifier périodiquement la précision des évaluations obtenus à l'aide de notre nQC-PCR.

3.1.4. Les analyses de reproductibilité

Les analyses de reproductibilité font partie des mises au point de méthodologies; elles sont, cependant, rarement décrites lors du développement de technique de PCR compétitive. En effet, cette méthode de quantification est probablement la plus fiable qui existe. Cependant, nous voulions

déterminer précisément la variabilité lors de l'évaluation afin de cerner les intervalles de confiance de notre méthode de PCR. Nous voulions avoir une marge d'erreur inférieure à un log afin de compléter la méthode de PCR semi-quantitative mise au point auparavant. Vous pouvez consulter les détails dans la figure 2 et les explications s'y rattachant dans la section 2.

Afin de simplifier la procédure, nous avons comparé des évaluations obtenues à partir de deux substrats différents: l'agarose et le polyacrylamide. L'emploi de gel de polyacrylamide semble nécessaire dans certains cas, afin de bien discriminer les deux types d'ADN. Néanmoins, l'utilisation de l'agarose est plus simple et plus rapide. Nous avons évalué cinq réactions de compétition effectuées entre MD6 et les standards cellulaires DHL-16 à partir des données obtenues par les deux substrats. La corrélation entre les 5 évaluations indépendamment du substrat utilisé était excellente (Figure 7). Ainsi, nous pouvons avoir recours à deux substrats différents lors de l'analyse des échantillons. Ce dernier point démontre la versatilité de la nQC-PCR et la reproductibilité que l'utilisation d'un CI peut procurer lors de l'évaluation des produits de PCR.

Nos résultats démontrent que l'utilisation d'un système de documentation de gel permet de simplifier la procédure de quantification, car il offre l'avantage de travailler en absence de radioactivité. Néanmoins, nous devons attribuer les faibles taux de variabilité à notre nQC-PCR, car sans CI, l'utilisation de ce système ne permet pas ces performances: le substrats de migration, les paramètres d'expositions du gel sont des facteurs qui, en temps normal, entraînent des variations énormes lors de l'évaluation de la quantité d'ADN sur gel. Comme les données qui résultent des analyses de

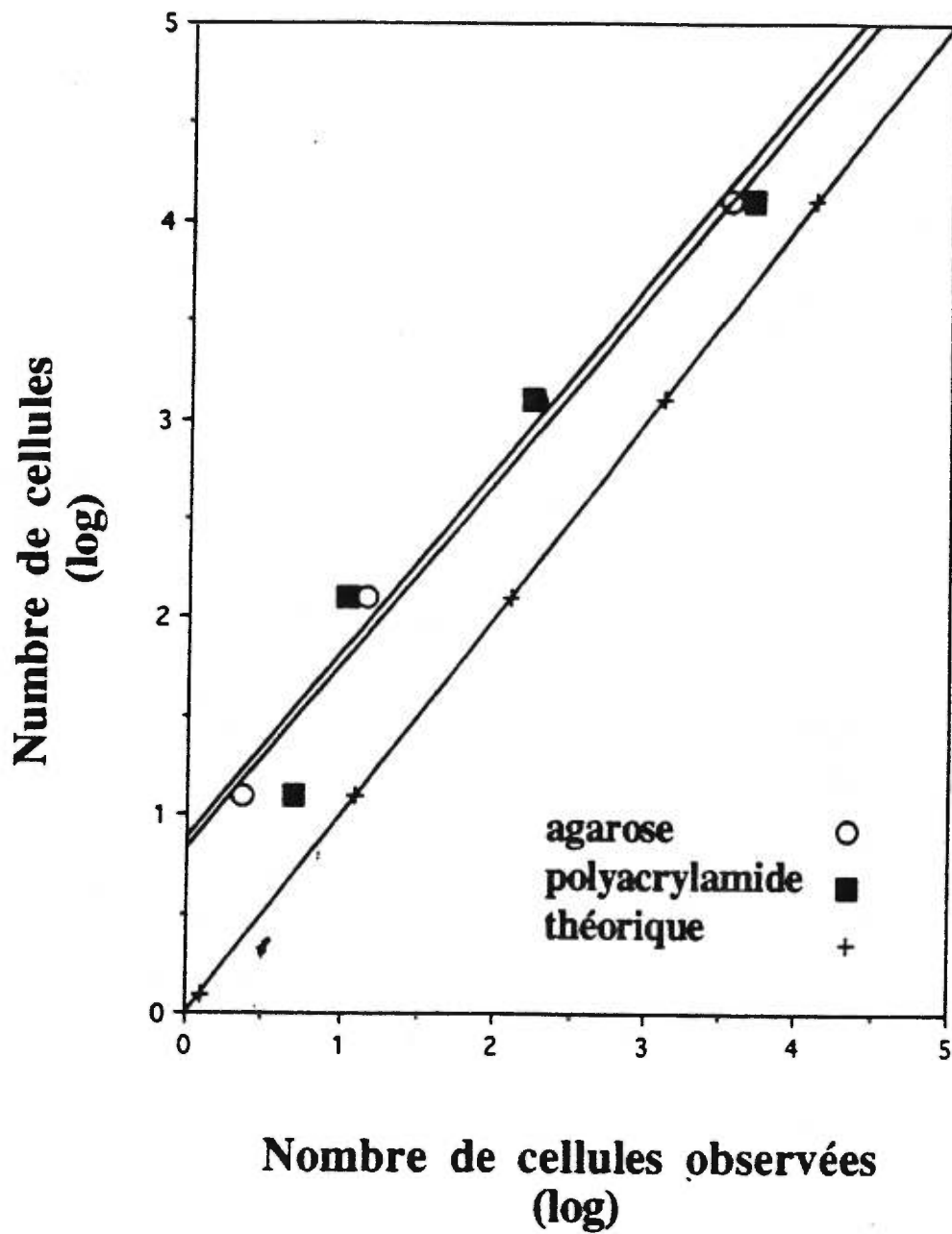
Figure 7: Analyse de la variabilité induite par l'utilisation de substrats de migration différents

