

Université de Montréal

Intérêt de l'identification d'une population monoclonale pour le diagnostic et la  
relance des  
patients avec infiltrats cutanés à cellules T

par

Katarzyna Dadej  
Département de Pathologie et Biologie Cellulaire  
Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Biopathologie cellulaire

Octobre, 1999

©Katarzyna Dadej, 1999



W  
4  
U58  
2000  
V.052



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Intérêt de l'identification d'une population monoclonale pour le diagnostic et la  
relance des patients avec infiltrats cutanés à cellules T

présenté par:  
Katarzyna Dadej

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président - rapporteur: Mark Basik  
Directeur de recherche: Louis Gaboury  
Codirecteurs: Izabella Gòrska-Flipot et Louis Lamarre  
Membre du jury: Michel Trudel

Mémoire accepté le:.....

## SOMMAIRE

Le diagnostic de lymphome cutané à cellules T (L.C.T.) est difficile à poser particulièrement pour les lésions de la peau qui se composent d'infiltrats lymphoïdes qualifiés d'atypiques ou de *borderline*. La dénomination *borderline* possède plusieurs acceptions ce qui précisément en complique l'usage: tantôt, elle désigne un infiltrat de cellules lymphocytaires légèrement anormales pour la taille ou la forme; tantôt, on l'utilise plutôt pour rendre compte de l'expression aberrante de marqueurs de différenciation lymphocytaire; dans d'autres cas encore, elle sert d'épithète pour désigner un infiltrat lymphocytaire dense qui ne possède pas par ailleurs toutes les caractéristiques nécessaires pour porter le diagnostic de néoplasie maligne. Dans le contexte étroit de telles lésions, l'identification d'une population monoclonale de lymphocytes T pourrait constituer un argument décisif en faveur de la nature néoplasique du processus. Néanmoins, la signification clinique que l'on doit donner à une population lymphocytaire T monoclonale fait encore l'objet de controverse tant il est vrai que l'on a démontré la nature clonale de certaines lésions lymphoïdes généralement considérées bénignes. Seul un suivi étroit et suffisamment prolongé portant à la fois sur l'évolution clinique et le génotype des populations lymphocytaires T permettra d'en préciser, à terme, la valeur.

Cette étude a pour but d'évaluer le risque de développement ultérieur d'un lymphome et les conséquences au plan clinique qui pourraient résulter de la mise en évidence d'une population lymphocytaire T monoclonale chez les patients atteints d'infiltrats lymphoïdes atypiques de la peau.

Pour ce faire, nous avons d'abord voulu vérifier la sensibilité et la spécificité de la technique PCR pour l'identification des populations monoclonales T en examinant les réarrangements spécifiques des gènes codant pour les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur antigénique des cellules T. À cet égard, nous avons analysé les populations lymphocytaires présentes dans 47

échantillons de L.C.T. contrôles et dans 25 lésions d'autre nature, c'est-à-dire des lésions n'appartenant pas au groupe des processus lymphoprolifératifs. Nous avons ensuite examiné rétrospectivement 8 patients atteints de L.C.T. et 3 patients suivis pour des lésions récidivantes de la peau de nature réactionnelle. Pour ce faire, nous avons employé, outre la technique PCR, le buvardage de Southern pour rechercher les populations lymphocytaires T monoclonales. Les résultats de l'examen génotypique ont ensuite été comparés aux données histologiques et cliniques de ces patients.

La réaction de PCR a permis de retrouver une population T monoclonale chez 72% des L.C.T. contrôles et n'a montré aucun résultat faux-positif. Chez les 8 patients avec L.C.T., on a pu confirmer la présence du même clone T spécifique pour chaque individu dans 28/32 des lésions appartenant au groupe des lésions malignes et dans 26/33 des infiltrats dits atypiques et ce, en dépit de l'aspect histologique souvent très variable des lésions. Quatre (4) patients ayant un infiltrat cutané atypique clonal ont développé un lymphome cutané T dans les mois ou les années qui ont suivi le diagnostic. En revanche, pour les 3 patients ayant des lésions cutanées non lymphomateuses, dans aucun des 36 prélèvements étudiés, il n'a pas été possible de mettre en évidence une population lymphocytaire T monoclonale, ni par la technique de PCR, ni par la technique de Southern.

Contrairement aux résultats des études antérieures concernant la valeur clinique de clonalité T dans les infiltrats lymphoïdes atypiques de la peau, nos résultats semblent indiquer que, à tout le moins pour la population que nous avons étudiée, la clonalité lymphocytaire T est étroitement liée au développement ultérieur d'un lymphome et partant qu'elle constitue un facteur de mauvais pronostic. Quant aux populations lymphocytaires polyclonales retrouvées régulièrement chez patients sans L.C.T., elles témoignent de l'utilité et de la spécificité du clone T comme marqueur tumoral. Enfin, le système de détection PCR s'avère fiable non seulement pour le diagnostic mais aussi pour le suivi des L.C.T. à un stade précoce.

## TABLE DES MATIÈRES

<i>Identification du jury</i> .....	<i>i</i>
<i>Sommaire</i> .....	<i>ii</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>iv</i>
<i>Liste des figures</i> .....	<i>vi</i>
<i>Liste des tableaux</i> .....	<i>vii</i>
1. Introduction.....	1
1.1. Classification des infiltrats lymphoïdes cutanés .....	2
1.2. Lymphomes cutanés .....	3
1.3. Pathogénie des lymphomes cutanés .....	4
1.3.1. Pathogénie des lymphomes cutanés à cellules T .....	5
1.3.2. Pathogénie des lymphomes cutanés à cellules B .....	6
1.3.3. Gène p53 .....	7
1.4. Marqueurs de clonalité des lymphomes cutanés .....	8
1.4.1. Inactivation d'un chromosome X .....	9
1.4.2. Immunoglobulines monotypiques.....	12
1.4.3. Réarrangements chromosomiques et intégration virale .....	13
1.4.4. Réarrangements des gènes des récepteurs antigéniques .....	14
1.4.4.1. Structure moléculaire des récepteurs antigéniques .....	15
1.4.4.2. Réarrangement génique .....	16
1.4.4.3. Buvardage de Southern .....	21
1.4.4.4. Amplification élective des acides nucléiques (PCR).....	23
1.4.4.4.1. Systèmes de PCR pour détecter la clonalité T .....	26
1.4.4.4.2. Systèmes de PCR pour détecter la clonalité B .....	30

1.5. Hypothèse.....	31
2. Article.....	33
3. Discussion .....	68
4. Conclusion.....	75
5. Bibliographie .....	77
<i>Remerciements</i> .....	<i>viii</i>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Réarrangement du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines au cours de la différenciation lymphocytaire B.....	17
Figure 2: Réarrangement du gène gamma du récepteur des cellules T au cours de la différenciation des lymphocytes T .....	18
Figure 3: Résultat positif et négatif de la réaction PCR-RCT .....	25

### Figures comprises dans l'article

Figure 1: PCR detection of monoclonal T-cell populations in the majority of malignant (M), benign (B) and borderline (BL) skin lesions of mycosis fungoides patient no.2.....	65
Figure 2: Detection of monoclonal T-cell populations by Southern blot analysis in initial borderline (BL) and subsequent malignant (M) and benign (B) lesions of mycosis fungoides patient no.4.....	66
Figure 3: PCR detection of polyclonal T-cell populations in all borderline (BL) and benign (B) lesions of non-progressing patient no.10.....	67



## LISTE DES TABLEAUX

### Tableaux compris dans l'article

Table I: Efficiency of detection of TCR gene rearrangements in T-cell skin lymphoma by PCR .....	60
Table II: Clinical, histological and molecular follow-up of patients with CTCL.....	61
Table III: Clinical, histological and molecular follow-up of patients without CTCL... .....	63
Table IV: Presence of monoclonal T-lymphocyte populations in borderline lesions of patients with and without CTCL .....	64

**CHAPITRE # 1**  
**INTRODUCTION**

### 1.1. Classification des infiltrats lymphoïdes cutanés

Les infiltrats cutanés lymphoïdes sont très polymorphes. Ils constituent un large spectre de lésions allant d'une banale réaction d'hypersensibilité à de véritables processus lymphomateux. Alors que les affections situées aux deux extrémités du spectre peuvent être facilement rangées dans le groupe des lésions bénignes ou malignes, il existe un 3<sup>e</sup> groupe de lésions au devenir incertain, localisé à l'interface des deux premiers et comprenant des lésions que l'on a convenu de désigner par la dénomination *borderline* (B.L.). L'existence même du terme *borderline* est né des difficultés inhérentes à porter un diagnostic de malignité ou de bénignité en se fondant principalement sur des critères histologiques qui peuvent être ou ne pas être présents dans une lésion donnée. En effet, si l'épidermotropisme, les atypies lymphocytaires ou le monomorphisme demeurent des critères morphologiques d'appui très utiles pour le diagnostic de lymphome cutané à cellules T, il faut reconnaître que chacun de ces paramètres peut aussi s'observer dans certaines affections bénignes, et notamment l'allergie de contact, la toxidermie ou l'actinoréticulose. À l'inverse, les signes morphologiques accompagnant généralement les lésions cutanées de nature réactionnelle comme la spongiose, la nécrose des kératinocytes, l'œdème papillaire ou la lichénification peuvent être présents dans certaines formes de lymphomes cutanés (Wechsler 1992; Willemze *et al*, 1997; Bagot 1993).

Les mêmes réserves doivent aussi être exprimées pour l'examen immunohistochimique; en effet, si la disparition ou l'expression aberrante de certains marqueurs de différenciation lymphocytaire aident à formuler le diagnostic de lymphome de la peau, il faut aussi savoir que ces changements immunophénotypiques ne sont ni entièrement sensibles ni spécifiques. Quoiqu'il en soit, les techniques immunohistochimiques permettent tout de même l'identification du phénotype B ou T des populations lymphocytaires dans un infiltrat cutané quelqu'en soit la nature c'est-à-dire bénin, malin ou *borderline* (Finn *et al*, 1996; Gorguet *et al*, 1992; Cerroni et Kerl, 1994).

À ceci s'ajoute la difficulté d'établir un pronostic vital chez un patient donné sachant qu'une même «étiquette diagnostique» peut se retrouver dans le contexte d'une maladie cutanée ayant tantôt une évolution favorable et typique des maladies de nature réactionnelle tantôt une évolution rapide et péjorative. L'exemple classique d'une telle maladie est la papulose lymphomatoïde où l'on note que de 10 à 15% des patients ont une évolution associée à un processus lymphomateux (Kempf *et al*, 1999; Chott *et al*, 1996). Par ailleurs, puisque les infiltrats cutanés lymphoïdes sont des lésions fréquentes, il arrive que lors de l'évolution d'un lymphome de la peau, on observe chez un même patient de multiples lésions à des sites différents, et que seulement quelques-unes d'entre elles soient diagnostiquées d'une lésion maligne, les autres étant bénignes ou difficilement classifiables.

Pour porter un diagnostic tissulaire correct et pour établir un pronostic vital pertinent, il y aurait un intérêt évident pour le pathologiste à disposer de nouveaux outils incluant des techniques de biologie moléculaire permettant de rechercher une population lymphocytaire monoclonale. À priori, les lésions lymphoïdes B.L. de la peau pourraient être les premières à bénéficier d'une telle approche.

## **1.2. Lymphomes cutanés**

Le diagnostic de lymphome cutané (L.C.) repose sur l'analyse détaillée d'un ensemble de critères: cliniques, histologiques, immunohistochimiques ou autres. Ce n'est que dans l'éventualité où un nombre suffisant de critères se trouvent réunis que l'on peut l'employer avec assurance.

Quatre classifications histo-pronostiques des lymphomes non Hodgkiniens ont été élaborées au cours des 25 dernières années. Il s'agit de la classification de Kiel modifiée, la *Working formulation*, la *REAL* classification et plus

récemment la classification *EORTC* qui ne concerne que les lymphomes de la peau (Willemze *et al*, 1997).

D'après la classification *EORTC*, les L.C. se répartissent en deux groupes principaux selon qu'ils sont primitifs à la peau ou qu'ils résultent de l'extension d'un lymphome à point de départ ganglionnaire. Cette distinction est fondamentale, car le pronostic et le traitement sont différents, même si les lymphocytes tumoraux sont semblables. Les L.C. primitifs constituent le second groupe le plus fréquent parmi les lymphomes non Hodgkiniens extra ganglionnaires et leur incidence annuelle est estimée entre 0.5 et 1/100.000 (Kempf *et al*, 1999). L'atteinte cutanée secondaire par un lymphome à point de départ ganglionnaire contribue généralement peu au diagnostic; en revanche, elle permet de définir le stade clinique de la maladie.

Pour chacun de ces deux groupes de L.C., primitif ou secondaire, le phénotype B (L.C.B.) ou T (L.C.T.) des cellules néoplasiques définit deux autres sous groupes. Les L.C.T. constituent environ 65% des lymphomes primitifs touchant la peau; le mycosis fongoïde et le syndrome de Sézary sont les formes les plus souvent rencontrées. L'évolution de ces lymphomes est souvent prolongée et longtemps limitée à la peau, mais ils peuvent secondairement envahir les ganglions, la moelle osseuse ou les viscères. Les L.C.B. comprennent environ 25% des L.C. primitifs à la peau; la plupart d'entre eux sont des lymphomes folliculaires. Ces lymphomes sont de malignité intermédiaire et présentent un faible risque de dissémination extracutanée ( Kempf *et al*, 1999; Willemze *et al*, 1997).

### **1.3. Pathogénie des lymphomes cutanés**

La pathogénie des L.C. primitifs se distingue très nettement de celle des autres lymphomes et des leucémies. En effet, la contribution relative des

anomalies cytogénétiques, des virus et des gènes régulateurs du cycle cellulaire à l'étiopathogénie des lymphomes primitifs de la peau semble très limitée contrairement à ce que l'on observe pour les autres syndromes lympho et myéloprolifératifs (Lightfoot et Mao 1998; Willemze *et al*, 1997; Dubus *et al*, 1996; Neri *et al* 1995; Garatti *et al*, 1995). Pour cette raison, les L.C. primitifs jouissent d'un statut particulier et d'une nosographie différente de celle des autres lymphomes.

### 1.3.1. Pathogénie des lymphomes cutanés à cellules T

On estime que les L.C.T. primitifs surviennent dans le contexte d'une stimulation antigénique locale chronique. Celle-ci permettrait l'émergence et l'amplification d'un clone dominant de cellules T sous l'action des cytokines élaborées par les cellules de Langerhans, les kératinocytes ou encore par contact de molécules d'adhérence telle que l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  ou CLA (*cutaneous lymphocyte-associated antigene*). Ces mécanismes biologiques fournissent une explication vraisemblable à la domiciliation des lymphocytes T néoplasiques dans le tissu cutané (Jumbou *et al*, 1998; Burg *et al*, 1995; Willemze *et al*, 1997, Piérard *et al*, 1996).

La participation du rétrovirus HTVL-1 à ces mécanismes a déjà été évoquée (Khan *et al* 1996; Pancake *et al*, 1995), mais des travaux récents remettent en cause le rôle de HTVL-1 dans la pathogénie des L.C.T. primitifs (Wood *et al*, 1997; Setoyama *et al*, 1998). Quant au rôle éventuel du virus Epstein Barr (EBV) des études américaines et asiatiques récentes soutiennent qu'il est inexistant (Angel *et al*, 1996; Su *et al*, 1993; Park *et al*, 1996). En revanche, des études européennes rapportent la présence de ce virus dans environ 20 à 30% de ces néoplasmes (Jumbou *et al*, 1998; Anagnostopoulos *et al*, 1996; Dréno *et al*, 1994). Comme ces études sont trop peu nombreuses, on

ne peut ni confirmer ni infirmer la contribution d'un facteur géographique pour la présence du virus EBV.

Plusieurs études récentes font état d'une translocation chromosomique t(2;5), caractéristique des lymphomes T à grandes cellules anaplasiques, dans le L.C.T. CD30+ primitif. La cassure touche un gène situé en 2p23 codant pour une protéine tyrosine-kinase nommée ALK, non exprimée à l'état normal dans les cellules hématopoïétiques, et le locus 5q35 (gène de nucléophosmine) codant pour une protéine nucléolaire (NPM). Cette translocation conduit à l'expression d'une protéine chimérique nommée NPM-ALK capable d'induire le phénotype transformé *in vitro* (revu en Kadin et Morris 1998; Wood 1995). La détection de la translocation t(2;5) ou de la protéine NPM-ALK demeure cependant inconstante. Certains auteurs les ont mises en évidence dans les L.C.T. primitifs CD30+ (Beylot-Barry *et al*, 1998) alors que d'autres ne les ont pas retrouvées (Li *et al*, 1997; DeCoteau *et al*, 1996).

### 1.3.2. Pathogénie des lymphomes cutanés à cellules B

Concernant maintenant l'étiopathogénie des L.C.B. primitifs, on croit qu'une stimulation chronique (tatouage, piqûre d'insecte, infection par *Borrelia burgdorferi*) serait susceptible d'induire l'hyperplasie et la prolifération monoclonale des lymphocytes B normalement présents dans la peau (Cerroni *et al*, 1997; Piérard *et al*, 1996).

La translocation chromosomique t(14;18) retrouvée dans plus de 90% des lymphomes folliculaires (L.F.) ganglionnaires a fait l'objet de nombreuses études portant sur les L.C.B. primitifs (Lightfoot et Mao 1998; Dubus *et al*, 1996; Staib et Sterry 1995; Garatti *et al*, 1995; Neri *et al*, 1995). Lors de cette translocation, l'oncogène *bcl-2* est placé sous le contrôle transcriptionnel puissant d'un élément enhancer du gène de la chaîne lourde d'immunoglobulines. La surexpression

constitutive de la protéine bcl-2 permettrait le blocage de la mort cellulaire par apoptose. Curieusement, l'expression de la protéine bcl-2 et la présence de t(14;18) sont des événements extrêmement rares dans les L.F. de la peau même si ceux-ci représentent environ 40% des L.C.B. primitifs (Kempf *et al*, 1999; Lightfoot and Mao 1998; Willemze *et al*, 1997). Il pourrait donc être possible de distinguer les L.C.B. primitifs des lymphomes B à localisation cutanée secondaire à l'aide de t(14;18).

La détection sporadique et aléatoire du virus EBV dans les L.C.B. primitifs ne permet pas d'en expliquer la pathogénie (Peris *et al*, 1994; Kafé *et al*, 1998). L'expression des cellules dendritiques positives pour l'antigène CD21 dans les L.F. cutanés suggère plutôt que les interactions cellulaires ou humorales (via les cytokines) entre les cellules B tumorales et les cellules de la peau permettent le développement et la progression des lymphocytes tumoraux (Mori *et al*, 1995; Burg *et al*, 1995).

### 1.3.3. Gène p53

L'implication du gène p53 dans la pathogénie des L.C. primitifs a été largement étudiée. Ce gène, classé parmi le groupe des gènes suppresseurs de tumeur ou «anti-oncogènes», exerce, à l'état normal, un rôle négatif sur la prolifération cellulaire en contrôlant l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Il peut aussi induire l'apoptose chez les cellules présentant des lésions irréversibles de l'ADN. Le p53 muté contribue à la croissance tumorale par une perte de sa fonction normale. Le mécanisme impliqué est de type récessif, c'est-à-dire, qu'il nécessite le plus souvent la délétion d'un premier allèle suivi par des mutations ponctuelles, additionnelles du deuxième allèle. L'inactivation de p53 par des mutations est l'une des altérations génétiques les plus fréquemment observées dans les cancers humains. Elle est aussi étroitement associée à la progression tumorale (Knudson 1993). Les lymphomes malins n'échappent pas à



cette règle et plusieurs études rapportent une fréquence élevée de mutations p53 dans les lésions lymphoprolifératives: lymphomes de Burkitt, leucémies lymphoïdes chroniques et lymphomes folliculaires de haut grade (revu en Garatti *et al*, 1995, Neri *et al*, 1995).

