

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie
Mémoire de fin d'études
En vue d'obtention du Diplôme de Master en Science Biologiques
Option : Biochimie appliquée



THÈME :

Étude épidémiologique et caractérisation Immunophénotypique et histologique de la leucémie lymphoïde chronique LLC-B dans la région de Tizi-Ouzou.

Réalisé par:

- Fellag Selma
- Lakhel Yasmine
- Hamdi Nour El Houda

Soutenu le : 12 /07/2023

Membre de jury :

Président de jury :	Pr Benahmed Djilali A	Professeur	UMMTO
Examinatrice:	Dr Benazzouz K.	MCB	UMMTO
Promoteur:	Dr Yezid H.	MCA	UMMTO

Année universitaire : 2022-223

Remerciement

Nous tenons à remercier au premier lieu notre Promoteur Dr Yezid H Maitre-de conférences

A la faculté de Biologie à l'UMMTO :

On vous remercie de nous avoir encadrées, orientées, aidées et conseillées. Votre encouragement inlassable, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.

Nous tenons à remercier aussi les membres de jury Pr Benahmed Djilali A et Dr Benazzouz K.

pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Nous tenons à remercier Monsieur Kedache et l'ensemble de la faculté de Biologie.

On n'oublie pas d'associer à nos remerciements tout le personnel du service d'hématologie et

hémobiologie spécialement : Ferka Lynda, Hayet,

Taboudjemaths Mohammed, Dr : Ait Sadik et Dr : Allouda et Tachour

pour leur soutien, gentillesse et bienveillance.

On remercie aussi le personnel du laboratoire d'immunologie de CHU de Béni-Messous.

Nous tenons enfin à remercier tous ceux qui ont collaborés de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

Je dédie cet évènement marquant de ma vie à mes chers parents qui sans leurs soutien je ne serais pas là aujourd'hui.

*A la mémoire de ma grand mère **Fatima**.*

*A ma chère **mère** qui a toujours cru en moi dans mes échecs et dans ma réussite. Quoi que je fasse je ne saurais te remercier comme il se doit .Tu es mon guide ,ta présence à mes cotés a toujours été une source d'énergie et force pour affronter tous les obstacles.*

*A mon cher **père** , tu as toujours été fier de moi ceci m'a encouragé à continuer d'avancer et réussir ainsi je suis fière d'être ta fille. Tu m'as appris à être humble malgré tous nos succès. C'est grâce à toi que je suis devenue la femme que je suis aujourd'hui.*

*A mes chers frères **Bilel** , **Idris** et le leurs femmes ,et mes deux petits frères **moussa** , **daoud** et mes **sœurs cherifa et Aïcha** et leurs enfants en particulier **Aymen** .*

*Je ne pourrais pas passer ce dédicace sans rappeler le soutien de mon frère **Bilel***

tu es mon deuxième père.

*A ma deuxième famille, mon mari **Mourad** qui m'a vraiment soutenu pendant ces deux années , soutien moral et physique. Je ne saurais jamais te remercier .Que dieu nous garde l'un pour l'autre .*

Dieu merci de m'avoir donné un précieux cadeau pour assister à cet évènement,

*ma fille **Maria** .*

A ma belle famille, belle mère et sœurs.

*A mon groupe **Houda** et **Yasmine** pour la détermination et le courage dont elles ont fait preuve. **Houda** les mots ne suffisent pas pour te remercier ma troisième sœur , merci pour tous tes efforts et surtout ta patience , que dieu te bénisse.*

*Sans oublier **Manel** et **Nihed**.*

A tous les profs qui ont contribué à mon instruction, merci.

***Selma**.....*

Dédicace

Je dédie ce travail :

*A mes grands- parents **Vah** et **Jedi lhadj**. Qui nous ont quittés mais vous vivez toujours dans nos cœurs. A chaque fois que je pense à vous, je me sens envahie par un sentiment de sécurité. Que votre âme repose en paix.*

*A mes parents, merci pour votre soutien sans faille depuis toujours. Merci à **ma mère** pour ses sacrifices sans limite et nos discussions si réconfortantes. Tu as vécu chaque épreuve de mon parcours comme si c'était le tien et je ne te remercierai jamais assez. Merci à **mon père** pour son implication et son aide dans ma scolarité depuis mon plus jeune âge ainsi que pour ses précieux conseils et ses encouragements pendant les moments de doutes. Je ne peux que vous dédier ce travail à tous les deux, ma réussite est aussi la vôtre et ce diplôme est l'aboutissement de plusieurs années de dur labeur auxquelles vous avez contribué de tant de façons !*

*A mes frères **Si Ahmed** et **Khaled** et ma belle sœur **Sara** pour leur amour et leur soutien.*

*A mes grand-mères **Ayi** et **Yemma Sadia** dont la fierté dans leur regard m'a aidé à ne jamais baisser les bras.*

*A mes chères oncles et tantes ainsi mes cousins et cousines et à toute la famille **LAKHEL** et la famille **MAZARI**.*

*A mes confidents **Mohamed** et **Massilva** qui n'ont pas cessés de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études.*

*A mes Amies **Houda** et **Selma** merci pour le parcours et les moments qu'on a vécu.*

Yasmine

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A ma grand-mère Aziza et mon oncle Abdelaziz qui nous ont quitté mais son toujours dans mon esprit.

A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui a fait tout son effort pour me rendre heureuse: Mon adorable maman Houria

A mes chers oncles : Abdeslam, Ramden, Saïd, Madjid et leur femmes : Hemama Makhoukh, Hemama Mouhend Ousaid, Sakina.

A mes tantes et leur hommes : Naima et Farid, Tourkia et Mohamed et Djidjiga.

A Mon fiancé Oussama Attia ,et mes cousins et cousines : Dahbia et son mari Hocine , Djohra et son mari Ramden, Abdalah ,Lamine, Nourhan , Kenza, Abderrahmane ,Khadija, Fatima , Achour, Ourdia, Ziena, Djahid.

Mes amis : Silia, Rania, Nabila, Céline , Nihed, Manel , Nora, thafsouth. Qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.

A mes adorables petits cousins et petites cousines Sabrina, , khalef , Aziza , Massi , Youcef, ghufraan , Zaid, Moustapha , Amina, Ritag, Mohamed et bien sur Omar qui sait toujours comment procurer la joie et le bonheur pour toute la famille.

Sans oublier mes binômes Selma Fellag et son marié et sa fille Maria, Yasmine lakhel et sa famille pour leur soutien moral, leur patience et leur compréhension que Dieu les protège et leurs offre une longue vie.

Nour El Houda

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AHAI : Anémie Hémolytique Auto-immune
AID : Activation Induced cytidin Deaminase
ATM : Ataxie Telangiectasie Muté
Bcl-2 : lymphome à cellule B 2
BCR: Récepteur cellule B
BR : Rituximab, Bendamustine
BTK: Bruton Tyrosine Kinase
CALLA : Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen
CD : Cluster de différenciation
CDK : Cyclin-Dependent Kinases
CG : Centre Germinale
CLP : Précurseur Lymphoïde Commun
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CSH : cellule souche hématopoïétique
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
DC : Cellules dendritiques
Del : délétion
FCR : Fludarabine, cyclophosphamide et rituximab
FNS : Formule numérotation sanguine
HLA : Antigène des Leucocytes Humain
Ig : immunoglobuline
IgHV : immunoglobuline chaîne lourde
IGHV-M : immunoglobuline des chaînes lourde muté
IGVH-UM : immunoglobuline des chaînes lourdes non mutées
ITAM : Motifs d'Activation des récepteurs Immuns basés sur la Tyrosine
LB : lymphocyte B
LDH : Lactate déshydrogénase
LLC-B : Leucémie lymphoïde chronique de type B
LNHB : Lymphome Non Hodgkinien B
LT : Lymphocyte T
MBL : Lymphocytose B monoclonales

Mcl-1 : Leucémie à Cellules Myéloïdes-1
MGG : May- Grünwald Giesma
NF- κ B : Facteur nucléaire-kappa B
NK : Natural killer
NLS : Signal de localisation nucléaire
PBMC : Cellules mononucléaire du sang périphérique
PCR : Polymerase Chain Reaction
PI3K : Inhibiteurs de la phosphatidyl-inositol 3-kinase
PMP : Progéniteurs Multipotents
PTK : Protéine Tyrosine Kinase
ROR : Récepteur transmembranaire de la tyrosine protéine kinase
SYK : Spleen tyrosine kinase
TDL : Temps de dédoublement des lymphocytes
TGF- β : Transforming Growth Factor beta
TK : Thymidine Kinase
TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale
TP53: Protéine Tumorale 53
VCAM-1 : protéine d'adhésion des cellules vasculaire 1
ZAP-70:Protéine Kinase associé à la chaîne Zeta 70

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique (LLC-B) est une hémopathie maligne médiée par l'accumulation et la prolifération de lymphocytes B monoclonaux matures dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes. Les cellules leucémiques LLC-B évoluent de manière variable, Elles sont résistantes à l'apoptose et dotées d'une capacité de survie allant de quelques mois à plusieurs décennies. Le comportement et la biologie des cellules LLC-B restent encore mal élucidés. L'objectif de notre étude est de décrire les caractéristiques cellulaires et moléculaires de la LLC-B dans la région de Tizi Ouzou. Pour ce faire, dans un premier temps, nous avons réalisé une étude observationnelle de 32 dossiers de malades hospitalisés dans le service d'Hémobiologie CHU de Tizi Ouzou sur la période 2019-2022. Ensuite nous avons procédé à l'analyse cytologique, la purification des cellules leucémiques par enrichissement au ficoll et l'immunophénotypage par cytométrie en flux pour la caractérisation des marqueurs de ces cellules B malignes. Cette étude s'inscrit dans l'objectif de mettre en place des systèmes cellulaires et moléculaires afin de comprendre au mieux le comportement des cellules LLC ce qui permet une meilleure prise en charge des patients LLC-B de notre région.

Mots clés : Leucémie Lymphoïde Chronique – Immunophénotypage – Frottis sanguin – Ficoll- PBMC- Typage HLA.

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is a hematological malignancy mediated by the accumulation and proliferation of mature monoclonal B lymphocytes in the blood, bone marrow and lymphoid organs. B-CLL leukemia cells evolve in a variable way, they are resistant to apoptosis and endowed with a survival capacity ranging from a few months to several decades. The behavior and biology of B-CLL cells remain poorly understood. The objective of our study is to describe the cellular and molecular characteristics of B-CLL in the region of Tizi Ouzou. To do this, we first carried out an observational study of 32 files of patients hospitalized in the Tizi Ouzou CHU Hemobiology department over the period 2019-2022. Then we proceeded to the cytological analysis, the purification of the leukemia cells by enrichment with ficoll and the immunophenotyping by flow cytometry for the characterization of the markers of these malignant B cells. This study is part of the objective of setting up cellular and molecular systems in order to better understand the behavior of CLL cells, which allows better management of CLL-B patients in our region.

Keywords: Chronic Lymphoid Leukemia - Immunophenotyping - Blood smear - Ficoll- PBMC-HLA typing

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma simplifié du processus de l'hématopoïèse.....	7
Figure 2 : Schéma de la lymphopoïèse B.....	10
Figure 3 : Différenciation des lymphocytes B.....	11
Figure 4 : Structure d'une immunoglobuline et relation entre organisation génique et structure protéique.....	12
Figure 5 : Observation microscopique d'un frottis sanguin issu d'un patient atteint de LLC.....	18
Figure 6 : Observation microscopique d'un frottis sanguin issu d'un patient atteint de LLC.....	19
Figure 7 : Représentation des principaux inhibiteurs des voies de signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR).....	36
Figure 8 : Algorithme thérapeutique pour les patients atteints de LLC.....	38
Figure 9 : Origine cellulaire de la leucémie lymphoïde chronique.....	42
Figure 10 : Schématisation des voies de signalisation associée à l'activation du récepteur BCR.....	44
Figure 11 : Comparaison entre les voies de signalisation du BCR des cellules M-CLL et celles des cellules U-CLL.....	45
Figure 12 : Représentation schématique de la structure primaire de ZAP-70.....	47
Figure 13 : Représentation schématique des voies de signalisation de l'apoptose.....	49
Figure 14 : Représentation illustrant les 3 groupes de protéines de la famille BCL-2.....	50
Figure 15 : Schéma représentant le contrôle de l'apoptose par la famille de protéines BCL2 dans les lymphocytes B.....	51
Figure 16 : Schéma représentant le microenvironnement de la LLC.....	56
Figure 17 : Représentation de l'analyse haute résolution de la del13q14 et caractérisation des sous-types de la LLC.....	59
Figure 18 : Schématisation du chromosome 17 humain.....	61
Figure 19 : Représentation schématique illustrant le gain 2p.....	62
Figure 20 : Représentation des principaux gènes et voies mutées de manière récurrente dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC).....	65
Figure 21 : Schéma représentant le paysage génétique de la LLC.....	70
Figure 22 : Photographie d'un étalement de frottis sanguin.....	73
Figure 23 : Photographie de la Ponction de la moelle osseuse.....	74
Figure 24 : Photographie d'un dépôt de PBMC sur une cellule de Malassez.....	76
Figure 25 : Photographie d'un résultat du marquage HE d'une biopsie de la moelle osseuse d'un patient LLC.....	77
Figure 26 : Photographie d'un appareil de Cytométrie en flux BD Facs Lyric.....	78
Figure 27 : Diagnostic par immunophénotypage d'un cas de LLC à l'aide de la cytométrie en flux.....	80
Figure 28 : Kit QIAamp DNA mini de QIAGEN utilisé pour l'extraction d'ADN génomique.....	80
Figure 29 : Photographie du spectromètre de dosage de l'ADN Nano Kurado.....	82
Figure 30 : Image du gel d'électrophorèse pour typage HLA.....	85
Figure 31 : Courbe représentative du nombre de patients LLC suivi au service d'hématologie de l'année 2016 jusqu'à 2022.....	86
Figure 32 : Représentation de la répartition des patients LLC selon leur catégorie d'âge.....	87
Figure 33 : Représentation de la répartition des patients LLC suivant le sexe.....	88
Figure 34 : Histogramme montrant la répartition des patients atteints de LLC suivant la classification de Matutes.....	89
Figure 35 : Représentation graphique de la distribution des patients selon la classification de Binet.....	90
Figure 36 : Représentation graphique de la répartition des patients selon leurs symptômes.....	91
Figure 37 : Formule de numération sanguine d'un patient atteint de LLC.....	91
Figure 38 : Observation microscopique des frottis sanguin coloré par MGG.....	92
Figure 39 : Observation au microscope d'une biopsie de moelle osseuse colorée par MGG sous un microscope optique.....	92
Figure 40 : Photographie d'un résultat du marquage HE d'une biopsie de la moelle osseuse d'un patient LLC.....	93
Figure 41 : Image représentant le résultat d'un isolement des PBMC à partir du sang total à l'aide de la méthode Ficoll.....	94
Figure 42 : Observation microscopique des PBMC isolées par Ficoll sur cellule de Malassez.....	94
Figure 43 : Représentation graphique du nombre de cellules PBMC isolées par Ficoll chez un individu sain et un patient atteint de la LLC exprimé en nombre de cellules/ml.....	95
Figure 44 : photographie des résultats de l'immunophénotypage par CMF.....	98
Figure 45 : Image du gel d'électrophorèse du résultat de typage HLA -A.....	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Calcul du score de Moreau/Matutes	20
Tableau II : Diagnostic différentiel de la LLC basé sur les marqueurs phénotypiques.....	20
Tableau III : Classification de Rai Classification de Rai.....	28
Tableau IV : Classification de Binet	29
Tableau V : Classification de Rossi.	29
Tableau VI : Critères et calcul du CLL-IPI et Catégories de risque et survie globale sans traitement selon le score CLL-IPI.	30
Tableau VII : Résumé des anomalies cytogénétiques fréquentes dans les cas de LLC et leurs effets biologiques et pronostiques associés..	64
Tableau VIII : Représentation du matériel utilisé dans notre étude.	71
Tableau IX : Liste des Anticorps utilisés dans l'étude avec leurs marqueurs fluorescents. Liste des Anticorps utilisés dans l'étude avec leurs marqueurs fluorescents.	71
Tableau X : Valeurs normales de la Formule de numérotation sanguine.....	72
Tableau XI : Programme de température utilisée pour la PCR du typage HLA.	84
Tableau XII : Répartition des patients atteint de LLC selon leur région.....	88
Tableau XIII : Numération des cellules PBMC isolées à partir d'un donneur sain et d'un patient atteint de la LLC sur cellule de Malassez.....	95
Tableau XIV : Représentation en pourcentage des niveaux d'expression des différents marqueurs membranaires caractéristiques des cellules malignes des 2 patients.	97

Table des matières

Liste des abbréviations_

Résumé

Abstract

Introduction :	1
1. Leucémies.....	3
1.1 Définition des leucémies	3
1.2 Types de leucémies.....	3
2. Epidémiologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique	4
3. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique.....	5
3.1. Rappels sur l'hématopoïèse	6
3.2 Lymphopoïèse	7
4. Différenciation lymphocytaire B indépendante de l'antigène	8
4.1 Le stade pré-pro B	8
4.2 Le stade pro-B	8
4.3. Le stade pré-B.....	9
4.4. Le lymphocyte B immature	9
4.5. Le lymphocyte B transitionnel	9
4.6. Différenciation lymphocytaire B dépendante de l'antigène	10
4.7. Réponse immune T-dépendante	10
4.8. Réponse immune T-indépendante	11
5. Les principales molécules de surface de la lignée lymphoïde B.....	12
5.1. B Cell Receptor (BCR).....	12
5.2. CD19	13
5.3. CD22	13
5.4. CD20	14
5.5. CD 10	14
5.6. CD 23	14
5.7. FMC7	14
6. Facteurs de risque de la LLC.....	15
6.1. Antécédents familiaux	15
6.2. Âge	15
6.3. Genre	15
6.4. Race.....	16
6.5. Les agents chimiques.....	16
6.6. Lymphocytose monoclonale des cellules B (MBL)	16

7.	Diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique.....	17
7.1.	Formule de la numération sanguine (FNS).....	17
7.2.	Frottis sanguin.....	17
7.3.	Immunophénotypage des cellules leucémiques.....	18
8.	Les signes cliniques de la LLC.....	21
9.	Description de l'évolution de la LLC.....	21
9.1.	Complications auto-immunes.....	21
9.2.	Complications infectieuses.....	23
9.3.	Transformation tumorale.....	23
9.4.	Cancers solides associés.....	24
10.	Marqueurs pronostiques.....	24
10.1.	Anomalies cytogénétiques.....	24
10.2.	Mutations somatiques des gènes des immunoglobulines.....	25
10.3.	Marqueurs phénotypiques CD38.....	25
10.4.	Marqueurs sériques Lactate déshydrogénase (LDH).....	26
10.5.	Temps de dédoublement des lymphocytes (TDL).....	27
11.	Stratégie thérapeutique de la leucémie lymphoïde chronique.....	31
11.1.	Abstention thérapeutique (Surveillance).....	31
11.2.	Traitements symptomatiques.....	32
11.3.	Traitement des transformations (Le syndrome de Richter).....	32
11.4.	Traitements spécifiques.....	32
11.5.	Chimiothérapie.....	32
11.6.	Immunothérapie.....	33
11.7.	Thérapies ciblées de LLC.....	35
12.	Schéma thérapeutique.....	37
12.1.	Traitement de première ligne.....	37
12.2.	Traitement des patients avec mutation de la TP53, en rechute ou réfractaires :.....	39
13.	Grefe de moelle.....	39
1.	Origine cellulaire de la LLC.....	41
2.	Voies de signalisation du BCR.....	43
2.1.	Signalisation du BCR dans les LB normaux.....	43
2.2.	Signalisation du BCR dans la LLC.....	44
3.	Mutations IGVH.....	46
4.	Expression de ZAP-70.....	46
5.	Expression de CD38.....	48
6.	Résistance à l'apoptose.....	48
6.1.	Membres de la famille Bcl-2.....	50
6.2.	Apoptose chimio-induite.....	52
6.3.	Régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.....	53
7.	NF- κB.....	53
8.	Prolifération des cellules de LLC.....	55
9.	Rôle du microenvironnement tumoral.....	55
10.	Anomalies génétiques observées au cours de la LLC.....	57

10.1.	Anomalies chromosomiques	57
10.2.	Les mutations somatiques.....	64
1.	Matériel	71
2.	Méthodes	71
2.1	Etude rétrospective	71
2.2	Formule de numérotation sanguine (FNS)	72
2.3	Frottis sanguin	72
2.4.	Ponction de moelle osseuse	73
2.5.	Coloration de May-Grünwald Giemsa.....	74
2.6.	Purification des PBMC à partir du sang périphérique de patients.....	75
2.7.	Marquage histologique de biopsies de la moelle osseuse par l'hématoxyline et l'éosine.....	77
2.8	Cytométrie en flux.....	78
2.9	Purification de l'ADN génomique à partir des PBMC	80
2.10	Typage HLA pour greffe de la moelle.....	82
1.	Epidémiologie de la LLC	86
1.2.	Répartition des patients suivant l'âge.....	87
1.3.	Suivi de la répartition des patients LLC suivant le sexe.....	87
1.4.	Répartition des patients selon la région.....	88
1.5.	Distribution immunophénotypiques des patients LLC suivant le classement de Matutes.....	89
1.7	Les signes cliniques observés chez les patients LLC	90
2.	Etude morphologique de la LLC	91
2.1.	Formule de numérotation sanguine (FNS)	91
2.2.	Frottis sanguin d'un patient atteint de LLC.....	92
2.3	Ponction de moelle osseuse	92
3.	Comparaison Immunophénotypique des cellules leucémiques LLC-B versus cellules du Lymphome Non Hodgkinien B (LNHB) :.....	95
	Présentation des 2 patients :	96
4 .	Typage HLA-A pour la recherche de compatibilité tissulaire	99
	Discussion et perspectives.....	100
	Références bibliographiques	102

Introduction Générale

Introduction :

L'hématopoïèse est un processus physiologique par lequel l'organisme produit et renouvelle de manière continue et régulée toutes les cellules sanguines. Ce mécanisme se déroule au niveau de la moelle osseuse. Une dérégulation au niveau de ce processus peut être à l'origine de la survenue de différentes pathologies telles que les leucémies. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est le type de leucémie le plus fréquent en occident. Elle se manifeste par une accumulation dans la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires de lymphocytes B matures monoclonaux avec un immunophénotypage caractéristique et résistants à l'apoptose.

La prolifération et la survie des cellules de la LLC sont favorisées par le microenvironnement tumoral soit via une interaction direct avec les cellules de ce microenvironnement Mesenchymal Stem Cells, Nurse Like Cells, les cellules T et NK ou bien via des cytokines générées par ces cellules. Souvent, le diagnostic de la LLC se fait de façon fortuite chez des patients asymptomatiques montrant une lymphocytose B ≥ 5000 lymphocytes/ μ l qui persiste au moins 3 mois.

Afin d'améliorer l'état et la survie des malades, plusieurs traitements comme la chimiothérapie, l'immunothérapie ciblée allant jusqu'à la greffe de moelle sont utilisés, la prise en charge thérapeutique des patients dépend du stade de la pathologie qui est déterminé via un ensemble de facteurs pronostiques qui peuvent être soit sous forme d'aberrations chromosomiques tel que la délétion 17p ,del 13q, del 11q ...etc. ; de mutations somatiques des gènes des immunoglobulines ou de l'expression de molécules transmembranaires caractéristiques comme le CD38 ou de protéines cellulaires tel que ZAP-70.

Au cours de ce travail, nous avons réalisé dans un premier temps une étude rétrospective par suivi des dossiers de patients hospitalisés durant la période de 2019-2022 dans le service d'Hématologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou. Cette étude épidémiologique s'est portée sur 32 patients atteints de LLC issus de la région de Tizi-Ouzou et ses environs. Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons suivi les caractéristiques biologiques des cellules LLC à l'aide des observations cytologiques au microscope optique. De l'enrichissement des cellules LLC par procédé d'isolement des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) purifiées à partir du sang de patients. Nous avons aussi procédé à l'analyse histologique de biopsies de la moelle osseuse de patients LLC par marquage HE.

Introduction

Dans une autre partie, nous avons analysé les propriétés immunophénotypiques de la LLC par cytométrie en flux. En ce qui concerne la dernière partie de ce travail, nous nous sommes intéressées à l'aspect moléculaire de la LLC à travers la purification de l'ADN génomique à partir des PBMC de patients, ainsi qu'au procédé du typage des gènes HLA, en particulier HLA-A pour évaluer la compatibilité tissulaire entre deux individus (donneurs et receveur). C'est un examen important préalable à la réalisation d'une greffe de la moelle osseuse sur un patient LLC.

Chapitre I:
Généralités sur la Leucémie
Lymphoïde Chronique (LLC)

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

1. Leucémies

1.1 Définition des leucémies

La leucémie est une affection maligne liée à la production de leucocytes non-différenciés ou anormaux, qui se caractérisent par une prolifération anormale, une expansion clonale et une diminution de l'apoptose. Ces leucocytes anormaux interfèrent avec la production de cellules sanguines normales et entraînent des symptômes liés aux cytopénies (Ashkan, 2022).

1.2 Types de leucémies

La classification des leucémies est basée sur plusieurs critères, il existe actuellement plusieurs systèmes de classification des leucémies. Ainsi on distingue la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui se repose sur la combinaison entre les caractéristiques cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et génétiques des cellules leucémiques. Parmi les autres systèmes de classification on trouve le système franco-américain-britannique (Fabbri and Dalla-Favera), celui-ci est basé sur la distinction morphologique des leucocytes anormaux.

1.2.1 Leucémie aigüe

La leucémie aigüe (LA) est une hémopathie maligne, caractérisée par une prolifération anormale des cellules indifférenciées dans la moelle osseuse appelées leucoblastes ou blastes, avec passage habituel dans le sang et parfois avec envahissement des organes hématopoïétiques. Les blastes sont de deux types : lymphoblastes (Pinto et al., 2020) et myéloblastes (LAM) (Costello ,2018).

A-Leucémie aigue lymphoblastique

La leucémie aigue lymphoblastique (Pinto et al., 2020) est une affection hématologique maligne correspondant à une prolifération médullaire clonale des progéniteurs lymphoïdes malins transformés. Les phénomènes impliqués dans le développement des LAL sont encore mal connus.

B- Leucémie aigue myéloblastiques

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) ou myéloïdes sont des hémopathies aiguës caractérisées par un blocage de la maturation des lignées myéloïdes, avec envahissement progressif de la moelle, du sang, des organes hématopoïétiques, et éventuellement des organes non hématopoïétiques par des cellules leucémiques anormales appelés myéloblastes.

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

1.2.2 Leucémie chronique

Leucémies chroniques (LC) sont des cellules leucémiques bloquées à différents stades de la maturation et qui se multiplient plus lentement. Ce type de leucémie se développe de manière progressive. Elles peuvent être issues de la lignée des cellules myéloïdes ou de la lignée des cellules lymphoïdes.

A- Leucémie myéloïde chronique

La leucémie myéloïde chronique (LMC) apparaît lorsqu'une cellule souche pluripotente subit une transformation maligne et clonale, entraînant une surproduction de granulocytes matures et immatures. Initialement asymptomatique, la progression de la leucémie myéloïde chronique est insidieuse, avec des manifestations non spécifiques "bénignes" (sensation de malaise, anorexie, perte de poids) aboutissant finalement à une phase d'accélération ou phase blastique avec des signes plus inquiétants tels qu'une splénomégalie, une pâleur, des ecchymoses, des hémorragies, une fièvre, des adénopathies, des lésions cutanées.

B-Leucémie Lymphoïde Chronique

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie maligne définie par l'accumulation et la prolifération de lymphocytes B monoclonaux matures dans 95% des cas, dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes, impliquant plus rarement la lignée T < 5% (Ashkan, 2022). La LLC est souvent diagnostiquée à partir du résultat d'une analyse sanguine en absence de tout symptôme clinique. La confirmation du diagnostic nécessite un hémogramme et un Immunophénotypage des lymphocytes sur un prélèvement sanguin, la présence d'une lymphocytose B > 5000/mm³ et la présence de marqueurs de surface caractéristiques sur les cellules malignes sont suffisantes pour confirmer le diagnostic (Padaro et al., 2019),

2. Epidémiologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique

Les hémopathies malignes représentent environ 10% des cancers. Chaque année, environ 191 000 cas et 61 000 décès sont attribués à la leucémie lymphoïde chronique dans le monde. C'est le sous-type de leucémie le plus fréquent dans les pays occidentaux, elle représente 25 à 30 % des leucémies totales aux États-Unis. L'incidence de la LLC est plus élevée dans les pays développés, par exemple le Canada et la France, où les taux annuels dépassent quatre nouveaux cas par 100 000 personnes. Elle est particulièrement faible dans les pays asiatiques, notamment au Japon (0,1 pour 100 000), en Malaisie (0,1 pour 100 000) et aux Philippines (0,2 pour 100 000) (Miranda-Filho et al., 2018). Bien qu'elle puisse survenir à

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

tout âge, l'âge moyen au moment du diagnostic est d'environ 70 ans, ainsi les patients de plus de 65 ans représentent plus de 70 % des LLC. En 2014, les données rétrospectives des registres américains rapportent une incidence globale de 4,4/100 000 personne par année, mais qui augmente progressivement pour atteindre 37/100000 personnes par année après 85 ans (Rai and Jain, 2016). En Asie, la prévalence est basse par rapport à celle observée en Europe et en Amérique du Nord, on observe des taux plus élevés dans les populations blanches non hispaniques, suivis par les noirs-américains, puis les hispaniques et enfin les plus faibles étant chez les populations asiatiques. En effet la rareté de la LLC dans les populations orientales et asiatiques est aussi observée chez les personnes ayant migré en occident, et persiste même chez leurs descendants de première et de seconde génération plaidant pour l'importance du facteur génétique chez ces patients La LLC demeure une pathologie relativement rare en Afrique, les données portant sur les populations subsahariennes sont très rares. Au Togo, la LLC représente 22% des hémopathies malignes soit 104 cas entre 1992 et 2013. En Algérie l'incidence évaluée sur une période de 5 ans (2016 – 2020) est faible (0,66/100.000) par rapport aux pays occidentaux (Bekadja, 2022).

Les différences spécifiques au sexe sont plus fortes pour la LLC que pour les autres leucémies. Un profil épidémiologique de la LLC a été établi, de sorte que la maladie a une incidence plus élevée chez les populations masculines (6,1 pour 100 000) comparativement à 4,3 pour 100 000 pour les populations féminines. La mortalité était également plus élevée chez les hommes (4,2 pour 100 000) que chez les femmes (2,8 pour 100 000) (Bray et al., 2018). Cependant, des études récentes ont montré que les femmes peuvent avoir des formes plus agressives de la maladie que les hommes.

3. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique

La LLC-B est caractérisée par une accumulation progressive des lymphocytes B malins de phénotypes matures. Les cellules leucémiques B sont activées suite à des mutations et à l'accumulation d'anomalies génétiques et des transformations oncogéniques des cellules B monoclonales conduisant au développement de la leucémie lymphoïde chronique. Les lymphocytes malins s'accumulent initialement dans la moelle osseuse, puis diffusent dans les ganglions lymphatiques et d'autres tissus lymphoïdes, induisant finalement une splénomégalie, une hépatomégalie et des symptômes systémiques tels que la fatigue, la fièvre, des sueurs nocturnes et une perte de poids non intentionnelle.

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

Le diagnostic de cette maladie est fait par la méthode de cytométrie en flux et Immunophénotypage des cellules B malignes. Le traitement est retardé jusqu'à l'apparition des symptômes et implique généralement une chimiothérapie et une immunothérapie. Cependant, les traitements peuvent comprendre l'utilisation des agents ciblés tels que les inhibiteurs de la tyrosine kinase BTK et Bcl-2, associés ou non à une chimiothérapie {Revue générale des leucémies. (Ashkan ,2022).

3.1. Rappels sur l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus physiologique responsable de la production continue et régulée des cellules sanguines : les érythrocytes, les plaquettes et les leucocytes. Elle est initiée à partir des cellules souches hématopoïétiques(CSH), qui produisent des progéniteurs permettant de générer les différentes cellules sanguines. Les CSH possèdent une capacité d'auto-renouveaulement qui sert au maintien du petit pool de ces cellules souches, ainsi qu'une capacité de différenciation qui leur permet de générer les différentes cellules sanguines. Les CSH donnent naissance à des progéniteurs multipotents (PMP) qui se différencient à leur tour en cellules myéloïdes multipotentes (ou progéniteurs communs érythromyéloïdes) ou en cellules lymphoïdes multipotentes. Ces progéniteurs prolifèrent et se différencient en précurseurs des cellules sanguines reconnaissables morphologiquement. La dernière étape de différenciation entraîne la formation de cellules matures et fonctionnelles qui correspondent à des érythrocytes, des plaquettes, des macrophages, des granulocytes ou des lymphocytes. Le devenir de ces cellules est dépendant de leur fonction. Les globules rouges et les lymphocytes sont destinés à rester dans la circulation sanguine, les polynucléaires neutrophiles et les macrophages sont capables de pénétrer dans les tissus afin d'assurer leur rôle immunitaire (Fey, 2007).

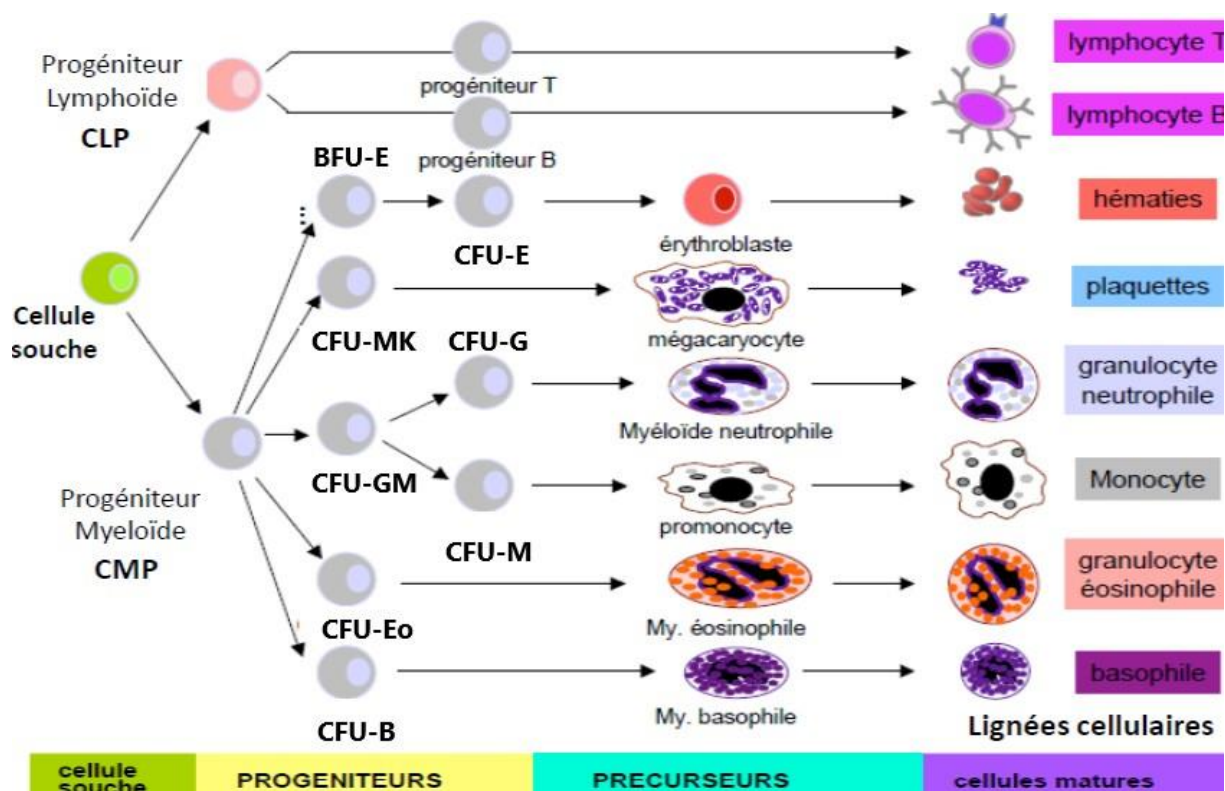


Figure 1 : Schéma simplifié du processus de l'hématopoïèse. . BFU-E : Unité formatrice de blastes d'érythrocytes ; CFU-MK : Unité formatrice de colonies mégacaryocytaire ; CFU-GM : CFU granulomonocytaire ; CFU-M : CFU de monocyttaire ; CFU-G : CFU granulocytaire ; CFU-B : CFU Basophile ; CFU-Eo : CFU granulocyte éosinophile (Pont, 2015).

3.2 Lymphopoïèse

La lymphopoïèse est un processus hématopoïétique, dans lequel les lymphocytes et les cellules Natural Killer (cellules NK) sont formés à partir des cellules souches hématopoïétiques. Chaque type de cellules lymphoïdes qui se forme possède son propre processus de genèse et de maturation. La lymphopoïèse se déroule en deux étapes essentielles qui sont la lymphopoïèse primitive et la lymphopoïèse secondaire (Roessler and Grosschedl, 2006).

Lymphopoïèse primitive : Elle est liée à la production des cellules lymphoïdes. Elle se déroule dans la moelle osseuse dans le cas des LB, où ces derniers subissent leur maturation. Contrairement aux LT, qui eux migrent vers le thymus pour accomplir leur développement et maturation.

Lymphopoïèse secondaire : correspond à la multiplication et la différenciation des cellules matures dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, Rate) après leur activation antigénique.

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

3.2.1 Lymphopoïèse B

La lymphopoïèse B est l'ensemble des processus qui conduisent au développement du lymphocyte B de la cellule souche hématopoïétique (CSH) vers le lymphocyte B mature fonctionnel.

4. Différenciation lymphocytaire B indépendante de l'antigène

Une partie des CSH se différencie en progéniteurs lymphoïdes communs (Common lymphoid precursor ou CLP) aboutissant à la formation de LB exprimant une immunoglobuline de surface (BCR) capable de reconnaître l'antigène spécifique. Cette différenciation se déroule dans la moelle osseuse et se réalise en différents stades :

4.1 Le stade pré-pro B

C'est le premier stade de différenciation du LB à partir du CLP. Par l'intervention de L'IL7 sécrétée par le microenvironnement stromale. Le CLP engagé dans la lignée B est caractérisé par l'expression de nombreux facteurs de transcription : IKAROS et PU1 (purine box factor 1) relayés par E2A (E box binding protein 2A) et EBF (early B cell factor) qui induisent l'expression de Pax5. Pax5 est indispensable au maintien de la différenciation des LB durant leur maturation. Les cellules pré-pro B expriment un faible taux de Pax5 et n'exprime pas de BCR (B Cell Receptor).

4.2 Le stade pro-B

Dans le stade pro-B, les cellules expriment à leur surface le marqueur CD19 ainsi qu'une ébauche de BCR que l'on appelle le pro-BCR formé de 2 corécepteurs CD79a et CD79b associés à la calnexine. Le réarrangement des gènes des immunoglobulines débute sous l'action de Pax5. La recombinaison des gènes V, D et J du locus IgH (segments codant à la chaîne lourde) est réalisé par les enzymes RAG-1 et RAG-2 (recombination activating gene). La recombinaison VDJ correspond au premier point de contrôle de la différenciation des LB permettant l'expression d'une chaîne lourde μ associée à une pseudo-chaîne, constituée des chaînes invariantes V pré B et lamda5. Cet ensemble forme le pré-BCR et marque le passage des cellules B vers le stade pré-B.

4.3. Le stade pré-B

La cellule B exprimant un pré-BCR est appelée un pré-BI. Elle reçoit un signal de survie grâce à la chaîne Lambda 5 qui reconnaît la galectine-1 exprimée à la surface des cellules stromales médullaires. Ce signal réprime ainsi l'expression des enzymes RAG-1 et RAG-2 et inhibe le réarrangement du second allèle de la chaîne IgH. De plus, la signalisation du pré-BCR est responsable de la prolifération des cellules pré-BI pour devenir des « large pré-BII » (grande taille). Enfin le pré-BCR réprime l'expression de la pseudo-chaîne légère et induit la perte de l'expression membranaire du pré-BCR. La cellule devient alors une cellule de petite taille appelée « Small pré-BII ». Les gènes RAG-1 et RAG-2 sont à nouveau exprimés grâce à la perte de l'expression membranaire du pré BCR. Ils vont initier le réarrangement VJ de la chaîne légère κ . Si ce réarrangement est fonctionnel, un récepteur BCR complet est exprimé sur la membrane, c'est le résultat de l'association de la chaîne κ à la chaîne lourde μ et marque le passage vers le stade supérieur qui est le lymphocyte B immature.