Évaluation de divers standards cellulaires DHL-16 en compétition avec le CI MD6 sur un gel d'agarose 2% (O) et sur gel de polyacrylamide 6%- 7M urée (■). Ces droites d'identité sont confrontées avec la droite théorique. Les équations de ces trois régressions sont:

$$\text{Agarose: } y = 0.89 + 0.93x \quad r^2 = 0.99$$

$$\text{Polyacrylamide: } y = 0.83 + 0.92x \quad r^2 = 0.94$$

$$\text{Théorique : } y = 1.00x \quad r^2 = 1.00$$



densitométrie sont des ratios dérivant des deux amplicons, il est possible de comparer différentes expériences entre elles. La nQC-PCR s'avère, donc, être une méthode d'analyse facile d'application, reproductible et précise.

3.2. Analyse des patients atteints de LNH éligibles à la GCSP

3.2.1. Quantification des cellules ayant la t(14;18) dans le sang et la MO

Comme certaines études suggèrent que le sang est moins fréquemment infiltré que la MO et que les GCSP ne sont pas accompagnées de purge, nous voulions comparer les taux d'infiltration de cellules malignes dans le sang et dans la MO.^{6,7} Cette analyse était justifiée par une série d'études de PCR qualitatives démontrant que les fréquences d'infiltration étaient similaires pour le sang et la MO et que les greffons de CSP étaient contaminés par les cellules lymphomateuses.^{8-10,56,57}

De plus, il serait intéressant de démontrer que le sang reflète fidèlement la MMR, car l'utilisation du sang lors des suivis, plutôt que la MO, simplifie grandement l'analyse des patients en rémission. Il a même été soulevé que le sang permettrait de simplifier l'interprétation des données, en diminuant la variabilité engendrée par l'hétérogénéité de l'infiltration des cellules malignes de la MO.¹³⁹

Ainsi, des échantillons de sang et de MO prélevés simultanément chez 24 patients éligibles à la greffe autologue ont été évalués. Les résultats confirment que les fréquences d'échantillons PCR positifs sont les mêmes dans les deux cas, c'est-à-dire, que 83% des prélèvements de sang et 80% des prélèvements de MO sont PCR positifs. Dans un deuxième temps, grâce à la nQC-PCR qui permet une analyse quantitative, nous avons pu remarquer que les taux d'infiltration ont été faibles; ainsi 46% des patients ont des taux

d'infiltration inférieurs à 5 cellules sur un million de cellules. En somme, sans une méthode de PCR nichée, l'évaluation serait négative pour la majorité des patients. De plus, nous avons remarqué que les taux d'infiltration évalués dans la MO sont supérieurs à ceux du sang; quoique, ces différences sont légèrement supérieures à un log, elles sont significatives.

3.2.2. Comparaison des greffons de MO et de CSP

Il a été démontré à maintes reprises que les greffons employés pour les autogreffes étaient contaminés par des cellules lymphomateuses.^{1,8,35,36,44} Grâce à la nQC-PCR, il est maintenant possible d'évaluer les niveaux d'infiltration de cellules lymphomateuses dans un greffon. Nous avons donc comparé chez un même patient, la fréquence et les taux d'infiltration du greffon de MO et ceux du sang mobilisé. Nous confirmons que les greffons de CSP sont infiltrés à plus de 85%, ces fréquences sont similaires à ce que nous observons avec des greffons de MO. De plus, nous pouvons démontrer que les taux d'infiltration des greffons de MO et de CSP sont aussi similaires. Suggérant, ainsi, que l'emploi du sang mobilisé comme source de cellules souches ne diminue pas le nombre de cellules malignes infusées au patient lors de la greffe autologue. Aussi, ces données justifient le développement et l'emploi de techniques de purge; elles permettraient de jouir des avantages que procure la GCSP tout en minimisant les risques de rechute. Nous croyons, d'ailleurs, détenir un outil qui permettrait de déterminer l'efficacité *in vitro* comme *in vivo* de nouvelles stratégies de purge.