La détection des mutations de p53 dans les L.C. primitifs est un événement extrêmement rare, limité à des cas isolés de mycosis fungoïdes en phase évolutive (Xerri *et al*, 1994; Neri *et al*, 1995; Garatti *et al*, 1995; Dubus *et al*, 1996). Comme pour les autres cancers humains, l'inactivation du gène p53 semble donc impliquée dans la progression tumorale des lymphomes cutanés primitifs.

Même si les travaux récents en biologie moléculaire permettent une meilleure compréhension des processus lymphoprolifératifs de la peau, aucune altération génétique spécifique, pouvant servir de marqueur tumoral, n'a été rapportée à ce jour dans le développement d'un L.C. primitif. Comme la plupart des lésions néoplasiques chez l'homme sont de nature clonale, il est probable que les L.C. n'échappent pas non plus à cette règle et que l'examen de la clonalité pourra venir en aide pour distinguer les infiltrats lymphocytaires bénins et malins de la peau.

#### **1.4. Marqueurs de clonalité des lymphomes cutanés**

Selon le Système International de Nomenclature en Cytogénétique Humaine, un clone se définit comme étant une population cellulaire constituée par multiplications successives d'une cellule progénitrice (Mark *et al*, 1998). En conséquence, puisque toutes les cellules d'un clone sont génétiquement identiques, il est possible de détecter un clone par la mise en évidence d'un élément caractéristique (un marqueur) exprimé par chacune de ces cellules. Plusieurs marqueurs de clonalité ont déjà été utilisés pour caractériser les

populations clonales: inactivation d'un chromosome X chez la femme; expression d'immunoglobulines monotypiques; anomalies chromosomiques spécifiques (chromosome de Philadelphie), intégration virale et réarrangements géniques spécifiques des récepteurs antigéniques.

#### **1.4.1. Inactivation d'un chromosome X**

L'évaluation de la monoclonalité fondée sur la mise en évidence de l'inactivation sélective d'un des allèles d'un chromosome X chez la femme a été décrite pour la première fois en 1967 par Fialkow et ses collègues (Fialkow, 1976). Les fondements théoriques de cette méthode sont les suivants. Tôt après la formation du zygote, il y a inactivation aléatoire de l'un de deux chromosomes X par un mécanisme de méthylation de l'ADN (Lyonisation). Ce mécanisme survient normalement dans toutes les cellules somatiques de la femme pendant l'embryogenèse. Le profil d'inactivation du chromosome X est aléatoire et génétiquement déterminé. Ainsi, tous les organes d'une femme sont constitués d'une mosaïque de cellules appartenant à l'une ou l'autre des populations cellulaires exprimant chacune soit le chromosome X paternel ( $X_p$ ) actif soit le chromosome X maternel ( $X_m$ ) actif de façon constitutive, dans un rapport égal 1:1. Cette stratégie permet de distinguer les populations polyclonales où l'inactivation porte alternativement sur l'un et l'autre des 2 chromosomes et les populations monoclonales où l'inactivation ne concerne exclusivement qu'un seul et même allèle du chromosome X (Vogelstein *et al*, 1985; Vogelstein *et al*, 1987; Fialkow, 1976).

Présentement, il est possible de mettre en évidence l'inactivation d'un des allèles du chromosome X par la réaction de polymérase en chaîne (PCR) (Gilliland *et al*, 1991; Harada *et al*, 1997). Cette méthode nécessite l'amplification d'un locus polymorphique situé sur le chromosome X et l'utilisation de deux endonucléases de restriction. La première digestion de l'ADN s'effectue avant

l'amplification à l'aide d'une endonucléase sensible à la méthylation, la PCR ne préservant pas la méthylation. Cette enzyme permet de distinguer l'allèle actif du chromosome X de l'allèle méthylé inactif. Le couple d'amorces encadrant le site de méthylation associé au processus d'inactivation du chromosome X ne permet pas d'amplifier l'allèle actif (non méthylé) puisque celui-ci a préalablement été digéré lors de la première réaction enzymatique. En revanche, l'allèle inactif (méthylé) demeurant intact après la première digestion enzymatique permet l'amplification. La deuxième digestion endonucléasique révélant le site polymorphique permet de distinguer les allèles paternel et maternel du chromosome X. Dans l'éventualité où l'ADN provient d'un tissu polyclonal contenant les allèles paternel et maternel du chromosome X ( $X_p$  et  $X_m$ ) en proportion égale et que l'inactivation touche ces deux allèles dans la même proportion alors l'électrophorèse sur gel permettra de distinguer deux fragments distincts. Dans le cas contraire où, l'ADN provient d'une lésion monoclonale dans laquelle le seul et même allèle a subi l'inactivation, il n'y aura qu'un seul fragment présent sur le gel.

Quelques loci polymorphiques de 4 gènes du chromosome X peuvent être utilisés comme marqueurs de clonalité grâce à cette méthode: phosphoglycérate kinase (PGK) (Vogelstein *et al*, 1987), hypoxanthine phosphoribosyl kinase transférase (HPRT) (Vogelstein *et al*, 1987), le locus DXS255 (M27 $\beta$ ) (Fey *et al*, 1994) et récepteur hormonal androgénique (HUMARA) (Busque *et al*, 1994). Le locus du gène HPRT est peu informatif en raison de la basse fréquence du polymorphisme (environ 30%) (Harada *et al*, 1997). Le locus DXS255 quoique très informatif est d'un intérêt limité en raison de la grande variabilité du processus de méthylation. Par contre, les gènes PGK et HUMARA semblent présenter toutes les caractéristiques nécessaires à leur utilisation comme marqueur de clonalité. En effet, ces marqueurs ont permis de confirmer la nature monoclonale d'hémopathies malignes et de différentes tumeurs solides (sein, ovaire, endomètre et surrénale) (revu en Harada *et al*, 1997; Hotta 1997). Signalons que les premières analyses de clonalité des cancers utilisaient la

détection des isoenzymes du gène glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (Fialkow, 1976). Toutefois, puisqu'il y a très peu de femmes hétérozygotes pour ce locus (2%), G6PD n'a pas pu être généralisé comme marqueur de clonalité (Gilliland *et al*, 1991).

En théorie, la méthode fondée sur l'inactivation d'un chromosome X offre beaucoup d'avantages pour l'étude des néoplasmes humains. Dans les faits cependant, son usage est limité aux individus de sexe féminin qui sont par ailleurs hétérozygotes pour un locus donné. La contamination de l'échantillon par le stroma non-tumoral avoisinant en complique aussi l'utilisation. De plus, on a montré qu'environ le quart des femmes saines présentent un biais (*skewing*) du processus de Lyonisation et conséquemment s'éloignent sensiblement du ratio théorique de 1:1 (El Kasser *et al*, 1998; Busque *et al*, 1996). Ce phénomène, plus fréquent pour les cellules sanguines, peut donc mimer l'expansion clonale de populations cellulaires et fausser l'interprétation des résultats réduisant ainsi l'utilité de cette approche méthodologique (Busque *et al*, 1996).

Même s'il n'y a eu aucune étude relative à l'utilisation de ces méthodes pour les infiltrats lymphoïdes cutanés, l'exploration de la monoclonalité par la mesure de l'inactivation d'un allèle du chromosome X a été largement employée pour d'autres syndromes lymphoprolifératifs. En raison du phénomène de Lyonisation excessive décrit plus haut, un certain doute persiste au sujet de la validité de ces travaux (Fey *et al*, 1994; Hodges *et al*, 1991).

Pour conclure, la mesure du degré d'inactivation d'un allèle du chromosome X ne semble pas devoir s'imposer comme outil diagnostique pour les lésions du système lymphoïde surtout lorsque l'on prend en compte la très haute spécificité et sensibilité des techniques de biologie moléculaire disponibles pour la détection des réarrangements spécifiques des gènes des récepteurs antigéniques. Néanmoins, cette technique demeure la méthode de choix pour

évaluer la clonalité des lésions de la lignée NK (LGL, CD30-) pour lesquelles il n'existe aucun autre marqueur de clonalité (Kelly *et al*, 1994).

#### **1.4.2. Immunoglobulines monotypiques**

Les méthodes immunohistochimiques actuelles permettent de mettre en évidence les antigènes de différenciation (CD / *Cluster of Differentiation*) normalement exprimés à la surface des lymphocytes grâce à l'emploi d'anticorps monoclonaux. Cette méthode permet en outre d'identifier des populations lymphocytaires B monoclonales dans les tissus. Pour l'instant, il n'existe aucun marqueur de clonalité des lymphocytes T reposant sur l'emploi d'anticorps monoclonaux (Cerroni et Kerl, 1994; Gorguet *et al*, 1992; Finn *et al*, 1996; Kempf *et al*, 1999).

Les lésions clonales de la lignée lymphocytaire B peuvent s'accompagner, suivant leur degré de différenciation, de l'élaboration par les cellules néoplasiques d'une composante monoclonale constituée d'immunoglobulines monotypiques. Cette composante monoclonale se caractérise par la présence d'un seul type de chaîne légère, kappa ( $\kappa$ ) ou lambda ( $\lambda$ ). L'identification d'une telle composante au sein d'un processus lymphoprolifératif B constitue un argument déterminant en faveur de la malignité de ce processus. Toutefois, le nombre des L.C.B. exprimant une immunoglobuline monotypique est très variable: 8 à 85% des L.C.B. sont clonaux (revu en Dubus *et al*, 1996). La prudence s'impose alors en raison du bruit de fond fréquemment observé et causé tantôt par la sécrétion d'immunoglobulines plasmatiques par les lymphocytes B normaux tantôt par la fixation non spécifique des anticorps sur les fibres de collagènes ou encore par des lymphocytes T réactionnels qui peuvent masquer la prolifération maligne, le tout responsable de réactions faussement négatives (Dubus *et al*, 1996; Gorguet *et al*, 1992).

Même si l'immunomarquage demeure un argument séméiologique fort utile pour le diagnostic de lymphome cutané à cellules B, en pratique il doit généralement être confronté aux données cliniques, histologiques et moléculaires.

### 1.4.3. Réarrangements chromosomiques et intégration virale

À ce jour, il n'existe aucune altération chromosomique spécifique ni séquences virales étiologiquement associées au développement des L.C. primitifs et capables de servir de marqueur de clonalité. Toutefois, des anomalies chromosomiques surviennent tout de même dans 85% des cas de leucémies/lymphomes ganglionnaires non hodgkiniens (Lightfoot et Mao, 1998). De plus, on sait que les virus EBV et HTVL-1 sont en cause dans plusieurs types de lymphomes ganglionnaires. Il y a donc un intérêt évident à rechercher et à identifier ces événements dans des lymphomes à localisation cutanée secondaire.

Plusieurs lymphomes s'accompagnent d'altérations chromosomiques spécifiques survenant lors de l'échange de matériel chromosomique entre deux ou plusieurs chromosomes. Le plus souvent, ces translocations permettent la juxtaposition de séquences d'ADN appartenant aux gènes des récepteurs antigéniques (Ig ou RCT) à des gènes qui appartiennent à la famille des proto-oncogènes. Les translocations les plus fréquemment retrouvées dans les leucémies/lymphomes ganglionnaires à cellules B sont les suivantes: t(14;18) (Ig<sub>H</sub>; bcl-2) - lymphome folliculaire, t(11;14) (Ig<sub>H</sub>; bcl-1) - leucémie lymphoïde chronique et leucémies à cellules T - t(11;14) (RCT; tcl-1) et t(11;14) (RCT; c-myc) (Kaplan 1989; Lightfoot et Mao, 1998; Kempf *et al*, 1999). Ces translocations peuvent désormais être mises en évidence par PCR en utilisant des amorces complémentaires encadrant les points de cassure. On peut aussi utiliser avec succès le buvardage de Southern et les sondes spécifiques aux régions concernées.

Quant à la recherche de l'ADN rétroviral du virus HTVL-1, celle-ci peut se faire grâce à la technique de PCR *in situ* utilisant des amorces spécifiques à la séquence rétrovirale «tax». L'avantage de la PCR *in situ* par rapport à la PCR conventionnelle réside dans la possibilité de localiser et de quantifier les cellules T infectées par le virus (Satoyama *et al*, 1998; Khan *et al*, 1996). En ce qui concerne le virus EBV, on peut le mettre en évidence de plusieurs façons: par hybridation *in situ* en utilisant ribosondes EBER; par la technique de Southern en se servant du fragment Bam W spécifique aux gènes de latence virale ou enfin par des techniques hybrides (Jumbou *et al*, 1998; Wechsler *et al*, 1998).

Ces différentes approches méthodologiques présentent un grand intérêt diagnostique surtout en ce qui a trait aux patients atteints de leucémies/lymphomes ganglionnaires à cellules T. En effet, la plupart de ces malades (77% des cas) présentent une infiltration cutanée secondaire par des lymphocytes T tumoraux à point de départ ganglionnaire (Weinberg *et al*, 1993).

On estime que la mise en évidence d'anomalies chromosomiques spécifiques ou la confirmation d'une infection virale (EBV, rétrovirus HTVL) dans un clone T ou B malin permet de distinguer les L.C. primitifs des L.C. secondaires et d'en préciser le stade évolutif (Setoyama *et al*, 1998; Piérard *et al*, 1996; Wechsler *et al*, 1998). Cependant, comme ces marqueurs de clonalité ne sont pas universellement présents, leur utilité demeure limitée à certaines entités bien définies.

#### **1.4.4. Réarrangements des gènes des récepteurs antigéniques**

Parmi tous les gènes susceptibles de permettre l'étude de la clonalité des lymphomes cutanés, signalons que ceux qui codent pour les récepteurs antigéniques sont de loin les plus utiles: gènes des immunoglobulines (Ig) pour les cellules B; gènes des différentes chaînes du récepteur des cellules T (RCT) pour les lymphoproliférations à cellules T. Comme les immunoglobulines et les

récepteurs des cellules T sont spécifiquement exprimés à la surface des populations lymphocytaires, celles-ci peuvent être distinguées des autres cellules de l'organisme. À quelques rares exceptions, ces molécules de reconnaissance sont présentes dans presque tous les cas de L.C. Ajoutons que ces protéines de surface ne subissent pas des modifications ultérieures et que les gènes qui les encodent demeurent stables même durant la progression tumorale (Staib et Sterry, 1995; Kempf *et al*, 1999).

#### **1.4.4.1. Structure moléculaire des récepteurs antigéniques**

La structure et l'organisation moléculaire des récepteurs spécifiques aux différents antigènes permettent l'étude de la clonalité des proliférations lymphocytaires. Une molécule d'immunoglobuline est un hétérodimère protéique constitué de deux chaînes lourdes (H) et de deux chaînes légères (L) monotypiques, soit kappa ( $\kappa$ ) soit lambda ( $\lambda$ ), reliées entre elles par des ponts disulfures. Les récepteurs T sont des glycoprotéines formées par l'association de deux peptides alpha ( $\alpha$ ) et bêta ( $\beta$ ) ou gamma ( $\gamma$ ) et delta ( $\delta$ ) reliés eux aussi par des ponts disulfures. Le récepteur des cellules T et des immunoglobulines appartiennent à la superfamille des Ig laquelle se compose de molécules ayant deux domaines: l'un variable, dont l'unité de base est constituée de 70 à 110 acides aminés organisés en sous unité globulaire (boucle) stabilisée par un pont disulfure, l'autre, constant (C), composé d'une région transmembranaire et d'une courte région intracytoplasmique. Le domaine variable des récepteurs antigéniques est spécifique pour chaque lymphocyte T ou B et se subdivise lui-même en trois zones hypervariables dites CDR (*Complementary determining region*) séparées les unes des autres par quatre zones conservées appelées charpentes ou FR pour *framework* (Weinberg *et al*, 1993; Revillard 1995). Ce domaine variable permet la reconnaissance des antigènes grâce aux segments CDR et plus particulièrement par la zone CDRIII qui est la plus diversifiée et la plus spécifique à l'antigène. C'est pourquoi, les gènes codant pour la zone CDR



III du gène d'immunoglobuline ou du récepteur des cellules T ont été choisis comme marqueur de clonalité des proliférations lymphocytaires.

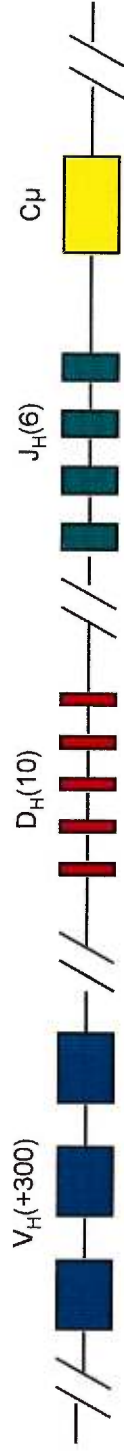
Les gènes d'Ig et du RCT comportent plusieurs types distincts de segments géniques appelés: variable (V), diversité (D), jonctionnel (J) et constant (C). Parmi eux, les segments V, D et J codent conjointement pour le domaine variable alors que le segment C du gène encode le domaine constant des récepteurs antigéniques. Bien que les segments V, J et C se trouvent pour les gènes Ig et RCT, le segment D n'est présent que dans le gène de la chaîne lourde d'Ig et dans les gènes bêta et delta du RCT (Griesser 1995; Revillard 1995). Dans les cellules non lymphocytaires, ces gènes demeurent en configuration germinale (non réarrangée et non fonctionnelle). En revanche, dans les cellules du système lymphoïde, ces gènes subissent de profonds remaniements lors du processus de différenciation lymphocytaire.

#### **1.4.4.2. Réarrangement génique**

Le réarrangement du gène des immunoglobulines est une caractéristique essentielle des lymphocytes B. De même, lors de l'ontogénie des lymphocytes T, il y a plutôt réarrangement des gènes des chaînes du récepteur T. Ces réarrangements sont des événements somatiques qui se produisent à l'intérieur du thymus pour les lymphocytes T ou dans la moelle osseuse pour les cellules B. Pour chaque lymphocyte, l'un ou l'autre de ces gènes ne peut se réarranger qu'une seule fois (Harrington 1990; Kaplan 1989).