4.4. Le lymphocyte B immature

Le LB immature se caractérise par l'expression membranaire d'un BCR d'isotype IgM et de phénotype IgM⁺ IgD⁻. La sélection négative a lieu durant ce stade et assure l'élimination par apoptose de tous les lymphocytes B exprimant un BCR auto-réactif capable de reconnaître et d'interagir fortement avec les antigènes du soi. Par contre, les lymphocytes B tolérants aux molécules du soi sont libérés dans la circulation périphérique. Certains LB sont orientés vers un état d'anergie et subissent une ignorance clonale lorsqu'ils n'interagissent pas avec l'antigène du soi. Ceux qui présentent de faibles affinités aux antigènes du soi subissent un processus d'édition du BCR (receptor editing) afin de remodeler la structure des régions variables sur leur BCR de manière à éliminer toute capacité d'interaction probable avec les antigènes du soi.

4.5. Le lymphocyte B transitionnel

Le LB immature libéré dans la circulation périphérique est appelé lymphocyte B transitionnel précoce ou T1. Cette phase permet au LB d'être sensible aux signaux de co-stimulation des LT lors de la réponse immune, en plus de stabiliser le signalosome du récepteur BCR. Ces LB T1 pénètrent tout d'abord dans la pulpe rouge de la rate, dans laquelle les LB auto-réactifs apoptotiques sont épurés par de nombreux macrophages. Ensuite, ils pénètrent dans les follicules lymphoïdes spléniques de la pulpe blanche riche en antigènes et en LT helper CD4⁺ (Th) et se différencient en LB transitionnels tardifs ou T2, qui se

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

caractérisent par la co-expression d'IgM et d'IgD de surface et deviennent alors des LB matures naïfs (Palanichamy et al., 2009).

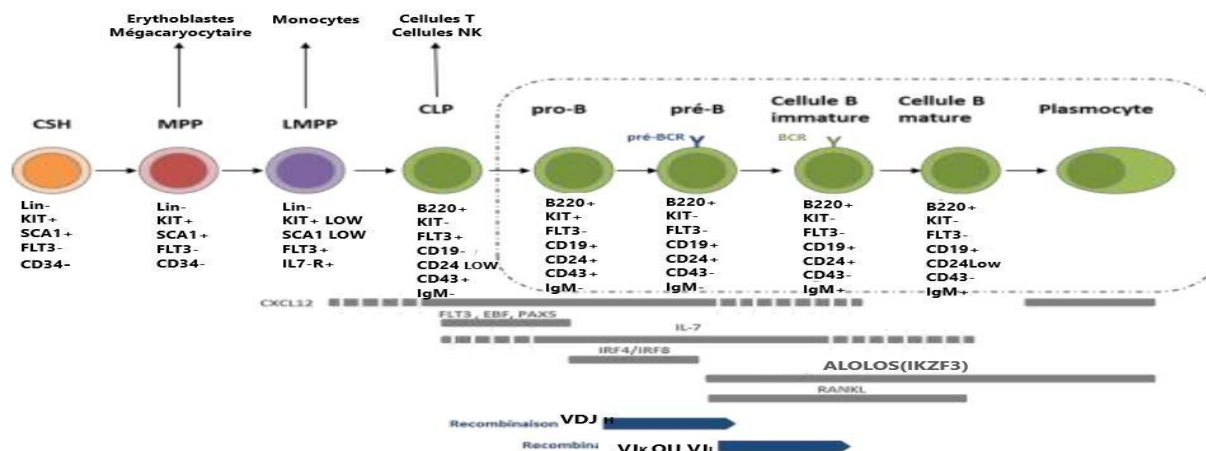


Figure 2 : Schéma de la lymphopoïèse B. Les différents stades de maturation des lymphocytes B sont associés à l'expression de marqueurs de surface, de récepteurs aux chimiokines, de facteurs de transcription et du déroulement de la recombinaison VDJ des gènes des immunoglobulines (Palanichamy et al., 2009)..

4.6. Différenciation lymphocytaire B dépendante de l'antigène

Les LB matures naïfs de phénotype IgM+IgD+ quittent la rate et rejoignent la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses MALT). Soit pour se différencier en LB folliculaires conventionnels impliqués dans les réponses humorales dépendantes des LT soit en LB de la zone marginale de la rate impliquée dans les réponses humorales LT-indépendantes.

4.7. Réponse immunitaire T-dépendante

Le LB naïf peut être activé grâce à son récepteur BCR après la reconnaissance antigénique et en présence des signaux de co-stimulation provenant des LTh CD4+ (qui sont activés par les CPA, les cellules dendritiques matures). En conséquence, le LB prolifère rapidement. La plupart des LB activés se différencient en plasmocytes de courte durée de vie qui sécrètent des IgM de faible affinité à l'antigène. Ces derniers sont responsables de la réponse immunitaire primaire. D'autres part ; une minorité des LB stimulés par l'antigène deviennent des cellules fondatrices du centre germinatif (Put et al.) ou lymphocytes B folliculaires. Le CG est composé d'une zone sombre et d'une zone claire. Dans la zone sombre, le LB subit une intense phase de prolifération. Le LB stimulé reçoit de multiples co-signaux des LTh CD4+ et des cellules folliculaires dendritiques puis se prolifère rapidement et devient un centroblaste. Dans cette zone, l'enzyme AID (Activation Induced cytidin Deaminase) contrôle le processus d'hypermutations somatiques. Ce dernier correspond à l'introduction de mutations ponctuelles dans les régions variables des gènes

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

des Igs afin d'augmenter leur affinité à l'antigène. Le centroblaste est ensuite redirigé vers la zone claire pour devenir un centrocyte. Dans cette zone claire, le centrocyte subit un processus de commutation de classe (CSR : pour class switch recombination), également contrôlé par l'enzyme AID. Ce processus permet au LB d'exprimer un autre isotype IgG, IgA ou IgE différent de l'IgM initiale, et ceci afin d'adapter au mieux la réponse immunitaire. Au final, le lymphocyte B se différencie soit en LB mémoire, capable de rester plusieurs années, soit en plasmocyte à longue durée de vie, producteur d'Ig spécifique de forte affinité à l'antigène initial.

4.8. Réponse immune T-indépendante

La réponse immune B peut se faire en dehors du CG et indépendante du Th CD4+ selon le type d'antigène. Les lymphocytes B de la zone marginale sont des lymphocytes qui ont gardé en mémoire une précédente interaction avec un antigène de nature non-protéique, donc sont capables de se multiplier rapidement en plasmocytes et assurer la production des anticorps et de nouveaux LB mémoires.

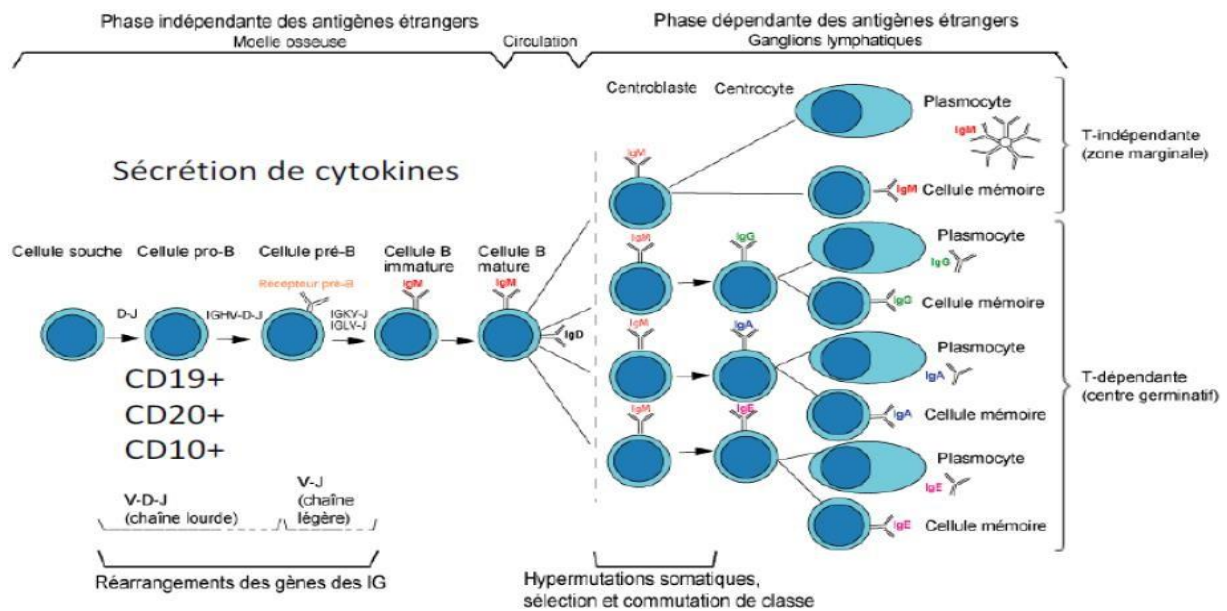


Figure 3 : Différenciation des lymphocytes B. . La différenciation des lymphocytes B comprend deux phases : une phase indépendante des antigènes étrangers, allant de la cellule souche hématopoïétique jusqu'au lymphocyte B mature, elle se déroule dans la moelle osseuse, et une phase dépendante des antigènes étrangers, du lymphocyte B mature au plasmocyte et au lymphocyte B mémoire, dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques). Cette seconde phase requiert la coopération entre les lymphocytes B et T (Lefranc M and Lefranc G.,2002).

5. Les principales molécules de surface de la lignée lymphoïde B

La Lymphopoïèse B est un processus contrôlé qui aboutit à l'expression des molécules de surface spécifiques à la lignée lymphoïde B, parmi ces molécules on trouve :

5.1. B Cell Receptor (BCR)

5.1.1. Structure du BCR

Le BCR est constitué d'une molécule d'immunoglobuline responsable de la reconnaissance antigénique, associée de manière non-covalente à un hétérodimère CD79a (Ig α) et CD79b (Ig β). Ce complexe est nécessaire à la transduction du signal.

Structure de la molécule d'immunoglobuline (Ig)

L'immunoglobuline (Ig) est une hétéroprotéine formée de deux chaînes légères identiques (L : Light) et de deux chaînes lourdes identiques (H : Heavy). Chaque chaîne lourde comporte 3 domaines constants et interconnectés CH1, CH2 et CH3, c'est le cas des isotypes δ , γ et α . Les isotypes μ ou ϵ possèdent 4 domaines constants CH1 à CH4. L'ensemble des isotypes portent un domaine variable VH porteur de la spécificité antigénique. Dans le cas de la chaîne légère, elle est composée d'un domaine constant CL qui définit l'isotype κ ou λ de la chaîne légère, ainsi qu'un domaine variable VL. Les différentes classes d'immunoglobulines IgG, IgD, IgA, IgM ou IgE sont définies par l'assemblage d'un dimère formé de chaîne lourdes γ , δ , α , μ ou ϵ avec un dimère de la chaîne légère κ ou λ respectivement (Schroeder and Cavacini, 2010).

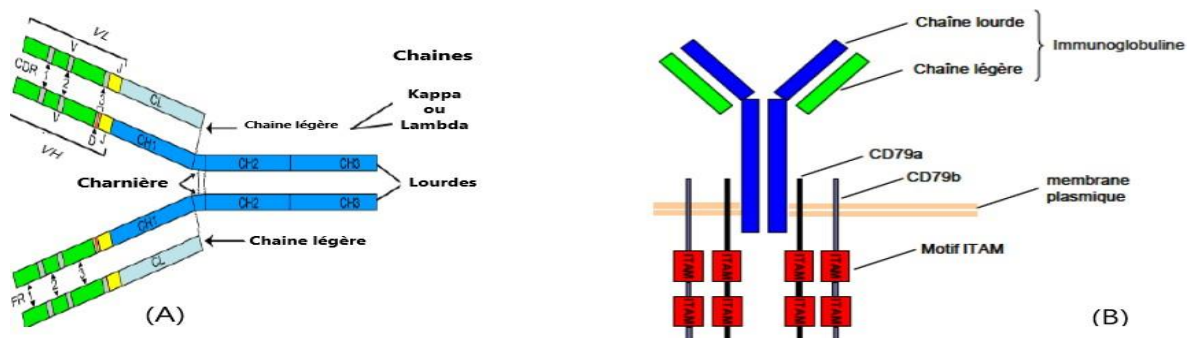


Figure 4 : Structure d'une immunoglobuline et relation entre organisation génique et structure protéique. (A) : La chaîne légère est codée par un gène variable V et un gène de jonction J. La chaîne lourde est codée par trois gènes, V, de diversité D et J. Les trois régions hypervariables ou CDR (Complementarity Determining Region) 1, 2 et 3 déterminent le site de reconnaissance et de liaison à l'antigène. La chaîne constante (CL) de la chaîne légère est codée par le gène IGKC (cas d'une chaîne kappa) ou l'un des gènes IGLC (cas d'une chaîne lambda), celle de la chaîne lourde par un gène IGHC. Chaque domaine de la chaîne lourde (CH1, CH2, CH3 dans le cas d'une IgG) est codé par un exon. La région charnière située entre le domaine CH1 et CH2 des IgG est codée par 1 exon ou plusieurs exons.

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

(B) : Structure générale du récepteur BCR : Le récepteur des lymphocytes B est formé d'une immunoglobuline et des CD79 qui sont des hétérodimères transmembranaires possédant des motifs ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), sur leur partie intracytoplasmique.

5.1.2. CD79a (Ig α) et CD79b (Ig β)

Les CD79a et CD79b sont des marqueurs de surface présents sur le lymphocyte B à tous les stades de différenciation du LB. Ils contiennent des motifs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), ces motifs sont très conservés composés de 4 acides aminés (Tyrosine, deux acide aminée quelconque et leucine ou isoleucine : YXXL/I), le CD79 contient deux motifs ITAMs sur sa queue cytoplasmique. Les hétérodimères CD79a et CD79b sont les médiateurs de la transduction des signaux intracellulaires en réponse à une activation antigénique du BCR (Radaev et al., 2010).

5.2. CD19

Le CD19 est une glycoprotéine appartenant à la superfamille des Igs. C'est un marqueur spécifique des lymphocytes B exprimé à tous les stades de la lignée B. Le CD19 a un domaine cytoplasmique d'environ 240 acides aminés avec neuf résidus tyrosine conservés et des régions localisées de forte charge négative. Après la phosphorylation de CD19 par Lyn, le CD19 fonctionne comme une protéine adaptatrice spécialisée dans l'amplification de l'activité de PTK de la famille Src qui est cruciale pour moduler les signaux intrinsèques et induits par le BCR. Le CD19 interagit également avec des molécules effectrices en aval de la signalisation BCR. Le complexe CD19/CD21 joue un rôle comme corécepteur du BCR ce qui fait du CD19 un important régulateur fonctionnel de la prolifération des lymphocytes B (Bailly et al., 2022).

5.3. CD22

Le CD22 est un cluster de différenciation des LB codé par le chromosome 19 humain. Il se fixe spécifiquement sur certains glucides, il médie les interactions entre les cellules B et il est aussi impliqué dans la localisation des LB dans les tissus lymphoïdes. Le CD 22 joue aussi un rôle dans la transduction du signal de BCR (Lanza et al., 2020).

5.4. CD20

Le CD20 est une phosphoprotéine transmembranaire non glycosylée exprimée sur les lymphocytes B normaux et malins. Elle assure la régulation de la conductance calcique transmembranaire. Le signal calcique joue un rôle important dans l'activation des LB. Ce marqueur a un effet sur la progression et la différenciation du cycle cellulaire par différentes voies de signalisation. Le CD20 régule les niveaux d'expression des protéines pro-apoptotiques par leur modulation telles que Bax, Bak, ainsi que NF-kB et ERK1/ERK2 (Pavlasova and Mraz, 2020).

5.5. CD 10

Le CD10 est une métalloprotéase extracellulaire capable de cliver divers peptides, exprimée sur la surface des cellules stromales LB et LT immature. Elle porte aussi le nom d'antigène CALLA (Mishra et al., 2016).

5.6. CD 23

Le CD23 est un récepteur connu sous le nom de FC epsilon RII, il est exprimé à la surface de diverses cellules comme les lymphocytes B, T et NK...etc. C'est un récepteur de faible affinité pour les IgE et peut se présenter sous forme de protéine membranaire ou de fragments solubles circulants. Il joue un rôle dans la prolifération des LB. Le CD23 est quasiment présent avec une forte expression dans les cellules tumorales B dans le cas de la LLC, donc il peut être utilisé comme une cible thérapeutique potentielle (Acharya et al., 2010).

5.7. FMC7

FMC7 est un anticorps monoclonal d'une structure glycoprotéique qui est exprimé sur les lymphocytes B matures normaux ; et est utilisé dans l'analyse immunophénotypique et le diagnostic différentiel de la LLC et des autres lymphomes SLP. Dans certains cas atypiques de LLC l'expression de FMC7 peut être positive.

Le FMC7 a la capacité de reconnaître un épitope conformationnel sur la molécule CD20 qui est exposé sur une sous-population de LB en formant un complexe multimérique, il n'est détecté que lorsque le CD20 est exprimé à des intensités modérées à élevées (Senturk Yikilmaz et al., 2020).

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

6. Facteurs de risque de la LLC

Un facteur de risque désigne un élément qui peut favoriser le développement d'un cancer ou d'une hémopathie maligne. La présence d'un ou plusieurs facteurs de risque n'entraîne pas systématiquement l'apparition d'un cancer. Inversement, un cancer peut se développer sans qu'aucun facteur de risque ne soit présent. La recherche scientifique n'a pas suffisamment de preuves pour affirmer les causes directes de l'apparition de la LLC, rien ne prouve que l'exposition aux radiations et à la chimiothérapie augmente le risque de développer une LLC. Cependant, on distingue certains facteurs qui peuvent être associés au développement de cette maladie :

6.1. Antécédents familiaux

Bien que cela soit rare, le fait d'avoir plus d'un parent au premier degré atteint de LLC ou d'un autre cancer lié à la lymphe peut augmenter un risque accru de LLC. Le degré d'apparition de la maladie et de même type cellulaire de LLC est élevé dans la génération future. Une analyse suédoise portée sur près de 10 000 patients comparés à un groupe témoin confirme ce mode de transmission de la pathologie.

6.2. Âge

Il est considéré comme le principal facteur de développement de LLC. Cette maladie survient le plus souvent chez les personnes âgées, et rares chez les jeunes adultes et ne se développe presque jamais chez les enfants. Environ 90 % des personnes diagnostiquées avec une LLC ont plus de 50 ans et on estime que l'âge moyen au diagnostic est de 70 ans chez les hommes et de 72 ans chez les femmes.

6.3. Genre

La prévalence de la LLC est légèrement plus élevée dans les populations masculines que dans les populations féminines. Les hommes développent la LLC plus souvent que les femmes, cependant, des études ont montré que les femmes peuvent avoir des formes plus agressives de la maladie que les hommes.

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

6.4.Race

La LLC est plus fréquente chez les personnes d'origine européenne et se développe rarement chez les asiatiques avec un profil moléculaire différent, en particulier chez les Japonais, vivants en Asie ou ayant immigrés. Elle se produit également couramment chez les noirs. Les raisons de ces différences ne sont pas encore connues, mais les recherches actuelles renforcent les hypothèses à ce que cette hémopathie soit liée à des facteurs génétiques.

6.5.Les agents chimiques

Plusieurs études ont démontré la relation entre la profession exercée et le diagnostic d'apparition de la LLC, qui est lié probablement à l'exposition aux agents chimiques. Certains herbicides et insecticides, dont l'agent orange qui est un défoliant utilisé pendant la guerre du Vietnam, aggravent le risque de développement de leucémie lymphoïde chronique. En conséquence, le département américain des anciens combattants classe la LLC comme une maladie associée à l'exposition à l'agent orange et l'a accepté comme un facteur de risque pour cette pathologie, ce dernier a permis aux anciens combattants atteints de LLC de réclamer des prestations s'ils ont déjà été exposés à cet agent chimique pendant leur service militaire.

6.6. Lymphocytose monoclonale des cellules B (MBL)

La MBL est définie comme une condition asymptomatique, dans laquelle les gens ont des niveaux de lymphocytes dans le sang périphérique plus élevés que d'habitude ($< 5\,000$ cellules B monoclonales/ μl). La majorité des MBL présentent un phénotype de leucémie lymphoïde chronique (CLL-like MBL) avec un score de Matutes de 3 à 5 avec les mêmes anomalies chromosomiques que la LLC. En fonction de la lymphocytose B absolue, on distingue les low-count CLL-like MBL (< 500 lymphocytes B/ μl), qui présente un risque négligeable de progression en LLC. Par contre, les MBL like-CLL (> 500 lymphocytes B/ μl) ont un risque accru d'évolution de cette maladie en leucémie lymphoïde chronique. Elle varie de 1 à 2 % par an, avec un niveau d'exposition aux infections et de mortalité plus élevé. Ces derniers nécessitent impérativement un suivi annuel par un clinicien.

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

7. Diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique

Le diagnostic de la LLC-B se fait par calcul de la formule de numération sanguine (FNS) souvent de manière fortuite chez des patients asymptomatiques montrant une lymphocytose B anormale ≥ 5000 lymphocytes/ μl qui persistent au moins 3 mois. L'observation microscopique d'un frottis sanguin d'un patient montre que les cellules LLC-B présentent une apparence de lymphocytes matures d'aspect monomorphe, de petite taille, l'immunophénotypage de ces cellules leucémiques par cytométrie en flux permet de les caractériser à travers le suivi de l'expression membranaire d'un certain nombre de marqueurs caractéristiques de la LLC « CD5, CD19, CD23 ...etc. La LLC de la lignée T est très rarement rencontrée < 5% des cas de LLC (Gregora, 2011).

7.1. Formule de la numération sanguine (FNS)

Cette méthode est appelée aussi hémogramme ou examen hématologique complet, c'est une analyse quantitative et qualitative des composants du sang : hématies, leucocytes et thrombocytes à l'aide d'un automate. La FNS permet de diagnostiquer la LLC lorsque le nombre des lymphocytes est supérieur aux normes, à savoir la présence d'une lymphocytose B anormale ≥ 5000 lymphocytes/ μl persistante de plus de 3 mois.

7.2. Frottis sanguin

C'est une technique basée sur l'observation sous microscope d'une goutte de sang étalée sur une lame de verre après coloration à base d'éosine et de bleu de méthylène, et ceci dans le but d'observer l'aspect morphologique des cellules sanguines et de les dénombrer. Ce procédé est effectué suite à l'apparition d'anomalies dans l'hémogramme. Le frottis d'une personne atteinte de LLC se caractérise par une observation de cellules matures de petite taille contenant un cytoplasme étroit et un noyau dense à chromatine partiellement agrégée ainsi que la présence de cellules lysées d'apparence écrasées appelées ombres de Gumprecht voir la figure-5.

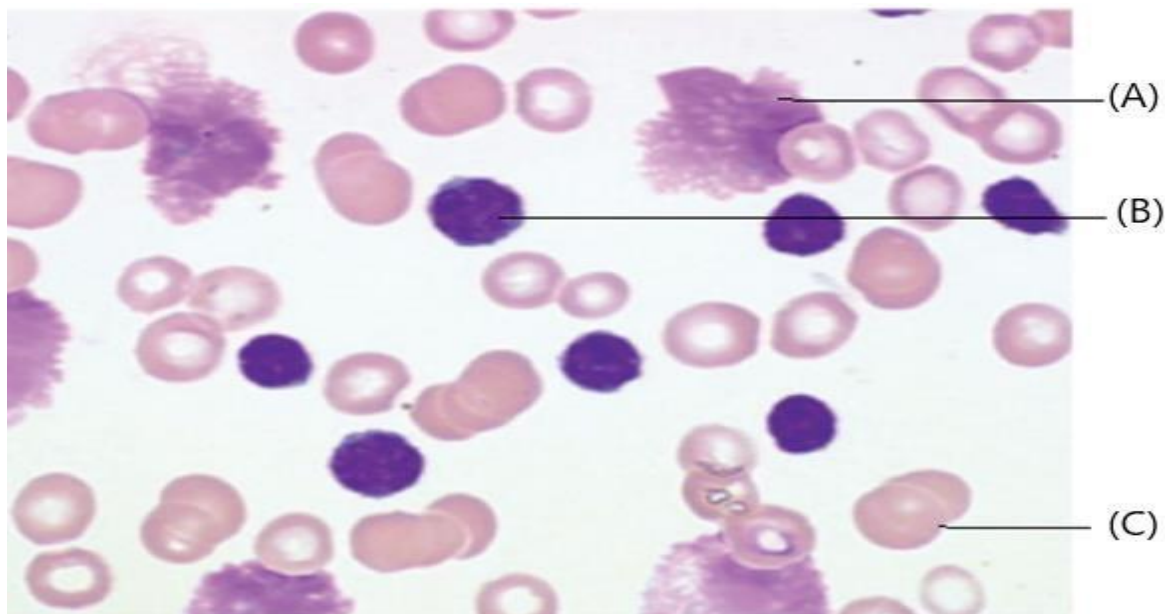


Figure 5 : Observation microscopique d'un frottis sanguin issu d'un patient atteint de LLC. . (A) Ombres de Gumprecht, (B) Lymphocytes de petite taille avec un rapport nucléo- cytoplasmique élevé et (C) Hématie.

7.3. Immunophénotypage des cellules leucémiques

L'Immunophénotypage de la LLC est réalisé par la technique de cytométrie en flux. Elle s'intéresse à la détection d'un nombre de marqueurs membranaires caractéristiques de ces cellules LLC en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques couplés à des fluorochromes. Le plus souvent la détection des cellules malignes est réalisée sur un prélèvement sanguin mais parfois il peut se faire sur des biopsies de la moelle osseuse. L'Immunophénotypage de la LLC sert à la détection de la leucémie ainsi le suivi de son évolution (Hallek et al., 2018).

En 1994, Matutes a établi un système des scores basé sur le suivi de 5 marqueurs par immunophénotypage à l'aide de la cytométrie en flux Voir tableau I et Figure-6 ; ce système est ensuite mis à jour en 1997 et se focalise au suivi de la forte expression des marqueurs CD5 et CD23, la faible expression de l'Ig de surface monotypique kappa ou lambda, la faible expression du CD22 et du CD79b et l'absence de FMC7. Le score de Matutes varie de 0 -5 en fonction de la présence ou l'absence de ces différents marqueurs qui vont faire attribuer un point ou non. Si le score =3, le patient est diagnostiqué comme atteint d'une LLC atypique lorsque le CD5, le CD23 sont positifs et le CD20 est faible, si le score < 3, il s'agit d'un Syndrome lymphoprolifératif B chronique qui exclut le diagnostic de la LLC. Par contre, un score ≥ 4 est en faveur d'une Leucémie lymphoïde Chronique (Moreau et al., 1997).

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

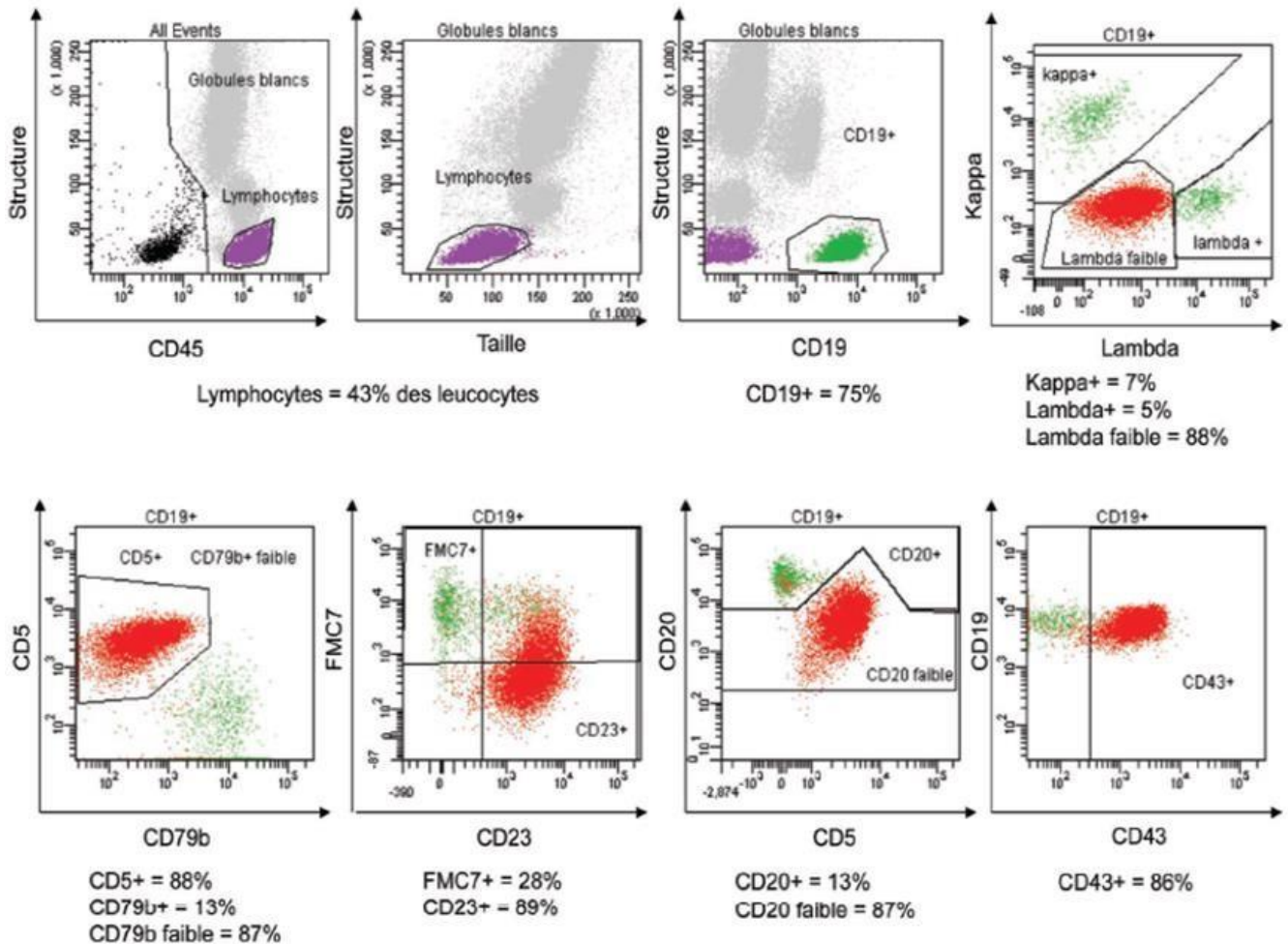


Figure 6 : Observation microscopique d'un frottis sanguin issu d'un patient atteint de LLC. Les lymphocytes (en violet), représentant 43 % des globules blancs, sont repérés par leur forte expression du CD45 et par leur taille et structure du cytoplasme peu complexe. Les lymphocytes B (en vert) sont isolés des lymphocytes totaux par leur expression du CD19. Les cellules LLC (en rouge), représentant 88 % des lymphocytes B, présentent ici des caractéristiques typiques : monotypie lambda de faible intensité, CD5+, CD23+, CD79b de faible intensité, FMC7- (score de Matutes/Moreau à 5). Elles sont également CD20+ de faible intensité et CD43+. En comparaison, la population B résiduelle normale est visualisée en vert. Ce phénotype permet de porter le diagnostic de LLC. (Megali le Garff et al 2013).

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

Tableau I : Calcul du score de Moreau/Matutes (Matutes et al., 1994).

Marqueur	+ 1 point	Pas de point
Expression des Ig de surface	Faible	Fort
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD22 ou CD79b	Faible	Fort

Le CD19, CD5, CD22, CD23, κ et λ sont généralement suffisants pour déterminer la LLC, mais il existe une panoplie d'autres marqueurs qui permettent le diagnostic, ils peuvent être fortement ou faiblement exprimés, exemple : CD79b, le CD43, le CD200, CD10, le CD38, et le ROR, le CD43, le CD200 et le CD180 (tableau II).

Tableau II : Diagnostic différentiel de la LLC basé sur les marqueurs phénotypiques.

Marqueur	LLC
Ig de surface	Plus faible
CD19	Plus faible
CD5	+
CD22	± faible
CD23	+
FMC7	-
CD79b	± faible
CD10	-
CD25	±
CD103	-
CD43	++
CD200	++
CD11c	±
CD180	±

8. Les signes cliniques de la LLC

Cliniquement, la plupart des patients sont asymptomatiques avant les stades avancés de la maladie. Souvent les personnes reçoivent un diagnostic de LLC lorsque le médecin trouve un excès de globules blancs lors d'un test sanguin de routine. De plus, leurs systèmes immunitaires ne fonctionnent pas convenablement et caractérisés par la production d'anticorps anormaux contre ses propres hématies et/ou plaquettes (auto-anticorps). Ces derniers détruisent ces cellules, entraînant ainsi une anémie ou thrombocytopenie, maladie immunitaire caractérisée par un nombre réduit de thrombocytes induisant des ecchymoses et des saignements. Les patients souffrant de la LLC peuvent développer ces auto-anticorps à tout moment et cela n'est pas directement lié à la gravité de la LLC ; mais ils peuvent avoir des problèmes avec leur système immunitaire qui les rend sensibles aux infections.

Les personnes atteintes présentent les symptômes courants de la LLC qui se manifestent par : la fatigue, perte du poids, une faiblesse, un essoufflement, des frissons, des sueurs nocturnes, des infections récurrentes et prolongées, une augmentation du volume de la rate et un gonflement ganglionnaire lymphatique qui peut être ressenti dans le cou, sous les bras {Revue générale des leucémies. (Ashkan, 2022).

9. Description de l'évolution de la LLC

L'évolution de la LLC est extrêmement variable. Certains patients présentent une forme indolente de la maladie, ont une espérance de vie proche de la normale et ne sont jamais traités. En revanche, d'autres patients développent une forme progressive et décèdent rapidement en dépit des traitements successifs. Des complications peuvent s'ajouter conjointement à l'évolution de la LLC, rendant ainsi le pronostic plus sombre, on peut citer :

9.1. Complications auto-immunes

Les complications auto-immunes sont fréquentes dans la LLC et surviennent chez 25% des patients. Dans la LLC, l'anémie hémolytique auto-immune (AHAI), est la complication la plus courante chez 7 à 10% des patients au cours de l'évolution de la maladie. Cette anémie est développée suite au ciblage du système immunitaire des lignées hématologiques provoquant ainsi une thrombocytopenie immunitaire, une aplasie des globules rouges et une granulocytopenie auto-immune. Les anticorps polyclonaux IgG sécrétés par des lymphocytes B non pathologiques possédant une forte affinité aux antigènes des érythrocytes, des thrombocytes et des érythroblastes sont la principale cause de cytopénies auto-immunes

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

secondaires. De plus une hémolyse intravasculaire causée par les auto-anticorps monoclonaux de type IgM produits par les cellules B leucémiques. L'érythropoïèse est inhibée par les cytokines générées des cellules LLC qui provoque par la suite une anémie et une thrombopénie. L'échappement à la surveillance immune est provoqué par le dysfonctionnement des lymphocytes T caractérisé par l'existence d'un déséquilibre au niveau du ratio Th17/Treg directement impliqué dans le développement de cellules auto-immunes. De nombreuses études montrent que les traitements utilisés contre la LLC peuvent aussi être à l'origine de ces complications auto-immunes. La chimiothérapie à base d'analogues de purines telle que la Fludarabine peut être à l'origine d'une AHAI, des thrombopénies auto-immunes peuvent apparaître suite à l'utilisation de l'Alemtuzumab (anti-CD52). Les cellules LLC-B produisent des cytokines immunosuppressives comme IL-10 et TGF- β . La sécrétion de l'IL-10 est une caractéristique principale définissant le lymphocyte B régulateur, représente une cytokine à effet pléiotropique produite par différentes cellules immunitaires. Elle est souvent détectée dans le sérum des patients atteints de différents cancers et est associée à un mauvais pronostic. Elle agit sur les monocytes et les macrophages par inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires, telles que : IL-1 α , TNF- α , IL-6 et IL-12, elle empêche également la production de chimiokines impliquées dans le recrutement des cellules dendritiques, des neutrophiles et des LT. Elle est qualifiée de modulateur de l'expression de cytokines, de médiateurs et de molécules de surface de ces cellules.

D'autre part, l'IL10 peut inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4+ et ainsi restreindre le fonctionnement et l'activation des LT CD8+. On trouve aussi la TGF- β (transforming growth factor β), une famille constituée de 3 formes (TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3), qui ont un rôle dans la régulation des réponses immunitaires et elles sont impliquées dans le développement et l'homéostasie de nombreux tissus. La TGF- β 1 est la plus immunorégulatrice, principalement sécrétée par les LT régulatrices ; elle inhibe la sécrétion des cytokines et la différenciation des lymphocytes T effecteurs. Après une stimulation des lymphocytes B, ces cellules sont capables de produire cette cytokine qui induit un blocage de la prolifération des LT CD8 + et provoque une apoptose des LT CD4+ (Tsang and Parikh, 2017).

9.2. Complications infectieuses

Les infections opportunistes d'origines bactériennes tel que *Cryptococcus neoformans* ou autres comme Pneumocoque, touchant les voies respiratoires sont considérées comme étant la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de la LLC. Les infections opportunistes d'origines bactériennes ou autres touchant les voies respiratoires sont considérées comme étant la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de la LLC (Forconi and Moss, 2015).

Cette complication se caractérise par une diminution quantitative des lymphocytes B et T, des déficits progressifs de l'immunité et d'une hypogammaglobulinémie ; ces manifestations sont les conséquences des effets secondaires de la chimiothérapie, de l'administration des anticorps monoclonaux anti-CD20 et des inhibiteurs des kinases. Une antibiothérapie prophylactique est adoptée comme moyen thérapeutique pour prévenir ces infections opportunistes (Dhalla et al., 2014).

9.3. Transformation tumorale

Le syndrome de Richter est une forme agressive qui découle de la transformation des LLC. Il correspond au développement dans la plupart des cas d'un lymphome B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) et plus rarement d'un lymphome de Hodgkin (LH). Cette transformation est déterminée par l'aggravation des symptômes tels que la croissance rapide des ganglions lymphatiques ou de la présence d'une masse lymphoïde extra-nodale et encore une augmentation excessive du taux de lactate déshydrogénase (LDH). Les mutations génétiques retrouvées dans les cas du syndrome de Richter de type LBDGC touchent les gènes : *NOTCH1*, *TP53*, *CDKN2A* et *MYC*. D'un point de vue immunophénotypique, les cellules LBDGC sont CD20+ et CD5-, Le CD23 n'est exprimé que dans certains cas. En ce qui concerne le LH, le diagnostic repose sur la présence de cellules de Reed-Sternberget de phénotype CD30+, CD15+, CD20-, CD5-, Igs+ et CD23- (Rossi and Gaidano, 2016).

La Prolymphocytaire est un autre type de transformation de la LLC, elle se caractérise par la présence de lymphocytes de diamètre de 14 à 22 micromètres ; dépourvues de granules, de vacuole, un noyau réniforme à chromatine fine et contiennent un nucléole volumineux. Cette forme clinique a une forte densité d'immunoglobulines membranaires à l'inverse de la leucémie lymphoïde habituelle qui a une faible densité d'Ig membranaires. Le pronostic est moins favorable que celui de la leucémie lymphoïde chronique et ses signes cliniques sont

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

plus agressifs que ceux de la LLC. Souvent la Prolymphocytaire est résistante aux chimiothérapies (Kipps et al., 2017).

9.4. Cancers solides associés

L'immunodépression associée à la LLC peut provoquer le développement des tumeurs malignes comme des mélanomes malins, des sarcomes, des cancers de l'estomac, du rein et de la prostate (Hisada et al., 2001). Les personnes atteintes de la LLC devraient impérativement réaliser des dépistages de manière régulière, parce qu'ils présentent un risque accru au développement de cancers comparativement aux sujets sains de même âge et du même sexe (Hallek et al., 2018).