J'aimerais souligner que dans les analyses comparatives sang, sang mobilisé et MO, les taux d'infiltration étaient fort variables: ils s'échelonnaient entre 0 cellules sur un million à plus de 100000 cellules sur un million. Cette diversité ne facilite pas l'analyse des données. Devant ce phénomène, nous croyons qu'il est nécessaire d'effectuer des études avec un nombre élevé de patients

afin de faire des analyses statistiques plus exhaustives. Nous pourrions regrouper certaines histologies ou autre critères cliniques et tenter de déterminer la valeur pronostic de ce phénomène.

3.2.3. Signification biologique de la MMR et son rôle lors de la récurrence

Désormais, nous voulons évaluer l'efficacité de la GCSP et déterminer si nous pouvons prédire la rechute en effectuant un suivi des patients en rémission. Plusieurs études de PCR effectuées à ce sujet se contredisent et la majorité semble nier l'existence d'une corrélation entre la t(14;18) et le faible taux de SSM. Des études de culture *in vitro* et de PCR soutiennent que la présence de cellules lymphomateuses dans les greffons corréle avec les récurrences,^{1,7,35,37} alors que d'autres études moléculaires soutiennent le contraire.^{36,140,141} Ces contradictions peuvent s'expliquer par divers facteurs tels que les seuils de sensibilité, l'histologie des lymphomes analysés et le nombre de patients inclus dans ces études. Est-il surprenant de ne constater aucune corrélation entre la présence de cellules ayant la t(14;18) et la rechute, alors que les patients ont une période de SSM s'échelonnant sur une dizaine d'années? De plus, il faut tenir compte qu'une étude conventionnelle de PCR détecte la présence de cellules ayant la t(14;18); alors qu'une étude de PCR quantitative permettrait de déterminer si la population de cellules malignes reste stable, croit ou décroît en nombre dans le temps. De plus, grâce à la nQC-PCR, nous pouvons évaluer quantitativement l'expression de cette translocation en fonction de la SSM.

Chez les patients faiblement infiltrés, il est difficile de déterminer la signification biologique d'un échantillon PCR positif. Nous avons remarqué qu'il y a une bonne corrélation entre les événements cliniques et les analyses de PCR chez les patients hautement infiltrés; contrairement aux patients

faiblement infiltrés (données non-divulguées). Nous croyons que les seuils de sensibilité de la PCR nous permet de détecter des événements sporadiques sans signification réelle. En effet, une étude démontrait que 50% des échantillons de cellules B purifiées étaient détectables par PCR pour la $t(14;18)^{73}$. Cette étude ne remet pas en cause la validité d'un test de PCR nichée pour le diagnostic et le suivi des patients atteints de LNH, car ils évaluent plus d'un million de lymphocytes B pour chacun des donneurs sains; alors que nous analysons un million de cellules mononucléées soit 50 000 cellules B. Néanmoins, cette étude renforce l'hypothèse que la $t(14;18)$ serait un événement sporadique et précoce de la maladie.

De plus, les études de culture *in vitro* permettent de détecter des niveaux de contamination supérieurs à 0.01%, alors que nous pouvons détecter des niveaux d'infiltration allant jusqu'à 0.0001%.^{7,127} Les études de clonalité dénotent que 38% des greffons de MO sont infiltrés. Dans cette étude, nous avons observé que 30% des greffons de MO étaient infiltrés à des taux supérieurs de 100 cellules sur un million soit 0.01%. Est-il possible que le seuil où les patients s'acheminent inévitablement vers la rechute se situe entre ces deux extrêmes soit 0.01% et 0.0001%? Des analyses à long terme avec un échantillonnage plus nombreux, nous permettraient de répondre à cette question.

4. Conclusion

L'avènement de nouvelles voies thérapeutiques telles que les greffes autologues de MO et de CSP ont suscité beaucoup d'espoir en oncologie. Grâce à cette stratégie, il est possible d'augmenter les doses de chimiothérapie administrées aux patients. Cependant, il est difficile d'évaluer leur potentiel thérapeutique. Afin de faire le point sur l'efficacité réelle de la greffe autologue et de l'impact de la valeur pronostic de la t(14;18) ainsi que l'influence de l'infusion de cellules de LNH sur le devenir du patient, nous avons développé une méthode quantitative de PCR (nQC-PCR) basée sur la détection de cette translocation. Elle est un marqueur particulièrement intéressant, car elle est présente chez plus de 45% des patients atteints de LNH. De plus, le développement d'une nQC-PCR nous permet de bénéficier de la haute sensibilité, de la rapidité et de la spécificité de la PCR. L'élaboration de cette méthode fut longue et fastidieuse, cependant, elle s'est révélée comme étant une technologie non-isotopique facile à utiliser, d'une précision et d'une reproductibilité impressionnante.