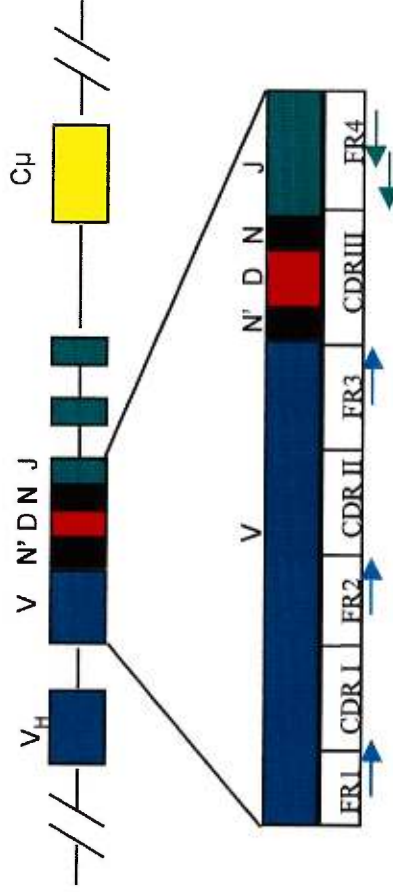
Le réarrangement consiste en l'assemblage, pour les chaînes lourdes des Ig et des chaînes  $\beta$  et  $\delta$  du RCT, d'un segment D et d'un segment J puis en l'ajout au complexe DJ d'un segment V (Figure 1). Pour les chaînes légères d'Ig et  $\alpha, \gamma$  du RCT, les gènes V et J sélectionnés sont simplement juxtaposés (Figure 2). Les séquences intercalaires de l'ADN sont éliminées par excision. Ce

## CONFIGURATION GERMINALE

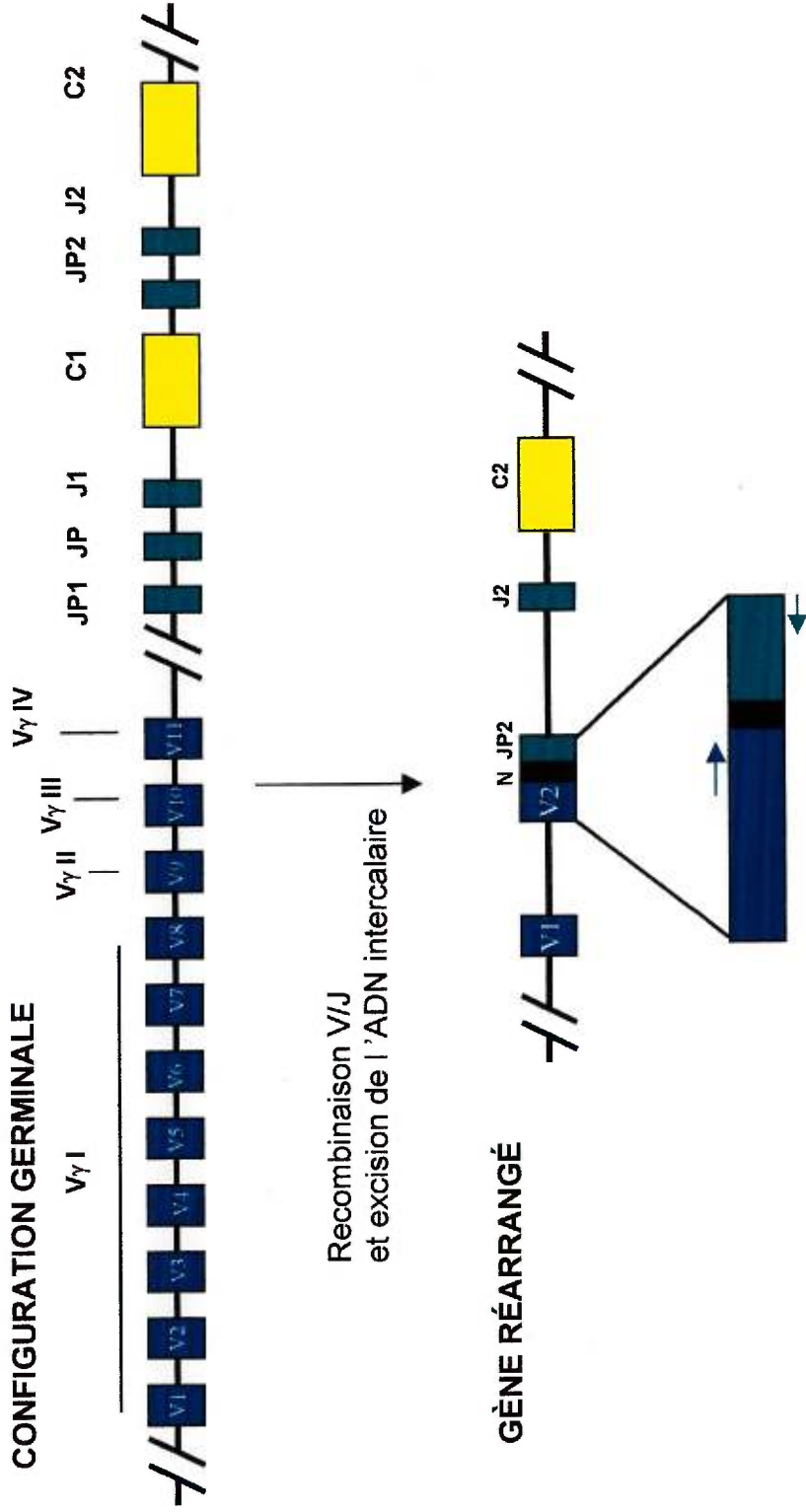


RECOMBINAISON D/J  
 ↓  
 PUIS V/D-J

## GÈNE RÉARRANGÉ



**Figure 1. Réarrangement du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines au cours de la différenciation lymphocytaire B.** Les flèches indiquent la position des amorces consensus (FR1-FR4) utilisées pour amplifier les régions CDR par PCR. Les segments variable V (environ 300 segments), de diversité D (environ 10 segments) et de jonction J (6 segments  $J_H$ ) codent pour la région variable des immunoglobulines alors que le segment  $C_\mu$  code pour la région constante. Les nucléotides N et N' (carrés noirs) sont des modifications additionnelles générées de façon aléatoire lors de la recombinaison. Celles-ci créent la région hypervariable CDRIII.



**Figure 2. Réarrangement du gène gamma ( $\gamma$ ) du récepteur des cellules T au cours de la différenciation des lymphocytes T.** Les segments  $V_\gamma$  et  $J_\gamma$  sont amplifiés par PCR au moyen d'amorces dérivant de quatre familles de gènes variables ( $V_{\gamma 1}$ , II, III et  $V_{\gamma 4}$ ) et d'amorces  $J_{\gamma 1/2}$  complémentaire aux  $J_{\gamma 1}$  et  $J_{\gamma 2}$ ,  $J_{P_{\gamma 1/2}}$  complémentaire aux  $J_{P1}$  et  $J_{P2}$  et d'amorce  $J_P$ . Les flèches indiquent la position des amorces  $V_{\gamma 1}$  et  $J_{P_{\gamma 1/2}}$  détectant la région  $V_2$ -N- $J_{P2}$  du gène  $TCR_\gamma$  réarrangé.

processus est catalysé par des enzymes appelés recombinaisons dont l'activation résulte d'interactions spécifiques avec les produits des gènes: RAG 1 et RAG 2. Les transcrits des gènes RAG 1 et RAG 2 ne sont exprimés que dans les cellules des tissus lymphoïdes primaires (Wood 1998; Griesser 1995). Le segment C se rapproche enfin du complexe V(D)J par épissage lors de la maturation de l'ARN messager. De plus, lors du réarrangement de ces gènes, l'action de l'enzyme terminal désoxynucléotidyle transférase (TdT) permet l'insertion au niveau des jonctions DJ, VD ou VJ de nucléotides supplémentaires N ou, au contraire, introduit des délétions aléatoires de courtes séquences nucléotidiques (McCarthy *et al*, 1992; Griesser 1995). Ainsi, par ce mécanisme, il y a création d'un segment réarrangé d'une extrême diversité VN(DN)J ou VNJ codant pour la région CDRIII du domaine variable des récepteurs à l'antigène. La région VN(DN)J correspond pour ainsi dire à une empreinte génétique de chaque lymphocyte T ou B, et, de ce fait, constitue un marqueur de clonalité inestimable.

Pendant la différenciation des lymphocytes B, le gène de la chaîne lourde d'immunoglobuline se réarrange en premier, suivi du réarrangement du gène de la chaîne légère  $\kappa$ . Si ces réarrangements ne sont pas productifs sur les deux allèles, alors ce sont les gènes  $\lambda$  qui se réarrangent. On appelle ce phénomène exclusion allélique. L'expression du gène  $\kappa$  est normalement plus fréquente que celle du gène  $\lambda$ , le ratio des lymphocytes B exprimant la chaîne  $\kappa$  par rapport à la chaîne  $\lambda$  étant normalement d'environ 2:1 (Wood 1998; Wechsler 1993).

La séquence temporelle des réarrangements des gènes du RCT est la suivante:  $\delta$ ,  $\gamma$  puis  $\beta$  et finalement  $\alpha$  (Griesser 1995; Revillard 1995). Lorsque les réarrangements des gènes  $\gamma$  et  $\delta$  ne conduisent pas à l'expression d'un RCT $\gamma/\delta$  fonctionnel dans un lymphocyte T, il y a réarrangement subséquent des chaînes  $\beta$  et  $\alpha$  remplaçant alors l'hétérodimère  $\gamma/\delta$ . Environ 95% des lymphocytes T périphériques expriment un récepteur de type  $\alpha/\beta$  alors que seulement 5% expriment les récepteurs  $\gamma/\delta$  (Griesser 1995). Tout comme pour les cellules B,

lorsque les réarrangements des gènes du récepteur des cellules T ne sont pas productifs, les lymphocytes T meurent par apoptose (Wood 1998).

Il est intéressant de signaler qu'au cours du réarrangement génique du RCT $\alpha$ , le gène  $\delta$  disparaît entièrement puisque son locus se trouve encadré par celui du gène  $\alpha$ . Par contre, la configuration réarrangée du gène  $\gamma$  reste intacte dans le génome de tous les lymphocytes T en raison du réarrangement précoce de ce gène lors de la maturation des lymphocytes T. De fait, même les lymphocytes T  $\alpha/\beta$  réarrangent leurs deux locus  $\gamma$  bien que l'expression des chaînes  $\gamma$  soit supprimée par un mécanisme encore inexpliqué (Wood 1998; Griesser 1995). Ces réarrangements du locus  $\gamma$  sont donc particulièrement utiles pour étudier la clonalité T dans les syndromes lymphoprolifératifs à cellules T. Mais, l'étude du gène  $\beta$  est tout aussi intéressante puisque la plupart des lymphocytes T subissent un réarrangement du type  $\alpha/\beta$ . En ce qui concerne le gène  $\delta$ , il présente peu d'intérêt du fait des délétions nombreuses que subissent les deux allèles de ce locus. Enfin, la mise en évidence d'un réarrangement du locus  $\alpha$  du RCT semble être techniquement beaucoup plus difficile, car la région J très étendue (environ 100kb) ne permet pas de recourir aux techniques moléculaires usuelles (Cossman *et al*, 1988; Griesser 1995).

Ainsi, lors de l'étude de la clonalité des syndromes lymphoprolifératifs à cellules B, on procède généralement tout d'abord pour l'analyse du gène de la chaîne lourde d'Ig. Le réarrangement de ce gène survient à un stade précoce dans le développement des cellules B soit au stade pré-pré B. Ce gène est aussi réarrangé dans la plupart des leucémies et des lymphomes B (Yamada *et al*, 1989). L'analyse des gènes des chaînes légères semble moins pertinente puisque seulement 40% des lymphomes B réarrangent ces gènes (Harrington 1990).

En clinique, on procède à l'analyse des réarrangements de gènes des immunoglobulines et du récepteur des cellules T grâce aux techniques

d'hybridation moléculaire de Southern ou par la réaction de polymérase en chaîne (PCR).

#### 1.4.4.1. Buvardage de Southern

Pour des raisons historiques, c'est la technique de Southern qui a d'abord été utilisée pour mettre en évidence des réarrangements spécifiques des gènes des récepteurs antigéniques. Cette technique s'est donc rapidement imposée dans les années quatre-vingt pour l'étude de la clonalité des leucémies et des lymphomes B ou T (revu dans Weinberg *et al*, 1993). Cette technique d'hybridation moléculaire sur filtre permet de distinguer l'une de l'autre les configurations germinale et réarrangée des gènes des immunoglobulines et des diverses chaînes du récepteur des cellules T. De façon spécifique, l'exécution de hybridation de Southern nécessite l'utilisation d'ADN génomique, d'endonucléases de restriction et de sondes clonées spécifiques aux gènes à l'étude (RCT et immunoglobulines). D'abord, l'ADN doit être digéré par des endonucléases de restriction qui coupent sélectivement les deux brins d'ADN en des sites précis et spécifiques repartis dans tout le génome. Cette digestion conduit à une multitude de fragments d'ADN (fragments de restriction) que l'on peut ensuite séparer en fonction de leur taille par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Les fragments de restriction ainsi isolés sont ensuite transférés sous vide sur une membrane. L'ADN lié à la membrane est par la suite hybridé à une sonde marquée qui se compose d'une séquence d'ADN spécifique et complémentaire au gène d'intérêt. Les sondes les plus couramment utilisées pour explorer la clonalité dans les syndromes lymphoprolifératifs proviennent du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines ou du gène de la chaîne  $\beta$  du RCT (Griesser 1995; Wood 1998). Bien que le gène  $\gamma$  soit réarrangé dans tous les lymphocytes T, l'emploi de la sonde RCT $\gamma$  est généralement peu utilisée car elle génère de nombreux fragments non spécifiques ce qui en complique l'usage (Cossman *et al*, 1988). Finalement, l'autoradiographie des supports solides, une

fois l'hybridation et les étapes de lavages complétées, permet de révéler la réaction qui apparaît sous forme de bandes chacune correspondant à un des fragment d'ADN complémentaire à la sonde radiomarquée.

En absence de réarrangement clonal, la technique de Southern permet d'observer un certain nombre de fragments du gène intact. Ces fragments définissent une configuration dite «germinale» c'est-à-dire une configuration commune à l'ensemble des gènes non réarrangés des immunoglobulines et du récepteur T. Cette configuration germinale se compose généralement d'une à trois bandes de taille définie selon l'enzyme de restriction utilisée. En revanche, comme le mécanisme de réarrangement génique s'accompagne de délétions de l'ADN, la position relative des sites de restriction enzymatique s'en trouve modifiée et permet de confirmer l'existence d'une population monoclonale. Si l'ADN des lymphocytes du sang normal est analysé, chacun des fragments obtenus après digestion enzymatique aura une taille variable et se présentera en quantité nettement insuffisante pour être détecté en sorte que seulement les bandes en configuration germinale apparaîtront sur l'autoradiogramme. Par contre, en présence d'une prolifération lymphocytaire monoclonale, comme le réarrangement génique est identique pour chacune des cellules du clone, la superposition de fragments présentant la même mobilité électrophorétique permettra la détection d'un ou de plusieurs fragments additionnels. La limite de sensibilité de la méthode étant de 1 à 5%, une population cellulaire monoclonale pourra être détectée sous forme d'un fragment additionnel si elle constitue de 1 à 5 % de la population totale (Wood 1998; Rijlaarsdam et Willemze 1993). La technique de Southern permet donc d'identifier outre le phénotype B ou T de la population à l'étude, la présence ou l'absence d'un réarrangement génique spécifique.

L'utilisation de la technique de Southern à des fins diagnostiques pour les lésions lymphoprolifératives de la peau demeure toutefois limitée. En effet, cette technique requiert l'extraction d'ADN de haut poids moléculaire à partir de tissu

frais ou congelé. Souvent, les biopsies cutanées au poinçon sont de petite taille et conséquemment ne permettent pas toujours d'obtenir de l'ADN en quantité suffisante. De même, la fragmentation excessive de l'ADN dans les tissus fixés à la formaline et enrobés en paraffine ne permet d'obtenir de l'ADN de haut poids moléculaire nécessaire à sa réalisation. Enfin, la sensibilité insuffisante de la technique Southern pose souvent des problèmes insurmontables pour l'étude des infiltrats lymphoïdes cutanés. Comme les tissus cutané et sous-cutané sont particulièrement riches en protéines (kératine) et en lipides (pannicule adipeux), l'extraction des acides nucléiques provenant des lymphocytes s'en trouve compliquée et les rendements obtenus parfois médiocres.

Pour toutes ces raisons, la réaction d'amplification en chaîne des acides nucléiques catalysée par la polymérase (PCR) semble être une méthode beaucoup mieux adaptée aux multiples contraintes que pose l'étude des infiltrats lymphoïdes cutanés que le buvardage de Southern.

#### **1.4.4.4. Amplification élective des acides nucléiques (PCR)**

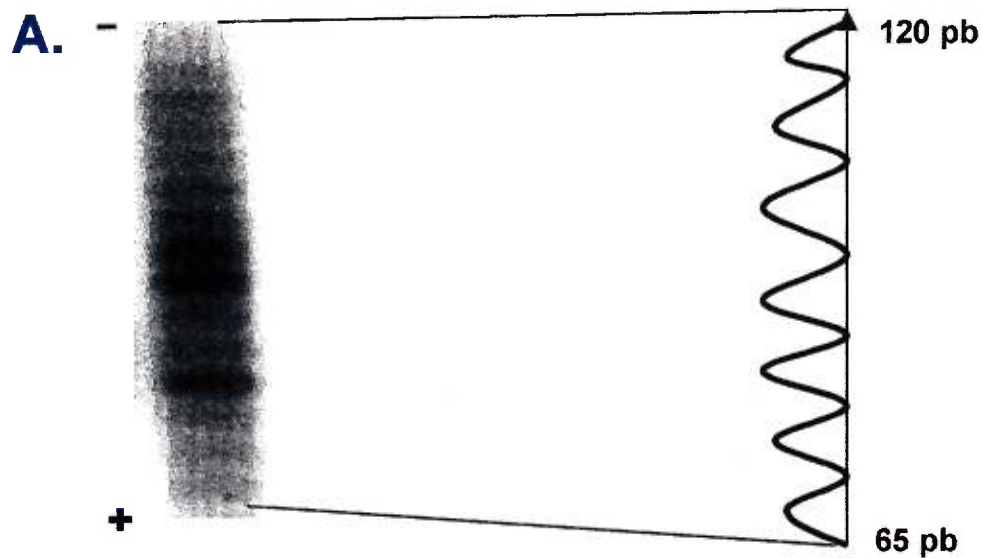
La réaction de PCR permet l'amplification rapide et exponentielle d'un court segment d'ADN encadré par des amorces situées de part et d'autre de ce segment. La réaction est catalysée par l'enzyme Taq polymérase. Elle procède par une succession de cycles comprenant chacun trois étapes: 1.- dénaturation de l'ADN double brin en ADN simple brin; 2.- hybridation spécifique (*annealing*) des amorces aux régions complémentaires de l'ADN simple brin; 3.- synthèse d'une copie complémentaire à l'ADN cible par extension des amorces (Clavel *et al*, 1993).