10. Marqueurs pronostiques

Dans le but de prédire l'évolution de la maladie et la prise en charge thérapeutique, il est nécessaire de rechercher les marqueurs pronostiques ; qui peuvent être sous forme d'aberrations chromosomiques, d'expression de molécules transmembranaires caractéristiques comme le CD38 ou bien une forte présence de protéines cellulaires tel que ZAP-70.

10.1. Anomalies cytogénétiques

La LLC est caractérisée par un nombre important d'anomalies cytogénétiques, les plus fréquemment observées sont des pertes ou des gains de matériels chromosomiques allant d'une petite région jusqu'à un chromosome entier. Les plus rencontrées sont la délétion (del) du bras long (q) du chromosome 13 (del 13q14), la délétion du bras long du chromosome 11, la trisomie 12, la délétion du bras court (p) du chromosome 17 et le gain du bras court du chromosome 2. Il existe également d'autres anomalies récurrentes comme les délétions 6q, 8p et 14q, et le gain 8q. Ces derniers peuvent être considérés comme des facteurs pronostiques de LLC. La del 13q14 est l'anomalie la plus fréquente actuellement considérée comme un événement précoce dans la transformation leucémique. Elle est détectée par la technique FISH dans environ 55% des cas (Puiggros et al., 2014).

La del 11 q, entraîne la perte du gène suppresseur de tumeur ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). Retrouvée chez 12 à 20% des patients, elle est associée à une atteinte ganglionnaire importante (Dohner et al., 2000).

La del 17p, conduit à la perte du gène suppresseur de tumeur TP53, est retrouvée par la technique FISH chez environ 5 à 7% des patients LLC non traités, aussi chez environ 30% des

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

patients atteints de LLC réfractaire. Par comparaison avec la del 13q14 et la del 11 q, on constate que cette anomalie chromosomique est le plus mauvais pronostic car elle est associée à une résistance à la chimiothérapie conventionnelle (Parikh and Shanafelt, 2016) ; (Malcikova et al., 2009).

10.2. Mutations somatiques des gènes des immunoglobulines

Le système immunitaire adaptatif assure une protection dynamique contre les agents pathogènes. Au cours de la maturation normale des LB, la formation de la région V des chaînes d'immunoglobulines lourde et légère dépend de la recombinaison génique des segments V (variable), D (diversité) et J (jonctionnel). L'ajout ou la suppression de nucléotides aux jonctions de ces segments crée une complexité de séquence supplémentaire. Le statut mutationnel de la région variable du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline est le marqueur pronostique le mieux établi de la LLC qui oriente le choix du traitement. L'étude du statut mutationnel appelé plus couramment IgHV permet l'identification de deux entités de LLC : une à IgHV muté dans lequel la chaîne lourde des Igs présente plus de 2 % de différence de séquence avec celle du lymphocyte B naïf, cette forme mutée existe chez environ 60 % des patients. Une deuxième avec IgHV non-muté, où la chaîne lourde des Igs présente moins de 2 % de différence de la séquence de IgHV avec le lymphocyte B naïf, ce type est retrouvé chez 40 % des patients (Crombie and Davids, 2017).

10.3. Marqueurs phénotypiques

Plusieurs marqueurs phénotypiques caractéristiques de la LLC sont actuellement utilisé pour la prédiction de l'évolution de la maladie tel que CD38, ZAP 70 et CD49d.

CD38

Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire présente sur les LB et les LT matures, il possède une activité ecto-enzymatique. Il assure les interactions cellule-cellule, la migration et la transduction du signal. Sa liaison au CD31 inhibe l'apoptose dans les centres germinatifs, ce qui augmente la survie cellulaire des LB. L'expression élevée du CD38 par les cellules leucémiques est associée à un stade clinique avancé de la LLC. Cependant, il n'existe pas une valeur seuil clairement définie (Malavasi et al., 2008).

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

ZAP 70

Zeta-Associated-Protein-70 est une tyrosine kinase intracellulaire de la famille SYK, Cette protéine est exprimée chez les lymphocytes T et NK mais elle n'est pas détectée dans les LB. Elle joue un rôle dans la transduction du signal. Ce facteur pronostique est un marqueur de stade évolué de la LLC, il est également corrélé avec l'absence de mutations du gène IGVH. La détection de ZAP 70 se réalise par plusieurs méthodes tels que : La RT-PCR, l'immunoblot, l'immunohistochimie et la cytométrie en flux (Richardson et al., 2006) (Durig et al., 2003).

CD49d

Il s'agit d'une molécule de surface, son expression induit la prolifération des cellules leucémiques. Des études ont montré que CD49d constitue un marqueur pronostic défavorable de la LLC, via sa capacité de liaison à la MMP-9 (métalloprotéinase matricielle 9) qui facilite la transmission de signaux de survie provenant du microenvironnement (Strati et al., 2017). De plus, un complexe multiprotéique impliquant CD49d, CD38, CD44v et MMP-9 a été identifié dans les LB LLC-NM, suggérant l'existence d'un réseau fonctionnel entre ces différents biomarqueurs pronostiques. Une hyper-expression de CD49b est aussi observée dans quasiment tous les cas de LLC avec trisomie 12 (Zucchetto et al., 2013).

10.4. Marqueurs sériques

Lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH est une enzyme intracellulaire ubiquitaire qui catalyse réversiblement la transformation du pyruvate en lactate en présence de NAD⁺/ NADH. Un taux élevé de LDH est un marqueur d'une mauvaise réponse au traitement de la LLC (Farhana and Lappin, 2023).

Béta 2 Microglobuline

C'est une sous-unité du complexe d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), elle est présentée à la surface des cellules nucléées de l'organisme faisant partie du complexe CMH-I. La béta 2 microglobuline est exprimée sous forme soluble en petite quantité dans le sérum et l'urine mais elle est augmentée en cas d'infections virales et aussi dans le cas de la LLC (Hallek et al., 1996).

Thymidine Kinase (TK)

La TK est une phosphotransférase présente dans toutes les cellules, elle est impliquée dans la réparation de l'ADN. Un taux élevé de TK est corrélé à un stade clinique avancé de la

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

LLC. Cependant ce facteur pronostique est non spécifique parce qu'il diminue avec l'âge, donc l'interprétation de son taux doit se faire en fonction de l'âge du patient (Hallek et al., 1999).

CD23 soluble

Le CD23 est un marqueur cellulaire de la LLC. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de faible affinité aux IgE. Le CD23 peut être clivé pour générer le CD23 soluble, son taux est corrélé au temps de doublement des lymphocytes. Le CD23 soluble est classiquement dosé par la technique ELISA (Grelier et al., 2014).

10.5. Temps de dédoublement des lymphocytes (TDL)

Le TDL représente le nombre de mois nécessaires pour que la valeur absolue des lymphocytes sanguins double. Cette valeur corrèle avec le stade clinique et le niveau d'infiltration médullaire de la LLC. C'est pour cette raison que le TDL est utilisé comme un indicateur de l'évolution de la LLC. Plus le nombre de mois est inférieur à 6, plus la maladie devient agressive, ainsi il est nécessaire d'entamer le traitement lorsque la lymphocytose est supérieure à 15 g/l (Cramer and Hallek, 2011).

10.6. Classifications pronostiques

Après le diagnostic de la LLC, les cliniciens se réfèrent à des systèmes qui permettent d'évaluer le stade de la pathologie chez un patient. Les deux principaux systèmes de classification les plus couramment utilisés sont la classification de Rai et la classification de Binet.

10.6.1. Classification de Rai

Elle est établie en 1975, ce système est très utilisé aux Etats-Unis, il définit cinq groupes basés sur la survie médiane la plus courte, un syndrome tumoral (adénopathie, splénomégalie ou hépatomégalie) et la présence de cytopénies (anémie, thrombopénie). Par la suite, la classification de Rai a été modifiée (Hallek, 2017) (Scarfo et al., 2016), pour la réduire à 3 catégories de risque. Les patients présentant une lymphocytose isolée dans le sang et/ou la moelle osseuse (cellules lymphoïdes >30%) sont considérés comme étant à faible risque (anciennement stade Rai 0), ceux avec lymphocytose, adénopathies et splénomégalies, associées ou non à une hépatomégalie, présentent une pathologie à risque intermédiaire

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

(anciennement stade Rai I ou Rai II). Tandis que les patients atteints d'une lymphocytose associée à une anémie (taux d'hémoglobine <11 g/dL) ou à une thrombopénie (nombre de plaquettes < 100000/mm³) sont considérés comme à risque élevé (anciennement stade Rai III et Rai IV respectivement) voir tableau III (Hallek, 2017).

Tableau III : Classification de Rai Classification de Rai (Rai et al., 1975).

Stade	Caractéristiques
0	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée.
I	Lymphocytose + adénopathie.
II	Lymphocytose + splénomégalie et/ou hépatomégalie.
III	Lymphocytose + anémie < 11 g/dl.
IV	Lymphocytose + thrombopénie < 100g/l

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

10.6.2. Classification de Binet

Cette classification montrée sur le tableau IV est basée sur le nombre d'aires ganglionnaires atteints comme l'aire cervicale, axillaire et inguinale, l'hépatomégalie et la splénomégalie ; et sur la présence de cytopénie. Elle définit 3 stades (A, B et C)

Tableau IV : Classification de Binet (Binet et al., 1981).

Stades	Caractéristiques
A	Absence d'anémie (Hb > 100 g/l) ou de thrombocytopénie (Plt > 100 g/l) et jusqu'à 2 aires ganglionnaires atteints.
B	Absence d'anémie ou de thrombocytopénie et plus de 2 aires ganglionnaires atteintes.
C	Anémie ou thrombocytopénie et quel que soit le nombre d'aires ganglionnaires atteints.

10.6.3. Classification de Rossi

Cette méthode de classification est basée sur les quatre gènes mutés de la LLC ainsi que les principales anomalies cytogénétiques observées (tableau V).

Tableau V : Classification de Rossi (Rossi et al., 2013).

Stades	Caractéristiques
Haut risque	Anomalie de <i>TP53</i> et/ou mutation de <i>BIRC3</i>
Risque intermédiaire	Mutation <i>SF3B1</i> et/ou <i>NOTCH1</i> et/ou del (11q)
Faible risque	Absence d'anomalie au caryotype ou trisomie 12
Très faible risque	del (13q)

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

10.6.4. CLL-IPI (CLL International Prognostic Index)

Le CLL-IPI correspond à un score pronostique. Il est établi avant la prise de la 1ère ligne de traitement. Cinq marqueurs pronostiques indépendants ont été retenus en 2016 par le comité CLL-IPI. Selon le nombre de points obtenus on détermine les catégories de risque ainsi que la survie globale pendant 5 ans sans traitement qui sont représenté sur le tableau suivant :

Tableau VI : Critères et calcul du CLL-IPI et Catégories de risque et survie globale sans traitement selon le score CLL-IPI (Gentile et al., 2016).

Facteurs pronostiques	Points	Score CLL-IPI	Catégorie de risque	SG à 5ans (%)
Del (17p) et/ou mutation <i>TP53</i>	4	0-1	Faible	93,2
Statut IGVH non muté ou $\beta 2$ microglobuline > 3,5 mg/l	2	2-3	Intermédiaire	79,3
RAI I à IV ou Binet B ou C	1	4-6	Elevé	63,3
Age > 65 ans	1	7-10	Très élevé	23,3

11. Stratégie thérapeutique de la leucémie lymphoïde chronique

L'évolution clinique de la LLC est hétérogène et souvent lente. La décision de traitement dépend du stade de développement de la pathologie. Les patients stables et non évolutifs nécessitent une simple surveillance sans aucun traitement avec des analyses FNS et des examens physiques réguliers. Le traitement est donc prescrit aux patients ayant des symptômes cliniques de la LLC. Ce traitement repose principalement sur l'utilisation d'immunochimiothérapie ou de thérapies ciblées et cela se fait en fonction de l'âge, de l'état de santé du patient ainsi que des aspects biologiques de la pathologie. Par exemple, l'apparition des premiers symptômes constitutifs de la LLC ou de ses complications. Les traitements actuels de la LLC demeurent non-curatifs. La mise en route d'un traitement est basée sur la présence ou non de certains signes d'activité de la maladie tels que :

-Défaillance médullaire progressive et baisse au niveau du fonctionnement de la moelle osseuse (Hb < 100 g/l et /ou plaquettes < 100 g/l) : développement d'une anémie hémolytique et/ou d'une thrombopénie auto-immune.

- Splénomégalie massive (augmentation massive du volume de la rate dû aux troubles lympho-prolifératifs).

- Présence de ganglions volumineux (au moins 10 cm dans le plus long diamètre).

-Augmentation progressive et rapide de la lymphocytose (dédoublément du nombre des lymphocytes dans le sang durant une période de deux mois).

-Apparition d'un ou de plusieurs signes ou symptômes cliniques en rapport avec la maladie sans raison apparente telle que : perte de poids non volontaire de plus de 10% au cours des derniers 6 mois, fatigue significative, fièvre > 38°C pendant 2 semaines sans présence d'infections et sueurs nocturnes persistantes sans signe d'infection.

11.1. Abstention thérapeutique (Surveillance)

La surveillance permet de détecter la progression de la maladie. Elle repose sur un examen clinique et un autre examen biologique. Dans le cas d'un examen clinique, le médecin recherche la présence éventuelle de complications infectieuses et de signes d'évolution de la LLC. Par contre, l'examen biologique est basé sur un hémogramme avec numération des réticulocytes, une électrophorèse des protéines sériques et un bilan d'hémolyse d'haptoglobine, bilirubine libre, LDH, test de Coombs direct qui met en évidence les immunoglobulines de surface existantes. L'abstention thérapeutique peut se faire en deux cas

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

Cas : lorsque la LLC n'a pas propagé et n'a pas provoqué de symptômes, dans ce cas la surveillance permet d'éviter le traitement et ses effets secondaires indésirables. Le deuxième cas concerne les patients ayant terminé leur traitement, un examen clinique et un autre biologique sont obligatoires tous les trois à six mois afin de surveiller l'état de la maladie.

11.2. Traitements symptomatiques

Le médecin prescrit plusieurs traitements afin de lutter contre le syndrome de lyse ; et pour traiter les complications infectieuses ; des antibiothérapies, des antiviraux ou antifongiques sont utilisés. Ainsi qu'une administration régulière de gammaglobulines pour rectifier l'hypogammaglobulinémie. Le traitement des cytopénies et/ou thrombocytopénie nécessite l'administration de corticoïdes à forte dose. Ce traitement peut provoquer une anémie hémolytique auto-immune suite à la prise des analogues des purines. Ces derniers sont contre-indiqués.

11.3. Traitement des transformations (Le syndrome de Richter)

Lors de la survenue d'un lymphome volumineux et asymétrique chez un patient porteur de la LLC, le traitement ne diffère pas de celui des lymphomes de haut grade de malignité ; et repose sur une polychimiothérapie associée au Rituximab.

11.4. Traitements spécifiques

L'identification des facteurs cliniques et pronostiques, cités auparavant, permet de déterminer le traitement le plus approprié pour le patient. Les patients ayant un risque faible en espérance de vie sont traités avec des traitements à des doses réduites dans le but de contrôler les symptômes de développement de la maladie. Les patients exigeant un traitement sont ceux situés au stade A, B, C présentant des critères d'activité de la pathologie sont traités par administration de fortes doses de chimiothérapies afin d'obtenir de longues rémissions.

11.5. Chimiothérapie

La chimiothérapie est le traitement systémique le plus utilisé pour les patients présentant un état évolutif et avancé de la LLC. Les agents chimiothérapeutiques les plus souvent employés sont les suivants :

11.5.1. Chlorambucil (CLB)

Le Chlorambucil est un agent anticancéreux cytostatique alkylant du groupe des moutardes d'azote. Son mode d'action consiste à ponter des guanines des chaînes d'ADN afin de former des liaisons covalentes fortes entre les brins et ainsi inhiber la réplication et la transcription, ceci entraîne la mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses. Le

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

Chlorambucil possède également des propriétés immunosuppressives.

11.5.2. Cyclophosphamide (Endoxan)

La cyclophosphamide est un agent de chimiothérapie, classé parmi les agents alkylants bifonctionnels, il peut être administré sous forme de perfusion ou par voie orale, son efficacité se rapproche de celle du Chlorambucil, il agit en endommageant l'ARN ou l'ADN ce qui permet l'arrêt de la division cellulaire provoquant ainsi la mort de la cellule. Il peut être associé à la Fludarabine et au Rituximab (FCR), le FCR est efficace et permet d'atteindre des niveaux de réponse élevés et rapides (Kim and Chan, 2017).

➤ **Bendamustine (Levact)**

C'est un agent alkylant anti-tumoral, possédant une action antinéoplasique et cytolytique basée sur sa capacité d'induire des liaisons covalentes croisées de l'ADN simple brin ou double brin par alkylation, cela est dû à sa structure comprenant un anneau benzimidazole purine qui lui confère ces propriétés cytotoxiques.

➤ **Fludarabine (Fludara)**

La Fludarabine est un analogue fluoré de l'adénine nucléosidique qui inhibe l'enzyme ADN polymérase et la ribonucléotide réductase ce qui favorise l'apoptose. C'est un analogue des purines majeur dans le traitement de la LLC, elle exerce une action anti-tumorale par inhibition de la synthèse de l'ADN. Elle est indiquée dans le traitement de la LLC -B chez les patients en stade avancé, ces patients doivent présenter une activité médullaire suffisante, par contre elle est contre-indiquée chez les patients possédant une insuffisance rénale (Gassner et al., 2011).

11.6. Immunothérapie

L'immunothérapie repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre un antigène spécifique exprimé sur les cellules tumorales, elle ne s'attaque pas à la tumeur mais permet de stimuler les cellules immunitaires afin de lutter contre la maladie, en induisant une cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps. Le Rituximab, l'ofatumumab et l'Obinutuzumab sont les anticorps monoclonaux les plus utilisés dans la LLC, ils sont dirigés contre le CD20 des lymphocytes B.

➤ **Rituximab (Mabthera)**

Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique. Son mode d'action repose sur sa

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

capacité de liaison à l'antigène transmembranaire CD20 humain qui est exprimé à la surface des lymphocytes B normaux ou malins et cela à travers le fragment Fab du Rituximab ; ce qui provoque le déclenchement de l'effet de cytotoxicité dépendant des anticorps(ADCC) mais également l'activation du complément en faveur de l'induction directe de l'apoptose (Smith, 2003).

➤ **Obinutuzumab (Gayvaro)**

Il s'agit d'un anticorps humanisé de type II qui se distingue de Rituximab par l'orientation du fragment Fc une fois fixé à la surface de la cellule. Ce fragment Fc augmente l'efficacité de cet anti-CD20 de 2^{ème} génération capable d'induire fortement la lyse des cellules LLC. Il est administré sous contrôle et dans un environnement où l'ensemble des moyens de réanimations sont disponibles.

➤ **Ofatumumab**

L'ofatumumab est un nouvel anticorps monoclonal humain de type IgG1 anti CD20, il est produit à partir d'une lignée de cellules murines par génie génétique. L'ofatumumab est différent du Rituximab, il se lie spécifiquement à un épitope distinct de l'antigène CD20, il s'agit de la petite et la grande boucle extracellulaire de cet antigène. La liaison de l'ofatumumab à l'épitope membranaire engendre le recrutement à la surface de la cellule et l'activation du complément entraînant une cytotoxicité dépendante du complément et provoquant ainsi la lyse des cellules cancéreuses (Kang and Blair, 2022).

➤ Alemtuzumab

C'est un anticorps monoclonal de type IgG1 humanisé qui reconnaît le CD52, il est une glycoprotéine exprimée sur les lymphocytes B et T normaux et atteints de leucémie. L'intérêt de cette molécule réside dans son efficacité chez les malades résistants aux analogues de purines.

11.7. Thérapies ciblées de la LLC

La thérapie ciblée est un traitement médicamenteux sélectif qui cible des caractéristiques spécifiques des cellules cancéreuses en épargnant au maximum les cellules saines. Ce traitement peut agir à différents niveaux : sur les facteurs de croissance, les récepteurs membranaires ou sur des facteurs intracellulaire (cytoplasme, noyau). Les progrès dans la compréhension de la biologie de la LLC ont permis le développement de nouvelles approches thérapeutiques qui ont considérablement amélioré la prise en charge des patients. Récemment, l'identification des cibles thérapeutiques spécifiques impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire, telles que le récepteur des cellules B (BCR) ou BCL-2, a révolutionné le traitement des patients atteints de LLC (Sedlarikova et al., 2020).

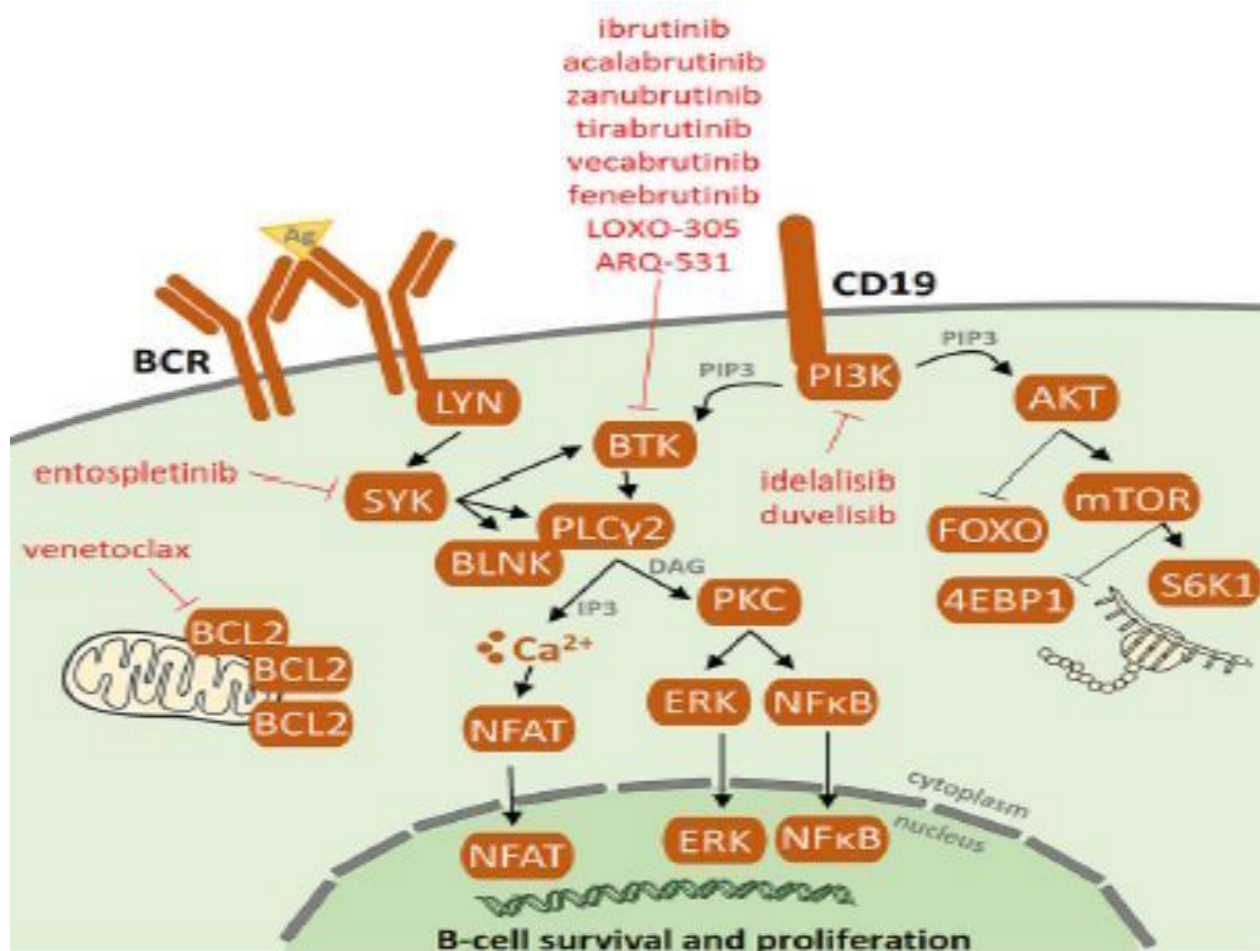


Figure 7 : Représentation des principaux inhibiteurs des voies de signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR). La liaison de l'antigène aux récepteurs des lymphocytes B la signalisation BCR est activée de manière chronique dans les cellules LLC. En conséquence, le signal BCR activé entraîne la production de seconds messagers et l'activation de NF-κB et des voies de prolifération et anti-apoptotiques ultérieures. Les cibles des inhibiteurs du BCR : Ibrutinib, Idelalisib, Acalabrutinib, Zanubrutinib, Tirabrutinib, Fenebrutinib, Vecabrutinib, LOXO-305, ARQ-531 et Entospletinib (Sedlarikova et al., 2020).

➤ Inhibiteurs de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK)

La physiopathologie de la LLC est caractérisée par une activation aberrante des voies de signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR), la voie de la tyrosine kinase de Burton (BTK) est alors exprimée de façon active. L'utilisation d'inhibiteurs de la tyrosine kinase de la voie du récepteur B est de ce fait une cible intéressante. Par exemple l'Ibrutinib (Imbruvica)[™] et Acalabrutinib (Calquence[™]).

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

➤ Inhibiteurs de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K)

La PI3K delta est une protéine surexprimée dans de nombreuses tumeurs malignes à cellules B et qui joue un rôle dans la survie, la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. Elle fait partie des tyrosines kinases de la signalisation du récepteur BCR. Les inhibiteurs de la PI3 Kinase sont utilisés pour le traitement de la LLC en inhibant le BCR via PI3K, par exemple Idelalisib (Zydelig™).

➤ Inhibiteurs de la protéine anti-apoptotique BCL2

Le BCL2 (B-cell lymphoma 2), est une protéine anti-apoptotique surexprimée dans les cellules de la LLC. Cette surexpression est impliquée dans l'augmentation de la survie des lymphocytes tumoraux. De plus, elle est aussi associée à la résistance à la chimiothérapie. Vénétoclax (Venclyxto™) est un médicament inhibiteur sélectif de BCL2 qui se comporte comme inducteur de l'apoptose au niveau des cellules malignes (Jones et al., 2018).

12. Schéma thérapeutique

Le suivi des directives de l'IWCLL (International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia), est important pour initier le traitement d'une maladie active chez les patients atteints de LLC à différents stades d'évolution A, B et C. Cela concerne les patients présentant des adénopathies et des splénomégalies volumineuses, progressives ou symptomatiques, une augmentation rapide de la lymphocytose avec un temps de doublement des lymphocytes court.

12.1. Traitement de première ligne

Rituximab + Fludarabine +Cyclophosphamide (R-FC), est considéré comme la meilleure option de traitement chez les patients jeunes porteurs de mutations IGHV sans del 17p. C'est un traitement qui induit un fort taux de réponse ciblant la LLC. La thérapie R-FC n'est pas bien tolérée chez les patients âgés de plus de 65 ans ou par ceux présentant des comorbidités, principalement en raison des effets secondaires tels que la myélo-suppression prolongée et l'apparition d'infections. Une meilleure tolérance avec une efficacité comparable chez les patients âgés a été démontrée avec le BR (Rituximab+ Bendamustine). Concernant les patients avec des anomalies de 17p/TP53 ou IGHV non muté, la chimio-immunothérapie n'apporte pas de réponse clinique adéquate. Le traitement standard de première ligne pour ces patients est l'inhibiteur de la signalisation du récepteur BCR « Ibrutinib » éventuellement

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

associé au Rituximab (Bosch and Dalla-Favera, 2019).

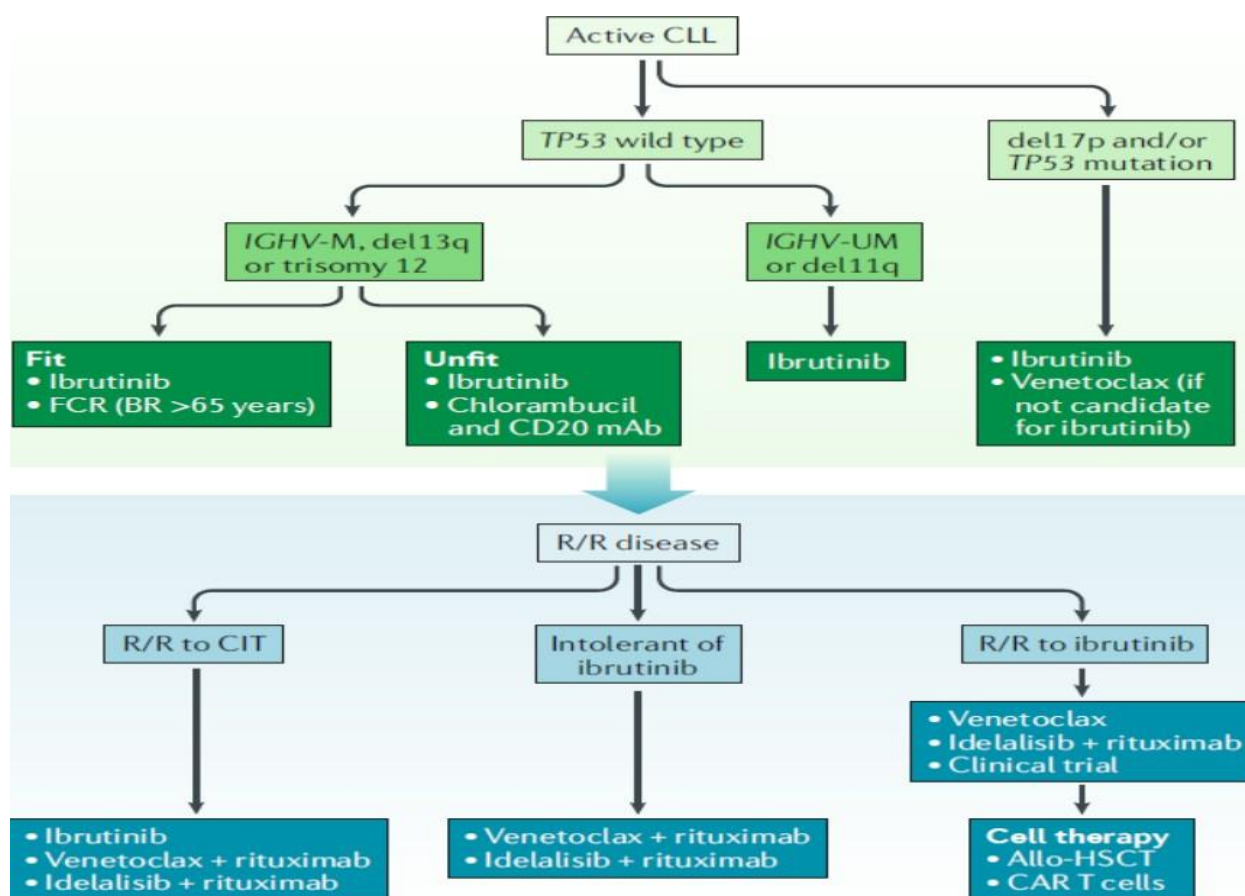


Figure 8 : Algorithme thérapeutique pour les patients atteints de LLC. Les patients atteints de LLC doivent être traités lorsqu'ils remplissent les critères d'iwCLL pour la maladie active. Les LLC présentant des mutations de la protéine P53 doivent être traités par l'Ibrutinib ou le Vénétoclax (chez les patients qui ne sont pas candidats à l'Ibrutinib). Chez les patients en forme présentant une LLC à faible risque (c'est-à-dire, statut IGHV- M, del13q4 ou trisomie 12) TP53 de type sauvage, les combinaisons de chimio- immunothérapie (CIT) conduisent à des résultats similaires à l'ibrutinib, alors que le traitement préféré chez les patients inaptes à faible risque l'ibrutinib plutôt que des combinaisons de Chlorambucil et d'Obinutuzumab ou d'autres anticorps anti- CD20 (Rituximab ou ofatumumab) .Un consensus général existe sur l'utilisation de l'ibrutinib en première ligne chez les patients atteints de LLC à haut risque, même ceux sans anomalies TP53. Chez les patients atteints d'une maladie en rechute/ réfractaire (R/ R) après une CIT, les options les plus recommandées sont l'ibrutinib ou le vénétoclax plus le rituximab, tandis que l'idelalisib plus le rituximab peut être considéré comme la troisième option. Les patients atteints d'une maladie R/ R qui ne tolèrent pas l'ibrutinib peuvent être sauvés avec du vénétoclax plus du rituximab ou de l'idelalisib plus du Rituximab. Enfin, les patients en progression après ibrutinib peuvent être traités par vénétoclax plus Rituximab ou idelalisib plus rituximab, ou inclus dans des essais cliniques, puis envisagés pour une thérapie cellulaire en fonction des caractéristiques du patient et du donneur. Allo- HSCT : allogreffe de cellules souches hématopoïétiques ; BR : Bendamustine plus rituximab ; CAR : récepteur antigénique chimère ; FCR : Fludarabine plus cyclophosphamide plus rituximab ; mAb : anticorps monoclonal (Bosch and Dalla-Favera, 2019).

12.2. Traitement des patients avec mutation de la TP53, en rechute ou réfractaires

Presque tous les patients atteints de LLC rechutent à un moment donné, mais ils n'auront pas tous besoin d'un traitement au moment de la rechute. Le traitement est envisagé pour les patients qui présentent des symptômes ou ceux qui ont une maladie active comme recommandé par l'International workshop. Les réponses et la tolérance aux traitements antérieurs, le moment de la rechute, les résultats pronostiques lors de la classification, les caractéristiques du patient et l'état de performance sont pris en compte pour la sélection du traitement approprié chez les patients en rechute. Si le patient avait obtenu une rémission supérieure à 24-36 mois, le premier traitement peut être répété. Dans le cas contraire, il faut choisir un autre traitement avec des agents ciblés comme l'ibrutinib, l'idelalisib, le vénétolax ou le duvelisib est recommandé dans ce contexte (Bosch and Dalla-Favera, 2019).

13. Greffe de moelle

L'allogreffe des cellules souches hématopoïétiques (CSH) est l'unique traitement curatif des patients atteints des hémopathies malignes. Elle est réalisée par administration intraveineuse des CSH saines. Son objectif est de remplacer totalement la moelle osseuse du receveur, qui produit un clone malin, par des CSH saines d'un donneur. Cette allogreffe nécessite l'élimination complète ou quasi complète des cellules hématopoïétiques du receveur, on appelle cette étape nécessaire le conditionnement afin d'éviter le rejet de la greffe. On distingue deux types de conditionnement :

- Myélo-ablatif : le patient est mis en aplasie totale par une chimiothérapie qui peut être accompagnée d'une irradiation corporelle totale. Ce traitement est fortement risqué pour le patient car il peut subir des effets secondaires immédiats ou tardifs.
- Non myélo-ablatif : Dans ce cas le patient subit une chimiothérapie et/ou radiothérapie moins intense que dans le cas précédent et par conséquent les effets secondaires sont mieux tolérés.

Dans le cas d'allogreffe des CSH, des conditions importantes de compatibilité sont requises afin de limiter les différentes réactions immunologiques de rejet de greffes. La première réaction redoutée dans toute greffe est le rejet du greffon causé par les lymphocytes T de l'hôte non-éliminés lors du conditionnement, et qui s'activent contre les antigènes HLA étrangers du greffon. La deuxième réaction vient du greffon et dirigée contre l'hôte, elle est liée à l'activation des lymphocytes T immunocompétents du greffon qui détectent les

Chapitre I : Généralités sur la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

alloantigènes HLA du receveur provoquant ainsi des dommages au niveau de nombreux organes du receveur pouvant provoquer le décès du patient.

Il existe plusieurs modalités de greffes, on trouve la greffe autologue qui consiste à greffer au patient ses propres cellules souches dont le HLA est identique. Ce prélèvement est réalisé chez le patient en phase de rémission complète, puis les cellules sont congelées jusqu'à leur réinjection, la deuxième modalité est la greffe syngénique correspondant à une greffe réalisée entre deux jumeaux monozygotes, dont le HLA est identique et enfin la greffe allogénique, elle est réalisée à partir des cellules d'un donneur qui peut être apparenté mais pas un jumeau monozygote. HLA est dit de type géno-identique. Les variations géniques se portent sur des gènes hors système HLA. Le donneur peut être non apparenté au receveur, dans ce cas on parle de greffe HLA phéno-identique.

La recherche d'un donneur compatible commence par l'étude de la fratrie, le receveur possède une chance sur quatre d'avoir un frère ou une sœur qui soit HLA géno-identique. Si aucune personne de la fratrie n'est compatible, la deuxième solution est la recherche d'un donneur non apparenté, le patient possède une chance sur un million de trouver un donneur compatible, mais cela dépend de son typage HLA. Un donneur est dit phéno-identique lorsqu'il existe une compatibilité entre les deux allèles de chacun des cinq loci : HLA-A, -B, -C, -DRB1 et -DQB1 (Jacque, 2015).

1. Origine cellulaire de la LLC

La leucémie lymphoïde chronique est la leucémie adulte la plus fréquente dans le monde occidental. Elle se caractérise par l'accumulation de petits lymphocytes B d'apparence matures possédant des marqueurs immunologiques distinctifs dans le sang, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques ou d'autres tissus lymphoïdes. La détermination de l'origine cellulaire de la LLC permet d'identifier les événements survenus lors de la transformation d'un lymphocyte B normal vers un lymphocyte malin dans l'objectif de comprendre les causes de la survenue de la LLC. Deux hypothèses concernant l'origine cellulaire de la LLC ont été proposées. La première hypothèse annonce que la LLC provient des méthylations et de modifications épigénétiques du génome dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC) {Gahn, 1997 #6} ; des xénogreffes de ces HSC chez des souris immunodéficientes ont été effectuées, les résultats obtenus ont généré des lymphocytes B qui expriment le marqueur CD5 indiquant le développement de la LLC. Dans la deuxième hypothèse, l'expression de CD5, les faibles niveaux d'expression de CD20 et d'Ig membranaires et de CD23 qui représente un marqueur d'activation des lymphocytes B suggèrent que le lymphocyte B malin dérivait de cellules B matures. L'expression de CD5 a orienté l'hypothèse que les cellules impliquées dans l'immunité innée (cellules LBs B1) sont originaire de cette hémopathie. La LLC peut être classée en deux sous- groupes à base de la présence ou de l'absence de mutations dans les gènes de la région variable de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IGHV) : muté (IGHV- M) et IGHV non muté (IGHV- UM). Ce dernier est dérivé de LB naïves situé au stade d'avant formation du centre germinal (pré- GC). En revanche, le statut M-IGHV est dérivé à partir des cellules du stade post- centre germinal (Post-GC) (Klein et al., 2001) Pour conclure, l'origine cellulaire exacte de la LLC reste encore mal connue, ces deux hypothèses doivent encore être confirmées (Husby and Gronbaek, 2017).