Grâce à cette méthode, nous avons démontré que les échantillons de MO et de CSP étaient infiltrés par des taux similaires de cellules malignes. Par conséquent, le développement de méthodes de purge est nécessaire. Cette méthode pourrait, ainsi, être utilisée comme outil de détection précoce de la rechute, en effectuant un suivi de ces patients. De plus, nous pourrions l'employer au cours des traitements afin de personnaliser la procédure dans le but ultime de maximiser les chances de survie. D'ailleurs, nous possédons, désormais, un outil parfait pour évaluer plusieurs techniques de purge de MO ou de CSP telles que l'expansion des CSP, la sélection des cellules CD34 positives, sans oublier les techniques immunologiques et chimiques. Il est abominable, mais stimulant, de constater, à la fin d'une maîtrise, que la plus grande charge de travail concernant la nQC-PCR est encore à venir.

5. Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Dr Denis-Claude Roy pour m'avoir accepté dans son équipe de recherche. Je suis reconnaissante de la confiance et du support qu'il m'a témoigné aux cours de ces dernières années.

J'aimerais remercier Francis Héту pour m'avoir appris les trucs du métier, ainsi qu'à Anne Châteauneuf, Christiane Le Houillier et Marie-Hélène Lachapelle pour leurs conseils, leurs expertises ainsi que pour les services rendus.

Je voudrais souligner, particulièrement, la disponibilité de Chantal Baron, Sylvie Brochu et Martin Guimond, ainsi que les longues discussions fort utiles partagées avec eux.

Finalement, je remercie ma famille pour leur compréhension et leur soutien moral, ainsi que Robert pour sa patience, ses encouragements et son infime sagesse.

6. Bibliographie

1. Gribben JG, Freedman AS, Woo SD, Blake K, Shu RS, Freeman G, et al. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood* 1991; 78:3275-3280.
2. Brenner MK, Rill DR, Moen RC, Krance RA, Mirro JJ, Anderson WF, et al. Gene marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1993; 341:85-86.
3. Deisseroth AB, Zu Z, Claxton D, Hanania EG, Fu S, Ellerson D, et al. Genetic marking shows that Ph+ cells present in autologous transplants of chronic myelogenous leukemia (CML) contribute to relapse after autologous bone marrow in CML. *Blood* 1994; 83:3068-3076.
4. Roberts MM, To LB, Gillis D, Mundy J, Rawling C, Ng K, et al. Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12:469-475.
5. Scheduling S, Brugger W, Mertelsmann R, Kanz L. Peripheral blood stem cells: in vivo biology and therapeutic potential. *Stem Cells* 1994; 12 Suppl 1:203-210.
6. Gribben JG, Neuberg D, Barber M, Moore J, Pesek KW, Freedman AS, et al. Detection of residual lymphoma cells by polymerase chain reaction in peripheral blood is significantly less predictive for relapse than detection in bone marrow. *Blood* 1994; 83:3800-3807.
7. Sharp JG, Kessinger A, Mann S, Crouse DA, Armitage JO, Bierman P, et al. Outcome of high-dose therapy and autologous transplantation in non-Hodgkin's lymphoma based on the presence of tumor in the marrow or infused hematopoietic harvest. *J Clin Oncol* 1996; 14:214-219.

8. Negrin RS, Pesando J. Detection of tumor cells in purged bone marrow and peripheral-blood mononuclear cells by polymerase chain reaction amplification of bcl-2 translocations. *J Clin Oncol* 1994; 12:1021-1027.
9. Yuan R, Dowling P, Zucca E, Diggelmann H, Cavalli F. Detection of bcl-2/JH rearrangement in follicular and diffuse lymphoma: concordant results of peripheral blood and bone marrow analysis at diagnosis. *Br J Cancer* 1993; 67:922-925.
10. Berinstein NL, Jamal HH, Kuzniar B, Klock RJ, Reis MD. Sensitive and reproducible detection of occult disease in patients with follicular lymphoma by PCR amplification of t(14; 18) both pre- and post-treatment. *Leukemia* 1993; 7:113-119.
11. Aisenberg AC. Coherent view of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1995; 13:2656-2675.
12. Gloeckler Ries. Non-Hodgkin's lymphoma cancer statistics review 1973-1989. 278th ed. Bethesda: 1992.
13. Devesa SS, Fears T. Non-Hodgkin's lymphoma time trends: United States and international data. *Cancer Res* 1992; 52:5432s-5440s.
14. Gail MH, Pluda JM, Rabkin CS, Biggar RJ, Goedert JJ, Horm JW, et al. Projections of the incidence of non-Hodgkin's lymphoma related to acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83:695-701.
15. Douay L, Mary JY, Giarratana MC, Najman A, Gorin NC. Establishment of a reliable experimental procedure for bone marrow purging with mafosfamide (ASTA Z 7557). *Exp Hematol* 1989; 17:429-432.
16. Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelenyi G, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* 1988; 1:292-293.
17. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: *Blood* 1994; 84:1361-1392.