La réaction de PCR permet l'étude de la clonalité des lésions cutanées ou autres, développées dans le cadre des syndromes lymphoprolifératifs. Le principe de la méthode repose sur l'amplification de la région CDR III des gènes

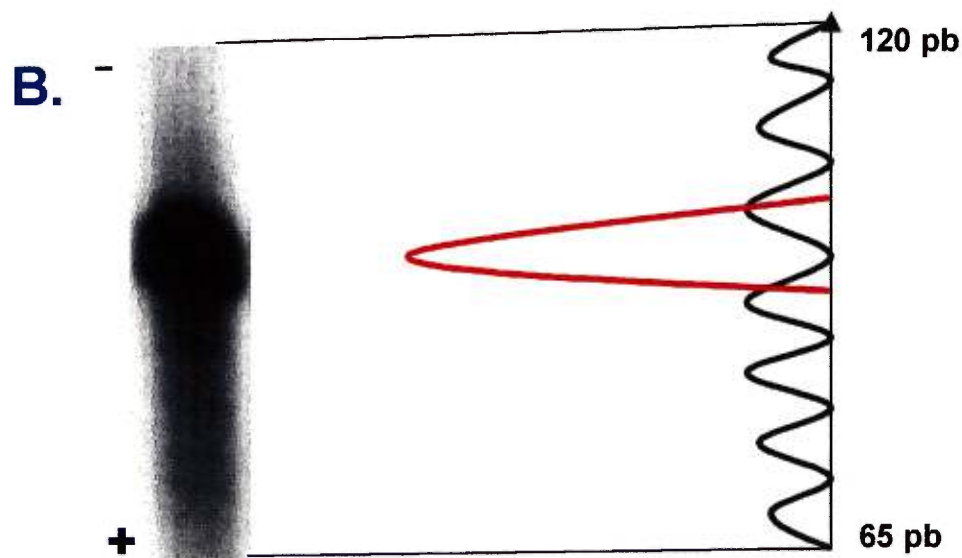


des récepteurs à l'antigène. En utilisant des amorces spécifiques de la région FR, on peut amplifier électivement les fragments réarrangés appartenant aux segments hypervariables VDJ ou VJ (CDR) (Figure 1 et 2). Comme les segments V, D et J en configuration germinale sont trop éloignés l'un de l'autre pour être amplifiés, (par exemple, un fragment d'ADN de 16 kilobases sépare la région V de la région J du gène  $\gamma$  du RCT), seuls les segments d'un gène réarrangé pourront permettre l'amplification élective du segment d'ADN contenu entre les amorces sélectionnées (Staib et Sterry, 1995). Comme chaque réarrangement est unique, la variation dans la taille et dans la séquence de ces fragments V(ND)NJ amplifiés permettra d'affirmer la clonalité au sein d'une population cellulaire donnée. La PCR CDRIII permet d'amplifier une région réarrangée à l'état physiologique dans tous les lymphocytes B ou T. De ce fait, il y a amplification polyclonale des régions VDJ présentes dans les lymphocytes normaux, ce qui se traduit lors de la migration des amplicons sur gel de polyacrylamide par une multitude de bandes en «barreau d'échelle». Au contraire, pour une population dérivée d'une seule cellule lymphocytaire progénitrice, le réarrangement clonal se traduira par un fragment unique ou dominant lors de la migration sur le gel (Figure 3).

La PCR CDRIII est une méthode extrêmement sensible qui permet de détecter une population clonale ne représentant que 0,001 à 1 % des cellules d'un infiltrat lymphoïde cutané (Wood, 1998; Bagot *et al*, 1993; Weinberg *et al*, 1993). Ainsi, on estime que la sensibilité de la méthode est de 10 à 1000 fois plus élevée que celle de la technique de Southern. La taille des amplicons, généralement entre 75 et 150 paires de bases, et la possibilité de réaliser la méthode même avec de très petits échantillons tissulaires en font la méthode de choix pour l'étude de la clonalité dans les lésions cutanées lymphoïdes. De plus, et ce fait est digne de mention, la technique de PCR permet une étude rétrospective des tissus fixés à la formaline et enrobés en paraffine. Concernant la spécificité de la méthode, on estime que tout comme pour la technique de buvardage de Southern, la PCR CDRIII permet de détecter une population lymphoïde clonale.



RÉSULTAT NÉGATIF DE LA REACTION PCR-RCT



RÉSULTAT POSITIF DE LA REACTION PCR-RCT

**Figure 3. (A) Résultat négatif de la réaction PCR-RCT.** Les réarrangements polyclonaux s'observent chez les lymphocytes normaux et se manifestent sur gel de polyacrylamide sous forme d'une multitude de bandes de même intensité tel que schématisé par les pics observés entre 65 et 120 paires de bases.

**(B) Résultat positif de PCR-RCT.** Un réarrangement clonal s'observe dans une population lymphocytaire dérivée d'une cellule progénitrice commune (tumeur). Il apparaît sur gel de polyacrylamide comme une bande très intense schématisée par un pic rouge parmi les réarrangements polyclonaux (pics noirs).

Présentement, il existe plusieurs approches distinctes, utilisant la PCR CDRIII pour identifier une population monoclonale T ou B dans les syndromes lymphoprolifératifs de la peau.

#### **1.4.4.4.1. Systèmes de PCR pour détecter la clonalité T**

Les premières études portant sur l'application de la PCR aux L.C.T. ont été réalisées à l'aide d'amorces spécifiques pour un clone spécifique, capables d'amplifier les gènes réarrangés  $\beta$  ou  $\gamma$  du récepteur T (Lessin *et al*, 1991; Volkenandt *et al*, 1991). Ces amorces présentaient le désavantage de n'être spécifiques que pour un malade donné. Aujourd'hui, grâce à l'utilisation généralisée d'amorces consensus ou spécifiques pour les segments V, D et J de la région CDR III, la méthode peut désormais s'appliquer au diagnostic des L.C.T.

La caractérisation d'une population monoclonale lymphocytaire T utilisant le gène  $\beta$  du récepteur des cellules T est limitée. En effet, compte tenu de la multiplicité des segments  $V\beta$  et  $J\beta$  pour ce gène (60 segments  $V\beta$  et 15 segments  $J\beta$  (Griesser 1995)), on doit utiliser un grand nombre d'amorces et multiplier le nombre des réactions pour mettre en évidence un clone réarrangé. En outre, la diversification des zones conservées à travers des segments  $V\beta$  et  $J\beta$  conduit à l'impossibilité de détecter la plupart des réarrangements  $\beta$  clonaux du RCT en utilisant les amorces consensus. Le couple d'amorces:  $D\beta$ , spécifique au segment D, et  $J\beta$  consensus peut être utile au diagnostic des lymphomes ayant un réarrangement partiel DJ. Néanmoins, la sensibilité de la PCR-RCT $\beta$  demeure faible: on ne peut identifier un réarrangement clonal que dans seulement 44 à 50% des lymphomes malins avérés (Diss *et al*, 1995; Slack *et al*, 1993). En revanche, l'utilisation d'amorces pour les zones conservées  $V\gamma$  et  $J\gamma$  du TCR  $\gamma$  est beaucoup plus efficace et permet de mettre en évidence une

population monoclonale dans la plupart des lymphomes T. Le degré d'homologie élevé des zones FR des segments V $\gamma$  et J $\gamma$  permet de restreindre le nombre d'amorces consensus nécessaires pour détecter la majorité des réarrangements du gène  $\gamma$  du récepteur T. De fait, la PCR-RCT $\gamma$  détecte la clonalité dans 59 à 90% de cas des L.C.T. (Ashton-Key *et al*, 1997; Algara *et al*, 1994; Theodorou *et al*, 1995; Wood *et al*, 1994; Scheller *et al*, 1998). Pour toutes ces raisons, le choix des méthodes de PCR se limite à celles qui visent à amplifier le gène  $\gamma$  du RCT.

La première stratégie utilisée consiste très simplement à utiliser les amorces consensus spécifiques des séquences conservées des segments V et J (McCarthy *et al*, 1992) du gène du récepteur antigénique des cellules T. La seconde, désignée sous le nom de PCR multiplex requiert l'utilisation conjuguée d'amorces spécifiques à tous les segments V et J connus qui sont combinés en plusieurs réactions de PCR (Delfau-Larue *et al*, 1998; Trainor *et al*, 1991; Bottaro *et al*, 1994). Enfin, la PCR qualifiée généralement de *nested primer PCR* consiste à effectuer 2 réactions de PCR consécutives: la première réaction utilisant une paire d'amorces dites externes alors que la seconde fait appel à un couple d'amorces internes, enclavées entre les premières (*nested primers*). Le produit d'amplification de la première PCR sert de matrice à la seconde réaction. Cette méthode augmente la sensibilité de la réaction PCR d'environ 1000 fois (Clavel *et al*, 1993).

Ces trois approches distinctes pour l'amplification des segments des gènes  $\gamma$  du RCT sont couplées à différents systèmes de détection par électrophorèse. Ils comprennent nommément les gels dénaturants avec gradient (DGGE), les gels assortis de gradients de température (TGGE), les gels de type *single strand conformational polymorphism analysis* (SSCP) et finalement le gel de polyacrylamide pour le séquençage. Le principal avantage des méthodes DGGE, TGGE et de SSCP réside dans la possibilité de séparer une population

clonale mineure diluée à l'intérieur de populations polyclonales de lymphocytes T.

Pour les analyses de DGGE et de TGGE, qui font intervenir la migration électrophorétique des acides nucléiques à travers un gradient, les fragments d'ADN double brin sont d'abord dénaturés en ADN simple brin en fonction de leur température de fusion, laquelle est déterminée par la nature de la séquence nucléotidique. Cette altération de la température de fusion, entraîne un ralentissement de la mobilité des produits de PCR dans le gel et permet ainsi l'accumulation des fragments de même nature en une position précisément déterminée du gel. Dans les mêmes conditions expérimentales, les produits polyclonaux interrompent leur course à une position variable, différente pour chaque fragment dans le gel. Dans l'éventualité où le clone T constitue de 0.1 à 1% de l'ADN total, il apparaîtra sous forme d'une bande unique sur le gel (Meyer *et al*, 1997, Scheller *et al*, 1998). Ajoutons, que la résolution des amplicons dans un gel de type DGGE peut être améliorée par l'incorporation de pinces de résidus guanosine-cytosine (*GC clamps*) dans les produits de PCR (Tok *et al*, 1998; Theodorou *et al*, 1995).

L'analyse de type SSCP a été employée avec succès pour l'identification des produits de PCR transcrits en ARN complémentaire (ARNc) (Volkenandt *et al*, 1993). La migration des fragments d'ARNc s'effectue sur gel de polyacrylamide en fonction de la configuration de la molécule, laquelle est fonction de la séquence nucléotidique. On estime que le seuil de sensibilité de cette méthode varie entre 0.01 et 0.1 %. Récemment, deux nouvelles méthodes de SSCP ont été introduites: la première qui est fondée sur l'utilisation d'un fluorochrome permet l'analyse des produits d'amplification du gène  $\gamma$  du RCT par le système *ABI Gene Scanner*; la seconde, de type SSCP non radioactif, utilise des gels préformés et adaptés à la méthodologie *Phastsystem* (Signoretto *et al*, 1999; Simon *et al*, 1998). Ces nouvelles approches permettent généralement d'améliorer l'identification du clone mais, elles demeurent très coûteuses.

D'une manière générale, l'ensemble des stratégies de PCR-RCT $\gamma$  et des systèmes de détection pour les populations lymphocytaires T clonales se sont avérés très utiles dans le diagnostic des L.C.T., toutefois ils présentent aussi des désavantages. Par exemple, l'analyse par DGGE de fragments d'acides nucléiques amplifiés par PCR (*nested*) constitue une méthode extrêmement sensible pour détecter une population monoclonale T dans les infiltrats lymphoïdes de la peau (Wood *et al*, 1994). L'extrême sensibilité de la méthode, peut faire craindre la détection d'un clone lymphocytaire développé dans le cadre d'une affection de nature réactionnelle (Delfau-Larue *et al*, 1998). Par ailleurs, l'utilisation de seulement deux paires d'amorces consensus au RCT $\gamma$  et la résolution des amplicons par gel non dénaturant de polyacrylamide pourrait réduire indûment la sensibilité de la méthode (Ashton-Key *et al*, 1997). Quant à la PCR multiplex, quoique très sensible, elle demeure dans les faits fastidieuse à utiliser (Delfau-Larue *et al*, 1998; Bottaro *et al*, 1994; Trainor *et al*, 1991). Dans le cas des méthodes TGGE et ARNc/SSCP, l'interprétation des résultats demeure quand même subjective et nécessite par conséquent l'utilisation de critères très stricts (Scheller *et al*, 1998; Menke *et al*, 1995; Volkenandt *et al*, 1993). Finalement, l'ensemble des techniques de type DGGE, TGGE et SSCP comportent le désavantage d'être lourdes et complexes (Meyer *et al*, 1997; Tok *et al*, 1998; Scheller *et al*, 1998; Volkenandt *et al*, 1993).

L'approche méthodologique préconisée pour l'amplification des acides nucléiques et le système utilisé pour la détection des fragments amplifiés demeure avant tout un choix subjectif. Dans le cadre de notre étude, nous avons opté pour deux réactions de PCR radioactives utilisant des amorces consensus pour les chaînes  $\beta$  et  $\gamma$  du récepteur antigénique des cellules T. Bien que la sensibilité de la PCR RCT $\gamma$  soit légèrement supérieure à celle normalement utilisée pour la PCR-RCT $\beta$ , il semble que l'utilisation conjuguée des deux méthodes soit encore meilleure lorsque vient le temps de détecter une population clonale T (Diss *et al*, 1995; Slack *et al*, 1993).

Concernant le système de détection, nous avons opté pour un gel dénaturant de séquençage. En effet, celui-ci permet de séparer les produits de PCR selon leur taille même s'ils ne se distinguent l'un de l'autre que par une seule paire de base.

#### **1.4.4.4.2. Systèmes de PCR pour détecter la clonalité B**

La technique de PCR CDRIII pour la recherche d'une population monoclonale B dans les syndromes lymphoprolifératifs repose sur l'amplification d'un segment réarrangé du gène de la chaîne lourde d'immunoglobuline. On estime que cette technique permet de mettre en évidence une population clonale dans 34 à 86% des lymphomes cutanés B (Dubus *et al*, 1994; Staib and Sterry, 1995; Dubus *et al*, 1996; Ritter *et al*, 1997). L'étude du réarrangement des gènes des chaînes légères kappa et lambda a déjà été réalisée mais en raison de sa faible sensibilité, elle est généralement réservée aux seuls cas où la réaction de PCR pour la détection d'un réarrangement du gène de la chaîne lourde d'immunoglobuline a été infructueuse (Küppers *et al*, 1993).

Tout comme dans le cas précédent, il existe trois stratégies de PCR CDRIII susceptibles d'être utilisées pour mettre en évidence une population monoclonale B dans un infiltrat cutané lymphocytaire B. Toutes ces méthodes emploient exclusivement des amorces consensus pour les segments  $V_H$  et  $J_H$ .

La première stratégie qu'on qualifie de classique consiste à effectuer une ou plusieurs réactions de PCR à l'aide d'une seule paire d'amorces  $V_H$  et  $J_H$  (Dubus *et al*, 1994; Dubus *et al*, 1996); la seconde, consiste en l'utilisation d'une PCR enchâssée de type *nested primers* (Staib and Sterry 1995; Ritter *et al*, 1997); enfin, la troisième fait appel à la stratégie désormais connue sous le nom de PCR multiplex. Cette dernière fait intervenir une réaction dans laquelle une amorce  $J_H$  est couplée à un ensemble d'amorces  $V_H$  spécifique pour chacune des

familles VH1, 2, 3, 4a, 4b, 5 et 6 (Deane *et al*, 1991). La résolution des amplicons s'effectue grâce à un gel de polyacrylamide non dénaturant, à un gel d'agarose et à un gel de SSCP (Davis *et al*, 1993). Le profil électrophorétique permet la résolution d'un fragment unique dans le cas d'un réarrangement spécifique du gène ou de l'apparition d'une multitude de fragments non résolus dans le cas d'une population lymphocytaire polyclonale.

L'identification d'un clone B par la technique de PCR-CDR III demeure très importante pour le diagnostic des infiltrats de la peau à cellules B. C'est grâce à cette méthode entre autres qu'on admet actuellement l'existence d'un spectre continu entre les hyperplasies polyclonales bénignes et les proliférations L.C.B. monoclonales ayant une évolution maligne (Willemze *et al*, 1997; Piérard *et al*, 1996). Toutefois, comme les L.C.B. primitifs ont une malignité faible et sont des entités plutôt rares, il y a un plus grand intérêt en recherche oncologique appliquée aux L.C. d'étudier les L.C.T. que l'on observe beaucoup plus fréquemment et dont le diagnostic clinique, histomorphologique et immunohistochimique est souvent difficile à préciser.

## **1.5. Hypothèse**

L'apport des techniques de biologie moléculaire a largement contribué à approfondir nos connaissances des infiltrats lymphoïdes cutanés. La caractérisation des populations lymphocytaires a notamment permis de préciser la signification clinique des populations clonales présentes dans les lésions cutanées. Ainsi, a-t-on pu associer une population monoclonale de lymphocytes T, mise en évidence par l'identification d'un réarrangement du gène du RCT, au développement d'un lymphome cutané à cellules T. Cependant, il n'y a pas obligatoirement d'adéquation entre la détection d'une population monoclonale au sein d'un infiltrat lymphoïde et l'éventuelle malignité d'une telle lésion tant il est vrai que l'on a mis en évidence une population clonale dans des infiltrats rangés



dans la catégories des infiltrats bénins et *borderline*. À titre d'exemple citons l'identification d'un clone T dans la papulose lymphomatoïde (Kadin *et al*, 1987), le pityriasis lichénoïde et varioliformis acuta (PLEVA) (Weiss *et al*, 1987) et plus récemment dans les hyperplasies lymphoïdes cutanées (Landa *et al*, 1993; Theodorou *et al*, 1995), les dermites chroniques (Wood *et al*, 1994), les infiltrats de la peau à cellules T atypiques (Delfau-Larue *et al*, 1997) et le parapsoriasis (Staib et Sterry, 1995). La signification de ces résultats n'est pas encore connue puisque d'une part, on ne dispose généralement d'aucune information pertinente sur l'évolution ultérieure de la maladie et d'autre part, parce qu'il ne s'agit, le plus souvent, que de cas isolés et peu documentés. Seule une étude prospective à long terme prenant en compte à la fois la relance des malades et à la fois l'évolution temporelle du clone identifié à l'échelon moléculaire pourrait apporter des éclaircissements quant à la valeur pronostique du clone présent dans les lésions peut-être qualifiées trop rapidement de bénignes ou de *borderline*.

L'objectif de ce travail a été de déterminer dans quelle mesure la présence ou l'absence d'une population monoclonale T dans une lésion tissulaire pouvait avoir un impact significatif du double point de vue du diagnostic pathologique et de l'évolution de la maladie. Autrement dit, d'un point de vue clinique, y a-t-il un intérêt pour le médecin qui a la charge de patients atteints d'infiltrats cutanés lymphoïdes de connaître l'existence d'une population clonale? Afin de répondre à cette question, nous avons suivi rétrospectivement l'évolution de la maladie au moyen d'analyses de Southern et de PCR et avons pu déterminer la présence ou l'absence d'une population monoclonale lymphocytaire T chez huit patients atteints de L.C.T. avérés et chez trois patients atteints d'infiltrats cutanés T récidivants attribués à un processus lymphoïde réactionnel. Les résultats de l'analyse moléculaire ont été confrontés aux données cliniques et histologiques recueillies chez ces patients.

**CHAPITRE # 2**

**ARTICLE**

The Value of Clonality in the Diagnosis and Follow-up of  
Patients with Cutaneous T-cell Infiltrates  
Short title: Clonality in the diagnosis of T-cell infiltrates

Katarzyna Dadej\*, Louis Gaboury\* #, Louis Lamarre\*, Caroline Pétorin\*,  
Chantal Séguin<sup>♦</sup>, Marcel Cadotte and Isabelle Gòrska-Flipot\*

\*Laboratory of Molecular Oncopathology, Department of Pathology and

<sup>♦</sup>Dermatology Division, Department of Medicine, Centre Hospitalier de  
l'Université de Montréal, Montréal (Québec) Canada H2W 1T8

# Department of Pathology, Université de Montréal,  
Montréal (Québec) Canada H3C 3J7

Key words: TCR gene rearrangement, PCR, cutaneous T-cell lymphoma

Abbreviations: BL, borderline lesion; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CTCL,  
cutaneous T-cell lymphoma; MF, mycosis fungoides; SB, Southern blot; TCR, T-  
cell receptor

## ***Abstract***

The diagnosis of early stages of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) is often difficult, especially for lesions which are at the borderline between reactive and neoplastic skin T-cell infiltrates. T-cell clonality in these lesions is considered by some authors to be an important prognostic factor of neoplastic evolution, while others claim that clonality can be found in benign skin infiltrates and is therefore of limited diagnostic value. To address this question, we studied the malignant progression of patients with lymphocytic infiltrates of the skin and compared it to the presence/absence of clonality in these lesions during the time course of the disease. We analyzed retrospectively 8 patients with lymphocytic skin lesions who progressed to CTCL and 3 patients with recurrent T-cell lymphocytic infiltrates who had not developed skin lymphoma during several years of follow-up. We detected T-cell receptor rearrangement by PCR and by Southern blot (SB) analysis.