Chapitre II : Biologie de la LLC

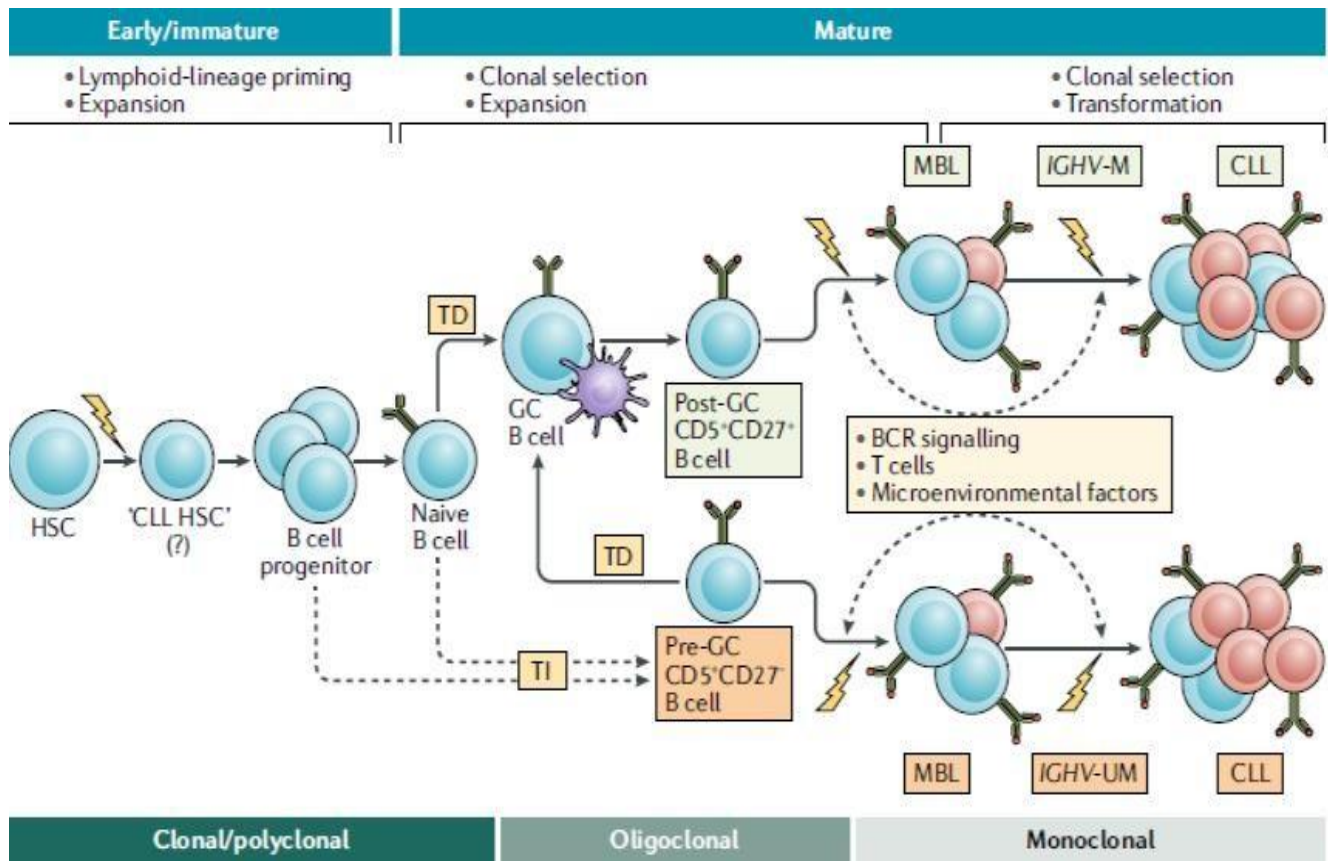


Figure 9 : Origine cellulaire de la leucémie lymphoïde chronique. Il a été suggéré que les événements génétiques et épigénétiques provoquent la leucémie lymphoïde chronique (LLC), La LLC se produit au niveau du stade des cellules souches hématopoïétiques (CSH), bien que cette hypothèse reste controversée, elle survient après acquisition des CSH des lésions génétiques et épigénétiques (indiquées par des symboles de foudre). La conséquence de ces lésions pourrait être une expansion polyclonale des cellules progénitrices B. Une stimulation antigénique ultérieure pourrait conduire à une sélection oligoclonale et à une expansion des cellules B matures. Les cellules LLC présentant des mutations dans les gènes de la région variable de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (GHV- M) semblent provenir des cellules CD5 CD27 B post- centre germinal (GC), qui sont très probablement dérivées des cellules CD5 CD27 B qui ont passé par le centre germinal Post-GC " À l'inverse, la LLC non mutée IGHV (GHV- UM) semble être dérivée de cellules CD27- B CD5+ (pré- GC), qui pourraient provenir de cellules B naïves ou d'une lignée distincte de cellules B précurseurs, probablement dans un processus indépendant des cellules T. L'évolution de ces progéniteurs vers la lymphocytose B monoclonale (MBL) et, finalement, vers la LLC manifestée est dictée par des anomalies génétiques et épigénétiques supplémentaires (indiquées par des symboles d'éclair), la stimulation des récepteurs des cellules B (BCR), ainsi que des facteurs micro- environnementaux et des cellules T. les flèches indiquent un mécanisme hypothétique. TD, Antigène dépendant des cellules T ; TI. Antigène indépendant des cellules T (Bosch and Dalla-Favera, 2019).

2. Voies de signalisation du BCR

2.1. Signalisation du BCR dans les LB normaux

Le BCR est un récepteur à l'antigène des LB, la fixation de l'Ag sur le BCR déclenche un ensemble de réactions qui permettent son activation, suite à la phosphorylation des résidus tyrosines situés sur les motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) intracytoplasmiques du CD79a et CD79b, après recrutement des kinases telles que la tyrosine kinase SYK et la kinase SRC LYN. Cette phosphorylation génère un signalosome composé de nombreuses kinases et protéines adaptatrices telles que Lyn et SYK qui recrute après la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) et des molécules régulatrices comme la protéine BLNK (B-cell linker). Il y a aussi l'activation de la phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) et la protéine Ras. Cette dernière se lie et active la kinase Raf qui propage ensuite le signal vers la kinase extracellulaire (ERK). La PLC γ 2 à son tour va cliver le PIP2 en diacylglycérol (DAG) et IP3 (inositol triphosphate), ce qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire et le DAG. Le taux élevé du calcium intracellulaire permet l'activation de la PKC β qui va phosphoryler CARMA 1, MALT, BCL-10, IKK conduisant à l'activation des facteurs de transcription nécessaires à la prolifération tels que NF κ B. En revanche l'IP3 permet l'activation de la NFAT. Parallèlement, la voie phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) va permettre le maintien de l'activation du BCR par activation d'Akt (protéine kinase B). Certaines phosphatases telles que SHP1 et SHIP1/2 ainsi que les co-récepteurs CD22 et CD5 vont jouer le rôle de régulateurs négatifs de la signalisation des LB voir figure-10.

L'activation du BCR se fait de façon antigène-dépendante ou de façon antigène-indépendante, qui est appelée signalisation tonique du BCR. Afin que les LB se prolifèrent, se différencient et permettent la production d'anticorps (LeBien and Tedder, 2008).

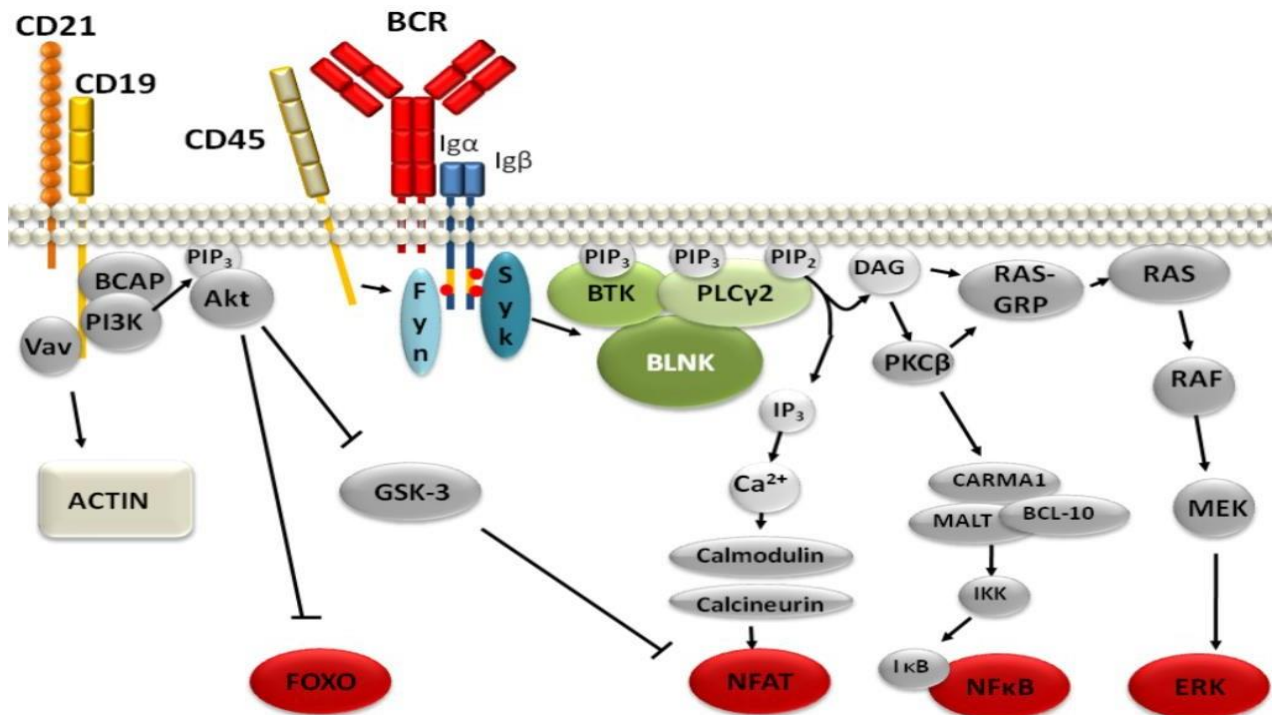


Figure 10 : Schématisation des voies de signalisation associée à l'activation du récepteur BCR.. En présence de l'antigène spécifique, La liaison de l'antigène provoque rapidement le cross-link des BCR qui activent les kinases de la famille Src, notamment Blk, LYN et FYN et les tyrosines kinases SYK et BTK. Cela conduit à la formation d'un « signalosome » qui est constitué des tyrosines kinases mentionnées en haut, du BCR et des protéines adaptatrices, par exemple, BLNK et CD19, ainsi que des molécules de signalisation, telles que P13K, PLC γ 2 et VAV. Cela aboutit à des modifications du cytosquelette et à l'activation de facteurs de transcription tels que NFAT et NF- κ B (https://en.wikipedia.org/wiki/B-cell_receptor#/media/File:B_cell_singaling.png).

2.2. Signalisation du BCR dans la LLC

La signalisation de la LLC est différente des LB normaux. Elle est caractérisée par une expression réduite d'IgM, une réponse variable à la stimulation antigénique, et une activation de voies anti-apoptotiques (Woyach et al., 2012) ; Ainsi que la ZAP-70 qui est normalement absente dans la signalisation du BCR. Elle est anormalement surexprimée dans la LLC et d'une façon plus importante dans le cas U-CLL (IGHV non muté) que dans les M-CLL (IGHV muté). ZAP-70 joue un rôle de protéine adaptatrice et augmente la signalisation du BCR par augmentation du flux calcique. Elle permet la réponse aux signaux de survie provenant du microenvironnement (Richardson et al., 2006) ; les LLC expriment des formes phosphorylées de Lyn, Syk, ERK et NF- κ B ; mais il existe une forte expression de Btk de même une activation constitutive de PI3K qui renforce l'activation des voies MAPK et NF- κ B (Hoellenriegel et al., 2012), (Ponader et al., 2012). Le type d'antigène reconnu par le BCR varie entre les M-CLL lesquelles leur BCR est monoréactif ; reconnaît des antigènes protéiques alors que les U-CLL ont un BCR poly-réactif, capable de reconnaître plusieurs

Chapitre II : Biologie de la LLC

antigènes poly-spécifiques de nature non protéique. La stimulation des cellules avec un anticorps anti-IgM immobilisé in vitro permet de démontrer l'importance de la signalisation BCR dans l'évolutivité de la LLC. Les M-CLL ne répondent que très peu ou pas à la stimulation in vitro du BCR. Ces patients sont dits « non répondeurs » caractérisés par une faible activité métabolique de la LLC, une réponse à l'apoptose non modifiée et présente dans la majorité des cas une maladie indolente. Par contre U-CLL présentaient une activation du cycle cellulaire avec une entrée en phase G1, une activité métabolique accrue et une inhibition de l'apoptose, conduisant à l'activation des effecteurs du BCR et donc à l'augmentation de la survie cellulaire et de la progression de la maladie. Ces patients sont appelés « répondeurs ». Toutes les cellules B de la U-LLC présentent une phosphorylation constitutive des protéines de signalisation, et une activation constitutive du facteur de transcription NFAT, qui affiche une capacité de liaison à l'ADN plus importante lors de la stimulation des IgM des cellules U-LLC.

Figure 11 : Comparaison entre les voies de signalisation du BCT des cellules M-CLL et celles des cellules U-CLL. La comparaison entre les voies de signalisation M-CLL et U-CLL montre que les cellules M-CLL possèdent une phosphorylation constitutive des protéines de signalisation et une activation réduite de la réponse après stimulation du BCR par des antigènes externes. Les cellules U-CLL expriment des BCR spécifiques aux auto-antigènes. Les U-CLL sont généralement très sensibles à la stimulation antigénique, ainsi que la présence à des niveaux élevés de CD38 et de ZAP70 (Ten Hacken and Burger, 2016).

Chapitre II : Biologie de la LLC

3. Mutations IGHV

Les cellules de la LLC expriment un faible niveau d'Ig membranaires (IgM co- exprimées avec des IgD). Selon le statut mutationnel d'IGHV, les patients LLC sont répartis en deux groupes IGHV mutés et non mutés. Ce statut mutationnel dépend de l'origine des cellules B, en effet, les cellules B naïves (ou pré-germinales) possèdent des gènes IGHV non mutés, tandis que les cellules B mémoires (post-germinales) sont mutés (Chiorazzi et al., 2005). La mutation du gène IGHV est obtenue par comparaison de la séquence IGHV du clone tumoral CLL-B à la séquence germinale de référence. Un gène IGHV est considéré comme muté (M-IGHV) si plus de 2% de la séquence d'ADN (acide désoxyribonucléique) est non-homologue à celle des LB naïfs. Lorsque la différence entre les séquences est moins de 2%, IGHV est considéré comme non muté (UM-IGHV). Le M-IGHV est associé à un pronostic plus favorable (Dohner et al., 2000). Tandis que l'UM-IGHV est de mauvais pronostic pour le patient à cause de sa référence à un stade plus avancé de la pathologie. Une étude a démontré que plus le taux de mutation est élevé plus le pronostic de survie sans progression et de survie globale est favorable, le classement des patients selon le pourcentage de mutation des gènes IGHV serait plus relevant qu'une séparation entre muté et non muté (Chauzeix et al., 2018).

4. Expression de ZAP-70

ZAP-70 est une tyrosine kinase cytoplasmique qui appartient à la famille de SYK (spleen tyrosine kinase). Elle est constituée de 619 acides aminés, codée par un gène localisé chez l'homme sur le chromosome 2. Sa structure est composée de deux domaines SH2 (Src Homology 2) N-SH2 et un C-SH2 séparé par une région nommée interdomaine A (I-A), et d'un domaine kinase qui est séparé de C-SH2 par une région interdomaine B (I-B). Ces domaines SH2 permettent à ZAP-70 de reconnaître et de lier les motifs ITAMs phosphorylés. ZAP-70 possède plusieurs sites de phosphorylation sur des résidus tyrosines : 3 sites en I-B (Y2292, Y315 et Y319) et 2 sites en domaine kinase (Y492 et Y493), ces derniers forment la boucle d'activation (Wang et al., 2010). Ces sites servent à la régulation de l'activité de la protéine kinase et à l'interaction avec diverses protéines comme représenté sur la figure-12.

5. Expression de CD38

Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire des Lymphocyte T, NK. Cette glycoprotéine est fortement exprimée au niveau des précurseurs médullaires, des cellules du centre germinatif et des plasmocytes, mais elle est absente chez les lymphocytes B matures. Son rôle dans la moelle est de bloquer la prolifération médullaire des précurseurs lymphoïdes, alors qu'il les maintient en survie dans le centre germinatif. Il est doté d'une activité enzymatique NAD glycohydrolase et joue un rôle important dans les processus apoptotiques. Une forte expression de CD38 dans les cellules leucémiques est associée à un mauvais pronostic, et lié à des stades avancés de la LLC (Rosenquist et al., 2013). L'expression de CD38 dépend du statut IGVH, on trouve un pourcentage de 63,9% de CD38 chez les patients à statut IGVH non muté alors que dans le groupe IGVH muté on ne trouve que 7,3%.

6. Résistance à l'apoptose

La LLC est considérée comme une pathologie due à l'accumulation des LB résistants à la mort cellulaire programmée (apoptose). Cette résistance à l'apoptose est attribuée à l'expression d'une variété de facteurs anormaux de protéines de la famille Bcl2 comprenant des protéines pro et anti-apoptotiques (Schieber and Ma, 2019). Les protéines anti-apoptotiques sont localisées sur la membrane externe de la mitochondrie où elles favorisent la survie cellulaire en régulant négativement l'activité des protéines pro-apoptotiques notamment Bax et Bak. On distingue deux voies majeures de l'apoptose impliquant les protéines caspases (cystéine protéases à spécificité aspartate) qui sont les effecteurs clés de l'exécution de la cascade apoptotique, et qui sont activées par clivage lors du déclenchement de l'apoptose : La voie de mort cellulaire intrinsèque : plusieurs signaux sont impliqués dans son activation y compris les radiations, le stress cellulaire, le retrait du facteur de croissance et les médicaments cytotoxiques. Elle amène à partir de l'espace inter membranaire mitochondrial à la libération de protéines comme le cytochrome C qui va s'associer à une molécule adaptatrice Apaf-1 et une caspase inactive la procaspase 9 qui va s'activer en caspase 9 et déclencher ainsi l'activation de la caspase 3, provoquant des modifications morphologiques et biochimiques spécifiques de l'apoptose. La deuxième voie de mort cellulaire « extrinsèque » : elle est activée par les récepteurs Fas, qui sont des récepteurs de mort sur la surface cellulaire, appartenant à la famille de TNF, possédant un domaine intracytoplasmique, qui permet de déclencher la voie des caspases 8 induisant à l'apoptose (Packham and Stevenson, 2005).

Chapitre II : Biologie de la LLC

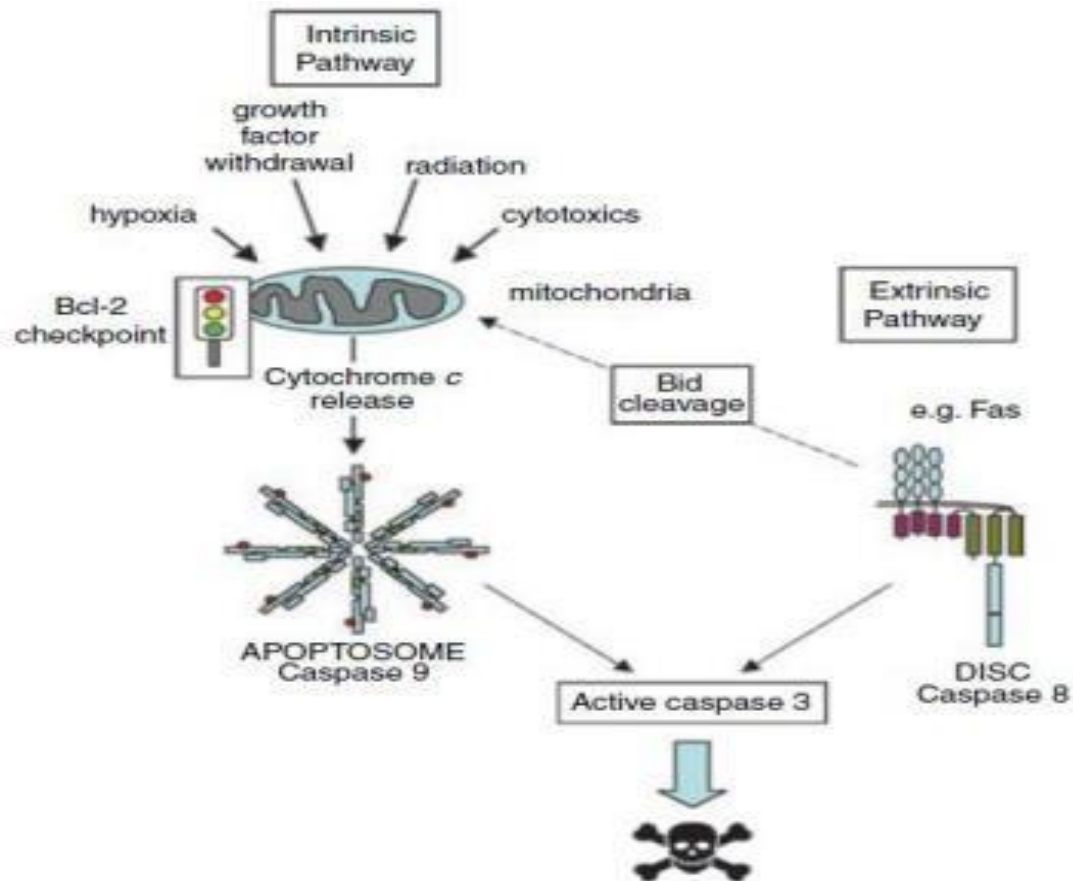


Figure 13 : Représentation schématique des voies de signalisation de l'apoptose. . Les voies d'apoptose « intrinsèque » et « extrinsèque » convergent vers les protéines caspases effectrices, telles que la caspase 3, qui induit les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose. La voie « extrinsèque » est activée par les récepteurs de la mort de surface cellulaire, tels que Fas, et est médiée par l'activation de la caspase initiatrice, la caspase 8, au sein d'un complexe de signalisation induisant la mort (DISC). La voie intrinsèque est activée par une large gamme de stimuli qui déclenchent la libération de cytochrome C par les mitochondries, conduisant à l'activation d'une caspase initiatrice distincte, la caspase 9, au sein de l'apoptosome. Dans certaines situations, l'activation de la caspase 8 peut conduire au clivage de Bid, qui est également capable de favoriser la libération du cytochrome C. Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle clé dans le contrôle de la fonction mitochondriale associée à la voie intrinsèque de la mort cellulaire, empêchant ou favorisant la libération du cytochrome C (Packham and Stevenson, 2005).

6.1. Membres de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille de Bcl-2 jouent un rôle crucial dans le contrôle de l'apoptose par la voie intrinsèque ; elles sont des régulateurs majeurs de l'apoptose qui contrôlent directement la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Flores-Romero et al., 2022). Cette famille comprend des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques et sont classées en trois catégories principales selon leurs structures et leurs fonctions principales. La sous-famille des anti-apoptotiques est définie par la présence de quatre domaines d'homologie (BH1, BH2, BH3 et BH4), et contient les molécules telles que Bcl-2, Bcl-x L ou Mcl-1 (leucémie à cellules myéloïdes 1). De plus, le domaine BH4 est responsable de la liaison stable et recouvre le domaine BH3, ce qui entraîne l'inhibition de l'effet pro-apoptotique des protéines de la famille BCL-2 (Qian et al., 2022). Par contre, les protéines pro-apoptotiques sont divisées en deux sous-familles : les pro-apoptotiques multidomaines comme BAK et BAX et protéines à BH3 only domaine, due à la présence seulement du domaine BH3, et comprend BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK (Perini et al., 2018).

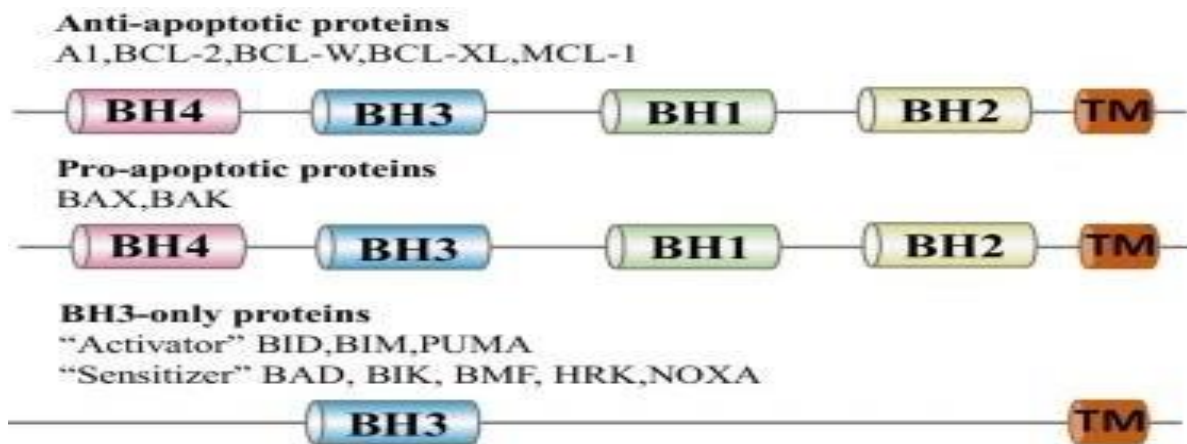


Figure 14 : Représentation illustrant les 3 groupes de protéines de la famille BCL-2. Les protéines anti-apoptotiques et les protéines effectrices pro-apoptotiques contiennent toutes deux les domaines BH 1–4 (BH 1–4). Les protéines BH3 only contiennent uniquement le domaine BH3 (à l'exception de BID, qui contient BH1-4 (Wang et al., 2021).

6.1.1. Protéine anti-apoptotique Bcl-2

Bcl-2 est un oncogène situé sur le chromosome 18q21 et code pour une protéine anti-apoptotique la plus caractéristique de la famille des protéines BCL-2 ; dont la fonction est de maintenir les cellules en vie via l'inhibition de l'apoptose. Cette inhibition est due à la formation d'un hétérodimère avec Bax et permet ainsi la survie cellulaire en régulant la concentration de Ca^{2+} et de l'effet antioxydant. Elle peut induire également l'inhibition des activités des caspases comme les caspases 9, 3,6 et 7. Lorsqu'un signal de stress significatif est induit, par exemple ceux induits par la chimiothérapie ou la radiothérapie, les protéines BH3 seront activées, provoquant l'inactivation de BCL2 et la surexpression de BAX, ce qui permet à l'apoptose de se déclencher (figure 15). Le niveau d'expression de ces protéines est lié à la régulation de l'apoptose : lorsque BAX augmente, l'apoptose cellulaire sera favorisée.

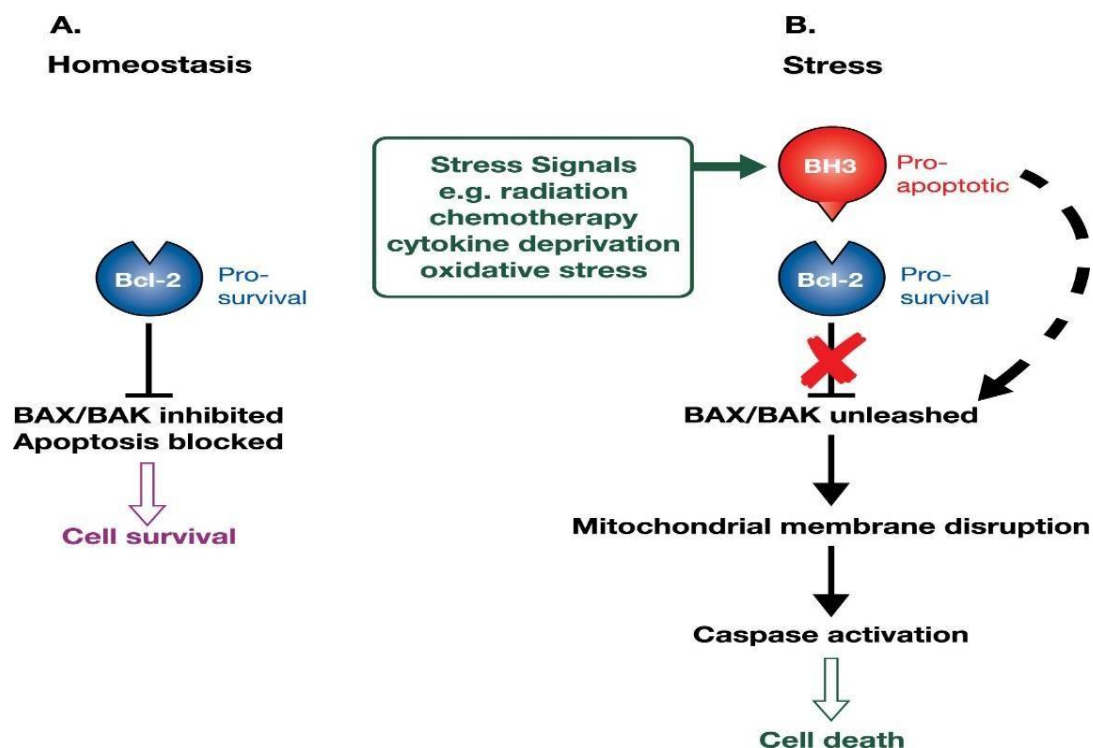


Figure 15 : Schéma représentant le contrôle de l'apoptose par la famille de protéines BCL2 dans les lymphocytes B. (A) Dans les lymphocytes B matures normaux non transformés, la protéine BCL2 maintient la viabilité cellulaire en bloquant l'apoptose. (B) Lorsqu'un signal de stress important est appliqué (par exemple, dommages de l'ADN ou de microtubules, privation de cytokines, stress oxydatif), les protéines BH3 only sont activées. En se liant et en inactivant BCL2 et les protéines pro-survie, ces protéines BH3 only permettent le déclenchement de l'apoptose. Certaines protéines BH3 only peuvent activer directement BAX et/ ou BAK (Anderson et al., 2014).

6.1.2. Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1)

Mcl-1 est une molécule anti-apoptotique appartenant à la famille Bcl-2. Elle est nécessaire à la survie de nombreuses cellules. Cette protéine inhibe la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) et la libération de cytochrome C par les mitochondries. L'expression à des niveaux élevés de MCL-1 ou l'amplification du gène Mcl-1 contribuent à la tumorigénèse et à la résistance aux médicaments anticancéreux, les chimiothérapies conventionnelles et aussi les thérapies ciblées, y compris le vénétoclax, inhibiteur sélectif de Bcl-2. En conséquence, Mcl-1 constitue une cible très prometteuse pour le traitement des tumeurs (Fletcher, 2019), (Wang et al., 2021).

6.1.3. Les micro-ARNs

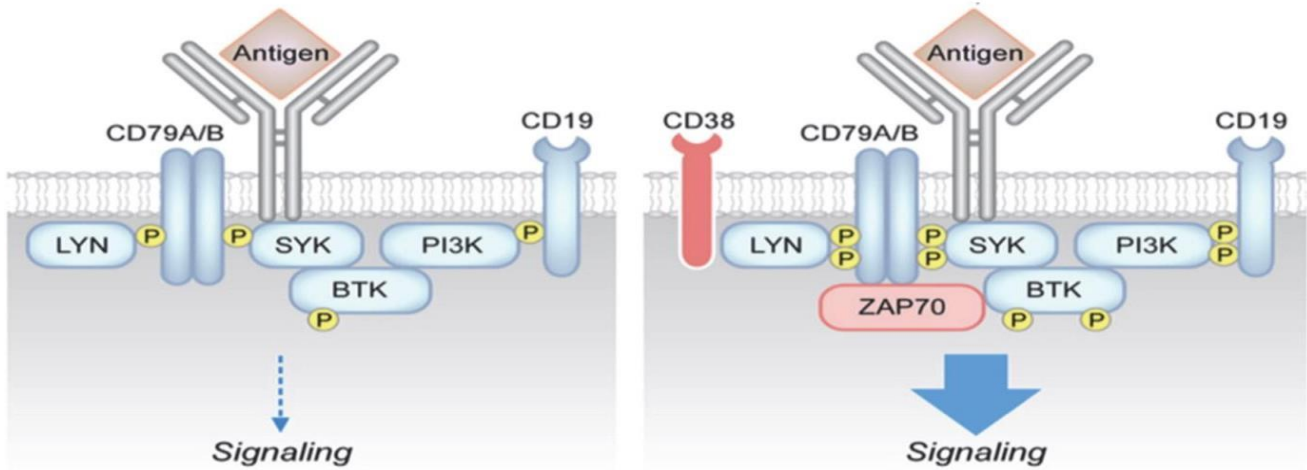
Plusieurs études ont montré l'importance du rôle des micro-ARNs (miRs) dans l'inhibition de l'apoptose. Ils correspondent à des petits ARNs non codants simple brin qui jouent un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes et donc de bloquer la traduction en protéines en interagissant avec leur ARN messager (ARNm).

Différentes découvertes ont révélé que les changements dans les profils d'expression des mi-ARNs ou leur dérégulation contribuent à la survie cellulaire, à la prolifération et au développement de divers cancers humains, ces mi-ARNs peuvent agir comme des suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes.

Un défaut au niveau de l'expression de mi-ARN-15A et mi-ARN-16-1, localisés au niveau du chromosome 13q14 est fortement associé à la LLC-B. Dans la leucémogénèse ces mi-ARN ont un effet sur le gène anti-apoptotiques Bcl2. C'est l'une de leurs cibles directes dans les cellules leucémiques favorisant ainsi la prolifération cellulaire et bloquant l'apoptose (Aqeilan et al., 2010).

6.2. Apoptose chimio-induite

Malgré l'utilisation des taux élevés des substances thérapeutiques, la rechute après chimiothérapie conventionnelle est inévitable, c'est une caractéristique de la LLC. Ce qui en fait un modèle de résistance à l'apoptose chimio-induite. L'un des phénomènes responsables de cette résistance, est l'inactivation de la voie p53 due à la perte du gène suppresseur de tumeur TP53 suite à l'apparition de délétions dans le bras court du chromosome 17 (del 17p) que les patients en rechute acquièrent, ce qui fait que ces patients soient résistants à la plupart des thérapies standards et ne bénéficient pas des schémas thérapeutiques à base de fludarabine et des agents alkylants (Kojima et al., 2012). Les autres malades de LLC sont porteurs d'une



mutation mono-allélique de TP53 incluant une altération au niveau de miR-34a et ATM, ces derniers peuvent aussi être associés à un mauvais pronostic en raison de la chimiorésistance. Egalement la dérégulation des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2 joue un rôle important dans la pathogenèse et la progression du cancer, sa surexpression favorise la résistance à la chimiothérapie. Enfin, il a été démontré que les cellules LLC avec del (17p) étaient moins sensibles à l'apoptose BAX dépendante induite par des inhibiteurs de BCL2 et de BCL-XL que les cellules LLC sans del (17p) (Zenz et al., 2009).

6.3. Régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose

Les cellules LLC sont à l'arrêt en phase précoce G0/G1 du cycle cellulaire ce qui contribue à leur accumulation. Le cycle cellulaire est régulé par des phénomènes de phosphorylation impliquant les kinases, les CDK (cyclin-dependent kinases), et la dérégulation de ces gènes régulateurs contribuent à l'expansion du clone malin. Des études récentes ont montré que la surexpression de l'ARNm de la cycline D2 et la présence de taux élevés de la protéine p27 inhibitrice de la kinase cycline-dépendante (CDK), un régulateur clé de la phase précoce du cycle cellulaire. Ces signaux ont été décrits dans les LLC ce qui les distingue des autres hémopathies lymphoïdes mais qui reste variable d'un patient à un autre. Une augmentation de la protéine p27 est associée à un mauvais pronostic dans la LLC-B, et conduit à la progression de la maladie. Selon le type cellulaire, la progression vers la phase G1 dépend de types de cyclines qui sont en association avec CDK. Exemple la Cycline D3, CDK6 et l'inhibiteur de CDK p27 ont été montrés comme étant les régulateurs les plus importants de la progression en phase G1 dans les lymphocytes B humains après stimulation avec anti-IgM et un nombre de cytokines (Decker et al., 2002).

7. NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription clé dans la LLC, et il a été proposé comme cible thérapeutique. Il est constitué de cinq sous-unités : RelA/p65, RelB, cRel, p50 et p52 {Pires, 2018 #120}. Ces cinq sous-unités de sont localisées dans le cytoplasme, une fois activées,

Chapitre II : Biologie de la LLC

elles se lient aux régions promotrices de l'ADN, modifiant ainsi l'expression des gènes. Dans la LLC, le NF- κ B est activé de manière constitutive et permet l'expression des gènes anti-apoptotique comme TRAF1, BCL2, BCL2L1, IAPs et augmentent la résistance à l'apoptose, ainsi il assure la résistance accrue aux thérapies anticancéreuses. Il médie aussi les phénomènes d'invasion par les métastases. Plusieurs inhibiteurs de NF- κ B ont été testés avec succès sur des cellules LLC dans des études in vitro. Le DHMEQ induit de manière efficace l'apoptose des cellules LLC. Par contre, cet inhibiteur n'a jamais été testé sur des cellules LLC cultivées en présence de leur microenvironnement protecteur (Shimizu et al., 2012).

Chapitre II : Biologie de la LLC

8. Prolifération des cellules LLC

La LLC survient suite à une accumulation de LB bloqués en phase G0/G1 qui présentent des défauts dans l'apoptose. Ces LB sur-expriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2, la protéine p27Kip1 inhibitrice de kinases dépendantes du cycle cellulaire (Lanasa, 2010). Une étude réalisée sur des patients LLC ayant ingérés de l'eau deutérée ($2H_2O$), qui est un isotope stable non radioactif qui marque l'ADN des cellules en division. La mesure du taux de renouvellement des cellules par spectrométrie de masse a révélé que les cellules de LLC sont très dynamiques, le taux de croissance de ces cellules est compris entre 0,1% à plus de 1% du clone par jour, 10^9 à 10^{10} nouvelles cellules leucémiques sont fabriquées chaque jour pour un patient (Messmer et al., 2005). Ces résultats ont été confirmés récemment (Burger et al., 2017). Ces taux de division cellulaire sont suffisants pour permettre l'apparition de nouveaux clones ainsi la progression de la maladie. Les cellules leucémiques en prolifération sont observées dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques (Defoiche et al., 2008), {Hayes, 2010 #47}. La proportion la plus importante est située dans les ganglions lymphatiques (Herndon et al., 2017). Deux populations sont distinguées : les LB-LLC CD38+ qui ont une prolifération beaucoup plus importante que les LB-LLC CD38- (Calissano et al., 2009), LLC CD38+ sont caractérisées par une expression élevée de facteurs de prolifération, comme ZAP-70, Ki67 ou encore la télomérase (Damle et al., 2007).

9. Rôle du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la survie et la prolifération des cellules LLC *in vivo*. Des études *in vitro* ont montré que lorsque les cellules LLC sont mises en monoculture elles subissent spontanément l'apoptose, mais leur co-culture avec des cellules accessoires prolonge leur survie. En effet, *in vivo* les différentes cellules du microenvironnement telles que les MSC (Mesenchymal Stem Cells), les NLC (Nurse Like Cells), les cellules T et NK transmettent des signaux de survie aux cellules LLC notamment via le facteur d'activation des cellules B (BAFF) et du ligand APRIL. L'interaction direct entre le CD31 présent à la surface des cellules NLC et le CD38 présent sur les cellules LLC, ainsi que la coopération des cellules LLC avec les lymphocytes T via l'interaction CD40-CD40L, de même, le facteur WNT produit par les cellules stromales qui interagit avec ROR1 et ROR2, ainsi que les interactions impliquant les molécules d'adhésion : entre VCAM1 des cellules MSC et l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ des cellules LLC. De plus, la chimiokine CXCL12 sécrétée par les cellules stromales NLC favorisent la survie des cellules LLC.

En effet, la migration des cellules LLC dans les tissus lymphoïdes est principalement médiée

Chapitre II : Biologie de la LLC

par CXCL12 et son récepteur CXCR4, dans les ganglions lymphatiques se produit également via le récepteur CC-chimiokine 7 (CCR7) en réponse aux ligands CCL19 et CCL21, qui sont produits par les cellules endothéliales des HEV (High Endothelial Venules). Suite à l'activation du BCR, les cellules stromales induisent une augmentation de l'expression des marqueurs agressifs de la maladie tels que ZAP70 et CD38 et une down-régulation de l'expression du CXCR4 et du CD62L sur la surface des cellules tumorales conduisant à la diminution de la migration ganglionnaire et de l'adhésion aux cellules endothéliales lymphatiques (Ten Hacken and Burger, 2016).