18. Gaidano G, Pastore C, Volpe G. Molecular pathogenesis of non-Hodgkin lymphoma: a clinical. *Haematologica* 1995; 80:454-472.
19. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay MF, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1996; 87:265-272.
20. Bierman PJ, Armitage JO. Non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Hematol* 1996; 3:266-272.
21. Bonadonna G. Lymphoma. *Current Opinion in Oncology* 1995; 7:399-400.
22. Bierman PJ, Armitage JO. Autologous Bone Marrow Transplantation for Non-Hodgkin's Lymphoma. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, editors. *Bone marrow transplantation*. Boston: Blackwell scientific publications, 1994:683-708.
23. Johnson PW, Rohatiner AZ, Whelan JS, Price CG, Love S, Lim J, et al. Patterns of survival in patients with recurrent follicular lymphoma: a 20-year study from a single center. *J Clin Oncol* 1995; 13:140-147.
24. Anonymous. A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma: The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med* 1993; 329:987-994.
25. Levine EG, Arthur DC, Frizzera G, Peterson BA, Hurd DD, Bloomfield CD. There are differences in cytogenetic abnormalities among histologic subtypes of the non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1985; 66:1414-1422.
26. Weiss LM, Warnke RA, Sklar J, Cleary ML. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 1987; 317:1185-1189.
27. Yunis JJ, Prakash O. The origin of man: a chromosomal pictorial legacy. *Science* 1982; 215:1525-1530.

28. Lukes RJ, Collins RD, Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Immunologic characterization of human malignant lymphomas Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Cancer British Journal of Cancer* 1972; 26:239-257.
29. Rohatiner A, Lister TA. Management of follicular lymphoma. *Current Opinion in Oncology* 1994; 6:473-479.
30. Vose JM, Bierman PJ, Weisenburger DD, Armitage JO. The therapy of non-Hodgkin's lymphomas. Introduction and overview. *Hematology-Oncology Clinics of North America* 1991; 5:845-852.
31. Silingardi V, Federico M, Cavanna L, Avanzini P, Gobbi PG, Lombardo M, et al. ProMECE-CytaBOM vs MACOP-B in advanced aggressive non-Hodgkin's. *Leuk Lymphoma* 1995; 17:313-320.
32. Mazza P, Zinzani PL, Martelli M, Fiacchini M, Bocchia M, Pileri S, et al. MACOP-B vs F-MACHOP regimen in the treatment of high-grade. *Leuk Lymphoma* 1995; 16:457-463.
33. Frei E, Canellos GP. Dose: a critical factor in cancer chemotherapy. *Am J Med* 1980; 69:585-594.
34. Clifford P, Clift RA, Duff JK. Nitrogen-mustard therapy combined with autologous marrow infusion. *Lancet* 1961; 1:687-690.
35. Gribben JG, Neuberg D, Freedman AS, Gimmi CD, Pesek KW, Barber M, et al. Detection by polymerase chain reaction of residual cells with the bcl-2 translocation is associated with increased risk of relapse after autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *Blood* 1993; 81:3449-3457.
36. Johnson PW, Price CG, Smith T, Cotter FE, Meerabux J, Rohatiner AZ, et al. Detection of cells bearing the t(14;18) translocation following myeloablative treatment and autologous bone marrow transplantation for follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1994; 12:798-805.
37. Sharp JG, Joshi SS, Armitage JO, Bierman P, Coccia PF, Harrington DS, et al. Significance of detection of occult non-Hodgkin's lymphoma in histologically uninvolved bone marrow by a culture technique. *Blood* 1992; 79:1074-1080.

38. Champlin R. Optimizing the composition of bone marrow for allogeneic transplantation. *J Hematother* 1995; 4:53-60.
39. Sharkis SJ, Santos GW, Colvin M. Elimination of acute myelogenous leukemic cells from marrow and tumor suspensions in the rat with 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Blood* 1980; 55:521-523.
40. Rowley SD, Jones RJ, Piantadosi S, Braine HG, Colvin OM, Davis J, et al. Efficacy of ex vivo purging for autologous bone marrow transplantation in the treatment of acute nonlymphoblastic leukemia. *Blood* 1989; 74:501-506.
41. Coulombel L, Kalousek DK, Eaves CJ, Gupta CM, Eaves AC. Long-term marrow culture reveals chromosomally normal hematopoietic progenitor cells in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 1983; 308:1493-1498.
42. Chang J, Morgenstern GR, Coutinho LH, Scarffe JH, Carr T, Deakin DP, et al. The use of bone marrow cells grown in long-term culture for autologous bone marrow transplantation in acute myeloid leukaemia: an update. *Bone Marrow Transplant* 1989; 4:5-9.
43. Widmer L, Pichert G, Jost LM, Stahel RA: Fate of contaminating t(14; 18)+ lymphoma cells during ex vivo expansion of CD34-selected hematopoietic progenitor cells. *Blood* 88:3166, 1996
44. Gribben JG, Freedman AS, Neuberger D, Roy DC, Blake KW, Woo SD, et al. Immunologic purging of marrow assessed by PCR before autologous bone marrow transplantation for B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1991; 325:1525-1533.
45. Roy DC, Felix M, Cannady WG, Cannistra S, Ritz J. Comparative activities of rabbit complements of different ages using an in-vitro marrow purging model. *Leukemia Res* 1990; 14:407-416.