From a total of 65 biopsies in 8 progressing patients, 32 were diagnosed as malignant and 33 as benign or borderline lymphocytic infiltrates. We found clonality in 28 of 32 malignant and in 26 of 33 non-malignant lesions. None of the 36 control biopsies of 3 non-progressing patients was clonal by either PCR or SB.

These results strongly indicate that the presence of monoclonality in benign-borderline T-cell skin infiltrates is tightly related to the risk of developing CTCL. The value of clonality as a marker of malignancy is supported by the absence of

T-cell clonal populations in all infiltrates from patients who had not progressed to lymphoma.

## ***Introduction***

The diagnosis of early stages of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) is often difficult, especially in cases which manifest changes that are at the borderline between reactive and neoplastic skin T-cell infiltrates and for which no immunophenotypic marker of clonality is available (Griesser 1995; Diss *et al*, 1995). These borderline lesions occur in patients at a very early or alternatively advanced stage of CTCL but also in patients who have never manifested any evidence of malignant lymphoma. Pre-malignant T-cell skin infiltrates are difficult to distinguish from benign inflammatory skin disorders by morphological criteria because they often share the same histological characteristics (Wechsler 1992; Willemze *et al*, 1997). The diagnostic usefulness of immunophenotyping in these cases is also limited by the variable expression of surface antigen and lack of specificity for neoplastic cells (Gorguet *et al*, 1992; Landa *et al*, 1993; Cerroni and Kerl, 1994).

Since it is well established that CTCL results from clonal expansion of T-cells (Weiss *et al*, 1985; Ralfkiaer *et al*, 1987), identification of unique T-cell receptor (TCR) gene rearrangements by Southern blot (SB) or PCR analysis strongly supports the diagnosis of malignancy in borderline lesions of the skin (Ashton-Key *et al*, 1997; Delfau-Larue *et al*, 1998; Tok *et al*, 1998; Wood *et al*, 1994; Zelickson *et al*, 1991; Landa *et al*, 1993). Although T-cell monoclonal populations have also been reported recently to be present in inflammatory skin lesions such as chronic dermatitis, cutaneous lymphoid hyperplasia, and other T-

cell skin infiltrates (Wood *et al*, 1994; Theodorou *et al*, 1995; Delfau-Larue *et al*, 1998), the risk of developing CTCL in patients with T-cell monoclonality in the context of histologically benign or borderline lesions has not yet been fully clarified. A long-term follow-up study on the clinical outcomes of patients with recurrent lymphocytic infiltrates whose T-cell populations have been characterized at the molecular level is likely to shed light on this controversial issue.

Here, we report a retrospective study of 11 patients with recurrent lymphocytic infiltrates of the skin for whom we analyzed corresponding TCR gene rearrangement. Eight patients developed CTCL during the course of their disease, while 3 patients with recurrent lymphocytic T-cell infiltrates of the skin never progressed to cutaneous lymphomas. Our results indicate a striking relationship between the presence of monoclonal T-cell populations in histologically borderline or benign skin lesions and clinical progression to malignant cutaneous lymphomas.

## ***MATERIALS AND METHODS***

### **Patients and clinical material**

Eleven patients with cutaneous T-cell infiltrates, followed between January 1985 and February 1998 at Hôtel-Dieu Hospital of Montreal, were studied retrospectively. These patients belonged to 2 disease categories. Group 1 consisted of 8 patients who developed clinical and histopathological evidence of CTCL during the course of their disease: 5 of these patients were diagnosed as mycosis fungoides (MF), 2 as T-cell lymphoma and 1 as T-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). Group 2 was comprised of 3 patients with benign and borderline lesions who never developed CTCL during a follow-up period ranging from 2 to 11 years. The patients in this category, had a clinical diagnosis of inflammatory skin disorder, pseudolymphoma and lymphomatoid papulosis.

Histological diagnoses for all biopsies were established by standard morpho-histologic examination. A diagnosis of MF was made if a superficial infiltrate of cytologically atypical T-cells was seen in conjunction with epidermotropism or Pautrier's microabscesses. A diagnosis of atypical lymphocytic infiltrate was rendered if an infiltrate did not fit the criteria for one of the known dermatoses. The criteria for inclusion consisted of the availability of at least 3 sequential biopsies performed during a follow-up period of at least 4 months in Group 1 (CTCL patients) and of at least 1 year in Group 2 (patients without CTCL). A total of 101 tissue samples comprising 87 skin biopsy specimens, 9 lymph nodes, 3 peripheral blood samples and 2 bone marrow samples were analyzed. TCR gene rearrangement analysis by PCR was performed on all



specimens while SB was restricted to instances where snap-frozen tissue was available.

To evaluate the sensitivity and specificity of PCR analysis in TCR gene rearrangement, 27 paraffin-embedded and 20 fresh or snap-frozen skin tissue specimens of CTCL were obtained from the archives of the Department of Pathology to serve as positive controls. Twenty-five samples of unrelated lesions were used as negative controls. These included 8 solid epithelial tumours: 4 colon cancer, 3 lung carcinoma and 1 basal cell carcinoma; 3 normal peripheral blood specimens; 2 normal, formalin-fixed, paraffin-embedded lymph node biopsy specimens; 2 epithelial cell lines: MCF-7 (human mammary gland adenocarcinoma) and MCF-10A (human mammary gland); and 10 non-lymphoid skin lesions comprising 4 naevi, 3 solar keratoses, 2 erythema nodosa and 1 fibrino-leukocytic exudate.

### **DNA isolation**

High molecular weight DNA was purified from snap-frozen tissue with a standard cell lysis protocol using proteinase K (GIBCO BRL) digestion followed by phenol/chloroform extraction. DNA isolation of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue was performed according to the slide extraction method (Dadej *et al*, in preparation ). Briefly, 3 to 5 tissue sections of 3- $\mu$ m were laid on Probe-on-Plus slides (Fisher), covered with a clean glass slide to form a sandwich, heated for 10 min at 72°C and dewaxed in 3:1 v/v xylene-HemoDe (Fisher) solution by 4 washes of 1-min each. Xylene-HemoDe was removed by 4

additional washes in 100% ethanol and 95% ethanol, respectively. The slides were air-dried and tissue sections were scratched with a pipette tip and transferred into 30-200  $\mu$ l drop of extraction buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1 mM EDTA, 0.5% Tween, 50 mM KCl and 0.5 mg/ml Proteinase K, then transferred into 1.5-ml microcentrifuge tubes. Digestion was performed at 58°C for 3 h or alternatively overnight. Proteinase was inactivated by boiling for 8 min. After centrifugation, 2 or 5  $\mu$ l of supernatant was taken for PCR amplification. A control section of tissue was stained with Hematoxylin, Phloxin and Saphranin to confirm the adequacy of the sample. To assess DNA quality, a 115 base pair fragment of microsatellite D3S1038 from chromosome 3 was amplified.

### **Southern blot**

Five  $\mu$ g of high molecular weight DNA extracts were digested by BamHI, EcoRI and HindIII restriction enzymes (GIBCO BRL). Digested DNA was subjected to agarose gel electrophoresis (0.8%) and transferred onto nylon membranes (Hybond N+, Amersham Life Science Inc.) using an LKB Vacu Gene XL apparatus (Pharmacia). The membranes were hybridized with a <sup>32</sup>P-labelled probe specific for the constant region of the human TCR  $\beta$  chain gene, as described earlier (Allaire *et al*, 1997). The filters were washed stringently with 0.1 X sodium citrate buffer (0.15 M NaCl and 0.015 M sodium citrate) containing 0.3% sodium dodecyl sulfate at 65°C for 1 h. Autoradiography was performed at -74°C for 1 or 2 days.

### PCR amplification

Since tissue fixation and paraffin embedding result in extensive DNA fragmentation, we opted for primer pairs which amplify relatively short DNA fragments (below 120 base pairs). The rearranged TCR- $\beta$  and TCR- $\gamma$  genes were amplified using primers described by Diss *et al* (1995) and by Slack *et al* (1993) respectively in 2 separate reactions with the following primer combinations: (D $\beta$ 1) 5'-CAAAGCTGTAACATGTGGGGAC-3' and (J $\beta$ 2) 5'-AGCACCGTGAGCCTGGTGGC-3'; (V $\gamma$ 11) 5'-TCTGG(A/G)GTCTATTACTGTGC-3', (V $\gamma$ 101) 5'-CTCACACTC(C/T)CACTTC-3' and (J $\gamma$ 12) 5'-CAAGTGTTGTTCCACTGCC-3'. The amplification of TCR- $\beta$  rearrangements was conducted out in a 20- $\mu$ l volume containing 100 ng of DNA extracted from frozen tissue or 2 and 5  $\mu$ l of tissue extract from paraffin sections, 10 mM Tris/HCl, pH 9.2, 75 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each of 2  $\beta$ -primers, 0.5 units Taq polymerase (GIBCO BRL), 200  $\mu$ M of each dATP, dTTP, dGTP, 100  $\mu$ M of dCTP and 4  $\mu$ Ci of <sup>32</sup>P-dCTP with a specific activity of 3,000 mCi/mmol (Amersham). TCR- $\gamma$  gene amplification was carried out in a 20- $\mu$ l reaction mixture containing 100 ng of DNA extracted from frozen tissue or 2 and 5  $\mu$ l of paraffin section extract, 10 mM Tris/HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5  $\mu$ M of each of 3  $\gamma$ -primers, 0.5 units Taq polymerase (Pharmacia Products Biotech), 200  $\mu$ M of each dATP, dTTP, dGTP, 100  $\mu$ M of dCTP and 4  $\mu$ Ci of <sup>32</sup>P-dCTP with a specific activity of 3,000 mCi/mmol. Initial denaturation for 5 min at 95°C was followed by 30 cycles of 1 min at 95°C, 55°C, and 72°C. The program ended with 5 min incubation at 72°C. Reactions were performed in Robocycler (Stratagene). A 3- $\mu$ l

aliquot of PCR products was subjected to electrophoresis on 6% denaturing polyacrylamide gel at 60 W for 1 h 30 min. Autoradiography of the dried gel was performed at  $-74^{\circ}\text{C}$  for 24 h using BioMax MS intensifying screen and BioMax MR film (Kodak). In the presence of T-cell clonal proliferation,  $\beta$ -primers generate a PCR product of 55-100 base pairs and  $\gamma$ -primers an amplicon of 70-110 base pairs.

## **RESULTS**

The presence of 1 or 2 discrete bands within the expected size range after radioactive PCR was considered to be indicative of a positive amplification result. On the other hand, a ladder or smear pattern was considered to be a negative result. For SB analysis, a TCR- $\beta$  gene showing germline configuration only was considered to be negative while the presence of 1 to 2 additional bands was interpreted as evidence of clonal TCR gene rearrangement. All samples contained a sufficient quantity of nucleic acids as we were able to amplify DNA from all snap-frozen and paraffin-embedded tissue extracts using microsatellite D3S1038 primers (data not shown).

### **Efficiency of PCR for the detection of TCR gene rearrangement**

Although Southern blot analysis is generally considered to be the gold standard for the detection of monoclonal T-cell populations (Diss *et al*, 1995), we could not use this technique in the majority of cutaneous biopsies since they were either too small or embedded in paraffin. Before using the alternative approach – PCR amplification of TCR gene rearrangement - we evaluated the efficiency of this technique with 47 histologically-proven CTCL samples (Materials and Methods – positive control biopsies). The results are summarized in Table I. PCR analysis of TCR- $\beta$  and TCR- $\gamma$  gene rearrangement revealed a monoclonal pattern in 34 (72%) of 47 biopsies. As expected, all of the 25 negative control tissues and cell lines (see Materials and Methods) displayed a negative pattern of amplification.

### **Molecular follow-up of CTCL patients**

Group 1, which consisted of 8 patients who eventually developed CTCL, was comprised of 5 cases diagnosed as MF (patients 1-5), 2 patients with nodal T-cell lymphoma and secondary skin involvement (patients 6 and 7) and 1 patient (no. 8) who suffered from cutaneous involvement of T-cell CLL. Table II presents a detailed chronological follow-up of each patient along with the results of the clinical, histological and molecular diagnoses. A specific TCR rearrangement was detected by PCR in 7 patients (no. 1-3 and 5-8) with TCR- $\gamma$  primers, but for patients 6 and 8, a clonal population could also be amplified with TCR- $\beta$  primers (data not shown). In patient 4, the evidence of clonality was derived exclusively from SB analyses.

PCR and SB analyses performed on skin, lymph nodes, blood and bone marrow samples from patients with CTCL revealed the presence of a specific monoclonal T-cell population in the majority of tissue samples analyzed for each patient. Monoclonal TCR gene rearrangement was detected in 28 of 32 (87.5%) histologically confirmed malignant lesions diagnosed as CTCL, MF, T-cell lymphoma, angioimmunoblastic lymphadenopathy-type lymphoma or CLL. T-cell monoclonality was also identified in 26 of 33 (78.8%) lymphoid infiltrates, classified as either benign or borderline on histological examination. These clonal, histologically diverse lesions included the following entities: chronic dermatitis (6 cases), atypical lymphocytic skin infiltrates (4 cases), inflammatory

skin infiltrates (3 cases), cutaneous pseudolymphoma (2 cases), cutaneous actinic reticuloid (2 cases), vasculitis (2 cases) and 1 case each of the following entities: parapsoriasis, folliculitis, psoriasis, disseminated lupus erythematosus, vascular edema, lymphocytosis and chronic balanitis (Table II). A rearranged TCR gene fragment of the size specific for each patient persisted during evolution of the disease in the majority of neoplastic or borderline lesions, as depicted in Figure 1 (patient no. 2/PCR- $\gamma$ ) and in Figure 2 (patient no. 4/SB). The exception to this rule was CLL patient no. 8 for whom the second clone was found on 1 occasion in sample no. 5 (Table II). The presence of more than 1 clonal TCR gene rearrangement had been reported previously in cases of acute lymphoblastic leukemia (Tycko *et al*, 1992).

A sub-group of 4 patients (no. 3, 4, 5 and 8) was of special interest as it illustrated the progression of histologically non-malignant skin lesions to overtly malignant lymphoproliferation. Interestingly, their initial cutaneous biopsies displayed evidence of monoclonality several months or years before histology could uncover their full malignant potential (Table II, Figure 2).

Initial biopsies of the 4 remaining patients belonging to Group 1 (no. 1, 2, 6 and 7) all displayed histological evidence of malignant T-cell neoplasm at the outset, but lesions of borderline or benign as well as malignant nature were found during the course of the disease. Monoclonal T-cell populations were detected in a high proportion of lesions whether they were qualified as malignant or non-malignant based on morphological evidence.

### **Molecular follow-up of patients without CTCL**

In addition to the 8 patients with malignant lymphomas, we investigated 3 subjects with multiple recurrent cutaneous T-cell infiltrates who never progressed to malignant lymphoproliferation (Table III). Histological diagnoses of the samples analyzed included a wide spectrum of lymphocytic infiltrates, which are considered by some authors to be either pre-malignant (parapsoriasis, lymphomatoid papulosis), undetermined in terms of neoplastic potential (actinic reticuloid, atypical lymphocytic infiltrate) or rightly non-neoplastic such as lichen simplex chronicus. All the tissue samples from this group were shown to be negative when analyzed by PCR using specific primers for the TCR- $\gamma$  and TCR- $\beta$  chain. The results of SB hybridization performed on 5 snap-frozen tissue samples available for analysis were also negative, presenting only germline configuration.

Patient no. 9 had the longest follow-up period (11 years) during which a total of 23 skin biopsy specimens and 1 lymph node were obtained. Histological diagnoses included 8 different benign or borderline entities, of which lichen simplex and actinic reticuloid were the more frequent. The negative pattern of amplification found in initial skin and lymph node biopsies was maintained in all subsequent cutaneous lesions during follow-up (Table III). Also, only polyclonal lymphocytic populations were found in all biopsies obtained from the 2 other patients followed for 6 years (patient no. 10, Figure 3) and for 2 years (patient no. 11, Table III), respectively.



### **Clonality of benign and borderline lesions**

To fully appreciate the diagnostic implication of T-cell monoclonality in skin lesions characterized by lymphocytic infiltration, we compared histological entities which were present in patients with or without CTCL. As shown in Table IV, the same histological entities found in both groups were: (i) chronic dermatitis, (ii) atypical lymphocytic skin infiltrates, (iii) pseudolymphoma, (iv), actinic reticuloid (v) inflammatory skin infiltrates and (vi) psoriasis. Clonal TCR gene rearrangement was detected only in lesions from Group 1 patients who eventually progressed to malignancy: 6 out of 7 chronic dermatitis, 4 out of 7 lymphocytic skin infiltrates, 2 out of 2 pseudolymphomas, 2 out of 2 actinic reticuloid, 3 out of 3 inflammatory skin infiltrates and 1 out of 1 psoriasis were shown to be clonal. Remarkably, in the group of patients with a benign outcome (Group 2), none of 22 lymphocytic infiltrates displayed evidence of T-cell clonality, in spite of the fact that their histological diagnoses were similar to those of Group 1.

## ***Discussion***

Up to now, the actual significance of identifying a dominant T-cell clone by TCR gene rearrangement assays in lymphocytic skin infiltrates has remained a matter of debate. Many recent studies indicate that in MF, a unique T-cell clone persists from inception to later stages of the disease. T-cell dominant clones can be detected long before clinical and histopathological evidence of a malignant process has accumulated (Delfau-Larue *et al*, 1998; Ashton-Key *et al*, 1997; Tok *et al*, 1998; Chott *et al*, 1996; Wood *et al*, 1994). Therefore, clonality may well represent one of the earliest objective signs that a given T-lymphocytic population has acquired a proliferative advantage which can, over time, evolve into a fully malignant lesion. What still remains open for discussion is the predictive value of T-cell clonality in cutaneous T-cell infiltrates in the absence of clinical or histopathological signs of malignancy. Several studies have reported clonal TCR gene rearrangements in a wide spectrum of cutaneous benign and borderline lesions such as polymorphous skin infiltrate (Landa *et al*, 1993), chronic dermatitis (Wood *et al*, 1994; Scheller *et al*, 1998), psoriasis (Scheller *et al*, 1998), parapsoriasis (Staib and Sterry, 1995; Theodorou *et al*, 1995) and in dermatoses (Zelickson *et al*, 1991), which may suggest that T-cell clonality is not a very specific marker of malignant lymphoproliferation and can be occasionally detected in reactive lesions. In our opinion, this controversy will remain unsolved as long as correlations between clonality and long-term clinical outcomes have not been determined.