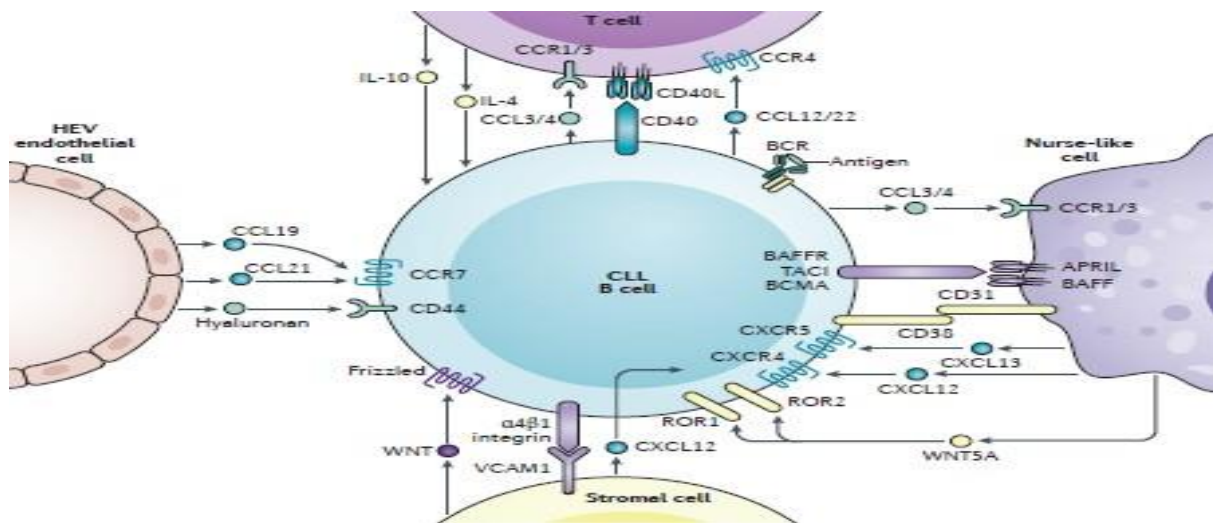


Figure 16 : Schéma représentant le microenvironnement de la LLC (Kipps et al., 2017).

La migration des cellules LLC dans le tissu lymphoïde est médiée par le récepteur CXCR4 en réponse au ligand CXCL12 qui est sécrété principalement par les cellules de type nourrice (NLC) et mésenchymateuses cellulaires stromales dérivées. La migration des cellules LLC dans les ganglions lymphatiques se produit également via le récepteur CCR7 en réponse au ligand CCL19 et CCL21, qui sont produits par les cellules endothéliales de hautes veinules endothéliales (HEV). Les cellules endothéliales du HEV expriment également l'Hyaluronane, qui peut interagir avec le CD44, pour faciliter la signalisation des LB et pourrait améliorer la production de métalloprotéinase matricielle active 9 (MMP9). Une fois dans les tissus, plusieurs chimiokines favorisent la survie des LB, notamment CXCL12, facteur d'activation des lymphocytes B. BAFF et un ligand induisant la prolifération : APRIL. De plus, la survie des cellules LLC peut être favorisée par des interactions entre CD31 et CD38, et la production par les cellules stromales de facteurs WNT, qui peuvent interagir avec ROR1, ROR2. Le contact des cellules LLC avec les cellules stromales mésenchymateuses peut également être établi par la protéine d'adhésion VCAM1 et l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ qui contribuent à la survie des cellules LLC. À leur tour, les cellules LLC peuvent sécréter des chimiokines telles que CCL3 et CCL4, qui peuvent recruter des cellules T et les cellules précurseurs de la NLC (monocytes) au microenvironnement de la LLC. Les

Chapitre II : Biologie de la LLC

lymphocytes T activés peuvent fournir aux cellules LLC des signaux prolifératifs par le biais des interactions ligand CD40 (CD40L)- CD40 et de la sécrétion de plusieurs cytokines, telles que l'IL-2, l'IL-4 et l'IL -10. À leur tour, les cellules LLC activées sécrètent CCL12 et CCL22, qui attirent davantage de cellules T dans le microenvironnement de la LLC. Dans les tissus, les cellules LLC peuvent être exposées à des antigènes environnementaux et/ ou du soi susceptible de déclencher l'activation des lymphocytes B par le biais d'interactions avec l'immunoglobuline de surface. Cela pourrait amplifier la réactivité des cellules CLL aux signaux et facteurs fournis par le microenvironnement. BAFFR, récepteur BAFF (également connu sous le nom de TNFRSF13C); BCMA, protéine de maturation des cellules B (également connu sous le nom de TNFRSF17); BCR, récepteur des cellules B. TACI, activateur transmembranaire et interacteur CAML (également connu sous le nom de TNFRSF13B) (Kipps et al., 2017).

L'implication du complexe protéique hypoxia-inductible factor 1 (HIF-1 α) dans la modulation des interactions des cellules de LLC avec le microenvironnement a été mise en évidence récemment. En effet, HIF-1 α permet la détection de la disponibilité en oxygène et ainsi une adaptation de la réponse cellulaire lors d'une hypoxie, il induit aussi une régulation à la hausse de l'augmentation de l'expression des récepteurs aux chimiokines, tels que CXCR4, et des molécules d'adhésion cellulaire qui contrôlent l'interaction des cellules leucémiques avec la moelle osseuse et les microenvironnements lymphoïdes. Le contact des cellules de LLC avec les cellules stromales induit l'expression du facteur HIF-1 α via l'induction de la signalisation de la PI3K et de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), est aussi due à une réduction du produit du gène von Hippel-Lindau (pVHL), qui est responsable de la dégradation de HIF-1 α . Ce dernier est associé à un comportement agressif des cellules cancéreuses.

10. Anomalies génétiques observées au cours de la LLC

10.1. Anomalies chromosomiques

Différentes anomalies chromosomiques ont été observées au cours de l'évolution de la pathologie LLC, ces anomalies sont situées au niveau des régions chromosomiques 13q, 11p, 12q, 17p, 6q et la trisomie 12. Ces anomalies peuvent être mises en évidence par la technique d'hybridation *in-situ* en fluorescence (FISH) dans 82% des cas de LLC. Plus récemment, l'utilisation d'agents mitogènes spécifiques des lymphocytes B (Interleukine-2 et Oligonucléotides CpG) a permis d'obtenir un caryotype analysable dans plus de 90% des cas, et des anomalies clonales dans 53% à 83% des cas (Haferlach et al., 2007), (Put et al., 2009) ;

Chapitre II : Biologie de la LLC

actuellement, ces 2 agents sont utilisés en combinés afin de mettre en évidence les anomalies chromosomiques. Enfin, on a la technique d'hybridation sur puce à ADN qui peut compléter de façon intéressante avec une approche de génomique comparative.

10.1.1. délétion 13q14

La délétion du bras long du chromosome 13 est une anomalie génétique mise en évidence chez 55 à 60% des patients, de façon mono-allélique ou bi-allélique. La MDR (Minimal Deleted Region) est une région localisée en 13q14 qui abrite le site de deux micro-ARN : les miR-15a et miR-16-1 qui sont localisés au sein de l'intron 4 du gène *DLEU2*. Ils sont des inhibiteurs de *Bcl-2* et *mcl-1* qui sont deux protéines anti-apoptotiques, ainsi que du gène *CCND1* qui code pour la cycline D1, impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. La délétion ou la diminution de l'expression de ces deux micro-ARNs favorise la survie des cellules tumorales de la LLC. La délétion 13q n'est pas la seule qui assure la diminution du niveau d'expression de ces micro-ARN, étant donné que même la p53 peut provoquer aussi une diminution d'expression des deux micro-ARNs. La taille de la délétion 13q est variable. Les délétions de plus grande taille peuvent induire la perte du gène suppresseur de tumeur *RBI*. Ce gène joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Récemment, à l'aide des analyses de biopuces SNP- array, des chercheurs ont pu définir 2 sous-groupes de délétions 13q : Le type I excluant le gène *RBI* chez 30% des patients et des délétions de type II incluant le gène *RBI* chez 20% de l'ensemble des patients (Ouillette et al., 2008).

Chapitre II : Biologie de la LLC

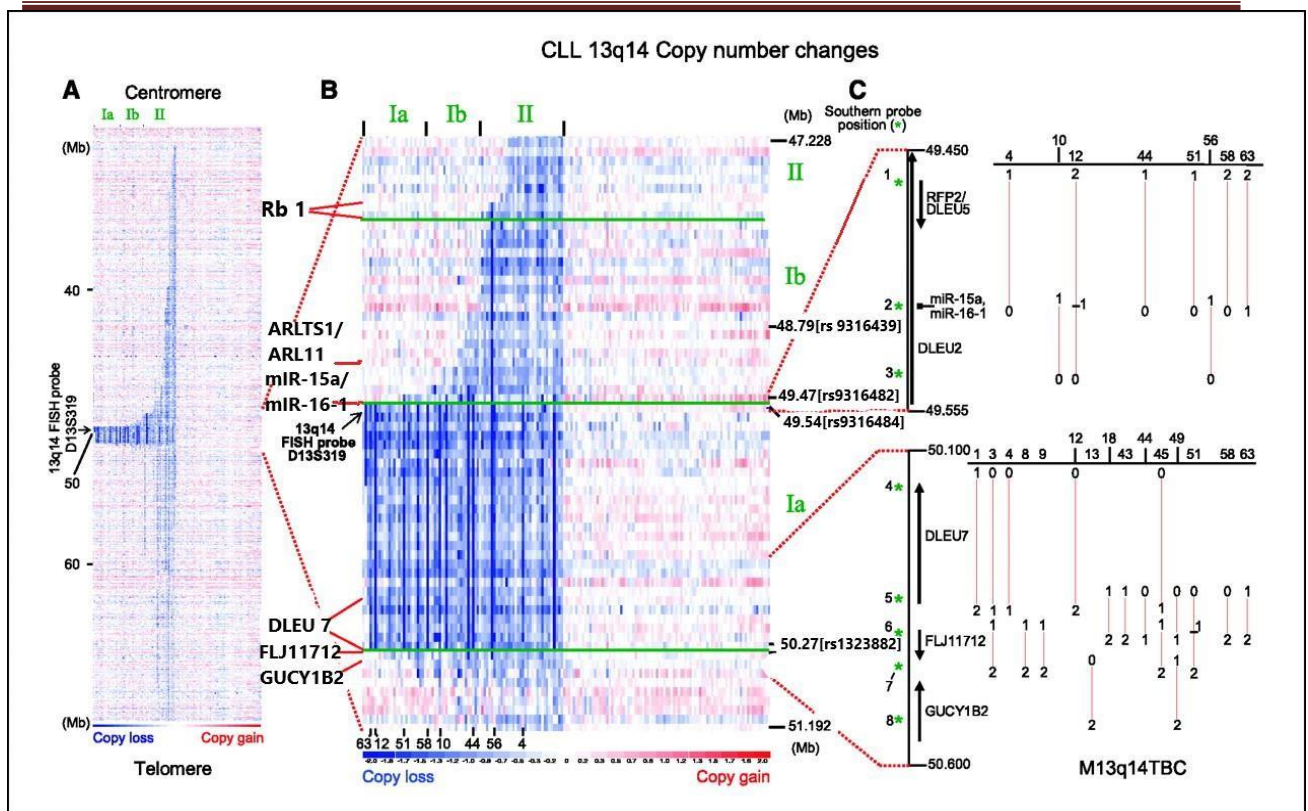


Figure 17 : Représentation de l'analyse haute résolution de la dél13q14 et caractérisation des sous-types de la LLC. Les estimations du nombre de copies pour toutes les positions du chromosome 13 étaient générées par dChipSNP comme décrit et affiché sur toute la longueur des chromosomes. Les pertes de copies sont affichées avec des couleurs bleues, les gains de copie avec des couleurs rouges. A Carte thermique des estimations du nombre de copies pour tous les patients pour une sous-région du chromosome 13 couvrant 13q14.3. L'emplacement de la sonde FISH couramment utilisé couvrant le marqueur génomique D13S319 à la position physique de 49,6 Mb est indiqué par une flèche. B, Cartes thermiques des estimations du nombre de copies pour tous les patients pour une sous-région du chromosome 13 couvrant 13q14.3 entre les positions physiques 47,228 et 51,192 Mb. Les positions approximatives des gènes sont indiquées à gauche. Les sous-catégories proposées de délétions 13q14.3 sont indiquées par des chiffres romains (types Ia, Ib et II). C : cartographie des points d'arrêt pour les délétions 13q14 de type I en utilisant la technique de Southern blot. Les emplacements des gènes et l'orientation de la transcription sont indiqués par les flèches noires verticales et noms de gènes adjacents. Astérisques verts, emplacement des sondes utilisées pour l'analyse Southern blot. Les cas individuels de LLC sont indiqués par des chiffres noirs au-dessus des lignes horizontales. Lignes verticales rouges, région dans laquelle une rupture se produit, avec des nombres à chaque extrémité indiquant l'estimation du nombre de copies. Lignes rouges pointillées reliant à B, position approximative des pauses par rapport à la vue d'ensemble 13q14.3 (Ouillette et al., 2008).

Chapitre II : Biologie de la LLC

10.1.2. Délétion 11q

La délétion 11q est une délétion mono-allélique du bras long du chromosome 11 est mise en évidence chez 6 à 27% des patients atteints de LLC. La région minimale de délétion pour cette anomalie a été localisée en 11q22.3-q23.1, cette région comporte le gène suppresseur de tumeur ATM (Ataxia Telangiectasia-Mutated) qui est généralement ciblé par des mutations dans 12% des cas de LLC, et associé à la del (11q) chez environ 30% des cas. L'ATM code pour une kinase jouant un rôle dans la signalisation liée à la réparation des dommages de l'ADN. Sa délétion ou mutation confère aux cellules une résistance à l'apoptose. Également la del (11q) est associée à des mutations du gène SF3B1 qui est un facteur d'épissage des ARNm développé dans la partie VI. Cette altération favorise l'introduction d'erreurs dans l'épissage des transcrits d'ARNm (Wang et al., 2011). La délétion 11q peut aussi inclure la perte de BIRC3, régulateur négatif de la voie NF- κ B (Rose-Zerilli et al., 2014). Sur le plan clinique, la del (11q) constitue un facteur de mauvais pronostic.

10.1.3. Délétion 17p

La délétion du bras court du chromosome 17 est l'anomalie associée au plus mauvais pronostic dans la LLC. Elle est retrouvée chez environ 4 à 9% des patients. La Del 17 p présente des tailles variables, allant de la totalité du bras court jusqu'à la perte d'une région minimale comme la région 17p13 qui contient le gène suppresseur de tumeur TP53. Dans la plupart des cas, des mutations inactivatrices sont détectées sur la copie restante du gène TP53 entraînant alors une perte de la fonction de la protéine p53, qui est un facteur régulateur du cycle cellulaire et de l'apoptose via des dommages de l'ADN. La perte de la fonction de p53 rend les cellules plus résistantes aux traitements classiques. En effet, la chimiothérapie induit une mort dépendante de p53. Les patients avec une p53 non-fonctionnelle seront réfractaires à la chimiothérapie (Dicker et al., 2009) (Rossi et al., 2009).

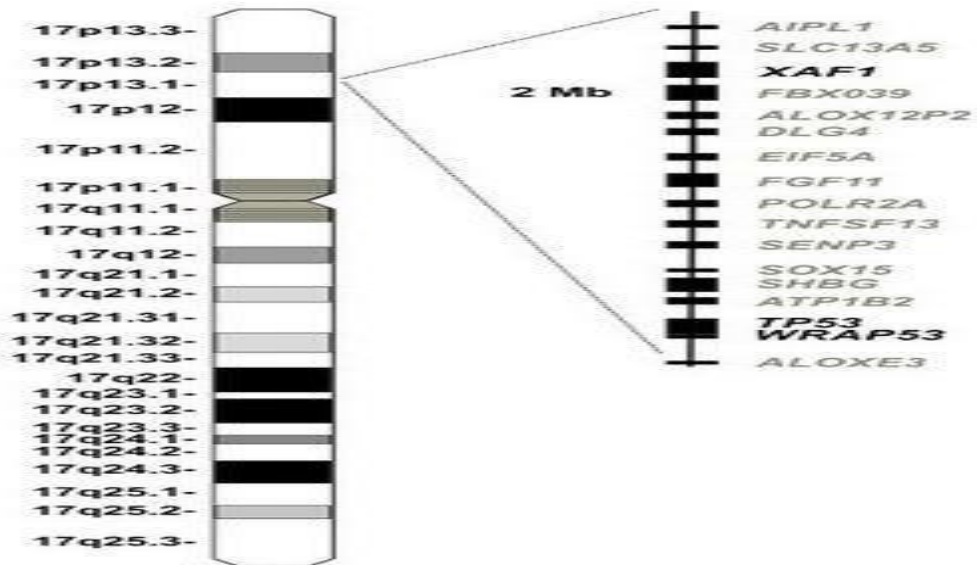


Figure 18 : Schématisation du chromosome 17 humain. . La bande chromosomique 17p13.1 code pour AIPL1, SLC13A5, XAF1, FBX039, ALOX12P2, DLG4, EIF5A, FGF11, POLR2A, TNFSF13, SENP3, SOX15, SHBG, ATP1B2, TP53 et ALOXE3. Les gènes XAF1 et TP53 se trouvent à une distance d'environ 2 Mbases (Pinto et al., 2020).

10.1.4. Le gain 2p

Elle est une anomalie qui correspond au gain d'une région ou de tout le bras court du chromosome 2. Elle est détectée chez 28% des cas de LLC (Chapiro et al., 2010). Cette anomalie entraîne une dérégulation des gènes présents dans cette région notamment REL (2p16.1), ACP1 (2p25.3), XPO1 (2p15) et les oncogènes NCOA1 (2p23.3), ROCK2 (2p25.1), ALK (2p22.3) et MYCN (2p24.3) (Cosson et al., 2017). Le gène REL code pour des protéines activatrices de la voie NF-KB et qui agit en tant que facteur de transcription régulant l'expression des gènes intervenant dans la survie cellulaire, l'apoptose, ainsi que dans la maturation et la prolifération des lymphocytes B. L'ACP1 (Acid Phosphatase 1) est impliqué dans la signalisation des lymphocytes T (LT), XPO1 (l'exportin-1) est impliquée dans la régulation de la voie des MAPKs et régule les facteurs de transcription NFAT et AP-1 (Activating Protein 1). ROCK2 (Rho-associated protein kinase 2) et NCOA1 (Nuclear Receptor Coactivator 1) sont impliquées dans l'activation des voies de signalisation, respectivement de la voie des MAPKs et les facteurs de transcriptions STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) et STAT5. ALK (Anaplastic lymphoma kinase) joue un rôle dans la signalisation par les récepteurs à activité tyrosine kinase, tandis que Myc-N est un facteur de transcription surexprimé dans de nombreux cancers. A l'heure actuelle, le gain 2p est une anomalie peu caractérisée. La valeur pronostique de cette anomalie n'est pas complètement définie.

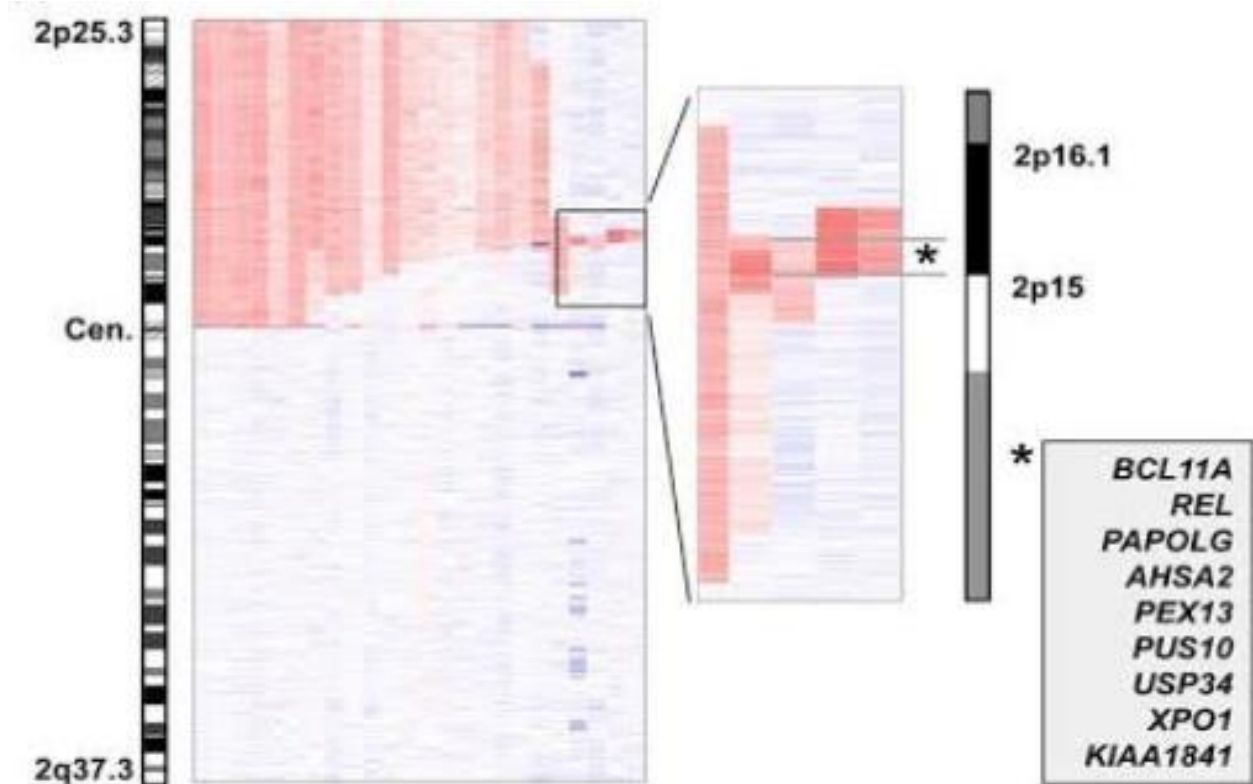


Figure 19 : Représentation schématique illustrant le gain 2p. . Le chromosome 2 est formé de deux bras court p et long q et un centromère. La région minimale dans la bande 2p16.1 a une taille de 1.909 Mb et abrite 9 gènes BCL11A, REL, PAPOLG, AHSA2, PEX13, PUS10, USP34, XPO1, KIAA1841 (Edelmann et al., 2012).

10.1.5. La trisomie 12

Elle correspond à une anomalie cytogénétique observée dans les cas de LLC, elle est détectée chez 10 à 20% des patients et associée à un pronostic intermédiaire avec une médiane de survie de 114 mois (Nguyen-Khac et al., 2011). L'étude des cas de trisomie 12 partielle par FISH a permis de restreindre la « région minimale de duplication » au segment 12q13q22 (Dierlamm et al., 1997). Cette région contient un grand nombre de gènes candidats pouvant expliquer les particularités phénotypiques (MDM2, CDK2, CDK4, GLI1, HMGA2...). Néanmoins, cette anomalie reste mal connue à l'heure actuelle.

Chapitre II : Biologie de la LLC

10.1.6. Autres anomalies chromosomiques

Certains cas de LLC peuvent présenter des anomalies moins fréquentes comme :

10.1.6.1. Anomalies déséquilibrées

Grâce à l'utilisation de la technique de génomique comparative par hybridation sur puce à ADN, d'autres anomalies ont été rapportées qui sont moins fréquentes. On trouve la délétion 6q chez 4,5% à 6% des cas, la trisomie 19 dans 1,7% à 4,7% des patients, les gains des régions 2p, 8q24, 3q26 et 20q13, la délétion 14q, ces déséquilibres étant considérés comme défavorables (Rodriguez et al., 2012) ; (Mian et al., 2013).

10.1.6.2. Translocations réciproques

Les translocations réciproques ne sont pas rares, on les trouve chez 20% à 34% des patients (Haferlach et al., 2007) ; (Put et al., 2009). Dans 5 à 7% des cas, elle implique les gènes des immunoglobulines IGH, IGK ou IGL. Ainsi que d'autres gènes, les plus fréquents étant BCL2, BCL3, BCL11A et CDK6. La présence de translocations chromosomiques impliquant ou non les gènes des Immunoglobulines est un facteur de pronostic péjoratif (Mayr et al., 2006) ; (Put et al., 2009) ; (Nguyen-Khac et al., 2011), la translocation rare 14;18 IGH-BCL2 est associée à une évolution favorable (2% des LLC), la translocation 14;19 IGH-BCL3 et les translocations impliquant MYC (8q24) sont associées à un pronostic particulièrement défavorable (Put et al., 2012).

10.1.6.3. Le caryotype complexe

Il est diagnostiqué lorsqu'un caryotype possède 3 anomalies cytogénétiques ou plus. Ces anomalies sont estimées par étude cytogénétique. On les trouve chez 16% des patients atteints de LLC. Le caryotype complexe est souvent associé avec des facteurs de mauvais pronostics CD38, IGHV non-muté, délétions 11q et 17p (Haferlach et al., 2007) ; (Jaglowski et al., 2012), et est donc de mauvais pronostic, avec une diminution de la survie sans progression tumorale et de la survie globale (Van Den Neste et al., 2007) ; (Woyach et al., 2012). C'est également la seule anomalie cytogénétique qui prédit une résistance aux traitements à l'Ibrutinib (Thompson et al., 2015).

Chapitre II : Biologie de la LLC

Tableau VII : Résumé des anomalies cytogénétiques fréquentes dans les cas de LLC et leurs effets biologiques et pronostiques associés. Extrait de (Ghamlouch et al., 2017).

Anomalies	Fréquence (%)	Gènes associés	Processus cellulaires affecté	Pronostique
del13q14	50	MIR15 A et MIR16-1, DLEU2, RB1, DLEU7	Régulation de l'expression de Bcl-2, contrôle du cycle cellulaire, signalisation NF-kB	Bon
Trisomie 12	20	Inconnu	Inconnu	Bon/Intermédiaire
del11q22-23	6-20	ATM, BIRC3	Réparation de l'ADN, signalisation NF-kB	Mauvais
del 17p13	5-10	TP53	Perte d'un suppresseur de Tumeurs	Mauvais
del 6q21	5-7	ZNF292	Régulation transcriptionnelle	Inconnu
Gain 2p	5-28	XPO1, REL, MYC N BCL11A,	Mécanismes d'épissage de l'ARN, signalisation NF-kB, prolifération	Mauvais
Amp8q24.21	5	MYC	Prolifération, apoptose	Mauvais
del 8p	5	TRAIL-R	Apoptose	Mauvais
del15q15.1	4	MGA	Régulation transcriptionnelle	Aucun
del 2q37	2	SP140/SP110	Régulation transcriptionnelle	Aucun
del3p21	2	SMARCC1/S ETD2	Épissage de l'ARN et réparation de l'ADN	Mauvais
del10q24	2	NFKB2	Signalisation NF-kB	Inconnu

10.2. Les mutations somatiques

Le développement des approches de séquençage à haut-débit de génome (Next Generation Sequencing) a permis d'élargir les connaissances sur l'hétérogénéité génomique des cas de LLC et de caractériser le paysage mutationnel de la maladie. Des études de séquençage haut-débit de l'exome ou du génome entier de patients ont identifié un nombre élevé d'anomalies génétiques, ce qui a fourni de nouvelles hypothèses sur les mécanismes de développement et de progression de la LLC ainsi que de l'apparition de résistances aux

Chapitre II : Biologie de la LLC

traitements. Les mutations récurrentes touchent des gènes impliqués dans les voies cellulaires comme représenté sur la figure ci-dessous :

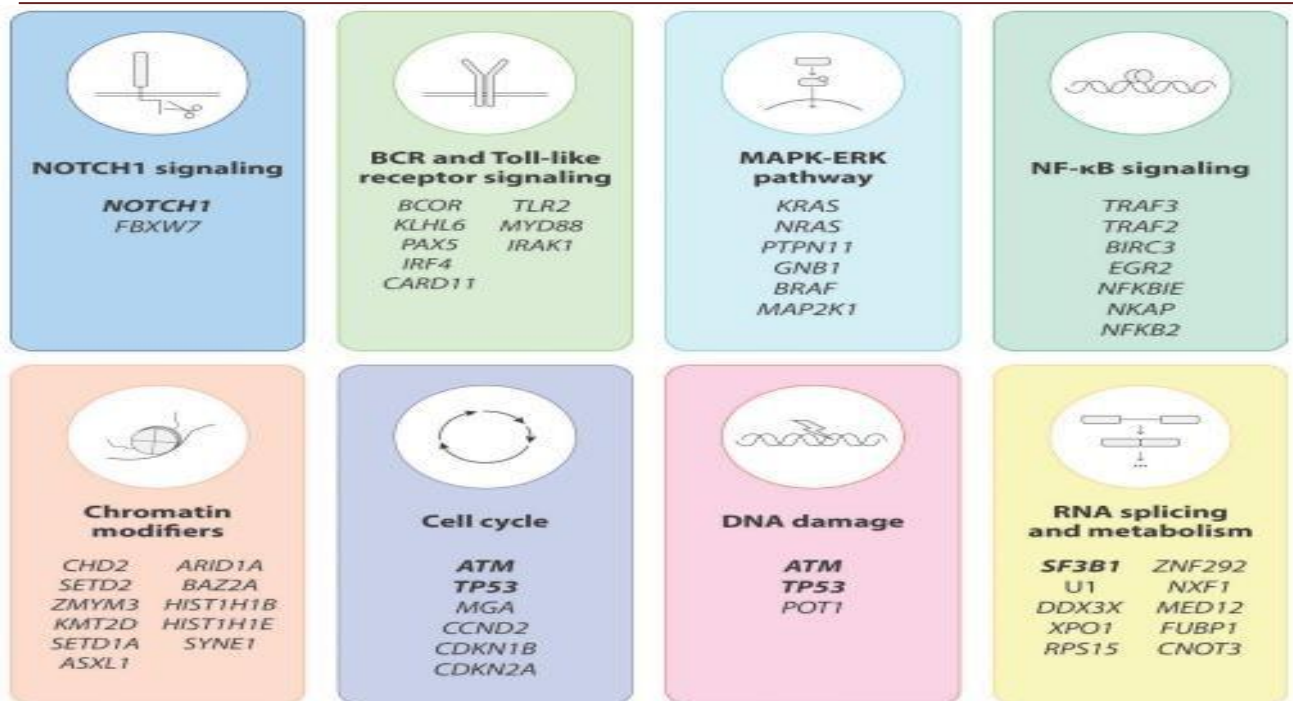


Figure 20 : Représentation des principaux gènes et voies mutées de manière récurrente dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC).. Les principales voies moléculaires affectées par les mutations dans la leucémie lymphoïde chronique sont représentées. Les gènes mutés à des fréquences plus élevées (5 %) chez les patients nouvellement diagnostiqués sont mis en évidence en gras (Delgado et al., 2020).

10.2.1. Mutation de TP53

Le gène *TP53* est situé au niveau de la région 17p13.1. Il code pour la protéine p53 qui induit l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose des cellules qui contiennent des dommages au niveau de l'ADN (gène suppresseur de tumeur). Si le gène *TP53* est altéré soit par la délétion 17p13 ou par des mutations de ce gène, les cellules présentant des dommages au niveau d'ADN peuvent tout de même poursuivre leur cycle cellulaire et échapper à l'apoptose ce qui favorise l'apparition de tumeurs.

10.2.1.1. Inactivation de p53 au cours de la LLC

Il existe plusieurs modes d'inactivation des fonctions suppressives de p53 qui surviennent au niveau de l'ADN (Put et al., 2009), de l'ARNm ou de la protéine :

1. Au niveau génique

La majorité des mutations introduites dans *TP53* sont ponctuelles situées au niveau du domaine de liaison à l'ADN ; ce sont fréquemment des mutations faux-sens, moins souvent des insertions-délétions, des mutations non-sens ou des mutations sur les sites d'épissage (Petitjean et al., 2007) ; (Zenz et al., 2010). Les positions 175, 179, 209, 248, 273 sont plus

Chapitre II : Biologie de la LLC

fréquemment touchées, la localisation des mutations est hautement variable. L'IARC a estimé l'équivalent de 188 mutations différentes dans la LLC. Ces mutations entraînent la plupart du temps une perte de fonction totale ou partielle de la p 53 (Petitjean et al., 2007).

2. Au niveau transcriptionnel

L'épissage alternatif favorisé par des mutations des sites d'épissage, peut induire une activité transcriptionnelle sélective de p53, ou le contraire, qui est la perte de l'activité transcriptionnelle. Certains micro ARN (-25, -30d, -92a, -125b, 504, -1285, -141, -15 et -16) peuvent également interférer au niveau post-transcriptionnel et diminuer la traduction de p53.

3. Au niveau protéique

Une interaction inhibitrice avec une autre protéine ou une séquestration cytoplasmique peuvent empêcher l'activité transcriptionnelle et induire une inactivation fonctionnelle de p53. Au cours de la LLC l'inactivation d'ATM est fréquente et peut provoquer une diminution de l'activation de p53. Enfin, la présence de SNP (Single Nucleotide polymorphism) au niveau du codon 72 de *TP53* (Arg/Pro) et au niveau du codon 31 de *P21* (Ser/Arg) pourrait affecter la fonction de *TP53* et avoir une influence sur l'évolution clinique au cours de la LLC (Johnson et al., 2009).

10.2.1.2. Conséquences cliniques des mutations *TP53* au cours de la LLC

Des mutations de *TP53* sont présentes chez 4 à 37% des patients atteints de LLC. Leur présence avec ou sans délétion 17p est associée à la résistance au traitement comme les analogues de purines, la fludarabine, les agents alkylants et les irradiations γ . Les résultats de l'essai d'une équipe allemande démontrent que l'allogreffe non-myéloablative est une option thérapeutique permettant le contrôle à long terme de la maladie même en cas de mutation *TP53* (Dreger et al., 2013). La P53 inactivée induit l'accumulation de multiples aberrations génomiques, 2,4 anomalies en cas de mutation *TP53* versus 1,3 anomalies en l'absence de mutations *TP53* (Zenz et al., 2008), ce qui explique le pronostic très péjoratif des patients *TP53*^{mut} au cours de la LLC.

10.2.2. Mutations de NOTCH1

NOTCH1 est un oncogène caractérisé dans la leucémie lymphoblastique aigue à cellules T (LAL-T). C'est un gène situé au niveau de la région 9q34 codant à un récepteur transmembranaire de classe I ; qui lors de la liaison à son ligand Jagged-1 et Jagged-2 exprimés à la surface des cellules voisines ; déclenche le clivage des domaines extracellulaires

Chapitre II : Biologie de la LLC

du récepteur par la métalloprotéase, l'enzyme de conversion du facteur de nécrose tumorale (TACE) et la γ -sécrétase, ce qui entraîne une protéolyse dans la région transmembranaire du récepteur, générant le domaine intracellulaire nucléaire actif sur le plan transcriptionnel de NOTCH1 (ICN1), qui transactive un nombre de gènes impliqués dans la régulation, la différenciation, la prolifération, l'apoptose, et l'activation du proto-oncogène MYC. Les mutations du gène NOTCH1 sont récurrentes dans LLC-B à une fréquence de 5 % à 12 % au moment du diagnostic. Elles permettent de supprimer le domaine PEST de la protéine NOTCH1, empêchant ainsi la dégradation protéasomique d'ICN1. Principalement ces mutations se trouvent chez les patients atteints de LLC à IGHV non muté de profil plus agressif et souvent sont corrélées à la trisomie12. Cette fréquence augmente avec la progression de la maladie atteignant les 31 %. Bien que les mutations NOTCH1 ne semblent pas être responsables de la LLC, elles sont associées à de mauvais pronostic et à une progression accélérée de la maladie avec des résistances à la chimiothérapie {Bosch (Bosch and Dalla-Favera, 2019), (Tardivon et al., 2021)}.

10.2.3. Mutation de SF3B1

Le gène SF3B1 est situé sur le bras long du chromosome 2 (2q33.1), c'est l'une des mutations les plus fréquentes parmi les mutations des splicosomes, et code pour la sous-unité du complexe protéique du facteur d'épissage 3b impliquée dans la formation de petites ribonucléoprotéines U2 nécessaires aux mécanismes d'épissage des ARN messagers et de l'assemblage du splicosomes. Des mutations de SF3B1 sont observées chez les patients de la LLC à une prévalence de 10 à 15% et sont en relation avec des délétions 11q22 et des mutations d'ATM. Ces mutations sont associées à un mauvais diagnostic, avec résistance au traitement par la fludarabine. Les mutations SF3B1 pourraient être induites chez les patients précédemment traités par la chimiothérapie moins que chez les sujets non traités (Cilloni et al., 2022).

10.2.4. Mutation d'ATM

L'ataxie-télangiectasie mutée (Herndon et al.) est une protéine sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose ; son gène codant est situé sur le chromosome 11q22-q23. L'ATM est le gène responsable de la maladie l'ataxie télangiectasie, dans laquelle l'inactivation biallélique du gène induit plusieurs symptômes, notamment l'ataxie, la télangiectasie, la radiosensibilité, la résistance à l'insuline, et l'immunodéficience (Ahmed et al., 2016). Dans la LLC, la

Chapitre II : Biologie de la LLC

fréquence des mutations d'ATM est d'environ de 10% ; elles sont souvent associées aux IGHV non-muté et à l'expression de ZAP-70, et sont de mauvais pronostic notamment lorsque les mutations sur ATM sont associées à la délétion 11q (Rossi and Gaidano, 2012).

10.2.5. Mutation BIRC3

Le gène BIRC3 Baculoviral IAP Repeat Containing 3, également appelé cIAP2 cellular Inhibitor of Apoptosis. BIRC3 est situé sur le chromosome 11 au voisinage d'ATM. Les délétions 11q incluent le locus BIRC3 dans environ 80% des cas. La mutation ou la délétion de BIRC3 a été rapportée dans environ 3 à 7 % des cas de LLC. BIRC3 est un régulateur négatif de la signalisation NF- κ B par induction de dégradation protéasomique de MAP3K14, principal moteur de l'activation non canonique de ce facteur nucléaire NF- κ B, et l'inactivation de BIRC3 passant par la voie NF- κ B a des conséquences sur les cellules tumorales puisqu'il induit leur prolifération et la survie de ces cellules.

Les altérations du gène BIRC3 sont également associées à un mauvais pronostic, avec une augmentation de la résistance aux chimiothérapies à base de fludarabine et la diminution de la survie globale. Les délétions et les mutations de BIRC3 sont reconnues comme des événements rares quoiqu'elles sont défavorables pour les patients atteints de LLC (Frazzi, 2021), (Tausch and Stilgenbauer, 2020).

10.2.6. Mutation MYD88

Le gène MYD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88) est localisé sur le chromosome 3p22.2 ; et code pour une protéine nécessaire à la transmission du signal par les récepteurs TLR (Toll-Like receptors). La mutation la plus courante de MYD88 est le changement d'un résidu leucine par une proline en position 265 (L265P) provoquant des effets fonctionnels tels que l'activation accrue de NF- κ B, augmentation de la signalisation JAK-STAT3 et la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6, et IFN- β , ainsi qu'une meilleure survie des cellules de lymphome.

Dans la LLC, les mutations de MyD88 surviennent à une fréquence variable de 1,5 % à 10 % et souvent retrouvées chez les patients avec des IGHV mutés et des délétions du chromosome 13q associées à une maladie à faible risque (Putowski and Giannopoulos, 2021).

10.2.7. Autres Mutations

10.2.7.1. Mutation XPO1

Exportin-1 nucléaire (XPO1) ; également connu sous le nom de Chromosome Region

Chapitre II : Biologie de la LLC

Maintenance 1(CRM1) est un gène situé sur le chromosome 2p15, il s'agit d'une caryophérine qui régule le trafic entre le cytosol et le noyau de plusieurs protéines. Les mutations XPO1 sont observées sous forme de mutations ponctuelles sur un résidu situé dans le sillon de liaison des signaux d'export nucléaire NES (le plus souvent E571K ou E571G). Ces mutations récurrentes ont été rapportées dans d'environ 5% des cas de LLC et entre 25 et 35% des cas de LLC évoluant vers le syndrome de Richter. La surexpression de XPO1 peut causer un mécanisme leucémogène critique chez les patients ayant la LLC avec gain du bras court du chromosome 2 (Jain et al., 2016) ; (Walker et al., 2021).

10.2.7.2. Mutation KLHL6

Le gène KLHL6 code pour la protéine « Kelch-Like Family Member 6 » et se trouve sur le locus 3q27.3. La première caractérisation des mutations de KLHL6 dans la LLC provient du séquençage du génome entier et de l'exome d'un patient atteint de LLC, révélant que les mutations de KLHL6 associées au cancer sont localisées sur le domaine Bric-a-Brac/Tramtrack/Broad (BTB). La fréquence de cette mutation est faible dans la LLC et coexiste avec les mutations IGHV, elles sont associées à un profil de bon pronostic comme les mutations de MYD88 (Choi et al., 2019).