46. Roy DC, Perreault C, Bélanger R, Gyger M, Le Houillier C, Blättler WA, et al. Elimination of B-lineage leukemia and lymphoma cells from bone marrow grafts using anti-B4-blocked-ricin immunotoxin. *J Clin Immunol* 1995; 15:51-57.
47. Rizzoli V, Carlo-Stella C. Stem cell purging: an intriguing dilemma. [Review]. *Exp Hematol* 1995; 23:296-302.
48. Philip T, Armitage JO, Spitzer G, Chauvin F, Jagannath S, Cahn JY, et al. High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1987; 316:1493-1498.
49. Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995; 333:1540-1545.
50. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Weisenburger DD. Reconstitution of human hematopoietic function with autologous cryopreserved circulating stem cells. *Exp Hematol* 1986; 14:192-196.
51. Peters WP, Rosner G, Ross M, Vredenburgh J, Meisenberg B, Gilbert C, et al. Comparative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. *Blood* 1993; 81:1709-1719.
52. Haas R, Ehrhardt R, Witt B, Goldschmidt H, Hohaus S, Pforsich M, et al. Autografting with peripheral blood stem cells mobilized by sequential interleukin-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor following high-dose chemotherapy in non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1993; 12:643-649.
53. Brandt SJ, Peters WP, Atwater SK, Kurtzberg J, Borowitz MJ, Jones RB, et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1988; 318:869-876.

54. Henon PR, Liang H, Beck-Wirth G, Eisenmann JC, Lepers M, Wunder E, et al. Comparison of hematopoietic and immune recovery after autologous bone marrow or blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant* 1992; 9:285-291.
55. Lange B, Ferrero D, Pessano S, Palumbo A, Faust J, Meo P, et al. Surface phenotype of clonogenic cells in acute myeloid leukemia defined by monoclonal antibodies. *Blood* 1984; 64:693-700.
56. Haas R, Mohle R, Fruhauf S, Goldschmidt H, Witt B, Flentje M, et al. Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma. *Blood* 1994; 83:3787-3794.
57. McCann JC, Kanteti R, Shilepsky B, Miller KB, Sweet M, Schenkein DP. High degree of occult tumor contamination in bone marrow and peripheral blood stem cells of patients undergoing autologous transplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Blood & Marrow Transplant* 1996; 2:37-43.
58. Brugger W, Bross KJ, Glatt M, Weber F, Mertelsmann R, Kanz L. Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors. *Blood* 1994; 83:636-640.
59. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ. Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 1992; 10:936-941.
60. Moss TJ, Cairo M, Santana VM, Weinthal J, Hurvitz C, Bostrom B. Clonogenicity of circulating neuroblastoma cells: implications regarding peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 1994; 83:3085-3089.
61. Rabbitts TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372:143-149.
62. Offit k, Chaganti RSK. Chromosomal Aberrations Non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical correlations. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 1991; 5:853-869.
63. Croce CM. Molecular biology of lymphomas. *Semin Oncol* 1993; 20:31-46.

64. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME, Ensrud KM, Howe RR, Theologides A. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1982; 307:1231-1236.
65. Reid AH, Cunningham RE, Fizzera G, O'Leary TJ. *bcl-2* Rearrangement in Hodgkin's disease. *American Journal of Pathology* 1993; 142:395-401.
66. Stetler-Stevenson M, Crush-Stanton S, Cossman J. Involvement of the *bcl-2* gene in Hodgkin's disease. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:855-858.
67. Ngan BY, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML. Expression in non-Hodgkin's lymphoma of the *bcl-2* protein associated with the t(14;18) chromosomal translocation. *N Engl J Med* 1988; 318:1638-1644.
68. Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, et al. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* 1985; 41:899-906.
69. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984; 226:1097-1099.
70. Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82:7439-7443.
71. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* 1985; 229:1390-1393.
72. Gauwerky CE, Hoxie J, Nowell PC, Croce CM. Pre-B-cell leukemia with a t(8; 14) and a t(14; 18) translocation is preceded by follicular lymphoma. *Oncogene* 1988; 2:431-435.