Our approach to study the value of clonality was based on a retrospective survey of 11 patients in whom a correlation could be established between T-cell gene rearrangement status on the one hand and the histopathological picture and clinical outcomes on the other. Since the methodological approach was critical to derive valid conclusions in this study, we sought to set up a PCR assay which would allow a compromise to be made between the sensitivity/specificity and simplicity of the method, permitting its easy use in the routine of a molecular pathology laboratory. PCR-based T-cell receptor gene rearrangement assay systems have a 59 to 83% detection rate in bonafide CTCL cases (Staib and Sterry, 1995; Algara *et al*, 1994; Ashton-Key *et al*, 1997; Scheller *et al*, 1998). The assay of Wood *et al* (1994) using nested PCR and denaturing gradient gel electrophoresis has an even higher detection rate (i.e. 90%). However, this highly-sensitive strategy raises important questions with regard to the specificity of the method because it allowed the detection of reactive clones which do not correspond to malignancy (Delfau-Larue *et al*, 1998). As for the multiplex PCR system comprising several specific primers for V and J segments and several reactions for TCR- $\gamma$  gene amplifications (Trainor *et al*, 1991; Bottaro *et al*, 1994; Signoretti *et al*, 1999), one caveat is that the assay is cumbersome and labour intensive. We chose 2 simple radioactive reactions, using a limited number of consensus primers for both  $\gamma$ - and  $\beta$ - chains (see Materials and Methods) because it has been demonstrated that the combination of TCR- $\beta$  and - $\gamma$  PCRs allows for the detection of a higher proportion of clonal rearrangements in T-cell lymphoproliferations (Diss *et al*, 1995). Indeed, our PCR strategy readily detected clonal rearrangement of TCR genes in the majority (68%) of snap-frozen CTCL

tissues and was even more efficient (77%) for paraffin-embedded tissue (Table I). We never observed a false positive result in any of the negative controls (see Materials and Methods) which indicates the high specificity of our PCR strategy. The use of SB on available frozen tissues confirmed the specificity of the PCR results and further increased the detectability of T-cell clonal populations in this group of patients.

Our retrospective study of 11 patients - 8 with cutaneous lymphoma (Group 1) and 3 with persistent inflammatory skin disorders (Group 2) - allows us to address several questions concerning the value of the molecular diagnosis of cutaneous T-cell lymphoid infiltrates. The results obtained in Group 1 confirm that pre-neoplastic and neoplastic CTLC lesions are clonal. A T-cell clone specific for each of the 8 patients persisted in skin, blood and lymph nodes throughout the evolution of their disease. The histopathological diagnoses in consecutive biopsies were very heterogeneous, ranging from MF to chronic dermatitis. Interestingly, in histologically non-malignant lesions specific rearrangements were frequently observed not only in lesions of unclear neoplastic potential, such as pseudolymphoma or parapsoriasis, but also in lesions viewed typically as inflammatory, such as folliculitis, vasculitis, disseminated lupus erythematosus, vascular edema and chronic balanitis (patients 2, 4, 6 and 8). To the best of our knowledge, this is the first report of monoclonality in these lesions. Only 3 of histologically-proven malignant lymphoid infiltrates failed to show detectable clonal TCR gene rearrangements (patients 2 and 5), which reflects rather a very low burden of neoplastic T-cells in a given biopsy specimen than the lack of

homology of PCR primers, since we were able to amplify a specific T-cell rearrangement from other specimens of the same patients. As for nonclonal cutaneous infiltrates present in CTCL patients, one cannot rule out that these lesions are truly benign inflammatory disorders occurring incidentally in CTCL patients.

A subset of Group 1, patients 3, 4, 5, and 8 are examples of CTCL development from a clonal histologically borderline or benign lesion which preceded the appearance of a typical malignant lesion by 1 month to 3 years. For all the other patients belonging to Group 1 (patients 1, 2, 6 and 7), the initial histological diagnosis was that of a malignant T-cell lymphoma with primary or secondary skin involvement. In these patients, we have consistently detected the same T-cell clone in the vast majority of recurrent biopsies, whether they represented malignant or non-malignant infiltrates.

The study of Group 2 patients with their follow-up period of 2 to 11 years corroborates the diagnostic value of clonality in the pathologic evaluation of benign- borderline cutaneous lymphoid infiltrates. In these patients who never developed clinical or pathological evidence of CTCL several years after the onset of the disease, consistent failure to detect a clonal TCR gene rearrangement in recurring skin lesions is a strong indication that the absence of clonality is associated with a very low risk of progression to malignancy. In contrast, patients with monoclonal benign or borderline skin lesions are at high risk of progression to malignancy. Several cautions should be added to this statement: first, that the

number of patients included in the present study is evidently limited, and secondly, that the follow-up period for patient 9 of Group 2 is relatively short (Table III); at this point, one cannot exclude a variation in clinical outcome in the years ahead.

Interestingly, lesions displaying benign or borderline T-cell infiltrates of the skin (e.g. chronic dermatitis, pseudolymphoma, psoriasis) were observed in patients from both groups independently of clinical outcome (Table IV). Up to now, it has not been possible to accurately predict, based on histopathological and immunohistochemical evidence, which of these lesions are likely to progress to malignancy. Here, we show that, albeit in a relatively small number of patients, in these lesions, monoclonality was restricted only to malignant evolution, while cutaneous infiltrates, which behaved in a clinically benign fashion, were always polyclonal. This confirms that histological image alone is often insufficient to detect malignancy, while malignant lymphocytes are indeed present and can be detected either by PCR or SB.

Taken together, our data suggest that there are 2 biologically distinct categories of histologically non-malignant lymphocytic infiltrates of the skin: those that are monoclonal and those that are polyclonal. Monoclonal infiltrates are associated with or precede the development of CTCL, while polyclonal lesions are more likely to be associated with a benign clinical course. It would be interesting to pursue this classification further to establish a correlation between

the clonality status of these lesions and specific morphological alteration or variation in the levels of expression of lymphocytic markers of differentiation.

In conclusion, we have shown that the simple PCR strategy used in this work is specific, sensitive, and can provide clinically relevant information when applied to the early diagnosis and follow-up of CTCL. Even though clonality should not be equated with malignancy, the results in this cohort of patients clearly indicate that identification of a clonal T-cell population in lymphocytic infiltrates of the skin either by PCR or SB is associated with malignant evolution. The value of clonality as a marker of malignancy is strongly supported by the absence of T-cell clonal populations in all the lesions of patients who did not develop lymphoma. Evidently, more patients should be studied to independently confirm the value of clonality determination in the diagnosis and clinical management of patients with atypical cutaneous T-cell infiltrates.

## ***Acknowledgement***

This work was supported in part by departmental funds and by a grant from Lafond et Associés.



## **REFERENCES**

- Algara P, Soria C, Martinez P, Sanchez L, Villuendas R, Garcia P, Lopez C, Orradre JL, Piris MA: Value of PCR detection of TCR- $\gamma$  gene rearrangement in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *Diagn Mol Pathol* 3: 275-282, 1994
- Allaire GS, Deschenes J, Turgeon PP, Gaboury L, Gorska-Flipot I, Laflame P, Biron GL. Angiocentric lymphoma presenting as massive unilateral eyelid swollen. *Can J Ophthalmol* 32: 259-264, 1997
- Asthan-Key M, Diss TC, Du MQ, Kirkham N, Wotherspoon A, Isaacson PG: The value of polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous T-cell infiltrates. *Am J Surg Pathol* 21: 743-747, 1997
- Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L: Heteroduplex analysis of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 11: 3271-3278, 1994
- Cerroni L, Kerl H : The use of monoclonal antibodies on paraffin sections in the diagnosis of cutaneous lymphoproliferative disorders. *Dermatol Clin* 12: 219-229, 1994
- Chott A, Vonderheid EC, Olbricht S, Miao NN, Balk SP, Kadin ME: The dominant T cell clone is present in multiple regressing skin lesions and associated T cell lymphomas of patients with lymphomatoid papulosis. *J Invest Dermatol* 106: 696-700, 1996
- Delfau-Larue MH, Petrella T, Lahet Ch, Lebozec Ch, Bagot M, Roudot-Thoraval F, Dalac S, Farcet JP, Wechsler J: Value of clonality studies of

- cutaneous T lymphocytes in the diagnosis and follow-up of patients with mycosis fungoides. *J Pathol* 184: 185-190, 1998
- Diss TC, Watts M, Pan LX, Burke M, Linch D, Isaacson PG: The polymerase chain reaction in the demonstration of monoclonality in T cell lymphomas. *J Clin Pathol* 48: 1045-1050, 1995
- Gorguet J, Wechsler J, Duga I, Delsol G: Diagnostic des infiltrats lymphoïdes cutané; diagnostic immunohistochimique. *Ann Pathol* 12: 244-249, 1992
- Griesser H: Gene rearrangements and chromosomal translocations in T-cell lymphoma - diagnostic applications and their limits. *Virchows Arch* 426: 323-338, 1995
- Landa NG, Zelickson BD, Peters MS, Muller SA, Pittelkow MR: Lymphoma versus pseudolymphoma of the skin: gene rearrangement study of 21 cases with clinicopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol* 29: 945-953, 1993
- Ralfkiaer E, O'Conner NTJ, Crick J, Wantzin GL, Mason DY: Genotypic analysis of cutaneous T-cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 88: 762-765, 1987
- Scheller U, Muche JM, Sterry W, Lukowsky A: Detection of clonal T cells in cutaneous T cell lymphoma by polymerase chain reaction: comparison of mutation detection enhancement-polyacrylamide gel electrophoresis, temperature gradient gel electrophoresis and fragment analysis of sequencing gels. *Electrophoresis* 19: 653-658, 1998
- Signoretti S, Murphy M, Cangi MG, Puddu P, Kadin ME, Loda M: Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements in paraffin-embedded

- tissue by polymerase chain reaction and non-radioactive single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 154: 67-75, 1999
- Slack DN, McCarthy KP, Wiedemann LM, Sloane JP: Evaluation of sensitivity, specificity, and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn Mol Pathol* 2: 223-232, 1993
- Staib G, Sterry W: Use of polymerase chain reaction in the detection of clones in lymphoproliferative diseases of the skin. *Recent Results in Cancer Research* 139: 239-247, 1995
- Theodorou I, Delfau-Larue MH, Bigorgne C, Lahet C, Cochet G, Bagot M, Wechsler J, Farcet JP: Cutaneous T-cell infiltrates: analysis of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood* 86: 305-310, 1995
- Tok J, Szabolcs MJ, Silvers DN, Zhong J, Matsushima AY: Detection of clonal T-cell receptor gamma chain gene rearrangements by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE) in archival specimens from patients with early cutaneous T-cell lymphoma: correlation of histologic findings with PCR/DGGE. *J Am Acad Dermatol* 38: 453-460, 1998
- Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA: Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 78: 192-196, 1991

- Tycko B, Ritz J, Sallan S, Sklar J: Changing antigen receptor gene rearrangements in a case of early pre-B cell leukemia: evidence for a malignant lymphoid stem cell and its implications for monitoring residual disease. *Blood* 79: 481-488, 1992
- Wechsler J: Diagnostic des infiltrats lymphoïdes cutanés; diagnostic différentiel des infiltrats lymphoïdes bénins et malins de la peau; critères morphologiques. *Ann Pathol* 12: 238-243, 1992
- Weiss LM, Hu E, Wood GS, Moulds C, Cleary ML, Warnke R, Sklar J: Clonal rearrangements of T-cell receptor genes in mycosis fungoides and dermatopathic lymphadenopathy. *N Engl J Med* 313: 537-544, 1985
- Willemze R, Kerl H, Sterry W, *et al.*: EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: A Proposal from the Cutaneous Lymphoma Study Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Blood* 90: 354-371, 1997
- Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, *et al.*: Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements in early Mycosis Fungoides/Sezary Syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 103: 34-41, 1994
- Zelickson BD, Peters MS, Muller SA, Thibodeau SN, Lust JA, Quam LM, Pittelkow MR: T-cell receptor gene rearrangement analysis: cutaneous T cell lymphoma, peripheral T cell lymphoma, and premalignant and benign cutaneous lymphoproliferative disorders. *J Am Acad Dermatol* 25: 787-796, 1991

Table I . Efficiency of detection of TCR gene rearrangements in T-cell skin lymphoma by PCR

	Number of cases	PCR $\beta/\gamma^a$ positive (%)
<b>T-cell skin lymphomas</b>		
Paraffin-embedded tissue	27	21 (77%)
Snap/frozen tissue	20	13 (65%)
Total	47	34 (72%)
<b>Negative controls<sup>b</sup></b>	25	0 (0%)

<sup>a</sup>Number of monoclonal cases detected by PCR

<sup>b</sup>Non-rearranged control samples,(see Materials and Methods section)

TABLE II . Clinical, histological and molecular follow-up of patients with CTCL

Patient No.	Disease	Follow-up	Biopsies / Date	Histological Diagnosis	Malignant/ Non-malignant	Presence of TCR Gene Rearrangement PCR <sup>a</sup>	SB
1	Mycosis Fungoides	3 yrs.	1. skin, 04.1991	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			‡2. skin, 03.1994	Perifolliculitis	B	+	+
			‡3. skin, 03.1994	Parapsoriasis	BL	+	-
			4. skin, 03.1994	Mycosis Fungoides	M	+	∇
2	Mycosis Fungoides	10 yrs.	1. skin, 01.1986	Mycosis Fungoides	M	-	∇
			2. skin, 04.1986	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			3. skin, 09.1986	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			4. skin, 05.1987	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			5. skin, 05.1987	Folliculitis	B	-	∇
			6. skin, 05.1987	Chronic Dermatitis	B	+	∇
			7. skin, 05.1987	Chronic Dermatitis	B	+	∇
			8. skin, 08.1989	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			9. skin, 08.1989	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			10. skin, 12.1991	CTCL	M	+	∇
			11. skin, 12.1992	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			‡12. skin, 01.1993	Lymphocytic infiltrate	BL	+	+
			13. skin, 11.1993	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			14. skin, 09.1995	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			15. skin, 09.1995	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			16. skin, 09.1995	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			17. skin, 06.1996	Mycosis Fungoides	M	+	∇
3	Mycosis Fungoides	2 yrs.	‡1. skin, 06.1992	Chronic Dermatitis	B	+	-
			2. skin, 11.1994	Mycosis Fungoides	M	+	∇
			3. skin, 11.1994	Mycosis Fungoides	M	+	∇
4	Mycosis Fungoides	6 yrs.	‡1. skin, 03.1992	ALyl	BL	-	+
			‡2. skin, 10.1992	Chronic Balanitis	B	-	+
			3. skin, 03.1993	Mycosis Fungoides	M	-	∇
			‡4. skin, 02.1995	Inflammatory Infiltrate	B	-	+
			*5. BM, 02.1995	Normal BM cells	B	-	-
			*6. LN, 01.1996	Mycosis Fungoides	M	-	+
			*7. LN, 09.1996	Dermatopathic lymphadenopathy	B	-	-
			*8. skin, 01.1997	Mycosis Fungoides	M	-	+
			*9. skin, 01.1997	Inflammatory Infiltrate	B	ND	+
			*10. skin, 02.1998	Mycosis Fungoides	M	-	+
5	Mycosis Fungoides	5 yrs.	1. skin, 01.1990	Actinic Reticuloid	BL	+	∇
			2. skin, 01.1990	Actinic Reticuloid	BL	+	∇
			3. skin, 02.1990	Mycosis Fungoides	M	-	∇
			4. skin, 02.1990	Mycosis Fungoides	M	-	∇
			5. skin, 06.1990	Chronic Dermatitis	B	+	∇
			6. skin, 03.1991	Chronic Dermatitis	B	+	∇
			7. skin, 05.1991	Psoriasis	B	+	∇
			8. LN, 12.1994	T-cell Lymphoma	M	+	∇
			9. skin, 12.1995	CTCL	M	+	∇
6	AILD Lymphoma	11 yrs.	1. LN, 07.1986	AILD Lymphoma	M	+	∇
			2. LN, 07.1986	AILD Lymphoma	M	+	∇
			3. skin, 05.1989	ALyl	BL	-	∇
			4. skin, 11.1990	Chronic Dermatitis	B	-	∇
			‡5. skin, 01.1995	Pseudolymphoma	BL	+	-
			6. skin, 02.1995	Pseudolymphoma	BL	+	∇
			7. skin, 03.1997	ALyl	BL	+	∇
			8. skin, 03.1997	Vascular Edema	B	+	∇
			9. skin, 03.1997	ALyl	BL	+	∇
			‡10. skin, 04.1997	ALyl	BL	-	-

7	T-cell Lymphoma	4 mos.	‡1. LN, 10.1993	T-cell Lymphoma	M	+	+
			*2. PBL, 12.1993	T-cell Lymphoma	M	+	+
			3. skin, 01.1994	CTCL	M	+	∇
			4. skin, 01.1994	CTCL	M	+	∇
			5. skin, 02.1994	Inflammatory Infiltrate	B	+	∇
8	CLL	12 mos.	1. skin, 11.1993	DLE	B	+	∇
			*2. PBL, 12.1993	Lymphocytosis	BL	+	+
			‡3. skin, 07.1994	Chronic Dermatitis	B	+	-
			4. skin, 09.1994	Vasculitis	B	+	∇
			*5. PBL, 10.1994	LGL	M	+	-
			*6. skin, 10.1994	ALyI	BL	-	-
			7. skin, 11.1994	Vasculitis	B	+	∇

<sup>a</sup>PCR-β and/or PCR-γ .

Abbreviations: PBL, peripheral blood cells; LN, lymph node; BM, bone marrow; AILD, angioimmunoblastic lymphadenopathy; ALyI, atypical lymphocytic infiltrate; CLL, chronic lymphocyte leukemia; CTCL, cutaneous T-cell lymphoma; DLE, disseminated lupus erythematosus; LGL, T-cell large granular lymphoma; BL, borderline lesion; B, benign lesion; M, malignant lesion; ND, not done.

‡ - Snap-frozen and paraffin-embedded tissue of the same lesion.

\* - Snap-frozen tissue.

∇ - Paraffin-embedded material on which Southern blot analysis could not be performed.

Table III. Clinical, histological and molecular follow-up of patients without CTCL

Patient No.	Disease	Follow-up	Biopsies/Date	Histological Diagnosis	Malignant/ Non-malignant	Presence of TCR Gene Rearrangement	
						PCR <sup>a</sup>	SB
9	Inflammatory skin disorder	11 yrs.	1. skin, 01.1985	LSC	B	-	∇
			2. skin, 04.1985	Chronic Dermatitis	B	-	∇
			3. LN, 04.1985	Actinic Reticuloid	BL	-	∇
			4. skin, 05.1986	Cutis Rhomboidalis	B	-	∇
			5. skin, 03.1987	Inflammatory Infiltrate	B	-	∇
			6. skin, 01.1988	Actinic Reticuloid	BL	-	∇
			7. skin, 02.1988	LSC	B	-	∇
			8. skin, 02.1988	LSC	B	-	∇
			9. skin, 02.1988	LSC	B	-	∇
			10. skin, 02.1988	Chronic Dermatitis	B	-	∇
			11. skin, 08.1988	LSC	B	-	∇
			12. skin, 02.1989	Prurigo Nodularis	B	-	∇
			13. skin, 07.1990	Inflammatory Infiltrate	B	-	∇
			14. skin, 07.1990	Inflammatory Infiltrate	B	-	∇
			15. skin, 07.1990	Fixed Drug Eruption	B	-	∇
			16. skin, 11.1990	Psoriasis	B	-	∇
			17. skin, 11.1990	Chronic Dermatitis	B	-	∇
			18. skin, 11.1990	Psoriasis	B	-	∇
			‡19. skin, 07.1991	Actinic Reticuloid	BL	-	-
			*20. skin, 12.1991	Actinic Reticuloid	BL	-	-
			21. skin, 08.1994	Chronic Dermatitis	B	-	∇
			22. skin, 08.1994	Inflammatory Infiltrate	B	-	∇
			23. skin, 04.1996	Chronic Dermatitis	B	-	∇
10	Pseudo-lymphoma	6 yrs.	1. skin, 01.1988	ALyl	BL	-	∇
			2. skin, 01.1988	ALyl	BL	-	∇
			3. LN, 01.1988	Fatty Regression	B	-	∇
			4. skin, 01.1991	Pseudolymphoma	BL	-	∇
			5. skin, 02.1991	Pseudolymphoma	BL	-	∇
			6. skin, 03.1994	ALyl	BL	-	∇
			‡7. skin, 03.1994	ALyl	BL	-	-
11	Lymphomatoid Papulosis (Lymph. Papul.)	2 yrs.	1. skin, 12.1995	Chronic Dermatitis	B	-	∇
			2. skin, 04.1996	Lymph. Papul.	BL	-	∇
			‡3. skin, 06.1996	Lymph. Papul.	BL	-	-
			*4. BM, 06.1996	Normal BM cells	B	-	-
			‡5. LN, 07.1996	Lymphadenopathy	B	-	-
			6. skin, 09.1997	Lymph. Papul.	BL	-	∇

<sup>a</sup>PCR-β and PCR-γ.