10.2.7.3. Mutation FBXW7

Le domaine de répétition F-box et WD contenant 7 (FBXW7), également connu sous le nom de Sel10 est un membre de la famille des protéines F-box, qui est une E3 ubiquitine ligase. FBXW7, est un suppresseur de tumeur critique et l'une des protéines du système ubiquitine-protéasome les plus couramment dérégulées dans le cancer humain. Le gène FBXW7 est situé sur le chromosome 4q32, il contrôle la dégradation médiée par le protéasome des oncoprotéines telles que la cycline E, MYC, Mcl-1 et NOTCH. Des mutations de ces gènes ont été retrouvées à très faible fréquence dans la LLC, elles sont aussi présentes dans les LAL-T. De nombreuses sources de données indiquent que le statut génétique de FBXW7 est lié à la résistance à la chimiothérapie des cellules cancéreuses (Yeh et al., 2018) ; (Yumimoto and Nakayama, 2020).

Chapitre II : Biologie de la LLC

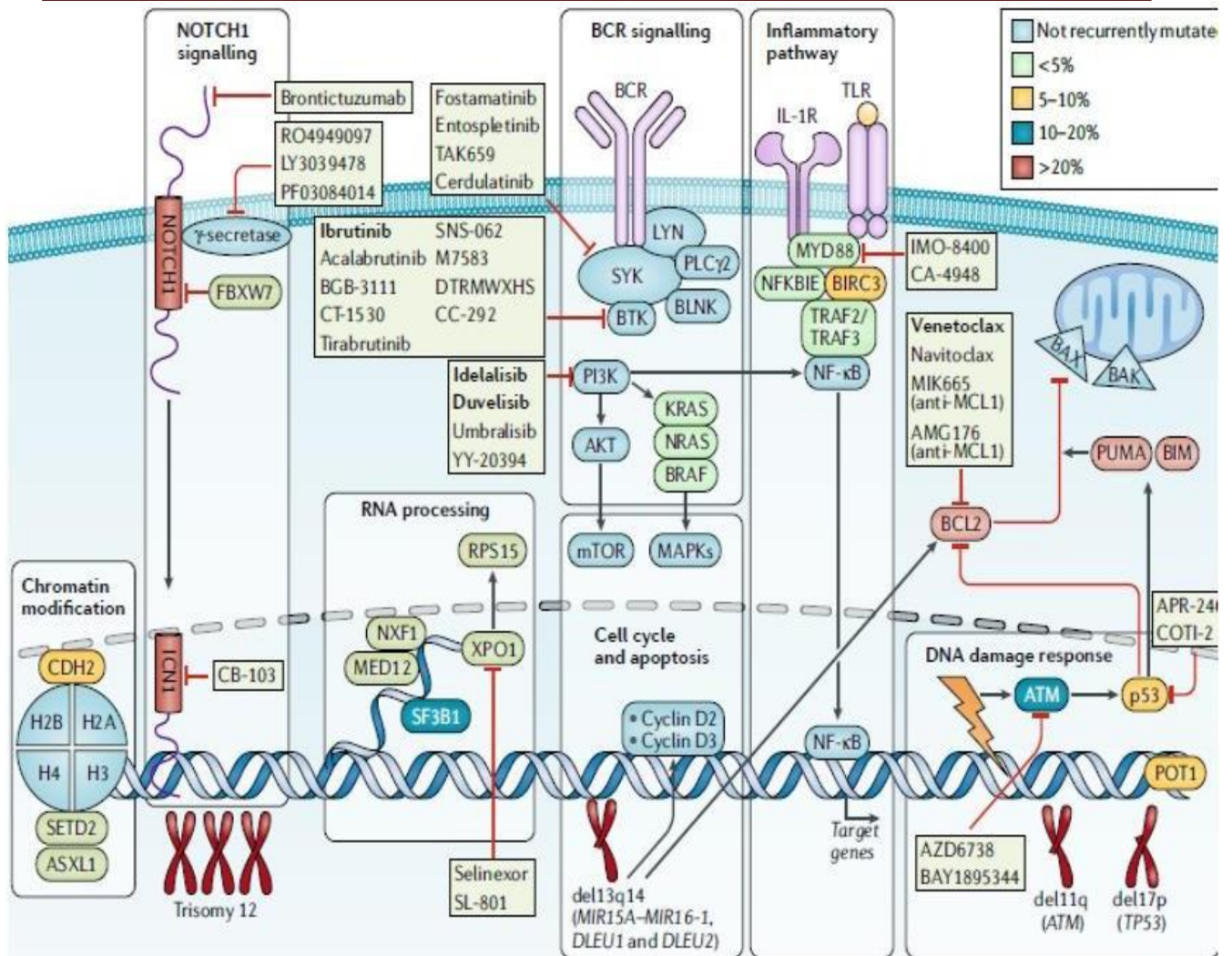


Figure 21 : Schéma représentant le paysage génétique de la LLC. Le schéma illustre la complexité du paysage génétique de la LLC révélé par la technique FISH et le séquençage de nouvelle génération (NGS) ainsi que les médicaments ciblés actuellement testés. Les anomalies chromosomiques les plus fréquemment détectées par FISH comprennent les délétions del13q14 ; (qui contient MIR15A-MIR16-1, DLEU1 et DLEU2), trisomie 12, del11q (qui contient ATM) et del17p (qui contient TP53) 50. La Del13q14 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, alors que del1q (Herndon et al.) et del17p (TP53) affectent la réponse aux dommages à l'ADN. Les altérations génétiques récurrentes identifiées par NGS incluent des mutations dans les gènes impliqués dans la modification de la chromatine (tels que CHD2), la signalisation du NF-κB (BIRC3 et MYD88), la voie NOTCH1 (NOTCH1 et FBXW7), maturation de l'ARN (SF3B1 et XPO1) ou les réponses aux dommages de l'ADN (par exemple, ATM, TP53 et POT1). Les fréquences des lésions génétiques et/ou des protéines codées sont indiquées par leur couleur (voir légende couleur). Les protéines qui ne sont pas mutées de manière récurrente dans la LLC sont représentées en bleu. Les thérapies ciblées actuellement testées dans des essais cliniques sont indiquées par des cases gris clair ; les agents agréés sont en gras. BCR : récepteur des cellules B (Bosch and Dalla-Favera, 2019).

Chapitre III : Matériel et Méthodes

1. Matériel

Tableau VIII : Représentation du matériel utilisé dans notre étude.

Appareillage	Réactifs	Echantillons
Automate d'hématologie Sysmex-Kx-21N. Microscope optique LEICA DM 500. Aerospray hematology pro. BD FACSCanto II implémenté du logiciel BD Facs Diva Thermocycleur C1000 Touch thermal cyler Microscope à camera SMCLAB QUIMICA Logiciel imageview Cellule de Malassez	Thiazin stain B Eosine stain C Méthanol Diation Sys diluant PBS Hématoxyline Eosine Ethanol 96% Butanol Ficoll	Sang périphérique de patients. Biopsies de la moelleosseuse.

Tableau IX : Liste des Anticorps utilisés dans l'étude avec leurs marqueurs fluorescents. Liste des Anticorps utilisés dans l'étude avec leurs marqueurs fluorescents.

Fluorochromes Anticorps	FITC	PE	PerCP-cy5.5	APC
1	KAPPA	LAMDA	CD19	CD20
2	FMC7	CD22	CD5	CD19
3	IgM	CD10	CD45	
4	CD23	CD79b		

2. Méthodes

2.1 Etude rétrospective

Nous avons réalisé une étude rétrospective, descriptive et analytique de 32 dossiers de patients atteints de la Leucémie lymphoïde chronique (LLC) diagnostiqués au niveau du service d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou durant la période 2019 jusqu'à la fin de 2022. Nous nous sommes focalisées sur un nombre de paramètres tels que : âge, sexe, complications associées, paramètres biologiques comme le FNS, analyse du Frottis sanguin et immunophénotypage par cytométrie en flux.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

2.2 Formule de numérotation sanguine (FNS)

2.2.1. Principe de FNS

C'est un examen biologique qualitatif et quantitatif qui permet de déterminer le nombre des hématies et leurs volumes et la teneur en hémoglobine, ainsi que le nombre des leucocytes et leurs répartitions en diverses catégories tel que les neutrophiles, monocytes, basophiles et lymphocytes.

Le FNS est soit automatisé ou bien pratiqué sur une cellule de Malassez. Le tableau ci-dessous montre les normes de la FNS.

Tableau X : Valeurs normales de la Formule de numérotation sanguine.

	3 à 10 ans	Femme	Homme
Hématies (millions/mm ³)	4.0-5.4	4.0-5.3	4.2-5.7
Hémoglobine (g/100ml)	12.0-14.5	12.5-15.5	14.0-17.0
Hématocrite (%)	36-45	37-46	40-52
VGM (μ ³)	74-91	80-95	80-95
CCMH (%)	28-33	30-35	30-35
Leucocytes (mm ³ x100)	5000-11000	4000-10000	4000-10000

2.2.2 Protocole de la FNS

Un prélèvement sanguin d'un patient atteint de la LLC est mis dans un tube EDTA, qui est ensuite homogénéisé pour éviter la coagulation du sang ; le tube est ensuite passé dans l'automate Sysmex-Kx-21N, après quelques instants les résultats de l'analyse sont récupérés.

2.3 Frottis sanguin

2.3.1 Principe de frottis sanguin

Un frottis sanguin correspond à faire étaler une goutte de sang de façon uniforme sur une lame en verre, ce qui permet d'obtenir une seule couche de cellules, qui vont être ensuite fixées et colorées afin de les observer sur un microscope. La figure-24 montre une photographie d'un frottis sanguin. L'analyse du frottis est souvent prescrite suite à l'apparition d'anomalies dans l'analyse de la formule sanguine. L'observation du frottis sanguin par le clinicien permet de distinguer les formes anormales des globules rouges tel

Chapitre III : Matériel et Méthodes

que les drépanocytes, acanthocytes...etc. Mais aussi pour détecter des anomalies lymphocytaires immatures, des Ombres de Gumprecht et la présence d'amas plaquettaires. Dans certains cas, le frottis est révisé par un hématologiste qui posera une conclusion sur l'ensemble des observations.

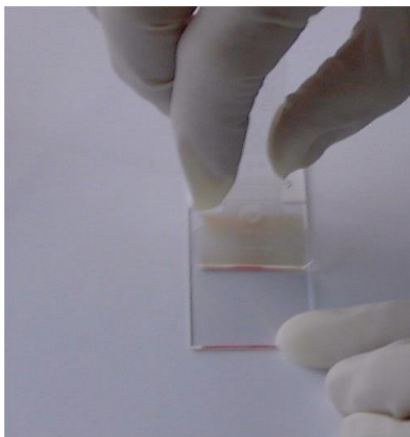


Figure 22 : Photographie d'un étalement de frottis sanguin.

2.3.2. Protocole de réalisation d'un frottis sanguin

1. Déposer une microgoutte de sang à 1 cm de l'extrémité de la lame en verre hématologique ;
2. Etaler la goutte de sang sur la lame ;
3. Sécher rapidement à l'air ;
4. Coloration du frottis avec le réactif May-Grunwald Giemsa ;
5. Placer la lame au microscope ajouter quelques gouttes d'huile d'immersion et observer à un grossissement X100.

2.4. Ponction de moelle osseuse

2.4.1 Principe de ponction de la moelle osseuse

La moelle osseuse est un tissu qui se trouve au centre des os, assurant la production continue et régulière des cellules sanguines : globules rouges, globules blancs et les plaquettes à partir des cellules souches hématopoïétiques. La ponction de moelle osseuse consiste à introduire une aiguille au niveau de sternum ou l'os iliaque afin d'aspirer une petite quantité de moelle pour l'analyser. La ponction de moelle osseuse est utilisée dans le cadre du diagnostic des cancers liquides (lymphomes et leucémies).



Figure 23 : Photographie de la Ponction de la moelle osseuse.

2.4.2. Protocole de Ponction de la moelle osseuse

Les échantillons sont généralement prélevés dans l'os iliaque ou de sternum du patient ; traité au départ avec un médicament anesthésiant, sous forme de crème ou de liquide injectable ou bien des patches pouvant être appliqués sur la zone où la procédure sera effectuée.

Sur la zone préalablement nettoyée, le trocart fixé à une seringue est inséré pour prélever la moelle liquide ; un pansement est appliqué immédiatement. Pour l'analyse, une goutte de moelle est ensuite déposée sur une lame dans le but de réaliser un frottis ; Les lames sont mises à sécher et colorées par May-Grünwald Giemsa.

2.5. Coloration de May-Grünwald Giemsa

C'est une méthode de coloration utilisée en hématologie en vue de différencier les différentes cellules du sang, elle repose sur l'action combinée de deux colorants neutres :

- Le May-Grünwald, formé d'un colorant acide, l'éosine, et d'un colorant basique qui est le bleu de méthylène ;
- Le Giemsa, formé aussi de l'éosine, et un colorant basique l'azur de méthylène.

Ces deux colorants sont mis dans une solution d'alcool méthylique sous forme inactive. Lors de l'addition d'eau d'éosine et d'azur de méthylène, ils se précipitent et se fixent sélectivement sur les constituants cellulaires :

Chapitre III : Matériel et Méthodes

- Les acides, fixeront les colorants basiques. Ces éléments sont qualifiés de basophiles ;
- Les basiques, fixeront les colorants acides. Ces éléments sont qualifiés d'éosinophiles ;
- Les constituants fixant les deux types de colorants sont les neutrophiles.

Durant l'observation microscopique on observe :

- Les noyaux sont colorés en bleu à violet-noir ;
- Les hématies sont de couleur beige-rosé ;
- Les granulations des granulocytes éosinophiles sont orange ;
- Les granulations des neutrophiles sont en violet-lilas ;
- Les granulations des basophiles sont bleu-noir ;
- Les granulations des grands lymphocytes sont pourpres.

2.6. Purification des PBMC à partir du sang périphérique de patients

L'isolement des cellules Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) du sang périphérique de patients LLC est effectué par la technique Ficoll. Cette technique est fondée sur le principe de la séparation entre les cellules sanguines suivant un gradient de densité. La séparation est basée sur les différences de densité existantes entre les lymphocytes, les érythrocytes, les plaquettes et les polynucléaires. Ce principe est appliqué pour isoler la majorité des cellules mononucléaires à partir du sang. Le sang est alors dilué et déposé sur la surface d'un tube contenant un volume de Ficoll suivi d'une centrifugation. Les globules rouges et les polynucléaires plus denses que le Ficoll passent à travers et sédimentent au fond du tube. Alors que les cellules mononucléaires dont les lymphocytes qui ont une densité plus faible restent à l'interface du Ficoll et la phase supérieure contient le plasma.

2.6.1 Protocole d'isolation des PBMC-LLC à partir du sang périphérique de patients

1ml de sang de patients LLC contenant l'anticoagulant EDTA et dilué dans 1ml de PBS ; ce mix est déposé dans un tube contenant 1 ml de Ficoll. Le tube est ensuite centrifugé à une vitesse de 1800 rpm pendant 20 minutes à température ambiante. Un aliquot de sérum est récupéré et congelé dans un tube tandis que le reste est éliminé à l'aide d'une micropipette. L'anneau formé de PBMC est repris dans un nouveau tube et re-suspendu avec 2 ml de PBS froid. Un lavage des cellules est réalisé par centrifugation à une vitesse de 1200 rpm pendant 10 minutes à 4°C ; par la suite, on récupère les PBMC après leur suspension dans 2 ml de PBS à 2%FBS froid. Les cellules PBMC purifiées sont enfin observées et comptées au microscope optique LEICA DM 500 en utilisant la cellule de Malassez.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

2.6.1.1 Principe de comptage cellulaire sur lame de Malassez

La cellule de Malassez est une lame en verre contenant des quadrillages qui permettent le comptage exact des cellules vivantes ou mortes (dans le cas de l'utilisation du bleu de trypan) dans une solution. Afin de dénombrer ces cellules, on pipette de 10 à 15 μl de suspension cellulaire entre la lamelle et la cellule de Malassez, attendre 5 minutes pour que les cellules sédimentent, puis observer la lame sur le microscope, l'objectif X10 est recommandé, dans le but de visualiser le quadrillage et les cellules, puis le comptage des cellules présentes dans les rectangles quadrillés est effectué à l'objectif X40. Un rectangle contient un volume de 0.01mm^3 , donc $0.01 \mu\text{l}$. A partir de la mesure, la concentration finale des cellules/ml est déduite de la numération.

2.6.1.2 Protocole de comptage des PBMC sur la cellule de Malassez

Prendre 10 μl des cellules PBMC et diluer avec 10 μl de PBS ; l'ensemble est déposé sur un champ de la cellule de Malassez ; qui est ensuite placée sur un microscope pour une observation au grossissement X10 après ajout d'huile d'immersion ; le comptage des cellules est ensuite réalisé au grossissement X40.



Figure 24 : Photographie d'un dépôt de PBMC sur une cellule de Malassez.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

2.7. Marquage histologique de biopsies de la moelle osseuse par l'hématoxyline et l'éosine

2.7.1 Principe du marquage HE

Le marquage à l'hématoxyline et éosine (HE) est une technique de coloration bichromatique très utilisée en histologie. Elle se compose de l'hématoxyline ayant une affinité aux éléments cellulaires chargés négativement, il colore les noyaux en bleu/violet suite à sa fixation aux groupements phosphates des acides nucléiques. Et de l'éosine ayant une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement, il permet de colorer le cytoplasme en rose.

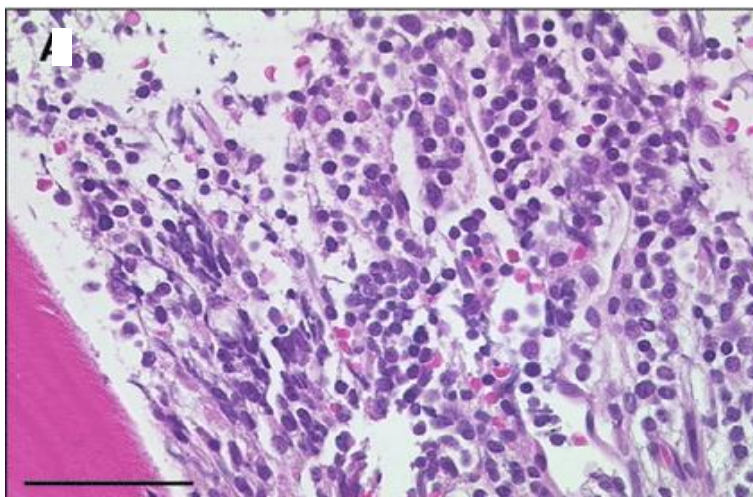


Figure 25 : Photographie d'un résultat du marquage HE d'une biopsie de la moelle osseuse d'un patient LLC. (Les cellules néoplasiques sont visibles) (Schmid et al., 2021).

2.7.2. Protocole de coloration HE de la moelle osseuse

Des lames de biopsies de la moelle prélevée sur des patients LLC et fixées et préparées préalablement sont mises dans un bain d'éthanol absolu pendant 20 min, elles sont ensuite récupérées et déposées dans un bain contenant l'hématoxyline pendant 15 min qui sert au marquage des noyaux. Ces lames sont rincées à l'eau courante du robinet, elles sont mises dans un bain d'éosine pendant 5 min. A la fin du marquage ; elles sont introduites dans un bain de butanol pendant 2 min, cette étape est répétée une deuxième fois. Afin d'observer ces lames sur microscope optique, on doit coller les lamelles sur ces lames en utilisant quelques gouttes de vernis transparent et serrer avec une pince, enfin, on observe ces lames au microscope Smclab Quimica implémenté du logiciel imageview pour l'observation et analyse des images.

2.8 Cytométrie en flux

2.8.1 Principe de la cytométrie en flux :

La cytométrie en flux (CMF) est une technique d'analyse qui permet de caractériser et de compter des cellules en suspension dans un flux liquide. Les molécules de surface de ces cellules sont révélées par un agent fluorescent couplé à un anticorps monoclonal spécifique. La CMF permet aussi de différencier les cellules en fonction des critères taille et granularité, cela se fait en exploitant leur capacité de diffraction et de faire diffuser des rayons lumineux. La diffusion dans l'axe de la source lumineuse renseigne sur la taille des cellules. La diffraction à 90°C des rayons lumineux renseigne sur la granularité ou le degré de complexité des structures internes des cellules analysées. La lumière du laser va également exciter des fluorochromes couplés à des anticorps monoclonaux qui interagissent spécifiquement avec des molécules spécifiques ; l'appareil est doté d'un système de filtre optique et de photomultiplicateur qui permettent de collecter la fluorescence émise par chaque fluorochrome et ensuite de la quantifier.

Le cytomètre en flux est composé de plusieurs systèmes :

- Un système fluide qui sert à introduire les cellules et les faire défiler une à une au niveau du laser ;
- Un système optique qui se compose de lasers et de filtres pour exciter, détecter et amplifier les différents signaux émis (miroirs dichroïques, photomultiplicateurs) ;
- Un système électronique pour convertir les signaux optiques à des signaux électroniques. Les signaux sont ainsi récoltés par des photomultiplicateurs, afin d'être numérisés et stockés dans un ordinateur ;
- Un programme informatique pour la visualisation des signaux et analyse des résultats.



Figure 26 : Photographie d'un appareil de Cytométrie en flux BD FACS Lyric.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

2.8.2 Protocole de cytométrie en flux

5 tubes polystyrènes à fond rond (spécial de CMF) mis sur un portoir numéroté de 1 jusqu'à 5, ajouter dans le tube 2 : 10 μ L d'anticorps CD19, FMC7, CD22 et CD5 ; dans le tube 4 : ajouter 10 μ L d'anti- CD23, CD79b, CD19, et dans le tube 5 : mettre 10 μ L d'anti CD103, CD11C, CD19, CD25 puis déposer dans ces tubes 100 μ L de sang total et agiter bien le mixte. En ce qui concerne le tube 1 : mettre 10 μ L d'anti- CD19, CD20, lambda et kappa, pour le tube 3 : ajouter 10 μ L d'anti- IgM, CD10 et CD19, préalablement effectuer 3 lavage du sang total avec du BPS et centrifuger 500 rpm pendant 5 min dans l'objectif d'éliminer les immunoglobulines naturelles circulantes qui interfèrent avec l'étude des chaînes légères et chaînes lourdes des immunoglobulines ; donc prendre 100 μ L du culot de sang et les déposer dans le tube 1 et 3 et bien agiter. Incuber les tubes à l'obscurité pendant 15 min ; ajouter 2ml de tampon de lyse afin d'éliminer les globules rouges puis incuber une autre fois à l'obscurité pendant 10 min. Vortexer les tubes ; et les centrifuger pendant 1 min à 350 rpm. Flic les tubes ou éliminer le liquide avec le pipetage ; laver les 5 tubes avec 3ml de PBS et les vortexer puis les centrifuger pendant 1 min à 350 rpm et flic les tubes pour une deuxième fois puis re-suspendre le culot dans le PBS et enfin lire le résultat de la CMF.

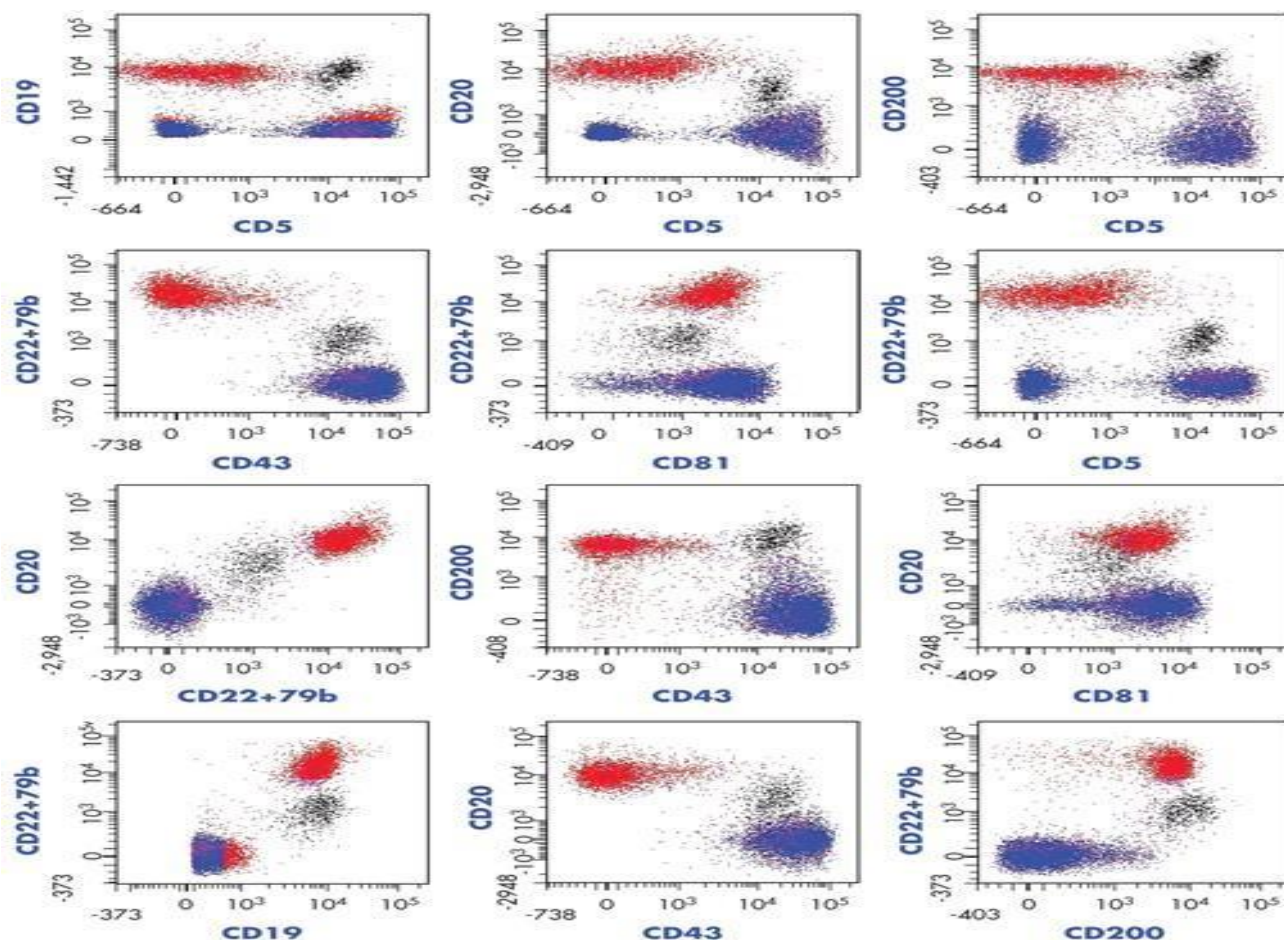


Figure 27 : Diagnostic par immunophénotypage d'un cas de LLC à l'aide de la cytométrie en flux.

2.9 Purification de l'ADN génomique à partir des PBMC

La purification de l'ADN génomique des cellules PBMC isolés par Ficoll à partir du sang de patients atteints de la LLC a été réalisée en utilisant le kit Qiaamp dNA Mini Kit de Qiagen.



Figure 28 : Kit QIAamp DNA mini de QIAGEN utilisé pour l'extraction d'ADN génomique.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

2.9.1 Protocole

Dans un eppendorf, mettre dans l'ordre : 20µl de protéinase K ; 200µl de sang total et 200 µl du tampon AL (tampon de lyse), vortexer pendant 15 seconde puis centrifuger 5 sec. Incuber l'eppendorf au bain marie pendant 10 min à 56°C, préparer la colonne et les poubelles (1 colonne et 2 poubelles/test) ; récupérer l'eppendorf du bain-marie, et bien vortexer et ajouter 200µl d'éthanol absolu, vortexer et centrifuger pendant 5sec puis transvaser le contenu de l'eppendorf dans la colonne chromatographique de Qiagen ; centrifuger 1 min à 8000 rpm, et retirer la colonne, jeter la poubelle et placer la colonne dans la poubelle 1. Ajouter 500 µl du tampon AW1(tampon de lavage 1), centrifuger 1min à 8000 rpm, récupérer la colonne placer la dans la 2éme poubelle et ajouter 500 µl du tampon AW2 (tampon de lavage 2), centrifuger 3 min á 13000 rpm puis placer la colonne dans un tube eppendorf numéroté ensuite centrifuger 1min à 13000 rpm et ajouter 120µl du tampon AE (Eluant) et l'incuber 1min à température ambiante, centrifuger 1min à 8000 rpm ; enfin récupérer le tube eppendorf contenant l'ADN purifié.

La solution d'ADN obtenue peut se conserver à 4°C pendant 5 jours ou bien congeler pendant plusieurs mois. Les ADN purifiés sont ensuite utilisés pour la caractérisation moléculaire des profils LLC-B, exemple, séquençage de la P53, vérification par PCR des statuts mutationnels des chaines lourdes des Igs (IGVH) ...etc.

2.9.2 Dosage de l'ADN génomique purifié des PBMC

La lecture de la densité optique (DO) à 260 nm, 230 et 280 nm des solutions ADN permet de calculer la concentration finale des ADN purifiés. Le contrôle de la qualité de l'ADN est vérifié par le calcul des rapports DO 260/280 et 260/230 ; un ADN pur doit présenter un rapport DO 260/280 compris entre 1,6 et 1.8. C'est une étape importante afin de vérifier si l'ADN est contaminé par des protéines ou bien par de l'ARN. Un résultat < 1.6 représente la présence d'une contamination protéique, si le ratio dépasse 2 il est synonyme de l'existence de contamination ARN donc l'extraction de l'ADN est à refaire.



Figure 29 : Photographie du spectromètre de dosage de l'ADN Nano Kurado.

2.10 Typage HLA pour greffe de la moelle

2.10.1 Principe du typage HLA

Le système HLA est un ensemble d'antigènes (ou de marqueurs) qui s'expriment à la surface de la plupart des cellules de l'organisme et qui permet à chaque individu de différencier entre le soi et le non soi. Le typage HLA consiste à identifier ces antigènes caractéristiques de l'individu. Cette analyse est réalisée avant une greffe d'un organe ou de moelle pour apprécier la compatibilité tissulaire entre deux individus. Il existe des antigènes HLA de classe 1, identifiés par les lettres A, B et C et des antigènes HLA de classe 2 identifiés par les lettres DP, DQ, DR, ces lettres sont suivies de numéro. Pour qu'une greffe de moelle soit réalisée, il faut que la compatibilité entre le donneur et le receveur soit complète. Il faut donc que les numéros qui suivent les lettres A, B, C, DP, DQ, DR soient identiques entre le donneur et le receveur.

Les techniques de typage disponibles actuellement dans la majorité des laboratoires sont des techniques basées sur l'analyse sérologique mais aussi par analyse de biologie moléculaire. Notamment, en utilisant la technique PCR Single Spécifique Primer (SSP) ou la PCR Sequence Specific Oligonucleotide probes (SSO).

Chapitre III : Matériel et Méthodes

2.10.2 Amplification PCR de l'ADN génomique pour le typage HLA

La PCR « Polymerase Chain Reaction » est une technique d'amplification enzymatique permettant d'obtenir un grand nombre de copies identiques d'un fragment d'ADN, la réaction PCR est réalisée sur un appareil appelé thermocycleur, un automate qui permet de faire changer la température de manière cyclique. La PCR se fait en plusieurs cycles (20-40) et chaque cycle est divisé en trois étapes :

- Dénaturation : les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage (95 °C) ;
- Hybridation : diminution de la température (53-68 °C), des amorces constituées de courts fragments oligonucléotidiques viennent s'hybrider sur les brins matrices d'ADN ;
- Elongation : la Taq polymérase catalyse la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux déoxynucléotides tri-phosphates (dNTPs) présents dans le milieu de la réaction.

2.10.3 Préparation de la plaque de Micro-SSP ONE Lambda

Sortir les plaques (ABC et DP/DQ/DR) et le D-Mix (tampon contenant du MgCL₂ et les 4 types de dNTP) et les laisser décongeler à température ambiante. Répartir 1µl d'eau distillée dans les puits du contrôle négatif ; retirer la Taq Polymérase du congélateur et l'ajouter dans le tube de D-Mix, vortexer et répartir le mélange D-Mix /Taq dans le puits contrôle négatif, après ajouter l'ADN génomique (100ng/0,1µl) dans le mélange D-Mix Taq, vortexer et répartir le mélange DNA/D-mix/Taq dans tous les puits des plaques sauf dans les puits du contrôle négatif.

2.10.4 Typage HLA par amplification PCR

1. Bien fermer la plaque à l'aide de l'adhésif et placer dans le thermocycleur C1000 Touch thermal cycler ;
2. Lancer la réaction d'amplification PCR en réglant le programme de température aux valeurs indiquées sur le tableau suivant.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

Tableau XI : Programme de température utilisée pour la PCR du typage HLA.

<u># of Cycles</u>	<u>Step</u>	<u>Temp. (°C)</u>	<u>Time (sec.)</u>
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
End	1	4	---

2.10.5 Electrophorèse sur gel d'agarose

La vérification du typage HLA est réalisée par

1. Migration électrophorétique des amplicons de l'ADN génomique sur un gel d'agarose 2.5 % baignant dans un tampon TAE en présence du BET.
2. Déposer les produits d'amplification de la plaque 96 puits à l'aide d'une micropipette ;
3. Couvrir la cuve d'électrophorèse et brancher sur le générateur. La migration se fait à 134 volts pendant 9 min.

2.10.5.1 Lecture et interprétation des résultats du typage

La visualisation des bandes d'électrophorèse est réalisée sur la lecture de gel d'agarose sous UV, et l'interprétation des résultats nécessite l'utilisation du programme Fusion Software :

- Le contrôle interne, bêta globine (témoin positif présenté dans la **plaque de Micro-SSP ONE Lambda**) doit être observé sur tous les puits sauf dans le témoin négatif ;
- Si un allèle HLA a été amplifié, une bande de migration de taille inférieure au contrôle interne est observable (voir Figure-31) ;
- Le contrôle Interne peut être faible ou même inexistant dans les puits positifs ;
- Si le contrôle interne et/ou la bande positive sont apparues dans le témoin négatif, la manipulation doit être refaite.

Chapitre IV : Résultats et discussion

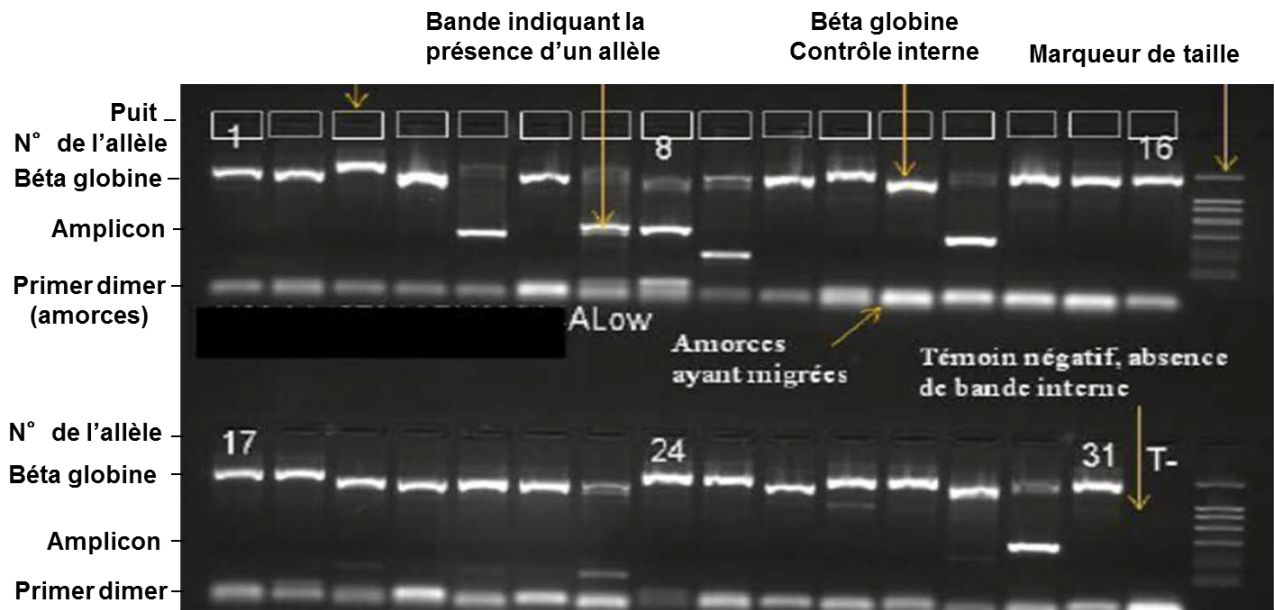


Figure 30 : Image du gel d'électrophorèse pour typage HLA. Les produits d'amplification PCR sur la plaque SSP ONE Lambda sont déposés dans les puits correspondant aux différents allèles des gènes HLA. La détection d'un amplicon dans un puit particulier est synonyme de la présence de l'allèle correspondant dans l'ADN analysé. Exemple du cas de l'allèle 30.

Chapitre IV : Résultats et discussion

1. Epidémiologie de la LLC

La première partie de notre étude est portée sur l'étude épidémiologique de la LLC comprenant 32 dossiers de malades LLC recensés au niveau du service d'hématologie du CHU de Tizi Ouzou sur la période de 2019 jusqu'à la fin 2022.

1.1. Variation annuelle du nombre de patients LLC sur la période 2016-2022

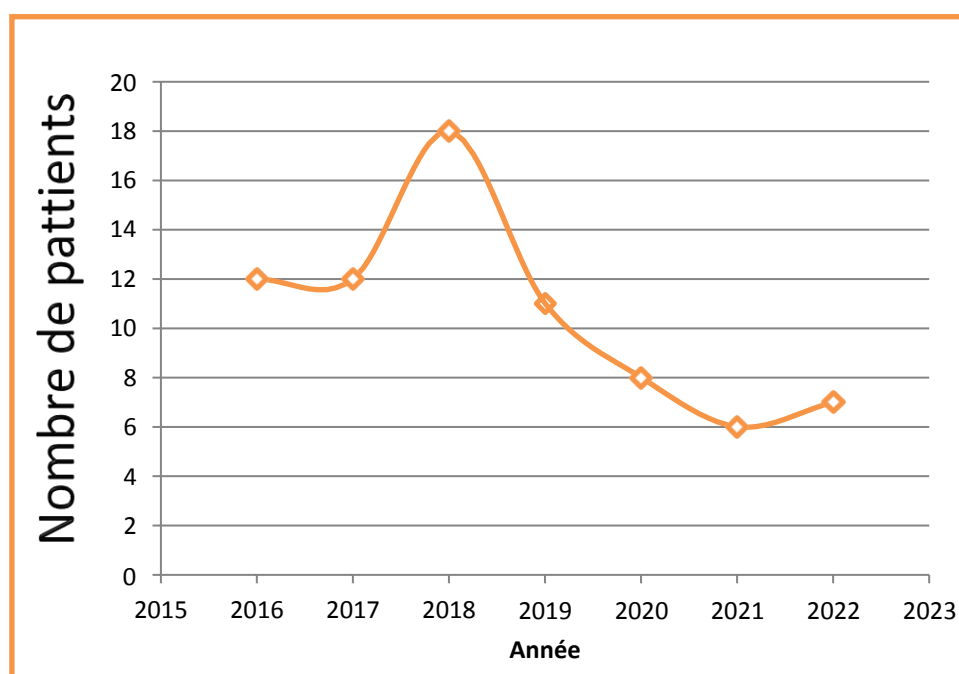


Figure 31 : Courbe représentative du nombre de patients LLC suivi au service d'hématologie de l'année 2016 jusqu'à 2022.