73. Limpens J, Stad R, Vos C, de Vlaam C, de Jong D, van Ommen GJ, et al. Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals. *Blood* 1995; 85:2528-2536.
74. Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young BD, van Ommen GJ, et al. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 1991; 6:2271-2276.
75. Richardson ME, Chen QG, Filippa DA, Offit K, Hampton A, Koduru PR, et al. Intermediate- to high-grade histology of lymphomas carrying t(14; 18) is associated with additional nonrandom chromosome changes. *Blood* 1987; 70:444-447.
76. Yunis JJ, Mayer MG, Arnesen MA, Aeppli DP, Oken MM, Frizzera G. bcl-2 and other genomic alterations in the prognosis of large-cell lymphoma. *N Engl J Med* 1989; 320:1047-1054.
77. McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, et al. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 1989; 57:79-88.
78. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 1991; 349:254-256.
79. Cory S. Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation. *Advances in Cancer Research* 1986; 47:189-234.
80. Langdon WY, Harris AW, Cory S, Adams JM. The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice. *Cell* 1986; 47:11-18.
81. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335:440-442.
82. Lee JT, Innes DJ, Jr., Williams ME. Sequential bcl-2 and c-myc oncogene rearrangements associated with the clinical transformation of non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Invest* 1989; 84:1454-1459.

83. de Jong D, Voetdijk BM, Beverstock GC, van Ommen GJ, Willemze R, Kluin PM. Activation of the c-myc oncogene in a precursor-B-cell blast crisis of follicular lymphoma, presenting as composite lymphoma. *N Engl J Med* 1988; 318:1373-1378.
84. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
85. Tsujimoto Y, Croce CM. Analysis of the structure, transcripts, and protein products of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:5214-5218.
86. Campana D, Coustan-Smith E, Manabe A, Buschle M, Raimondi SC, Behm FG, et al. Prolonged survival of B-lineage acute lymphoblastic leukemia cells is accompanied by overexpression of bcl-2 protein. *Blood* 1993; 81:1025-1031.
87. Graninger WB, Seto M, Boutain B, Goldman P, Korsmeyer SJ. Expression of Bcl-2 and Bcl-2-Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J Clin Invest* 1987; 80:1512-1515.
88. Gurfinkel N, Unger T, Givol D, Mushinski JF. Expression of the bcl-2 gene in mouse B lymphocytic cell lines is differentiation stage specific. *Eur J Immunol* 1987; 17:567-570.
89. Reed JC, Tsujimoto Y, Alpers JD, Croce CM, Nowell PC. Regulation of bcl-2 proto-oncogene expression during normal human lymphocyte proliferation. *Science* 1987; 236:1295-1299.
90. Miyazaki T, Liu ZJ, Kawahara A, Minami Y, Yamada K, Tsujimoto Y, et al. Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell* 1995; 81:223-231.
91. Hockenbery D, Nunez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 1990; 348:334-336.
92. Chen-Levy Z, Nourse J, Cleary ML. The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and

lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Molecular & Cellular Biology* 1989; 9:701-710.

93. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 1993; 361:365-369.

94. Monaghan P, Robertson D, Amos TA, Dyer MJ, Mason DY, Greaves MF. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1992; 40:1819-1825.

95. Nguyen M, Branton PE, Walton PA, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ, Shore GC. Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. *J Biol Chem* 1994; 269:16521-16524.

96. Hengartner MO, Horvitz HR. Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Current Opinion in Genetics & Development* 1994; 4:581-586.

97. Tsujimoto Y. Stress-resistance conferred by high level of bcl-2 alpha protein in human B lymphoblastoid cell. *Oncogene* 1989; 4:1331-1336.

98. Nunez G, London L, Hockenbery D, Alexander M, McKearn JP, Korsmeyer SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol* 1990; 144:3602-3610.

99. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:6961-6965.

100. Sentman CL, Shutter JR, Hockenbery D, Kanagawa O, Korsmeyer SJ. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell* 1991; 67:879-888.

101. Walton MI, Whyson D, O'Connor PM, Hockenbery D, Korsmeyer SJ, Kohn KW. Constitutive expression of human Bcl-2 modulates nitrogen mustard and camptothecin induced apoptosis. *Cancer Res* 1993; 53:1853-1861.

102. Miyashita T, Reed JC. Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line. *Blood* 1993; 81:151-157.
103. Garcia I, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science* 1992; 258:302-304.
104. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 1993; 75:229-240.
105. Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Shinkai Y, Louie MC, Fields LE, et al. Disappearance of the lymphoid system in Bcl-2 homozygous mutant chimeric mice. *Science* 1993; 261:1584-1588.
106. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993; 75:241-251.
107. Kahn A. BCL-2 inhibe-t-il l'apoptose en s'opposant à l'action des radicaux oxygènes? *médecine/sciences* 1994; 10 #2:208-209.
108. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO Journal* 1994; 13:1899-1910.
109. Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature* 1995; 374:811-813.
110. Fernandez-Sarabia MJ, Bischoff JR. Bcl-2 associates with the ras-related protein R-ras p23. *Nature* 1993; 366:274-275.
111. Pezzella F, Tse AG, Cordell JL, Pulford KA, Gatter KC, Mason DY. Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation. *American Journal of Pathology* 1990; 137:225-232.
112. Gaulard P, d'Agay MF, Peuchmaur M, Brousse N, Gisselbrecht C, Solal-Celigny P, et al. Expression of the bcl-2 gene product in follicular lymphoma. *American Journal of Pathology* 1992; 140:1089-1095.

113. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ. Immunolocalization of the Bcl-2 protein within hematopoietic neoplasms. *Blood* 1991; 78:1062-1068.
114. Pezzella F, Morrison H, Jones M, Gatter KC, Lane D, Harris AL, et al. Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 1993; 22:39-44.
115. Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, et al. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bcl-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *American Journal of Pathology* 1993; 143:390-400.
116. Charlotte F, L'Hermine A, Martin N, Geleyn Y, Nollet M, Gaulard P, et al. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *American Journal of Pathology* 1994; 144:460-465.
117. Lambrechts AC, Looijenga LH, van't Veer MB, van Echten J, Timens W, Oosterhuis JW. Lymphomas with testicular localisation show a consistent BCL-2 expression without a translocation (14;18): a molecular and immunohistochemical study. *Br J Cancer* 1995; 71:73-77.
118. Nguyen PL, Zukerberg LR, Benedict WF, Harris NL. Immunohistochemical detection of p53, bcl-2, and retinoblastoma proteins in follicular lymphoma. *American Journal of Clinical Pathology* 1996; 105:538-543.
119. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood* 1993; 81:3091-3096.
120. Dole M, Nunez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, et al. Bcl-2 inhibits chemotherapy-induced apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 1994; 54:3253-3259.
121. Dole MG, Jasty R, Cooper MJ, Thompson CB, Nunez G, Castle VP. Bcl-xL is expressed in neuroblastoma cells and modulates chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1995; 55:2576-2582.

122. Minn AJ, Rudin CM, Boise LH, Thompson CB. Expression of bcl-xL can confer a multidrug resistance phenotype. *Blood* 1995; 86:1903-1910.
123. Lyons J. The polymerase chain reaction and cancer diagnostics. *Cancer* 1992; 69:1527-1531.
124. Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:9717-9721.
125. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques* 1992; 13:444-449.
126. Lu W, Andrieu JM. Early identification of human immunodeficiency virus-infected asymptomatic subjects susceptible to zidovudine by quantitative viral coculture and reverse transcription-linked polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases* 1993; 167:1014-1020.
127. Hetu F, Coutlee F, Roy DC. A non-isotopic nested polymerase chain reaction method to quantitate minimal residual disease in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Mol Cell Probes* 1994; 8:449-457.
128. Kinoshita T, Imamura J, Nagai H, Shimotohno K. Quantification of gene expression over a wide range by the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 1992; 206:231-235.
129. Murphy LD, Herzog CE, Rudick JB, Fojo AT, Bates SE. Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of *mdr-1* gene expression. *Biochemistry* 1990; 29:10351-10356.
130. Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, et al. Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:7160-7164.
131. Becker-Andre M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Research* 1989; 17:9437-9446.

132. Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:2725-2729.
133. Gilliland G, Perrin S, Bunn HF. Competitive PCR for quantification of mRNA. In: *Anonymous PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. 1990:60-69.
134. Vandenbunder B. Repenser les oncogènes en 1995? *mÄdecine/sciences* 1995; 11 #10:1465-1470.
135. Apostolakos MJ, Schuermann WH, Frampton MW, Utell MJ, Willey JC. Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 1993; 213:277-284.
136. Eick S, Krieger G, Bolz I, Kneba M. Sequence analysis of amplified t(14;18) chromosomal breakpoints in B- cell lymphomas. *Journal Pathology* 1990; 162:127-133.
137. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
138. Boivin G, Olson CA, Quirk MR, St-Cyr SM, Jordan MC. Quantitation of human cytomegalovirus glycoprotein H gene in cells using competitive PCR and a rapid fluorescence-based detection system. *Journal of Virological Methods* 1995; 51:329-342.
139. Lambrechts AC, de Rooter PE, Dorssers LC, van 't Veer MB. Detection of residual disease in translocation (14;18) positive non-Hodgkin's lymphoma, using the polymerase chain reaction: a comparison with conventional staging methods. *Leukemia* 1992; 6:29-34.
140. Lambrechts AC, Hupkes PE, Dorssers LC, van't Veer MB. Clinical significance of t(14; 18)-positive cells in the circulation of patients with stage III or IV follicular non-Hodgkin's lymphoma during first remission. *J Clin Oncol* 1994; 12:1541-1546.
141. Price CG, Meerabux J, Murtagh S, Cotter FE, Rohatiner AZ, Young BD, et al. The significance of circulating cells carrying t(14;18) in long remission from follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 1991; 9:1527-1532.