Abbreviations: LN, lymph node; BM, bone marrow; ALyl, atypical lymphocytic infiltrate; LSC, lichen simplex chronicus; BL, borderline lesion; B, benign lesion.

‡ - Snap-frozen and paraffin-embedded tissue of the same lesion.

\* - Snap-frozen tissue.

∇ - Paraffin-embedded samples on which Southern blot analysis could not be performed.



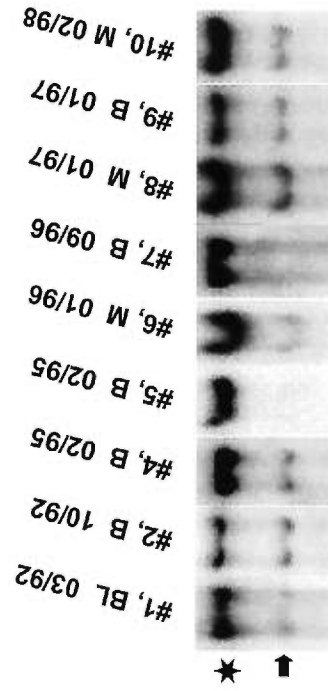
TABLE IV. Presence of monoclonal T-lymphocyte populations in borderline lesions of patients with and without CTCL<sup>a</sup>

Histological diagnosis	Patients with CTCL	Patients without CTCL
	number of biopsies with monoclonality / all biopsies	number of biopsies with monoclonality / all biopsies
Chronic Dermatitis (B)	6/7	0/6
Atypical Lymphocytic Infiltrate (BL)	4/7	0/4
Pseudolymphoma (BL)	2/2	0/2
Actinic Reticuloid (BL)	2/2	0/4
Inflammatory Infiltrate (BL)	3/3	0/4
Psoriasis (B)	1/1	0/2
TOTAL	16/22	0/22

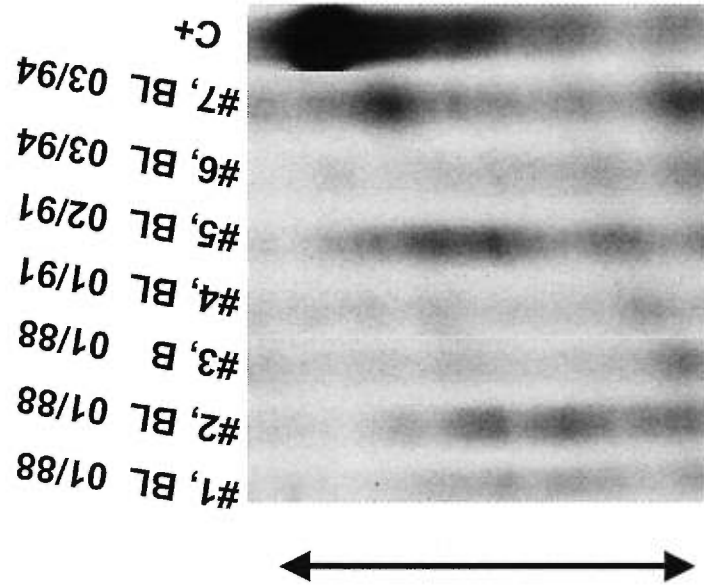
<sup>a</sup>Monoclonality was detected by PCR and SB  
 Abbreviations: B, benign; BL, borderline



**Figure 1. PCR detection of monoclonal T-cell populations in the majority of malignant (M), benign (B) and borderline (BL) skin lesions of MF patient no.2. The arrow indicates the rearranged fragment corresponding to a unique TCR- $\gamma$  clone in 15 out of 17 biopsies. Numbers, histological diagnoses and dates correspond to consecutive biopsies described in detail in Table II. "C+" - positive control, monoclonal CTCL lesion.**



**Figure 2. Detection of monoclonal T-cell populations by Southern blot analysis in initial borderline (BL) and subsequent malignant (M) and benign (B) lesions of MF patient no. 4.** The rearranged fragment is indicated by an arrow and the germline fragment by an asterisk. Numbers, histological diagnoses and dates correspond to the consecutive snap-frozen biopsies described in detail in Table II.



**Figure 3. PCR detection of polyclonal T-cell populations in all borderline (BL) and benign (B) lesions of non-progressing patient no. 10.** Numbers, histological diagnoses and dates correspond to the consecutive biopsies described in detail in Table III. "C+" - positive control, monoclonal CTCL lesion. Double-headed arrow indicates a smear of superimposed polyclonal fragments. PCR was carried out with TCR- $\gamma$  primers.

## **CHAPITRE # 3**

### **DISCUSSION**

La signification qu'on doit accorder à la mise en évidence d'une population monoclonale T lymphocytaire dans des infiltrats lymphoïdes cutanés que l'on qualifie soit de malin soit de *borderline*, c'est-à-dire des lésions dont les strictes caractéristiques histomorphologiques ne permettent ni de confirmer ni d'infirmer leur nature maligne demeure très controversée. Pourtant, il s'agit là d'une question très importante puisque le praticien, ayant rapidement épuisé les ressources de l'examen histomorphologique traditionnel, se trouve souvent fort démuni devant une lésion lymphocytaire atypique. Dans l'éventualité où l'identification d'une population clonale au sein d'une telle lésion pourrait fournir des informations utiles sur le devenir de la maladie, alors il y aurait un intérêt évident à la rechercher de façon systématique. De toute façon, il faut impérativement clarifier la signification d'un clone à cellules T dans les lésions *borderlines* et les lésions comme la dermatite (Wood *et al*, 1994), l'hyperplasie lymphoïde cutanée (Theodorou *et al*, 1995) et le parapsoriasis (Staib et Sterry, 1995). L'approche que nous avons utilisée pour déterminer la signification du clone T a consisté tout d'abord à suivre rétrospectivement l'évolution à long terme de la maladie au moyen des techniques PCR et le buvardage de Southern chez 11 patients atteints d'infiltrats lymphoïdes multiples et récidivants de la peau. Nous avons ensuite voulu établir une corrélation entre la présence ou l'absence du clone T et les données histomorphologiques et cliniques de chacun des patients.

Bien que l'analyse de Southern eut été longtemps considérée comme la méthode de choix pour identifier une prolifération monoclonale à cellules T (Diss *et al*, 1995), dans les faits, son application pour de petits échantillons cliniques comme les biopsies cutanées au poinçon est très limitée. En effet, ces échantillons sont le plus souvent fixés à la formaline et enrobés en paraffine. De plus, leur taille trop petite ne permet pas d'extraire suffisamment de l'ADN pour réaliser correctement cette analyse. En revanche, la technique de PCR est beaucoup mieux adaptée à la recherche d'un clone de cellules T sur les tissus fixés.

Le système de PCR appliqué aux gènes gamma et bêta permet l'identification d'un réarrangement clonal du RCT dans la majorité (68%) des prélèvements congelés des L.C.T. et encore davantage (77%) pour les tissus cutanés enrobés en paraffine. L'efficacité de la méthode que nous avons sélectionnée pour identifier le clone de cellules T est tout à fait comparable à celle des autres approches méthodologiques utilisées et citées dans les travaux récents où l'on avance des taux de détection allant de 59 à 83% dans les L.C.T. clonales (Ashton-Key *et al*, 1997; Tok *et al*, 1998; Delfau-Larue *et al*, 1998, Algara *et al*, 1994; Scheller *et al*, 1998). Seul Wood et collaborateurs (1994) prétendent que leur approche permet de détecter une population clonale dans 90% des L.C.T.. De fait, cette équipe utilise une approche PCR de type *nested primers* théoriquement plus sensible. Toutefois, une méthode ayant cette sensibilité présente, du moins théoriquement, un risque plus élevé d'amplifier une population clonale mineure dont la signification biologique est pour l'instant inconnue (Delfau-Larue *et al*, 1998).

Les résultats faux négatifs obtenus dans le cadre de notre étude concernent probablement des réarrangements clonaux  $V\gamma J\gamma$  ou  $D\beta J\beta$  pour lesquels les segments  $V\gamma$  ou  $D\beta$  distincts ne peuvent être mis en évidence à l'aide des amorces consensus que nous avons utilisées. L'utilisation d'amorces complémentaires aux segments géniques  $V\gamma 11$  ou  $D\beta 2$  pourrait théoriquement améliorer la sensibilité globale de notre PCR. Toutefois, il faut se rappeler que ces amorces génèrent des amplicons de plus grande taille et partant que ces amorces pourraient ne pas fonctionner adéquatement dans le contexte de l'utilisation d'échantillons fixés à la formaline et enrobés en paraffine. L'absence de résultats faux positifs parmi les contrôles négatifs que nous avons utilisés nous rassure sur la spécificité élevée de notre méthode de PCR.

L'étude rétrospective des populations clonales lymphocytaires T que nous avons menée concerne 11 patients: 8 d'entre eux sont atteints d'un L.C.T. (groupe 1); 3 autres présentent des lésions cutanées dont la caractéristique

principale est d'être composée d'un infiltrat lymphocytaire de type réactionnel (groupe 2). Cette étude rétrospective a permis de mieux comprendre l'évolution clinique d'affections cutanées qui s'accompagnent d'infiltrats lymphocytaires et de caractériser précisément le génotype retrouvé dans de telles populations.

Les observations que nous avons établies concernant les rapports existant entre le diagnostic histologique des lésions du 1<sup>er</sup> groupe et le statut de clonalité confirment celles des études précédentes (Ashton-Key *et al*, 1997; Delfau-Larue *et al*, 1998; Chott *et al*, 1996; Tok *et al*, 1998, Zelikson *et al*, 1991; Landa *et al*, 1993) indiquant que les lésions cutanées de mycosis fungoïdes au stade tumoral et leurs précurseurs (parapsoriasis et pseudolymphome) sont essentiellement des atteintes clonales. Toutefois, nos travaux indiquent aussi l'existence d'un clone T spécifique dans plusieurs affections cutanées réputées bénignes du fait qu'elles affichent un aspect histologique typique de lésions inflammatoires telles la vasculite, la folliculite, la balanite chronique et le lupus érythémateux. À notre connaissance, c'est la première fois qu'on rapporte une population lymphocytaire T clonale pour ces lésions.

Dans seulement trois cas de syndrome lymphoprolifératif malin, les analyses de Southern et de PCR n'ont pu identifier un clone T. Ces résultats faux négatifs pourraient être secondaires au faible nombre de cellules T néoplasiques présentes dans ces échantillons comme semblent le suggérer les résultats positifs obtenus pour d'autres échantillons tissulaires du même patient (sang, ganglions et peau). En ce qui concerne les infiltrats atypiques de type BL mais non clonaux survenant chez des patients avec L.C.T., on ne peut exclure que ces lésions soient bel et bien bénignes et donc sans aucun rapport avec le lymphome déjà diagnostiqué.

Concernant maintenant la corrélation existant entre la présence d'une population clonale et le pronostic vital, nos travaux indiquent que la moitié des malades du groupe 1 (patients no. 3, 4, 5 et 8) présentaient une population



monoclonale de lymphocytes T dans plusieurs de leurs prélèvements initiaux classés alors dans le groupe des lésions BL. Tous ces patients ont développé par la suite, dans une période variant entre un mois et trois ans, un lymphome cutané T suggérant que les infiltrats lymphoïdes atypiques clonaux possèdent la capacité d'évoluer vers un lymphome cutané agressif. Une autre interprétation, tout aussi vraisemblable est que les patients no. 3, 4, 5 et 8 avaient en réalité un lymphome dès le départ mais que le diagnostic n'a pu être posé plus tôt faute d'arguments sémiologiques suffisants mais qu'il a pu l'être dans les mois ou années qui s'ensuivirent.

Pour les autres patients du groupe 1 (patients no. 1, 2, 6 et 7) les biopsies initiales avaient permis de poser le diagnostic de lymphome T malin à localisation cutanée primitive ou secondaire. Un clone T spécifique identique a pu être retrouvée régulièrement non seulement dans la vaste majorité des lésions ayant un caractère typiquement malin mais encore dans beaucoup d'affections intercurrentes classées BL. Ces résultats suggèrent donc que les infiltrats clonaux à cellules T de type BL retrouvés chez nos patients no. 1, 2, 6 et 7 témoignent en réalité de la persistance des cellules lymphomateuses T.

En somme, les résultats de l'examen génotypique semblent indiquer que les méthodes PCR et Southern peuvent détecter une population lymphocytaire T néoplasique dans des lésions dont les caractéristiques histologiques ne permettent pas d'en affirmer la malignité.

D'autre part, les résultats obtenus à la suite de l'étude des patients du groupe 2 supporte la valeur diagnostique et pronostique de la détection d'une population clonale de lymphocytes T dans la mesure où les patients chez qui on a identifié une population polyclonale dans l'infiltrat lymphoïde BL n'ont pas développé 2 à 11 ans plus tard de signes cliniques ou pathologiques de L.C.T. Il semble donc que l'absence de population monoclonale dans un infiltrat lymphocytaire soit effectivement associée à une évolution favorable puisque pour

les individus chez qui l'on a identifié un réarrangement polyclonal du RCT, il n'y pas eu apparition de lymphome. Ceci tranche très nettement avec la situation évoquée plus haut où la mise en évidence d'un réarrangement clonal précédait ou accompagnait un lymphome cutané T.

Il convient toutefois d'interpréter ces résultats avec la plus grande prudence; d'abord, puisque le nombre de patients inclus dans l'étude est limité, ensuite, parce que la période de relance est relativement courte notamment pour le patient no.9 pour lequel un suivi de seulement deux années est disponible. Quoiqu'il en soit, certains faits sont dignes de mention. D'abord, les infiltrats lymphoïdes BL de la peau surviennent chez tous les patients étudiés, indépendamment de leur évolution clinique. Le pronostic vital de ces lésions ne peut être prédit en se fondant uniquement sur des arguments histomorphologiques ou immunohistochimiques. Ensuite, les outils de biologie moléculaire, dans les limites très strictes de l'étude que nous avons menée, nous ont permis de détecter une population lymphocytaire T clonale chez les individus ayant une lésion cutanée BL et qui ont développé au cours des années un lymphome. Dans un même ordre d'idée, nous avons aussi montré que les affections cutanées BL étaient toujours polyclonales chez les patients dont l'évolution était exempte de lymphome.

En somme, nos observations semblent indiquer que l'identification d'un réarrangement clonal du RCT pourrait être utilisé avec profit dans le diagnostic différentiel des infiltrats lymphocytaires atypiques et qu'il pourrait être utilisé comme marqueur pronostic. Nos résultats et des études récentes (Wood *et al*, 1994; Delfau-Larou *et al*, 1998) suggèrent également qu'il existe deux catégories des infiltrats lymphoïdes atypiques de la peau: ceux qui sont monoclonaux et ceux qui sont polyclonaux. Les infiltrats monoclonaux sont associés au L.C.T. ou bien le précèdent. Inversement, les infiltrats polyclonaux semblent traduire une évolution favorable de la maladie. Il serait très intéressant de tirer profit de cette observation afin d'élaborer si possible de nouveaux critères histologiques ou

immunohistochimiques capables de rendre compte de ces différences essentielles. Ces examens pourraient fournir des paramètres additionnels capables de faciliter le diagnostic des infiltrats cutanés lymphoïdes et permettre une classification de ces lésions qui prennent en compte une caractéristique fonctionnelle importante des populations lymphocytaires.

**CHAPITRE # 4**

**CONCLUSION**

L'identification d'une population clonale T dans les lésions tissulaires de patients ayant de multiples récurrences d'infiltrats cutanés *borderline* et ayant éventuellement développé un L.C.T. a permis de porter le diagnostic de lymphome malin à un stade très précoce de la maladie. Notre approche méthodologique Southern/PCR s'est révélée à la fois sensible et très spécifique. Un diagnostic précoce de la maladie nous semble maintenant à portée de main et il faut espérer que ceci se traduise à plus long terme par un meilleur pronostic, un traitement mieux adaptée, une diminution du nombre des récurrences et une survie prolongée pour les malades.

Pour conclure, et en dépit des incertitudes des vingt dernières années entourant la découverte d'un clone de cellules T, nos travaux récents indiquent que la détection d'une population monoclonale T dans les infiltrats lymphoïdes atypiques est associée à un mauvais pronostic. L'utilisation de la monoclonalité T comme marqueur tumoral semble bien devoir s'imposer dans la mesure où la monoclonalité est absente dans les processus réactionnels non lymphomateux. Évidemment, même si nous estimons que des travaux ultérieurs portant sur un plus grand nombre de malades seront indispensables pour confirmer les conclusions de notre étude, nos travaux ont permis à tout le moins d'explorer les pistes les plus prometteuses et d'ouvrir la voie à de nouvelles perspectives en recherche.

**CHAPITRE # 5**  
**BIBLIOGRAPHIE**

1. Algara P, Soria C, Martinez P, Sanchez L, Villuendas R, Garcia P, Lopez C, Orradre JL, Piris MA. 1994. Value of PCR detection of TCR- $\gamma$  gene rearrangement in the diagnosis of cutaneous lymphocytic infiltrates. *Diagn Mol Pathol* 3: 275-282.
2. Anagnostopoulos I, Hummel M, Kaudewitz P, Korbjuhn P, Leoncini I, Stein H. 1996. Low incidence of Epstein-Barr virus presence in primary cutaneous T-cell lymphoproliferations. *Br J Dermatol* 134: 276-281.
3. Angel CA, Slater DN, Royds JA, Nelson SN, Blechen SS. 1996. Absence of Epstein-Barr viral encoded RNA (EBER) in primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Pathol* 178: 173-175.
4. Asthon-Key M, Diss TC, Du MQ, Kirkham N, Wotherspoon A, Isaacson PG. 1997. The value of polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous T-cell infiltrates. *Am J Surg Pathol* 21: 743-747.
5. Bagot M. 1993. Progrès dans le diagnostic et la physiopathologie des lymphomes cutanés. *Ann. Dermatol. Venereol.* 120: 43-52.
6. Beylot-Barry M, Groppi A, Vergier B, Pulford K, Merlio JP. 1998. Characterisation of t(2;5) reciprocal transcripts and genomic breakpoints in CD30+ cutaneous lymphoproliferations. *Blood* 91: 4668-4676.
7. Bottaro M, Berti E, Biondi A, Migone N, Crosti L. 1994. Heteroduplex analysis of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements for diagnosis and monitoring of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 83: 3271-3278.