Dans un premier, nous nous sommes intéressé au suivi de la variation annuelle du nombre de patients enregistré dans le service depuis 2016 jusqu'à la fin 2022. La courbe représentée sur la Figure-31 montre la présence d'un pic en 2018 portant un nombre maximal de 18 patients LLC reçu dans le service. Le nombre de patients atteints de LLC en 2019 a baissé et estimé à 11 cas suivi dans le service d'hématologie. A partir de l'année 2020 jusqu'à 2022, le nombre de patients par année a diminué considérablement pour atteindre respectivement les valeurs minimales de 8 cas, 6 cas et 7 cas. Cette baisse est probablement associée à la pandémie du Covid-19, qui a contribué fortement à la baisse des consultations hospitalières de manière générale afin d'éviter toutes sortes d'exposition à des contaminations. En ce qui concerne l'année 2023, les dossiers de patients ne sont pas encore classés pour être analysés, mais les premières estimations affichent une tendance vers la hausse du nombre de cas LLC comparativement aux estimations de l'année dernière.

Chapitre IV : Résultats et discussion

1.2. Répartition des patients suivant l'âge

La LLC est une pathologie qui touche beaucoup plus les personnes âgées situées entre 60 jusqu'à 80 ans. 78.12 % des patients du service d'hématologie appartiennent à cette tranche d'âge (25 patients) voir figure-32, la LLC survient très rarement avant l'âge de 40 ans (1 patient enregistré). L'âge moyen des patients suivi au service est de 70 ans. Ces valeurs corrélient nettement avec celles rapportées par une étude américaine qui a estimé que les patients LLC de plus de 65 ans représentent plus de 70 % de cas LLC recensés au diagnostic avec un âge médian de 71 ans (Kipps et al., 2017), alors qu'en France, elle se situe entre 70 à 72 ans (Le Guyader-Peyrou et al., 2016). De manière intéressante, au Togo, l'âge moyen de survenue de la LLC est à 61 ans (Padaro et al., 2019) et elle est de 60 ans au Niger (Salawu et al., 2010). Ces différences sont probablement dues à l'influence des variations de facteurs génétiques et environnementaux et aussi des moyens d'accès aux soins médicaux.

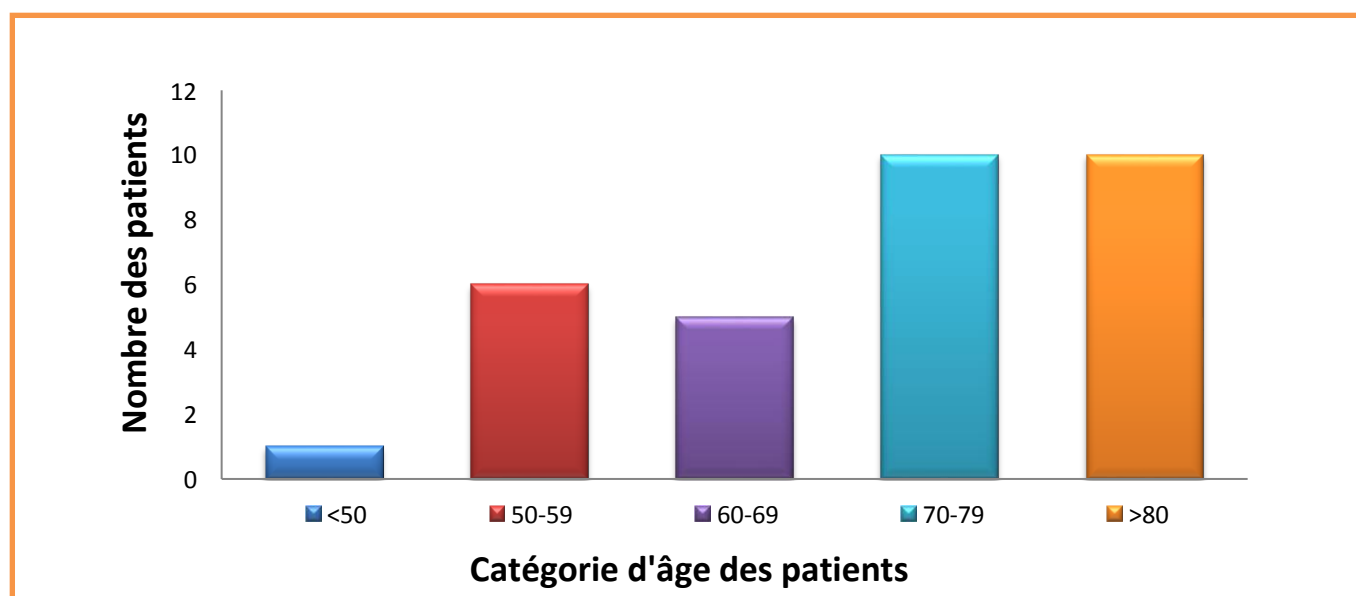


Figure 32 : Représentation de la répartition des patients LLC selon leur catégorie d'âge.

1.3. Suivi de la répartition des patients LLC suivant le sexe

Les patients LLC inclus dans notre étude sont en majorité de sexe masculin (71.87 %) correspondant à 23 hommes. Alors que les femmes représentent 28.12 % des cas équivalent de 9 femmes avec un ratio Hommes/Femmes évalué à 2.55 comme montré sur la figure-33. Ces résultats sont proches des données issues d'autres études effectuées dans d'autre pays, tel que la France avec un ratio H/F est de 1.9 {Revue Leucémie lymphoïde chronique, 2021}, aux USA ce ratio est évalué de 1.5 à 2 (Kipps et al., 2017). A partir de ces observations, on peut confirmer que la LLC est considérée comme une pathologie à prédominance masculine.

Chapitre IV : Résultats et discussion

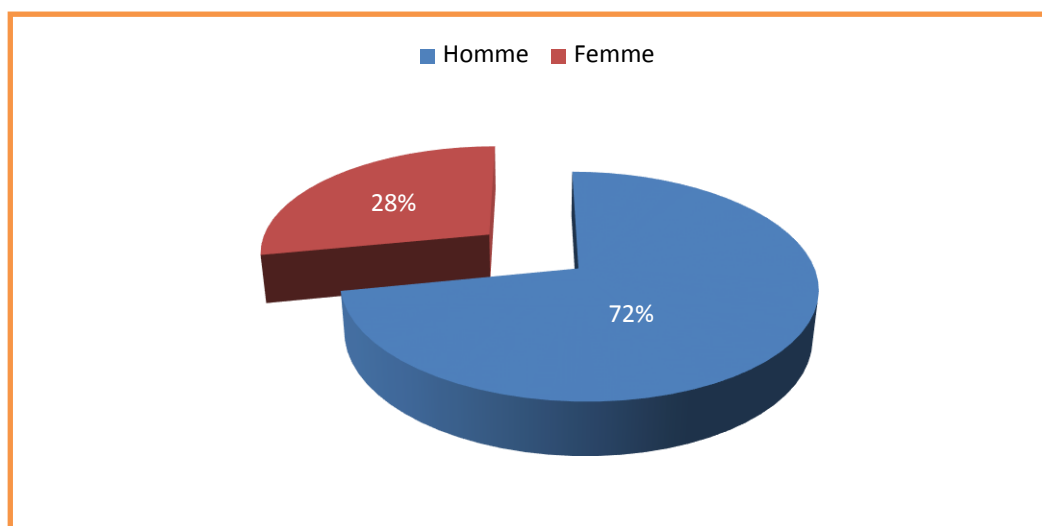


Figure 33 : Représentation de la répartition des patients LLC suivant le sexe.

1.4. Répartition des patients selon la région

Tableau XII : Répartition des patients atteints de LLC selon leur région.

Wilaya	Nombre de patients	Pourcentage (%)
Tizi-Ouzou	24	75%
Boumerdès	5	15.62 %
Bouira	2	6.25 %
Alger	1	3.12 %

La majorité des patients suivis au niveau du service d'hématologie viennent de la wilaya de Tizi –Ouzou représentant 75 % des patients. Certains patients viennent des autres wilayets limitrophes : Boumerdès avec 15.62 %, Bouira 6.25 % et Alger 3.12 % (tableau-XII). Malheureusement les données de la répartition géographique des patients LLC par Daïra de la wilaya de Tizi Ouzou ne sont pas précisées sur les dossiers.

Chapitre IV : Résultats et discussion

1.5. Distribution immunophénotypiques des patients LLC suivant le classement de Matutes

L'ensemble des dossiers de patients LLC suivi dans le service d'hématologie du CHU de Tizi Ouzou sur la période allant de 2019-2022 contiennent un descriptif détaillé de l'immunophénotypage des marqueurs membranaires caractéristiques des lymphocytes T et B. Cette identification est réalisée par analyse avec la technique de cytométrie en flux voir figure-34. Ces données recueillies permettent de déterminer le score de Matutes, qui est basé sur le suivi de l'absence ou de la présence sur les cellules leucémiques de 5 marqueurs caractéristiques : CD5, CD23, CD19, CD79b, FMC7 ainsi que l'expression des chaînes kappa ou lambda les résultats obtenus montrent que 17 patients ont un score de Matutes de 5/5 ce qui représente 53.12% de patients. 13 patients (40.62%) affichent un score de 4/5 et 2 patients du score 3/5, il s'agit d'une LLC atypique. Par contre le score 1/5 et 2/5 sont lié à un autre Syndrome lymphoprolifératif B, la LLC est diagnostiquée seulement lorsque le score de Matutes est supérieur ou égal 3/5.

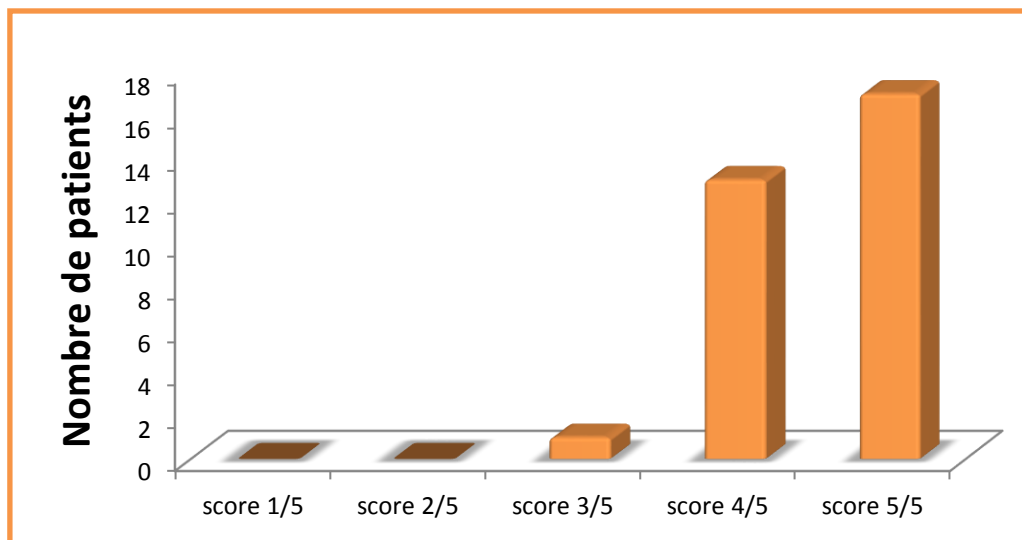


Figure 34 : Histogramme montrant la répartition des patients atteints de LLC suivant la classification de Matutes.

Chapitre IV : Résultats et discussion

1.6 Distribution des patients suivant la classification de Binet

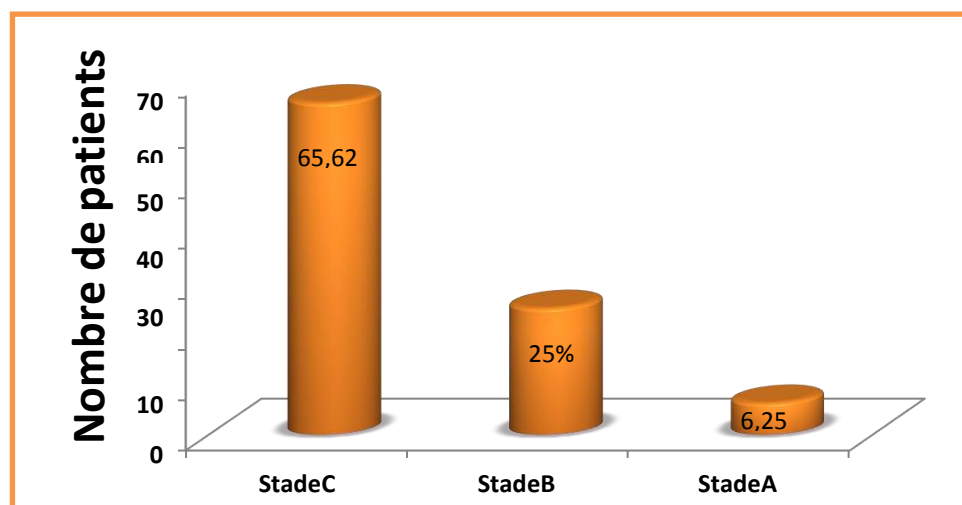


Figure 35 : Représentation graphique de la distribution des patients selon la classification de Binet.

Durant la période 2019-2022 environ de 68.75 % des personnes atteintes de LLC sont au stade C de la classification de Binet, dans lequel le taux d'hémoglobine est inférieur à 10g/100ml et ou leur taux en plaquettes est inférieur à 100 000/mm³, ceci quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes palpables ; 25% de patients du service sont au stade B. ils présentent trois aires lymphoïdes ou plus palpables et le taux d'hémoglobine n'est pas inférieur à 10g/100ml ainsi que le taux de plaquettes n'est pas inférieur à 100 000/mm³ ; et 6.25 % des cas sont de stade A, ces patients présentent moins de trois aires lymphoïdes palpables et le taux d'hémoglobine n'est pas inférieur à 10g/100ml et le taux de plaquettes n'est pas inférieur à 100 000/mm³ voir figure-35. On remarque que la plupart des patients LLC du service sont au stade C de la maladie qui correspond à un stade avancé de la maladie, et qui demandent plus de prises en charges comparativement aux patients des deux autres stades inférieurs qui nécessitent une surveillance médicale sans avoir recours à leur hospitalisation au niveau du service d'hématologie du CHU. Les hospitalisations des 2 patients du stade A et des 8 patients de stade B de la LLC sont dû à la forte propagation des cellules leucémiques LLC chez ces patients, associées à l'apparition de complications tels que les Splénomégalies et Adénopathies, ce qui justifie leur prise en charge au niveau du service.

1.7 Signes cliniques observés chez les patients LLC

La majorité des patients LLC du service d'hématologie CHU Tizi- Ouzou souffrent d'adénopathies caractérisées par une augmentation pathologique du volume des ganglions lymphatiques, chez 84% des patients Outre, la Splénomégalie qui correspond à une augmentation du volume de la rate, pouvant induire des cytopénies, sont aussi souvent rencontrés chez les patients LLC. 78% de nos patients présentent cette atteinte (figure-36).

Chapitre IV : Résultats et discussion

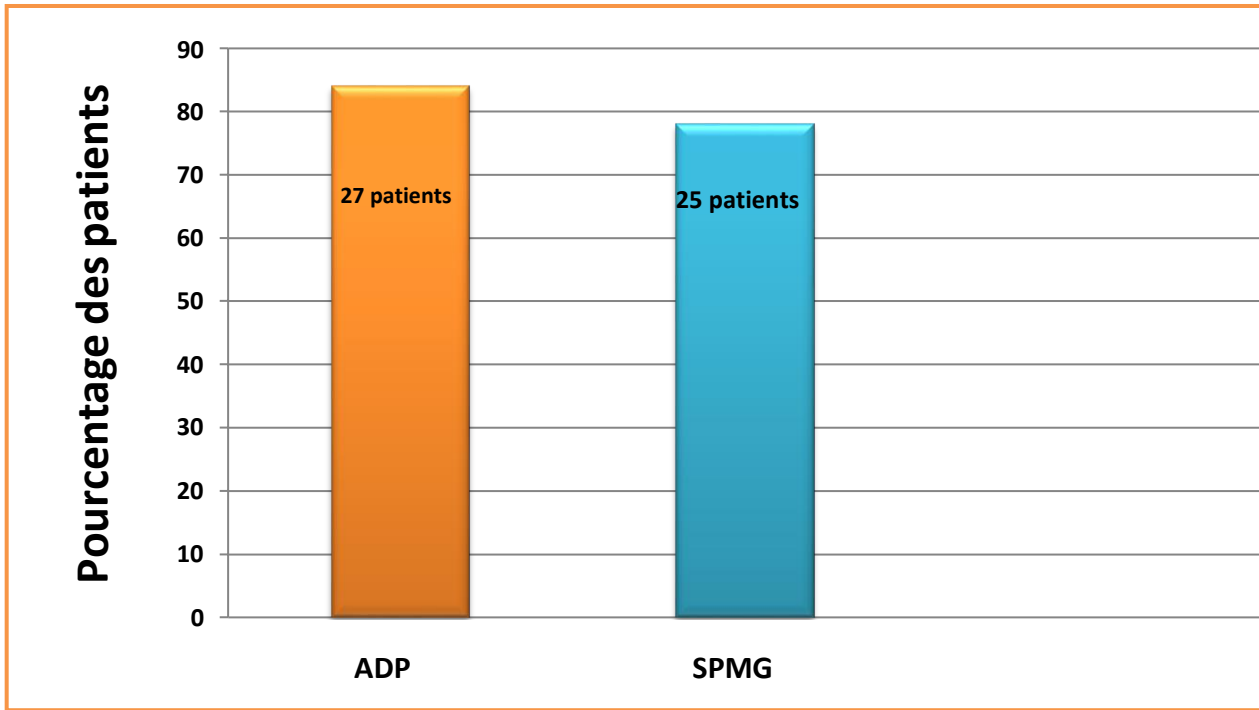


Figure 36 : Représentation graphique de la répartition des patients selon leurs symptômes.

2. Etude morphologique de la LLC

2.1. Formule de numérotation sanguine (FNS)

Un exemple d'hémogramme d'un patient LLC illustré sur la figure-39 montre un taux des globules blancs supérieure aux normes avec présence d'une lymphocytose de 89.3 %. Ce critère ne permet pas à lui seul de suspecter une LLC, mais le taux faible de globules rouges et de plaquettes oriente plutôt vers un diagnostic d'une anémie et d'une thrombopénie.

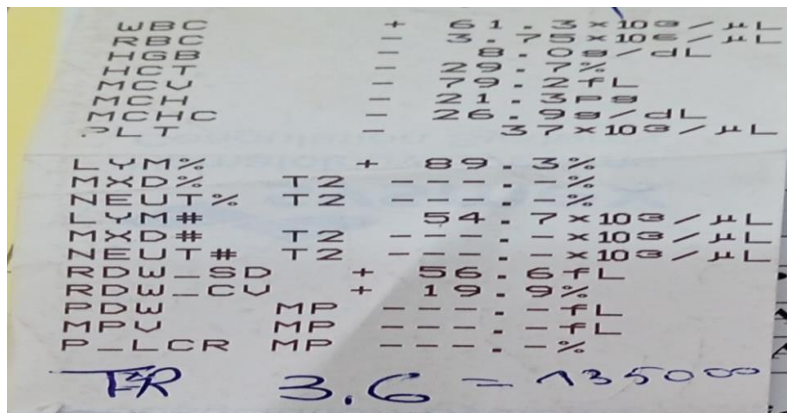


Figure 37 : Formule de numérotation sanguine d'un patient atteint de LLC.

Chapitre IV : Résultats et discussion

2.2. Frottis sanguin d'un patient atteint de LLC

La présence d'anomalies au niveau du profil FNS des patients indique la réalisation d'un Frottis sanguin. Les lymphocytes observés sur frottis sanguin ont des caractéristiques morphologiques matures de petits de tailles avec peu de cytoplasme et un noyau dense, sans nucléole, ayant une chromatine partiellement agrégée. La présence des ombres de Gumprecht est une caractéristique spécifique de la LLC figure-38.

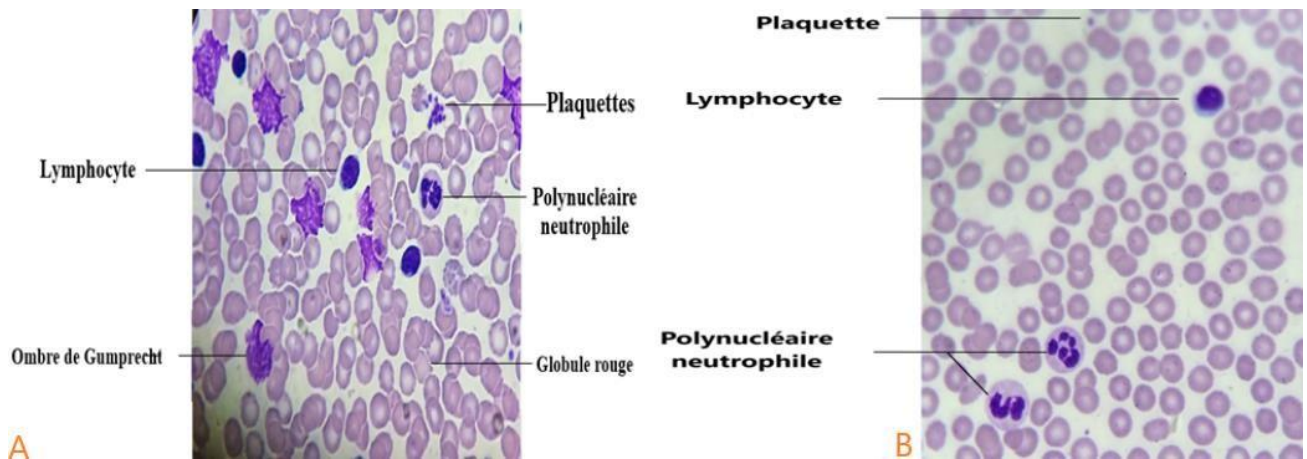


Figure 38 : Observation microscopique des frottis sanguin coloré par MGG. G X100 dans le cas d'un patient LLC (A) et un contrôlé sain (B).

2.3 Ponction de moelle osseuse

La biopsie de la moelle osseuse n'est pas un moyen de routine du diagnostic de LLC. Elle est effectuée dans le but de contrôler la richesse de la moelle osseuse en cellules et déterminer les niveaux de réponse de patients aux traitements ; en effet, la réponse est observée par apparition d'une diminution en taux de précurseurs lymphocytaires à l'état normal qui ne dépassant pas 30% du total des cellules voir figure-39.

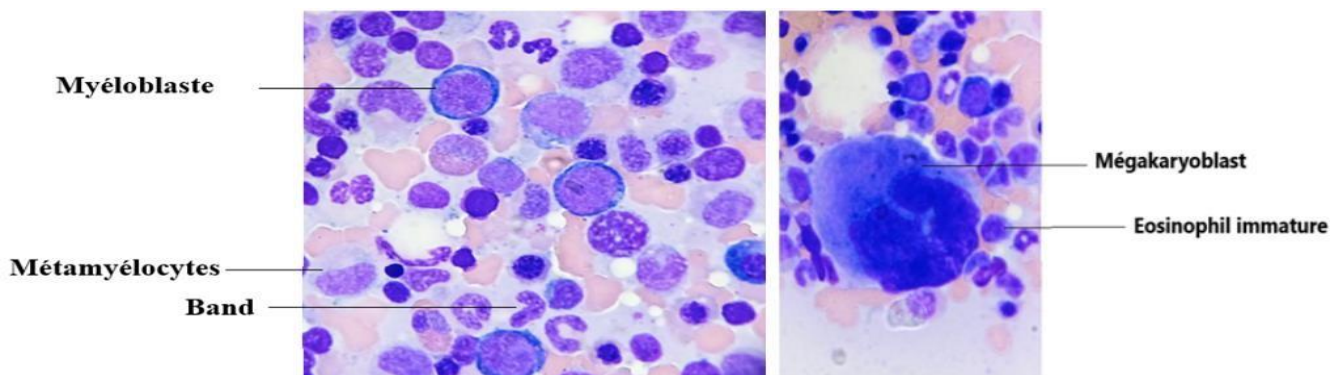


Figure 39 : Observation au microscope d'une biopsie de moelle osseuse colorée par MGG sous un microscope optique G X100.

Chapitre IV : Résultats et discussion

L'analyse histologique par coloration HE de biopsies de la moelle osseuse de patients est une approche très intéressante pour la caractérisation histologique des tissus de la moelle. Le résultat d'un exemple de marquage HE des biopsies de la moelle d'un patient est représenté sur la figure 40. La résolution des images des observations au microscope obtenus ne permet pas de distinguer entre les différents composants tissulaires. Une meilleure mise au point du protocole est requise pour accéder à l'analyse histologiques des organes lymphoïdes atteints de la LLC.

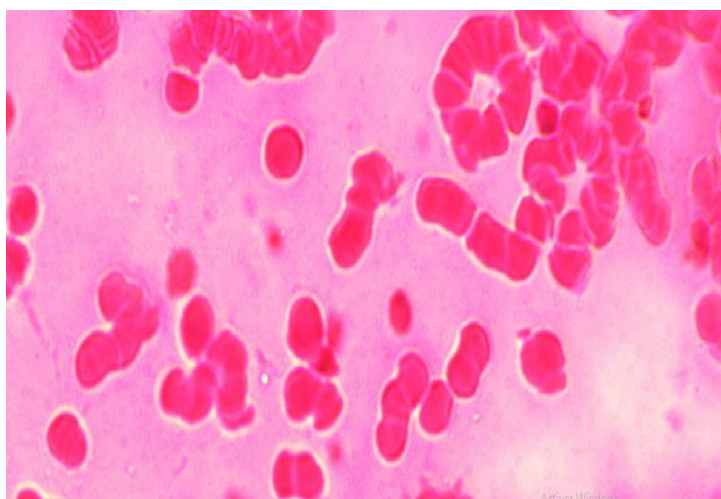


Figure 40 : Photographie d'un résultat du marquage HE d'une biopsie de la moelle osseuse d'un patient LLC.

2.4 Purification des PBMC à partir du sang périphérique de patients LLC

Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) sont des cellules sanguines à noyau rond unique. Elles correspondent à l'ensemble des leucocytes mononucléaires tels que les lymphocytes (cellules T, cellules B, cellules NK), les monocytes, les cellules dendritiques et les basophiles. Ces cellules sont séparées à partir du sang total grâce à la technique Ficoll suivant un gradient de densité après une centrifugation. Les cellules polynucléaires, globules rouges et plaquettes Cette méthode nous a permis d'enrichir nos échantillons en cellules leucémique LLC en les séparant des autres cellules tel que les polynucléaires, les globules rouges et les plaquettes qui sont des cellules plus denses que le Ficoll et précipitent au fond du tube, alors que les cellules mononucléaires se localisent à l'interface Ficoll et le plasma voire les Figure 41 et 42.

Chapitre IV : Résultats et discussion

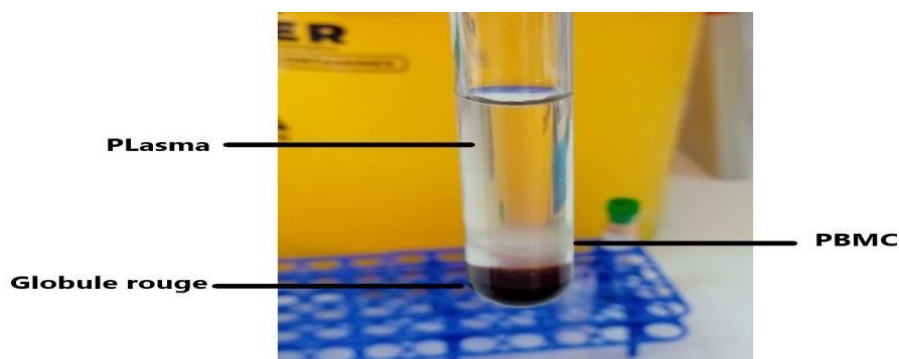


Figure 41 : Image représentant le résultat d'un isolement des PBMC à partir du sang total à l'aide de la méthode Ficoll.

2.4.1 Observation microscopique des PBMC et numération des Lymphocytes

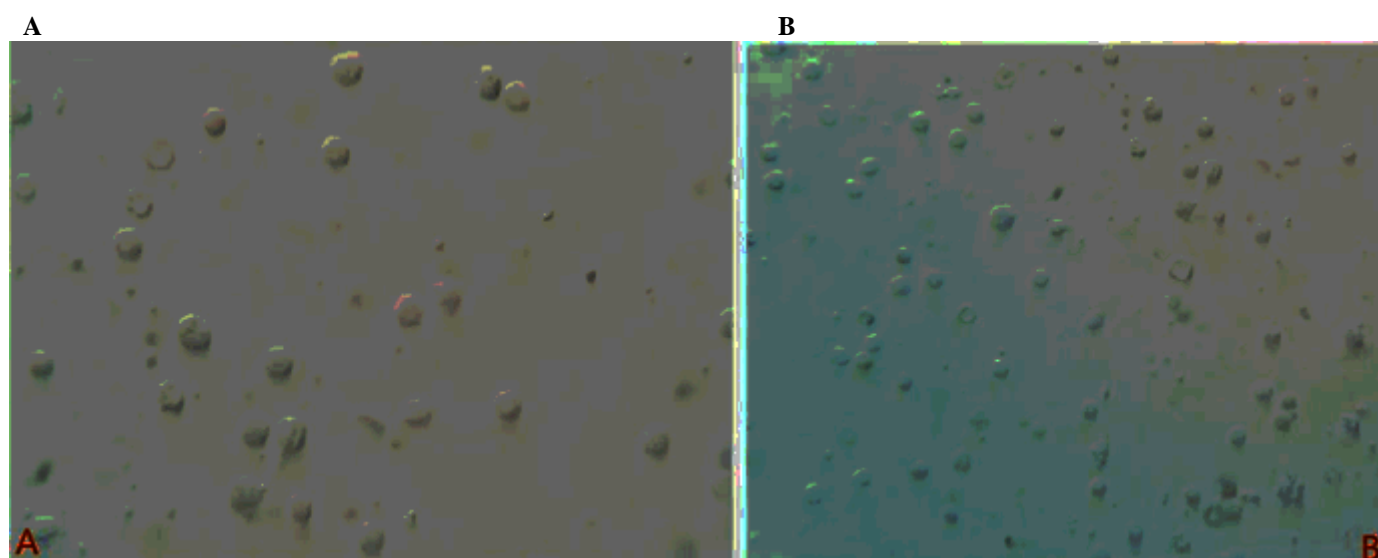


Figure 42 : Observation microscopique des PBMC isolées par Ficoll sur cellule de Malassez. (grossissement X 40). A : échantillon sain et B : échantillon LLC.

2.4.2 Comptage des cellules lymphocytaires sur cellule de Malassez

Après isolement par Ficoll des cellules mononucléaires à partir du sang périphérique de 2 échantillons, un individu sain (A) versus un patient LLC (B), nous avons procédé à la numération des lymphocytes sur les 2 échantillons en utilisant la lame de Malassez. Nous observons sur le Figure-43 un nombre très élevé et denses des petits lymphocytes dans le cas du patient LLC comparativement au contrôle. Cette observation est confirmée par un comptage des lymphocytes sur cellules de Malassez voir tableau XIII et Figure-44. Ces résultats confirment que l'hémopathie chez le patient est caractérisée par un taux de lymphocyte très important.

Chapitre IV : Résultats et discussion

Le procédé d'isolement des PBMC à partir du sang périphérique de patients LLC est une étape importante qui permet d'enrichir les échantillons en cellules leucémiques. Elle est nécessaire à la réalisation de nombreuses autres analyse ultérieures, par exemple la cytométrie en flux, la culture cellulaire in vitro des LLC...etc.

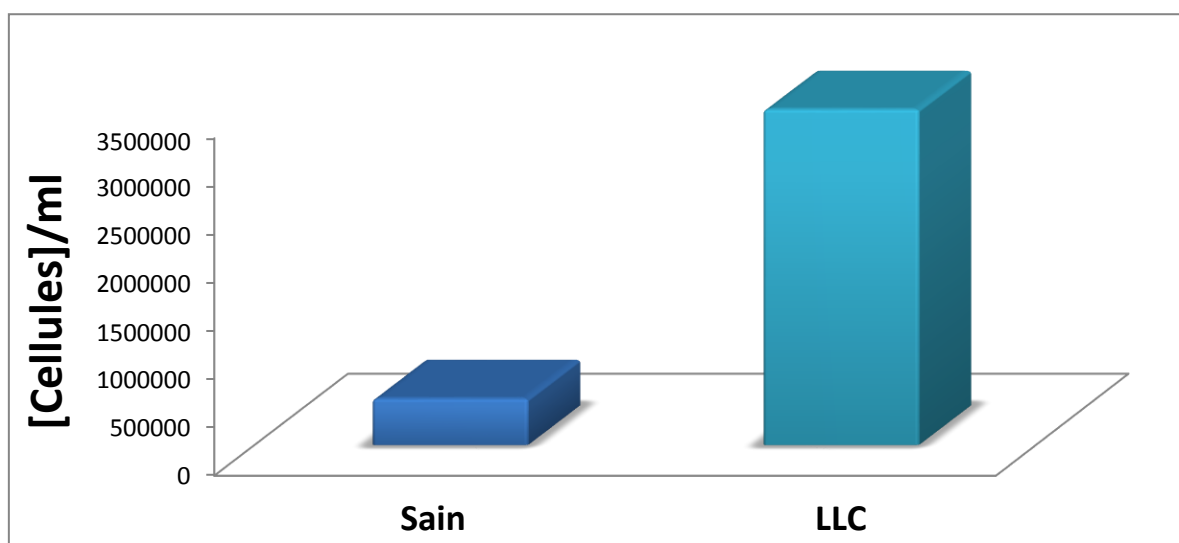


Figure 43 : Représentation graphique du nombre de cellules PBMC isolées par Ficoll chez un individu sain et un patient atteint de la LLC exprimé en nombre de cellules/ml.

Tableau XIII : Numération des cellules PBMC isolées à partir d'un donneur sain et d'un patient atteint de la LLC sur cellule de Malassez.

Patient	Nombre de cellules/carré	Concentration cellules/ml
Sain	24	480000
LLC	174.28	3485600

3. Comparaison Immunophénotypique des cellules leucémiques LLC-B versus cellules du Lymphome Non Hodgkinien B (LNHB) :

Le suivi des marqueurs membranaires présents sur la surface des cellules leucémiques par procédé d'immunophénotypage à l'aide de la cytométrie en flux représente la méthode de choix pour distinguer entre les différents types de cellules malignes, ce qui permet de poser le diagnostic de manière précise. Au cours de ce travail, nous avons réalisé une étude comparative par immunophénotypage des lymphocytes malins provenant de 2 patients.

Chapitre IV : Résultats et discussion

Présentation des 2 patients :

Patient 1 : Agé de 82 ans , présente une cardiopathie et une hypertendu diabétique et un bon état générale avec un taux de GB de 30.25 g/l , HB=11.4g/dl, VGM=87.4.

- Présence d'une population lymphocytaire B >5 g/l décelé dans le prélèvement évoquant une probablement une leucémie lymphoïde chronique typique.

Patient 2 : âgé de 66 ans, présente une lymphocytose >5 g/l et une splénomégalie depuis 2 ans et un taux des GB de 53.69 g/l.

L'analyse immunophénotypique des cellules malignes par cytométrie en flux chez les 2 patients a révélé des différences considérables au niveau des types de marqueurs membranaires exprimés voir tableau-XIV.

Les différences les plus remarquables recensées sont :

- L'expression élevée du marqueur CD5 chez le patient-1 alors que les cellules malignes sont CD5 négatif chez le patient-2 ;
- Le CD79b est exprimé avec une forte intensité chez le patient2 par contre il est faiblement exprimé chez le patient1 ;
- Les lymphocytes du patient2 expriment fortement le récepteur BCR de type IgM; alors qu'il est quasiment absent chez le patient-1.
- La population lymphocytaire B chez le patient2 exprime une chaîne légère monotypique kappa ce qui correspond à un diagnostic d'un lymphome Non-Hodgkinien (LNHB). De plus, le patient concerné présente un score de Matutes de 0/5.

D'autre part, le patient1 affiche un immunotypage d'un score Matutes de 4/5 typique d'une LLC-B. La LLC –B et le LNHB sont tous les deux des lymphomes caractérisés par une accumulation anormale des lymphocytes B.

Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau XIV : Représentation en pourcentage des niveaux d'expression des différents marqueurs membranaires caractéristiques des cellules malignes des 2 patients.

Marqueur	Patient LLC (%)	Patient LNHB (%)
CD19	100	72
Kappa	42	93
Lambda	00	00
CD5	56	00
CD79b	53	70
FMC7	03	31
CD22	88	67
IgMs	00	84
CD20	97	78
CD10	00	00
CD25	05	70
CD11C	37	72
CD38	00	04
CD103	02	00
CD23	96	00

Chapitre IV : Résultats et discussion

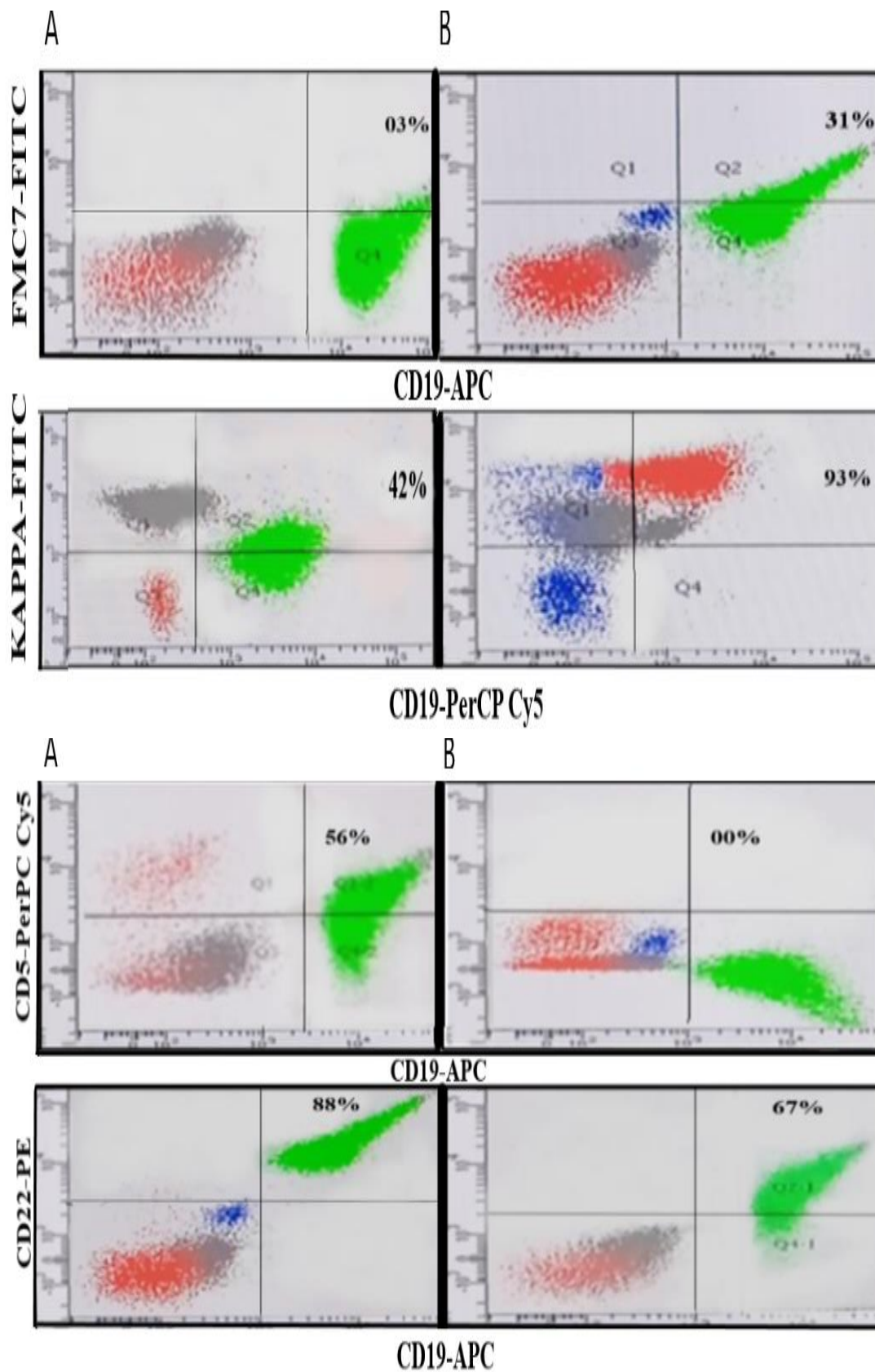


Figure 44 : photographie des résultats de l'immunophénotypage par CMF. , A : Patient1-LLC et B : Patient2 LNHB.