8. Burg G, Häffner A, Böni R, Dommann S, Dummer R. 1995. New perspectives in experimental and clinical research for cutaneous T cell lymphoma. *Recent Results in Cancer Research* 139: 225-237.
9. Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG. 1996. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonisation ratios vary with age. *Blood* 88: 59-65.
10. Busque L, Zhu J, DeHart D, Griffith B, Willman C, Carroll R, Black PMcl, Gilliland DG. 1994. An expression based clonality assay at the human androgen receptor locus (HUMARA) on chromosome X. *Nucleic Acids Res* 22: 697.
11. Cerroni L, Kerl H. 1994. The use of monoclonal antibodies on paraffin sections in the diagnosis of cutaneous lymphoproliferative disorders. *Dermatologic Clinics* 12: 219-229.
12. Cerroni L, Zöchling N, Puetz B. 1997. Infection by *Borrelia burgdorferi* and cutaneous B-cell lymphoma. *J Cutan Pathol.* 24:457-461.
13. Chott A, Vonderheid EC, Olbricht S, Ning-Ning M, Balk SP, Kadin ME. 1996. The same dominant T cell clone is present in multiple regressing skin lesions and associated T cell lymphomas of patients with lymphomatoid papulosis. *J. Invest. Dermatol.* 106: 696-700.
14. Clavel Ch, Binnering I, Polette M, Boutterin MC, Birembaut Ph. 1993. Polymérase chain reaction (P.C.R.) et pathologie. *Ann. Pathol.* 13: 88-96.
15. Cossman J, Uppenkamp M, Sundeen J, Coupland R, Raffeld M. 1988. Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 112: 117-127.



16. Davis TH, Yockey CE, Balk SP. 1993. Detection of clonal immunoglobulin gene rearrangements by polymerase chain reaction amplification and single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 142: 1841-1847.
17. Deane M, McCarthy KP, Wiedemann LM, Norton JD. 1991. An improved method for detection of B-lymphoid clonality by polymerase chain reaction. *Leukemia* 5: 726-730.
18. DeCoteau JF, Butmare JR, Kinney MC, Kadin ME. 1996. The t(2;5) chromosomal translocation is not a common feature of primary cutaneous CD30+ lymphoproliferative disorders: comparison with anaplastic large-cell lymphoma of nodal origin, *Blood* 87: 3437-3441.
19. Delfau-Larue MH, Petrella T, Lahet C, Lebozec C, Bagot M, Roudot-Thoraval F, Dalac S, Farcet JP, Wechsler J. 1998. Value of clonality studies of cutaneous T lymphocytes in the diagnosis and follow-up of patients with Mycosis Fungoides. *J Pathol* 184: 185-190.
20. Diss TC, Watts M, Pan LX, Burke M, Linch D, Isaacson PG. 1995. The polymerase chain reaction in the demonstration of monoclonality in T cell lymphomas. *J Clin Pathol* 48: 1045-1050.
21. Dréno B, Célérier P, Fleischmann M, Bureau B, Litoux P. 1994. Presence of Epstein-Barr virus in cutaneous lesions of mycosis fungoides and Sezary Syndrome. *Acta Dermatol*: 74: 355-357.
22. Dubus P, Labouyrie E, Bilhou-Nabera C, Belleanne G, Vergier B, Bernard Ph, De Mascarel A, Merlio J Ph. 1994. Étude de la clonalité B lymphocytaire par la technique d'amplification de gène *in vitro* (PCR) à partir de prélèvements fixés et inclus en paraffine. *Ann Pathol* 14: 227-233.

23. Dubus P, Vergier B, Beylot-Barry M, Delaunay MM, Goussot JF, Beylot C, de Mascarel A, Farcet JP, Merlio JP. 1996. Contribution of histopathologic molecular analyses to the diagnosis of cutaneous B-cell infiltrates. *Mod Pathol* 9: 1147-1155.
24. El Kasser N, Hefet G, Brière G, Grandchamp B. 1998. X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonisation with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. *Clinical Chemistry* 44: 61-67.
25. Fey MF, Liechti-Gallati S, von Rohr A. 1994. Clonality and X-inactivation patterns in hematopoietic cell populations detected by the highly informative M27 beta DNA probe. *Blood* 15: 931-938.
26. Fialkow PJ. 1976. Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta* 458: 283.
27. Finn DT, Joworsky Ch, Chooback L, Jensen PJ, Lessin SR 1996. Correlation between clonotypic T-cell receptor beta chain variable region (TCR-V $\beta$ ) gene expression and aberrant T-cell antigen expression in cutaneous T-cell lymphoma. *J Cutan Pathol* 23: 306-311.
28. Garatti SA, Roscetti E, Trecca D, Francchiolla NS, Neri A, Berti E. 1995. *bcl-1*, *bcl-2*, *c-myc*, and *lyt-10* analysis in cutaneous lymphomas. *Recent Results in Cancer Research* 139: 249-261.
29. Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. 1991. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 6848-6852.

30. Gorguet B, Wechsler J, Duga I, Delsol G. 1992. Diagnostic des infiltrats lymphoïdes cutanés: diagnostic immunohistochimique. *Ann. Pathol.* 12: 244-249.
31. Griesser H. 1995. Gene rearrangements and chromosomal translocations in T cell lymphoma-diagnostic applications and their limits. *Virchows Arch* 426: 323-338.
32. Harada M, Suzuki M, Ikeda T, Kaneko T, Harada S, Fukayama M. 1997. Clonality in nevocellular nevus and melanoma: an expression-based clonality analysis at the X-linked genes by polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 109: 656-660.
33. Harrington DS. 1990. Molecular gene rearrangement analysis in hematopathology. *Am J Clin Pathol.* 93 (Suppl 1): S38-S43.
34. Hodges E, Howell WM, Boyd Y, Smith JL. 1991. Variable X - chromosome DNA methylation patterns detected with probe M27 beta in a series of lymphoid and myeloid malignancies. *Br J Haematol* 77: 315-322.
35. Hotta T. 1997. Clonality in hematopoietic disorders. *Int J Hematol* 66: 403-412.
36. Jaworsky C, Cirrillo-Hyland V, Petrozzi JW, Lessin SR, Murphy GF. 1990. Regressing atypical histiocytosis: aberrant prothymocyte differentiation, T-cell rearrangements and nodal involvement. *Arch Dermatol.* 126: 1609-1616.
37. Jumbou O, Huet S, Bureau B, Litoux P, Dréno B. 1998. Recherche de l'Epstein-Barr virus par hybridation in situ chez 65 malades atteints de lymphomes cutanés T épidermotropes. *Ann Dermatol Venereol* 125: 90-93.

38. Kadin ME and Morris SW. 1998. The t(2;5) in human lymphomas. *Leuk Lymphoma* 29: 249-256.
39. Kadin ME, Vonderheid EC, Sako D, Clayton LK, Olbricht S. 1987. Clonal composition of T cells in lymphomatoid papulosis. *Am J Pathol.* 126: 13-17.
40. Kaplan JC et Delpech M: *Biologie moléculaire et médecine*, 1<sup>re</sup> éd. Paris: Flammarion Médecine-Science, 1989, 267-272; 365-377.
41. Kelly A, Richards SJ, Sivakumaran M, Shiach C, Stewart AD, Roberts BE, Scott CS. 1994. Clonality of CD3 negative large granular lymphocyte proliferations determined by PCR based X-inactivation studies. *J Clin Pathol* 47: 399-404.
42. Kempf W, Dummer R, Burg G. 1999. Approach to lymphoproliferative infiltrates of the skin. *Am J Clin Pathol* 111 (Suppl.1): S84-S93.
43. Khan ZM, Sebenik M, Zucker-Franklin D. 1996. Localization of human T-cell lymphotropic virus-1 tax proviral sequences in skin biopsies of patients with mycosis fungoides by *in situ* polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 106: 667-672.
44. Knudson AG. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 10914-10921
45. Küppers R, Zhao M, Rajewsky K, Hansmann ML. 1993. Detection on clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 143: 230-239.

46. Landa NG, Zelickson BD, Peters MS, Muller SA, Pittelkow MR. 1993. Lymphoma versus pseudolymphoma of the skin: gene rearrangement study of 21 cases with clinicopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol* 29: 945-953.
47. Le Boit PE, Beckstead JH, Bond B, Epstein WL, Frieden IJ, Parslow TG. 1987. Granulomatous slack skin: clonal rearrangement of the T cell receptor is evidence for the lymphoproliferative nature of a cutaneous elastolytic disorder. *J Invest Dermatol* 89: 183-186.
48. Lessin SR, Rook AH, Rovera G. 1991. Molecular diagnosis of cutaneous T-cell lymphoma: polymerase chain reaction amplification of T cell antigen receptor  $\beta$ -chain gene rearrangements. *J Invest Dermatol* 96: 299-302.
49. Li G, Salhany KE, Rook AH, Lessin SR. 1997. The pathogenesis of large cell transformation in cutaneous T-cell lymphoma is not associated with t(2;5)(p23;q35) chromosomal translocation. *J Cutan Pathol* 24: 403-408.
50. Lightfoot NE and Mao Y. 1998. Non-Hodgkin's lymphoma: the disease and occupational and other risk factors. *Current Oncology* 5: 33-47.
51. Mark HFL, Rehan J, Mark S, Santoro K, Zolnierz K. 1998. Fluorescence in situ hybridization of single-cell trisomies for determination of clonality. *Cancer Genet Cytogenet* 102:1-5.
52. McCarthy KP, Sloane JP, Kabarowski JHS, Matutes E, Wiedemann LM. 1992. A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor- $\gamma$  chain gene. *Diagn Mol Pathol* 1: 173-179.

53. Menke MAOH, Tiemann M, Vogelsang D, Boie Ch, Parwaresch R. 1995. Temperature gradient gel electrophoresis for analysis of a polymerase chain reaction-based diagnostic clonality assay in the early stages of cutaneous T-cell lymphomas. *Electrophoresis* 16: 733-738.
54. Meyer JC, Hassam S, Dummer R, Muletta S, Dobbeling U, Dommann SN, Burg G. 1997. A realistic approach to the sensitivity of PCR-DGGE and its applications as a sensitive tool for the detection of clonality in cutaneous T-cell proliferations. *Exp Dermatol* 6: 122-127.
55. Mori M, Santucci M, Pimpinelli N. 1995. Architectural and antigenic features of follicular dendritic cells as a clue to the histogenesis of primary cutaneous B-cell lymphoma. *Adv Exp Med Biol* 378: 277-279.
56. Neri A, Fracchiolla NS, Roscetti E, Garatti S, Trecca D, Boletini A, Perletti L, Baldini L, Maiolo AT, Berti E. 1995. Molecular analysis of cutaneous B- and T-cell lymphoma. *Blood* 8: 3160-3172.
57. Pancake BA, Zucker-Franklin D, Coutavas EE. 1995. The cutaneous T-cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T cell lymphotropic virus-associated disease. *J Invest Dermatol* 105: 547.
58. Park CK, Ko YH. 1996. Detection of EBEB nuclear RNA in T-cell lymphomas involving the skin-an in situ hybridisation. *J Dermatol* 134:488-493.
59. Piérard GE, Hermanns-Lé T, Arrese JE, Piérard-Franchimont C. 1996. Synopsis des lymphomes cutanés primitifs. *Rev Med Liege* 51: 12: 754-758.
60. Revillard, JP: *Immunologie*, 2<sup>ème</sup> éd. Bruxelles: De Boeck & Larcier S.A., 1995, 33-44.

61. Rijlaarsdam JU et Willemze R. 1993. Diagnostic et classification des pseudolymphomes cutanés. *Ann. Dermatol. Venereol.* 120: 100-106.
62. Rijlaarsdam JU, Bakels V, van Oostveen JW, Gordijn RJ, Geerts ML, Meijer CJ, Willemze R. 1992. Demonstration of clonal immunoglobulin gene rearrangements in cutaneous B-cell lymphomas and pseudo-lymphomas: differential diagnostic and pathogenetic aspects. *J Invest Dermatol* 99: 749-754.
63. Ritter JH, Wick MR, Adesokan PN, Fitzgibbon JF, Zhu X, Humphrey PA. 1997. Assessment of clonality in cutaneous lymphoid infiltrates by polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement. *Am J Clin Pathol* 108: 60-68.
64. Scheller U, Muche JM, Sterry W, Lukowsky A. 1998. Detection of clonal T cells in cutaneous T cell lymphoma by polymerase chain reaction: Comparison of mutation detection enhancement-polacrylamide gel electrophoresis, temperature gradient gel electrophoresis and fragment analysis of sequencing gels. *Electrophoresis* 19: 653-658.
65. Setoyama M, Kerdel FA, Elgart G, Kanzaki T, Byrnes JJ. 1998. Detection of HTLV-1 by polymerase chain reaction *in situ* hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol* 152: 683-689.
66. Signoretti S, Murphy M, Cangi MG, Puddu P, Kadin ME, Loda M. 1999. Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements in paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction and nonradioactive single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 154: 67-75.

67. Simon M, Kind P, Kaudewitz P, Krokowski M, Graf A, Prinz J, Puchta U, Medeiros LJ, Sander CA. 1998. Automated high-resolution polymerase chain reaction analysis: a method for detecting T-cell receptor  $\gamma$ -chain gene rearrangements in lymphoproliferative diseases. *Am J Pathol* 152: 29-33.
68. Slack DN, McCarthy KP, Wiedemann LM, Sloane JP. 1993. Evaluation of sensitivity, specificity, and reproducibility of an optimized method for detecting clonal rearrangements of immunoglobulin and T-cell receptor genes in formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn Mol Pathol* 2: 223-232.
69. Staib G and Sterry W. 1995. Use of polymerase chain reaction in the detection of clones in lymphoproliferative diseases of the skin. *Resent Results in Cancer Research* 139: 239-247.
70. Su IJ, Tsai TF, Cheng AL, Chen CC. 1993. Cutaneous manifestations of Epstein-Barr virus-associated T-cell lymphoma. *J Am Acad dermatol* 29: 685-692.
71. Theodorou I, Delfau-Larue MH, Bigorgne C, Lahet C, Cochet G, Bagot M, Wechsler J, Farcet JP. 1995. Cutaneous T-cell infiltrates: analysis of T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangement by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Blood* 86: 305-310.
72. Tok J, Szabolcs MJ, Silvers DN, Zhong J, Matsushima AY. 1998. Detection of clonal T-cell receptor gamma chain gene rearrangements by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE) in archival specimens from patients with early cutaneous T-cell lymphoma: correlation of histologic findings with PCR/DGGE. *J Am Acad Dermatol* 38: 453-460.



73. Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. 1991. Gene rearrangement in B and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. *Blood* 78: 192-196.
74. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Fienberg AP. 1985. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science* 227: 642-645.
75. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Preisinger AC, Willard HF, Michelson AM, Riggs AD, Orkin SH. 1987. Clonal analysis using recombinant DNA probes from the X-chromosome. *Cancer Res* 47: 4806.
76. Volkenandt M, Soyer HP, Kerl H, Bertino JR. 1991. Development of highly specific and sensitive molecular probe for detection of cutaneous lymphoma. *J Invest Dermatol* 97: 137-140.
77. Volkenandt M, Wienecke R, Koch OM, Buer J, Probst M, Atzpodien J, Horikoshi T, Danenberg P, Danenberg K, Bertino JR. 1993. Conformational polymorphisms of cRNA of T cell receptor genes as a clone-specific molecular marker for cutaneous lymphoma. *J Invest Dermatol* 101: 514-516.
78. Wechsler J, Willemze R, van der Brule, Thomine E, Joly P, Verola O, Fonck Y, Souteyrand P, Delfau MH, Bagot M, Gaulard P. 1998. Differences in Epstein-Barr virus expression between primary and secondary cutaneous angiocentric lymphomas. French study group of cutaneous lymphomas. *Arch Dermatol* 134: 479-484.
79. Wechsler J. 1992. Diagnostic des infiltrats lymphoïdes cutanés: diagnostic différentiels des infiltrats lymphoïdes bénins et malins de la peau: critères morphologiques. *Ann. Pathol.* 12: 238-243.

80. Weinberg JM, Rook AH, Lessin SR. 1993. Molecular diagnosis of lymphocytic infiltrates of the skin. *Arch Dermatol*. 129: 1491-1500.
81. Weiss LM, Hu E, Wood GS, Moulds C, Cleary ML, Warnke R, Sklar J. 1985. Clonal rearrangements of T-cell receptor genes in Mycosis Fungoides and dermatopathic lymphadenopathy. *N Engl J Med*. 313: 539-544.
82. Weiss LM, Wood GS, Ellisen LW, Reynolds TC, Sklar J. 1987. Clonal T-cell populations in Pityriasis Lichenoides et Varioliformis Acuta (MUCHA-HABERMANN Disease). *Am J Pathol* 126: 417-421.
83. Willemze R, Kerl H, Sterry W, Berti E, Cerroni L, Chimenti S, Diaz-Pérez JL, Geerts ML, Goos M, Knobler R, Ralfkiaer E, Santucci M, Smith N, Wechsler J, van Vloten WA, Meijer CJLM. 1997. EORTC classification for primary cutaneous lymphomas: a proposal from the cutaneous lymphoma study group of the european organisation for research and treatment of cancer. *Blood* 90: 354-371.
84. Wood GS, Schaffer JM, Boni R, Dummer R, Burg G, Takeshita M, Kikuchi M. 1997. No evidence of HTVL-1 proviral integration in lymphoproliferative disorders associated with cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Pathol*: 150: 667-673.
85. Wood GS, Tung RM, Haeffner AC, Crooks CF, Liao S, Orozco R, Veelken H, Kadin ME, Koh H, Heald P, Barnhill RL, Sklar J. 1994. Detection of clonal T-cell receptor  $\gamma$  gene rearrangements in early Mycosis Fungoides/Sezary Syndrome by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR/DGGE). *J Invest Dermatol* 103: 34-41.
86. Wood GS. 1995. Lymphocyte activation in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 105: 105S-109S.

87. Wood GS: Molecular biologic techniques for the diagnosis of cutaneous lymphomas, in Barnhill RL (ed): *Textbook of Pathology and Dermatology*. Boston: The McGraw-Hill companies, Inc., 1998, 864-869.
88. Zelickson BD, Peters MS, Muller SA, Thibodeau SN, Lust JA, Quam LM, Pittelkow MR. 1991. T-cell receptor gene rearrangement analysis: cutaneous T cell lymphoma, peripheral T cell lymphoma, and premalignant and benign cutaneous lymphoproliferative disorders. *J Am Acad Dermatol* 25: 787-79.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier la Compagnie Lafond et Associés pour son support financier.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers le Dr Louis Gaboury, mon directeur de recherche, qui a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. Ses conseils ont été essentiels à la réussite de ce projet.

Merci aux Drs Izabella Gòrska-Flipot et Louis Lamarre qui ont accepté la codirection de mes travaux. Leur disponibilité et les critiques constructives qu'ils m'ont adressées m'ont beaucoup aidé dans la poursuite de mes travaux.

Merci au Dr Serge Nolet pour ses encouragements et, surtout pour l'ambiance de travail stimulante dont il m'a entouré.

Enfin, un grand merci à tout le personnel du Département de pathologie de l'Hôpital Hôtel-Dieu de Montréal du CHUM pour sa gentillesse et pour les services dont j'ai pu bénéficier tout au long de mon travail.