Chapitre IV : Résultats et discussion

4 . Typage HLA-A pour la recherche de compatibilité tissulaire

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons réalisé un test de compatibilité tissulaire entre un donneur et son receveur dans le contexte d'une allo-greffe de la moelle osseuse. Ce test concerne le gène HLA-A. Après purification de l'ADN génomique à partir des PBMC du donneur, 100 ng ont été utilisés pour le typage HLA-A. Le résultat du gel d'électrophorèse du typage est montré sur la figure-44. L'apparition des amplicons sur les pistes 5 et 6 du gel indique que le typage correspondant au HLA-A du donneur est le HLA-A*0203. Le typage d'autres gènes du système HLA de classe I et 2 sont requis pour la vérification de la compatibilité tissulaire entre donneur et receveur afin de procéder à la greffe de la moelle osseuse.

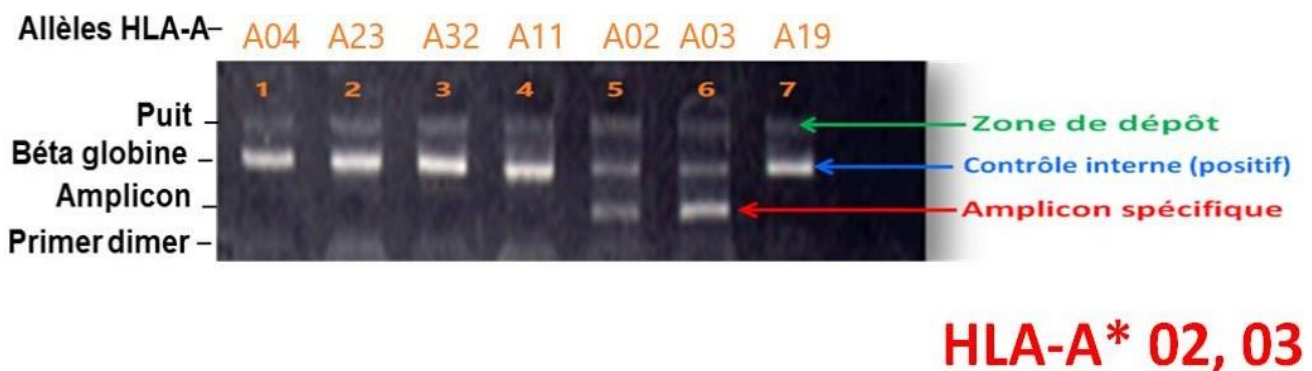


Figure 45 : Image du gel d'électrophorèse du résultat de typage HLA -A. Les amplifications sont observables sur les pistes A02 et A03. Le gène de la bêta-globine est utilisé comme contrôle interne.

Discussion, conclusion et perspectives

La leucémie lymphoïde chronique est caractérisée par l'accumulation de lymphocytes B monoclonaux CD5+ au niveau des organes lymphoïdes primaires et secondaires. La LLC correspond au type de leucémie le plus rencontré en occident. Les cellules leucémiques LLC-B présentent un profil d'évolution extrêmement variable, avec une capacité de survie allant de quelques mois à plusieurs années. Les progrès majeurs de la recherche ont permis d'identifier un nombre de marqueurs capables de prédire l'évolution de la maladie chez les patients atteints de la LLC. Particulièrement, le statut mutationnel des chaînes lourdes des Igs et la présence ou non d'anomalies chromosomales. Ces découvertes ont soulevé de nombreuses autres questions relatives à la biologie et le comportement des cellules leucémiques LLC-B. dans le présent travail nous avons essayé de suivre l'évolution de la LLC dans la région de Tizi Ouzou et environs et de mettre en place des systèmes pour l'analyse cellulaire et moléculaire des LLC afin d'accéder aux caractéristiques spécifiques de la LLC-B de la région.

Dans un premier nous avons mené une étude rétrospective des 32 dossiers de patients hospitalisés au niveau de CHU de Tizi Ouzou durant la période de 2019-2022. Une légère baisse du nombre de patients suivi dans le service au cours de cette période est observée. Cette décroissance peut être expliquer par des mesures préventives imposés par la pandémie du Covid ; cette maladie touche les personnes âgées dans 81.25 % des cas avec un sexe avec un ratio H/F de 2.55. La plupart des patients hospitalisés présentent une LLC à un immunophénotype typique avec un score de Matutes de 5/5. La majorité d'entre eux sont de classe C, synonyme de stade avancé de la maladie ; nécessitant des traitements et prises en charge plus que les classes A et B. Ces patients souffrent d'adénopathies et de Splénomégalie dus à l'accumulation anormale des lymphocytes B résistants à l'apoptose dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette résistance est expliquée par une surexpression anormale des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2.

Dans la seconde partie de notre travail, nous nous sommes intéressé à la caractérisation cellulaire et moléculaire de la LLC-B. l'examen FNS représente le premier outil qui permet de diagnostiquer la LLC après observation d'un défaut de numération sanguine avec un taux de lymphocytes $> 5g/l$, le frottis permet l'observation de la morphologie de lymphocytes B monoclonaux matures de petites tailles contenant un cytoplasme étroit et un noyau dense à chromatine partiellement agrégée ainsi que des ombres de Gumprecht ; nous avons également réalisé un frottis avec coloration MGG de la moelle osseuse provenant d'un patient LLC afin d'observer l'allure et la morphologie des cellules leucémiques de la moelle osseuse. Du fait de

l'importance du suivi des cellules LLC résidentes dans les organes lymphoïdes primaires et secondaires, nous avons procédé à une analyse histologique par coloration HE de biopsies de moelles provenant de patients LLC. Malheureusement notre démarche expérimentale nécessite des mises au points supplémentaires pour augmenter la résolution de la technique. La culture cellulaire de la LLC constitue une approche fondamentale pour la caractérisation cellulaire *in-vitro* de la LLC. Dans cette perspective, nous avons isolé des PBMC enrichi en cellules LLC à partir du sang périphérique de patients atteints de la LLC. Ces cellules sont ensuite comptées sur cellules de Malassez. Malheureusement nous n'avons pas pu accéder à la mesure de la viabilité de ces cellules par manque de réactifs. Ces cellules LLC isolées peuvent être utilisées pour réaliser différents tests cellulaires. A partir de ces cellules PBMC nous avons purifié l'ADN génomique en utilisant le kit Qiagen. Cet ADN a servi pour la réalisation d'un test de compatibilité tissulaire HLA partielle (HLA-A), ce test est important avant une greffe de moelle afin de contrôler la compatibilité entre donneur-receveur. L'immunophénotypage de la LLC par cytométrie en flux représente une démarche importante pour accéder aux marqueurs caractéristiques des cellules malignes. Dans notre étude nous avons réalisé une évaluation différentielle des différents marqueurs exprimés sur une LLC-B versus un lymphome non Hodgkinien B (LNHB). L'identification moléculaire de ces marqueurs comme CD38 et Zap70 est importante à la caractérisation de la LLC et à la prise en charge et traitements des patients. de nombreuses perspectives peuvent être soulever à concernant la compréhension de la LLC, tel que l'analyse histologique des différents stades de la LLC, l'isolement des cellules LLC à partir du sang périphérique et de la moelle osseuse et réaliser différents tests *in vitro* afin de les mieux caractériser. Le volet moléculaire peut être exploiter à travers des études cytogénétiques et le suivi du statut mutationnel des chaînes Igs.

Références bibliographiques

Uncategorized References

- ACHARYA, M., BORLAND, G., EDKINS, A. L., MACLELLAN, L. M., MATHESON, J., OZANNE, B. W. & CUSHLEY, W. 2010. CD23/FcepsilonRII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol*, 162, 12-23.
- AHMED, M., LI, L., PINNIX, C., DABAJA, B., NOMIE, K., LAM, L. & WANG, M. 2016. ATM mutation and radiosensitivity: An opportunity in the therapy of mantle cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 107, 14-19.
- ANDERSON, M. A., HUANG, D. & ROBERTS, A. 2014. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol*, 51, 219-27.
- AQEILAN, R. I., CALIN, G. A. & CROCE, C. M. 2010. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ*, 17, 215-20.
- BAILLY, S., CARTRON, G., CHAGANTI, S., CORDOBA, R., CORRADINI, P., DULL, J., FERRARINI, I., OSBORNE, W., ROSENWALD, A., SANCHO, J. M., TILLY, H., VAN DEN NESTE, E., VIARDOT, A. & VISCO, C. 2022. Targeting CD19 in diffuse large B-cell lymphoma: An expert opinion paper. *Hematol Oncol*, 40, 505-517.
- BINET, J. L., AUQUIER, A., DIGHIRO, G., CHASTANG, C., PIGUET, H., GOASGUEN, J., VAUGIER, G., POTRON, G., COLONA, P., OBERLING, F., THOMAS, M., TCHERNIA, G., JACQUILLAT, C., BOIVIN, P., LESTY, C., DUAULT, M. T., MONCONDUIT, M., BELABBES, S. & GREMY, F. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48, 198-206.
- BOSCH, F. & DALLA-FAVERA, R. 2019. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*, 16, 684-701.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- BURGER, J. A., LI, K. W., KEATING, M. J., SIVINA, M., AMER, A. M., GARG, N., FERRAJOLI, A., HUANG, X., KANTARJIAN, H., WIERDA, W. G., O'BRIEN, S., HELLERSTEIN, M. K., TURNER, S. M., EMSON, C. L., CHEN, S. S., YAN, X. J., WODARZ, D. & CHIORAZZI, N. 2017. Leukemia cell proliferation and death in chronic lymphocytic leukemia patients on therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *JCI Insight*, 2, e89904.
- CALISSANO, C., DAMLE, R. N., HAYES, G., MURPHY, E. J., HELLERSTEIN, M. K., MORENO, C., SISON, C., KAUFMAN, M. S., KOLITZ, J. E., ALLEN, S. L., RAI, K. R. & CHIORAZZI, N. 2009. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 114, 4832-42.
- CHAPIRO, E., LEPORRIER, N., RADFORD-WEISS, I., BASTARD, C., MOSSAFA, H., LEROUX, D., TIGAUD, I., DE BRAEKELEER, M., TERRE, C., BRIZARD, F., CALLET-BAUCHU, E., STRUSKI, S., VERONESE, L., FERT-FERRER, S., TAVIAUX, S., LESTY, C., DAVI, F., MERLE-BERAL, H., BERNARD, O. A., SUTTON, L., RAYNAUD, S. D. & NGUYEN-KHAC, F. 2010. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res*, 34, 63-8.
- CHAUZEIX, J., LAFORET, M. P., DEVEZA, M., CROWTHER, L., MARCELLAUD, E., DEROUAULT, P., LIA, A. S., BOYER, F., BARGUES, N., OLOMBEL, G., JACCARD, A., FEUILLARD, J., GACHARD, N. & RIZZO, D. 2018. Normal serum

- protein electrophoresis and mutated IGHV genes detect very slowly evolving chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Med*, 7, 2621-2628.
- CHEN, J., SATHIASEELAN, V., MOORE, A., TAN, S., CHILAMAKURI, C. S. R., ROAMIO FRANKLIN, V. N., SHAHSAVARI, A., JAKWERTH, C. A., HAKE, S. B., WARREN, A. J., MOHORIANU, I., D'SANTOS, C. & RINGSHAUSEN, I. 2021. ZAP-70 constitutively regulates gene expression and protein synthesis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 137, 3629-3640.
- CHIORAZZI, N., HATZI, K. & ALBESIANO, E. 2005. B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann N Y Acad Sci*, 1062, 1-12.
- CHOI, J., ZHOU, N. & BUSINO, L. 2019. KLHL6 is a tumor suppressor gene in diffuse large B-cell lymphoma. *Cell Cycle*, 18, 249-256.
- CILLONI, D., ITRI, F., BONUOMO, V. & PETITI, J. 2022. SF3B1 Mutations in Hematological Malignancies. *Cancers (Basel)*, 14.
- COSSON, A., CHAPIRO, E., BOUGACHA, N., LAMBERT, J., HERBI, L., CUNG, H. A., ALGRIN, C., KEREN, B., DAMM, F., GABILLAUD, C., BRUNELLE-NAVAS, M. N., DAVI, F., MERLE-BERAL, H., LE GARFF-TAVERNIER, M., ROOS-WEIL, D., CHOQUET, S., UZUNOV, M., MOREL, V., LEBLOND, V., MALOUM, K., LEPRETRE, S., FEUGIER, P., LESTY, C., LEJEUNE, J., SUTTON, L., LANDESMAN, Y., SUSIN, S. A. & NGUYEN-KHAC, F. 2017. Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: analysis of the central role of XPO1. *Leukemia*, 31, 1625-1629.
- CRAMER, P. & HALLEK, M. 2011. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol*, 8, 38-47.
- CROMBIE, J. & DAVIDS, M. S. 2017. IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, 92, 1393-1397.
- DAMLE, R. N., TEMBURNI, S., CALISSANO, C., YANCOPOULOS, S., BANAPOUR, T., SISON, C., ALLEN, S. L., RAI, K. R. & CHIORAZZI, N. 2007. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*, 110, 3352-9.
- DECKER, T., SCHNELLER, F., HIPPE, S., MIETHING, C., JAHN, T., DUYSSTER, J. & PESCHEL, C. 2002. Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia*, 16, 327-34.
- DEFOICHE, J., DEBACQ, C., ASQUITH, B., ZHANG, Y., BURNY, A., BRON, D., LAGNEAUX, L., MACALLAN, D. & WILLEMS, L. 2008. Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 143, 240-7.
- DELGADO, J., NADEU, F., COLOMER, D. & CAMPO, E. 2020. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*, 105, 2205-2217.
- DHALLA, F., LUCAS, M., SCHUH, A., BHOLE, M., JAIN, R., PATEL, S. Y., MISBAH, S. & CHAPEL, H. 2014. Antibody deficiency secondary to chronic lymphocytic leukemia: Should patients be treated with prophylactic replacement immunoglobulin? *J Clin Immunol*, 34, 277-82.
- DICKER, F., HERHOLZ, H., SCHNITTGER, S., NAKAO, A., PATTEN, N., WU, L., KERN, W., HAFERLACH, T. & HAFERLACH, C. 2009. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, 23, 117-24.
- DIERLAMM, J., MICHAUX, L., CRIEL, A., WLODARSKA, I., VAN DEN BERGHE, H. & HOSSFELD, D. K. 1997. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications. *Cancer Genet Cytogenet*, 94, 27-35.

- DOHNER, H., STILGENBAUER, S., BENNER, A., LEUPOLT, E., KROBER, A., BULLINGER, L., DOHNER, K., BENTZ, M. & LICHTER, P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343, 1910-6.
- DREGER, P., SCHNAITER, A., ZENZ, T., BOTTCHE, S., ROSSI, M., PASCHKA, P., BUHLER, A., DIETRICH, S., BUSCH, R., RITGEN, M., BUNJES, D., ZEIS, M., STADLER, M., UHAREK, L., SCHEID, C., HEGENBART, U., HALLEK, M., KNEBA, M., SCHMITZ, N., DOHNER, H. & STILGENBAUER, S. 2013. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood*, 121, 3284-8.
- DURIG, J., NUCKEL, H., CREMER, M., FUHRER, A., HALFMAYER, K., FANDREY, J., MOROY, T., KLEIN-HITPASS, L. & DUHRSEN, U. 2003. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17, 2426-34.
- EDELMANN, J., HOLZMANN, K., MILLER, F., WINKLER, D., BUHLER, A., ZENZ, T., BULLINGER, L., KUHN, M. W., GERHARDINGER, A., BLOEHDORN, J., RADTKE, I., SU, X., MA, J., POUNDS, S., HALLEK, M., LICHTER, P., KORBEL, J., BUSCH, R., MERTENS, D., DOWNING, J. R., STILGENBAUER, S. & DOHNER, H. 2012. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*, 120, 4783-94.
- FABBRI, G. & DALLA-FAVERA, R. 2016. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 16, 145-62.
- FARHANA, A. & LAPPIN, S. L. 2023. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Sarah Lappin declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
- FEY, M. F. 2007. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol*, 18 Suppl 1, i9-i13.
- FLETCHER, S. 2019. MCL-1 inhibitors - where are we now (2019)? *Expert Opin Ther Pat*, 29, 909-919.
- FLORES-ROMERO, H., HOHORST, L., JOHN, M., ALBERT, M. C., KING, L. E., BECKMANN, L., SZABO, T., HERTLEIN, V., LUO, X., VILLUNGER, A., FRENZEL, L. P., KASHKAR, H. & GARCIA-SAEZ, A. J. 2022. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. *EMBO J*, 41, e108690.
- FORCONI, F. & MOSS, P. 2015. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*, 126, 573-81.
- FRAZZI, R. 2021. BIRC3 and BIRC5: multi-faceted inhibitors in cancer. *Cell Biosci*, 11, 8.
- GASSNER, F. J., WEISS, L., GEISBERGER, R., HOFBAUER, J. P., EGLE, A., HARTMANN, T. N., GREIL, R. & TINHOFER, I. 2011. Fludarabine modulates composition and function of the T cell pool in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Immunol Immunother*, 60, 75-85.
- GENTILE, M., SHANAFELT, T. D., ROSSI, D., LAURENTI, L., MAURO, F. R., MOLICA, S., CUTRONA, G., UCCELLO, G., CAMPANELLI, M., VIGNA, E., TRIPEPI, G., CHAFFEE, K. G., PARIKH, S. A., BOSSIO, S., RECCHIA, A. G., INNOCENTI, I., PASQUALE, R., NERI, A., FERRARINI, M., GAIDANO, G., FOA, R. & MORABITO, F. 2016. Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood*, 128, 2093-2095.
- GHAMLOUCH, H., NGUYEN-KHAC, F. & BERNARD, O. A. 2017. Chronic lymphocytic leukaemia genomics and the precision medicine era. *Br J Haematol*, 178, 852-870.
- GRELIER, A., LE GARFF-TAVERNIER, M., NAUWELAERS, F., SARFATI, M. & MERLEBERAL, H. 2014. Soluble CD23 measurement by CBA: a convenient and reliable quantification method in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, 86, 91-7.
- HAFERLACH, C., DICKER, F., SCHNITTGER, S., KERN, W. & HAFERLACH, T. 2007.

- Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*, 21, 2442-51.
- HALLEK, M. 2017. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, 92, 946-965.
- HALLEK, M., CHESON, B. D., CATOVSKY, D., CALIGARIS-CAPPIO, F., DIGHIERO, G., DOHNER, H., HILLMEN, P., KEATING, M., MONTSERRAT, E., CHIORAZZI, N., STILGENBAUER, S., RAI, K. R., BYRD, J. C., EICHHORST, B., O'BRIEN, S., ROBAK, T., SEYMOUR, J. F. & KIPPS, T. J. 2018. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131, 2745-2760.
- HALLEK, M., LANGENMAYER, I., NERL, C., KNAUF, W., DIETZFELBINGER, H., ADORF, D., OSTWALD, M., BUSCH, R., KUHN-HALLEK, I., THIEL, E. & EMMERICH, B. 1999. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 93, 1732-7.
- HALLEK, M., WANDERS, L., OSTWALD, M., BUSCH, R., SENEKOWITSCH, R., STERN, S., SCHICK, H. D., KUHN-HALLEK, I. & EMMERICH, B. 1996. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*, 22, 439-47.
- HERNDON, T. M., CHEN, S. S., SABA, N. S., VALDEZ, J., EMSON, C., GATMAITAN, M., TIAN, X., HUGHES, T. E., SUN, C., ARTHUR, D. C., STETLER-STEVENSON, M., YUAN, C. M., NIEMANN, C. U., MARTI, G. E., AUE, G., SOTO, S., FAROOQUI, M. Z. H., HERMAN, S. E. M., CHIORAZZI, N. & WIESTNER, A. 2017. Direct in vivo evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia*, 31, 1340-1347.
- HISADA, M., BIGGAR, R. J., GREENE, M. H., FRAUMENI, J. F., JR. & TRAVIS, L. B. 2001. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 98, 1979-81.
- HOELLENRIEGEL, J., COFFEY, G. P., SINHA, U., PANDEY, A., SIVINA, M., FERRAJOLI, A., RAVANDI, F., WIERDA, W. G., O'BRIEN, S., KEATING, M. J. & BURGER, J. A. 2012. Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia*, 26, 1576-83.
- HUSBY, S. & GRONBAEK, K. 2017. Mature lymphoid malignancies: origin, stem cells, and chronicity. *Blood Adv*, 1, 2444-2455.
- JAGLOWSKI, S. M., RUPPERT, A. S., HEEREMA, N. A., BINGMAN, A., FLYNN, J. M., GREVER, M. R., JONES, J. A., ELDER, P., DEVINE, S. M., BYRD, J. C. & ANDRITSOS, L. A. 2012. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 159, 82-7.
- JAIN, P., KANAGAL-SHAMANNA, R., WIERDA, W., KEATING, M., SARWARI, N., ROZOVSKI, U., THOMPSON, P., BURGER, J., KANTARJIAN, H., PATEL, K. P., MEDEIROS, L. J., LUTHRA, R. & ESTROV, Z. 2016. Clinical and molecular characteristics of XPO1 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, 91, E478-E479.
- JOHNSON, G. G., SHERRINGTON, P. D., CARTER, A., LIN, K., LILOGLOU, T., FIELD, J. K. & PETTITT, A. R. 2009. A novel type of p53 pathway dysfunction in chronic lymphocytic leukemia resulting from two interacting single nucleotide polymorphisms within the p21 gene. *Cancer Res*, 69, 5210-7.
- JONES, J. A., MATO, A. R., WIERDA, W. G., DAVIDS, M. S., CHOI, M., CHESON, B. D., FURMAN, R. R., LAMANNA, N., BARR, P. M., ZHOU, L., CHYLA, B., SALEM, A.

- H., VERDUGO, M., HUMERICKHOUSE, R. A., POTLURI, J., COUTRE, S., WOYACH, J. & BYRD, J. C. 2018. Venetoclax for chronic lymphocytic leukaemia progressing after ibrutinib: an interim analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 19, 65-75.
- KANG, C. & BLAIR, H. A. 2022. Ofatumumab: A Review in Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. *Drugs*, 82, 55-62.
- KIM, J. & CHAN, J. J. 2017. Cyclophosphamide in dermatology. *Australas J Dermatol*, 58, 5-17.
- KIPPS, T. J., STEVENSON, F. K., WU, C. J., CROCE, C. M., PACKHAM, G., WIERDA, W. G., O'BRIEN, S., GRIBBEN, J. & RAI, K. 2017. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 16096.
- KLEIN, U., TU, Y., STOLOVITZKY, G. A., MATTIOLI, M., CATTORETTI, G., HUSSON, H., FREEDMAN, A., INGHIRAMI, G., CRO, L., BALDINI, L., NERI, A., CALIFANO, A. & DALLA-FAVERA, R. 2001. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*, 194, 1625-38.
- KOJIMA, K., DUVVURI, S., RUVOLO, V., SAMANIEGO, F., YOUNES, A. & ANDREEFF, M. 2012. Decreased sensitivity of 17p-deleted chronic lymphocytic leukemia cells to a small molecule BCL-2 antagonist ABT-737. *Cancer*, 118, 1023-31.
- LANASA, M. C. 2010. Novel insights into the biology of CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010, 70-6.
- LANZA, F., MAFFINI, E., RONDONI, M., MASSARI, E., FAINI, A. C. & MALAVASI, F. 2020. CD22 Expression in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biological Significance and Implications for Inotuzumab Therapy in Adults. *Cancers (Basel)*, 12.
- LE GUYADER-PEYROU, S., BELOT, A., MAYNADIE, M., BINDER-FOUCARD, F., REMONTET, L., TROUSSARD, X., BOSSARD, N., MONNEREAU, A. & FRENCH NETWORK OF CANCER, R. 2016. Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 64, 103-12.
- LEBIEN, T. W. & TEDDER, T. F. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112, 1570-80.
- MALAVASI, F., DEAGLIO, S., FUNARO, A., FERRERO, E., HORENSTEIN, A. L., ORTOLAN, E., VAISITTI, T. & AYDIN, S. 2008. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*, 88, 841-86.
- MALCIKOVA, J., SMARDOVA, J., ROCNOVA, L., TICHY, B., KUGLIK, P., VRANOVA, V., CEJKOVA, S., SVITAKOVA, M., SKUHROVA FRANCOVA, H., BRYCHTOVA, Y., DOUBEK, M., BREJCHA, M., KLABUSAY, M., MAYER, J., POSPISILOVA, S. & TRBUSEK, M. 2009. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*, 114, 5307-14.
- MATUTES, E., OWUSU-ANKOMAH, K., MORILLA, R., GARCIA MARCO, J., HOULIHAN, A., QUE, T. H. & CATOVSKY, D. 1994. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8, 1640-5.
- MAYR, C., SPEICHER, M. R., KOFLER, D. M., BUHMANN, R., STREHL, J., BUSCH, R., HALLEK, M. & WENDTNER, C. M. 2006. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107, 742-51.
- MESSMER, B. T., MESSMER, D., ALLEN, S. L., KOLITZ, J. E., KUDALKAR, P., CESAR, D., MURPHY, E. J., KODURU, P., FERRARINI, M., ZUPO, S., CUTRONA, G., DAMLE, R. N., WASIL, T., RAI, K. R., HELLERSTEIN, M. K. & CHIORAZZI, N. 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*, 115, 755-64.

- MIAN, M., RINALDI, A., MENSAH, A. A., ROSSI, D., LADETTO, M., FORCONI, F., MARASCA, R., UHR, M., STUSSI, G., KWEE, I., CAVALLI, F., GAIDANO, G., ZUCCA, E. & BERTONI, F. 2013. Large genomic aberrations detected by SNP array are independent prognosticators of a shorter time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia patients with normal FISH. *Ann Oncol*, 24, 1378-84.
- MIRANDA-FILHO, A., PINEROS, M., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., MONNEREAU, A. & BRAY, F. 2018. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*, 5, e14-e24.
- MISHRA, D., SINGH, S. & NARAYAN, G. 2016. Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and Prognosis. *Mol Biol Int*, 2016, 4328697.
- MORABITO, F., CUTRONA, G., MOSCA, L., D'ANCA, M., MATIS, S., GENTILE, M., VIGNA, E., COLOMBO, M., RECCHIA, A. G., BOSSIO, S., DE STEFANO, L., MAURA, F., MANZONI, M., ILARIUCCI, F., CONSOLI, U., VINCELLI, I., MUSOLINO, C., CORTELEZZI, A., MOLICA, S., FERRARINI, M. & NERI, A. 2015. Surrogate molecular markers for IGHV mutational status in chronic lymphocytic leukemia for predicting time to first treatment. *Leuk Res*, 39, 840-5.
- MOREAU, E. J., MATUTES, E., A'HERN, R. P., MORILLA, A. M., MORILLA, R. M., OWUSU-ANKOMAH, K. A., SEON, B. K. & CATOVSKY, D. 1997. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*, 108, 378-82.
- NGUYEN-KHAC, F., CHAPIRO, E., LESTY, C., GRELIER, A., LUQUET, I., RADFORD-WEISS, I., LEFEBVRE, C., FERT-FERRER, S., CALLET-BAUCHU, E., LIPPERT, E., RAGGUENEAU, V., MICHAUX, L., BARIN, C., COLLONGE-RAME, M. A., MUGNERET, F., ECLACHE, V., TAVIAUX, S., DASTUGUE, N., RICHEBOURG, S., STRUSKI, S., TALMANT, P., BARANGER, L., GACHARD, N., GERVAIS, C., QUILICHINI, B., SETTEGRANA, C., MALOUM, K., DAVI, F. & MERLE-BERAL, H. 2011. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res*, 1, 13-21.
- OUILLETTE, P., ERBA, H., KUJAWSKI, L., KAMINSKI, M., SHEDDEN, K. & MALEK, S. N. 2008. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*, 68, 1012-21.
- PACKHAM, G. & STEVENSON, F. K. 2005. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 114, 441-9.
- PADARO, E., LAYIBO, Y., KUEVIAKOE, I. D. M., AGBETIAFA, K., MAGNANG, H., KOUDOKPO, N. D. A., MAWUSSI, K. & VOVOR, A. 2019. [Characteristics of chronic lymphocytic leukemia in Togo]. *Pan Afr Med J*, 34, 84.
- PALANICHAMY, A., BARNARD, J., ZHENG, B., OWEN, T., QUACH, T., WEI, C., LOONEY, R. J., SANZ, I. & ANOLIK, J. H. 2009. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol*, 182, 5982-93.
- PARIKH, S. A. & SHANAFELT, T. D. 2016. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, 43, 233-40.
- PAVLASOVA, G. & MRAZ, M. 2020. The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*, 105, 1494-1506.
- PERINI, G. F., RIBEIRO, G. N., PINTO NETO, J. V., CAMPOS, L. T. & HAMERSCHLAK, N. 2018. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. *J Hematol Oncol*, 11, 65.
- PETITJEAN, A., MATHE, E., KATO, S., ISHIOKA, C., TAVTIGIAN, S. V., HAINAUT, P. & OLIVIER, M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*, 28, 622-9.
- PINTO, E. M., FIGUEIREDO, B. C., CHEN, W., GALVAO, H. C. R., FORMIGA, M. N.,

- FRAGOSO, M., ASHTON-PROLLA, P., RIBEIRO, E., FELIX, G., COSTA, T. E. B., SAVAGE, S. A., YEAGER, M., PALMERO, E. I., VOLC, S., SALVADOR, H., FUSTER-SOLER, J. L., LAVARINO, C., CHANTADA, G., VAUR, D., ODONE-FILHO, V., BRUGIERES, L., ELSE, T., STOFFEL, E. M., MAXWELL, K. N., ACHATZ, M. I., KOWALSKI, L., DE ANDRADE, K. C., PAPPO, A., LETOUZE, E., LATRONICO, A. C., MENDONCA, B. B., ALMEIDA, M. Q., BRONDANI, V. B., BITTAR, C. M., SOARES, E. W. S., MATHIAS, C., RAMOS, C. R. N., MACHADO, M., ZHOU, W., JONES, K., VOGT, A., KLINCHA, P. P., SANTIAGO, K. M., KOMECHEN, H., PARAIZO, M. M., PARISE, I. Z. S., HAMILTON, K. V., WANG, J., RAMPERSAUD, E., CLAY, M. R., MURPHY, A. J., LALLI, E., NICHOLS, K. E., RIBEIRO, R. C., RODRIGUEZ-GALINDO, C., KORBONITS, M., ZHANG, J., THOMAS, M. G., CONNELLY, J. P., PRUETT-MILLER, S., DIEKMANN, Y., NEALE, G., WU, G. & ZAMBETTI, G. P. 2020. XAF1 as a modifier of p53 function and cancer susceptibility. *Sci Adv*, 6, eaba3231.
- PONADER, S., CHEN, S. S., BUGGY, J. J., BALAKRISHNAN, K., GANDHI, V., WIERDA, W. G., KEATING, M. J., O'BRIEN, S., CHIORAZZI, N. & BURGER, J. A. 2012. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*, 119, 1182-9.
- PUIGGROS, A., BLANCO, G. & ESPINET, B. 2014. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int*, 2014, 435983.
- PUT, N., KONINGS, P., RACK, K., JAMAR, M., VAN ROY, N., LIBOUTON, J. M., VANNUFFEL, P., SARTENAER, D., AMEYE, G., SPELEMAN, F., HERENS, C., POIREL, H. A., MOREAU, Y., HAGEMEIJER, A., VANDENBERGHE, P., MICHAUX, L. & BELGIAN CYTOGENETIC GROUP FOR, H.-O. 2009. Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 843-53.
- PUT, N., VAN ROOSBROECK, K., KONINGS, P., MEEUS, P., BRUSSELMANS, C., RACK, K., GERVAIS, C., NGUYEN-KHAC, F., CHAPIRO, E., RADFORD-WEISS, I., STRUSKI, S., DASTUGUE, N., GACHARD, N., LEFEBVRE, C., BARIN, C., ECLACHE, V., FERT-FERRER, S., LAIBE, S., MOZZICONACCI, M. J., QUILICHINI, B., POIREL, H. A., WLODARSKA, I., HAGEMEIJER, A., MOREAU, Y., VANDENBERGHE, P., MICHAUX, L., BCGHO & THE, G. 2012. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol*, 91, 863-73.
- PUTOWSKI, M. & GIANNOPOULOS, K. 2021. Perspectives on Precision Medicine in Chronic Lymphocytic Leukemia: Targeting Recurrent Mutations-NOTCH1, SF3B1, MYD88, BIRC3. *J Clin Med*, 10.
- QIAN, S., WEI, Z., YANG, W., HUANG, J., YANG, Y. & WANG, J. 2022. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol*, 12, 985363.
- RADAEV, S., ZOU, Z., TOLAR, P., NGUYEN, K., NGUYEN, A., KRUEGER, P. D., STUTZMAN, N., PIERCE, S. & SUN, P. D. 2010. Structural and functional studies of Igalphabeta and its assembly with the B cell antigen receptor. *Structure*, 18, 934-43.
- RAI, K. R. & JAIN, P. 2016. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol*, 91, 330-40.
- RAI, K. R., SAWITSKY, A., CRONKITE, E. P., CHANANA, A. D., LEVY, R. N. & PASTERNAK, B. S. 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46, 219-34.
- RICHARDSON, S. J., MATTHEWS, C., CATHERWOOD, M. A., ALEXANDER, H. D., CAREY, B. S., FARRUGIA, J., GARDINER, A., MOULD, S., OSCIER, D., COPPLESTONE, J. A. & PRENTICE, A. G. 2006. ZAP-70 expression is associated

- with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 107, 3584-92.
- RODRIGUEZ, A. E., ROBLEDO, C., GARCIA, J. L., GONZALEZ, M., GUTIERREZ, N. C., HERNANDEZ, J. A., SANDOVAL, V., GARCIA DE COCA, A., RECIO, I., RISUENO, A., MARTIN-NUNEZ, G., GARCIA, E., FISAC, R., CONDE, J., DE LAS RIVAS, J. & HERNANDEZ, J. M. 2012. Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Ann Oncol*, 23, 2138-2146.
- ROESSLER, S. & GROSSCHEDL, R. 2006. Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells. *Semin Immunol*, 18, 12-9.
- ROSE-ZERILLI, M. J., FORSTER, J., PARKER, H., PARKER, A., RODRIGUEZ, A. E., CHAPLIN, T., GARDINER, A., STEELE, A. J., COLLINS, A., YOUNG, B. D., SKOWRONSKA, A., CATOVSKY, D., STANKOVIC, T., OSCIER, D. G. & STREFFORD, J. C. 2014. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*, 99, 736-42.
- ROSENQUIST, R., CORTESE, D., BHOI, S., MANSOURI, L. & GUNNARSSON, R. 2013. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma*, 54, 2351-64.
- ROSSI, D., CERRI, M., DEAMBROGI, C., SOZZI, E., CRESTA, S., RASI, S., DE PAOLI, L., SPINA, V., GATTEI, V., CAPELLO, D., FORCONI, F., LAURIA, F. & GAIDANO, G. 2009. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*, 15, 995-1004.
- ROSSI, D. & GAIDANO, G. 2012. ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica*, 97, 5-8.
- ROSSI, D. & GAIDANO, G. 2016. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin Oncol*, 43, 311-9.
- ROSSI, D., RASI, S., SPINA, V., BRUSCAGGIN, A., MONTI, S., CIARDULLO, C., DEAMBROGI, C., KHIABANIAN, H., SERRA, R., BERTONI, F., FORCONI, F., LAURENTI, L., MARASCA, R., DAL-BO, M., ROSSI, F. M., BULIAN, P., NOMDEDEU, J., DEL POETA, G., GATTEI, V., PASQUALUCCI, L., RABADAN, R., FOA, R., DALLA-FAVERA, R. & GAIDANO, G. 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121, 1403-12.
- SALAWU, L., BOLARINWA, R. A. & DUROSINMI, M. A. 2010. Chronic lymphocytic leukaemia: a-twenty-years experience and problems in Ile-Ife, South-Western Nigeria. *Afr Health Sci*, 10, 187-92.
- SCARFO, L., FERRERI, A. J. & GHIA, P. 2016. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 104, 169-82.
- SCHIEBER, M. & MA, S. 2019. The expanding role of venetoclax in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Blood Lymphat Cancer*, 9, 9-17.
- SCHMID, T., MAIER, J., MARTIN, M., TASDOGAN, A., TAUSCH, E., BARTH, T. F. E., STILGENBAUER, S., BLOEHDORN, J., MOLLER, P. & MELLERT, K. 2021. U-RT1 - A new model for Richter transformation. *Neoplasia*, 23, 140-148.
- SCHROEDER, H. W., JR. & CAVACINI, L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S41-52.
- SEDLARIKOVA, L., PETRACKOVA, A., PAPAJKI, T., TURCSANYI, P. & KRIEGOVA, E. 2020. Resistance-Associated Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Treated With Novel Agents. *Front Oncol*, 10, 894.
- SENTURK YIKILMAZ, A., AKINCI, S., BAKANAY, S. M., ZENGİN, Z. B. & DILEK, I.

2020. Is Cd11c and Fmc7 Negativity in Chronic Lymphocytic Leukemia Poor Prognostic? *Indian J Hematol Blood Transfus*, 36, 84-90.
- SHIMIZU, K., KONNO, S., OZAKI, M., UMEZAWA, K., YAMASHITA, K., TODO, S. & NISHIMURA, M. 2012. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel NF-kappaB inhibitor, inhibits allergic inflammation and airway remodelling in murine models of asthma. *Clin Exp Allergy*, 42, 1273-81.
- SMITH, M. R. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22, 7359-68.
- STRATI, P., PARIKH, S. A., CHAFFEE, K. G., ACHENBACH, S. J., SLAGER, S. L., CALL, T. G., DING, W., JELINEK, D. F., HANSON, C. A., KAY, N. E. & SHANAFELT, T. D. 2017. CD49d associates with nodal presentation and subsequent development of lymphadenopathy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 178, 99-105.
- TARDIVON, D., ANTOSZEWSKI, M., ZANGGER, N., NKOSI, M., SORDET-DESSIMOZ, J., HENDRIKS, R., KOCH, U. & RADTKE, F. 2021. Notch signaling promotes disease initiation and progression in murine chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 137, 3079-3092.
- TAUSCH, E. & STILGENBAUER, S. 2020. BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia - uncommon and unfavorable. *Haematologica*, 105, 255-256.
- TEN HACKEN, E. & BURGER, J. A. 2016. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 401-413.
- THOMPSON, P. A., O'BRIEN, S. M., WIERDA, W. G., FERRAJOLI, A., STINGO, F., SMITH, S. C., BURGER, J. A., ESTROV, Z., JAIN, N., KANTARJIAN, H. M. & KEATING, M. J. 2015. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*, 121, 3612-21.
- TSANG, M. & PARIKH, S. A. 2017. A Concise Review of Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*, 12, 29-38.
- VAN DEN NESTE, E., ROBIN, V., FRANCA, J., HAGEMEIJER, A., STUL, M., VANDENBERGHE, P., DELANNOY, A., SONET, A., DENEYS, V., COSTANTINI, S., FERRANT, A., ROBERT, A. & MICHAUX, L. 2007. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia*, 21, 1715-22.
- WALKER, J. S., HING, Z. A., HARRINGTON, B., BAUMHARDT, J., OZER, H. G., LEHMAN, A., GIACOPELLI, B., BEAVER, L., WILLIAMS, K., SKINNER, J. N., CEMPRE, C. B., SUN, Q., SHACHAM, S., STROMBERG, B. R., SUMMERS, M. K., ABRUZZO, L. V., RASSENTI, L., KIPPS, T. J., PARIKH, S., KAY, N. E., ROGERS, K. A., WOYACH, J. A., COPPOLA, V., CHOOK, Y. M., OAKES, C., BYRD, J. C. & LAPALOMBELLA, R. 2021. Recurrent XPO1 mutations alter pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol*, 14, 17.
- WANG, H., GUO, M., WEI, H. & CHEN, Y. 2021. Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. *J Hematol Oncol*, 14, 67.
- WANG, H., KADLECEK, T. A., AU-YEUNG, B. B., GOODFELLOW, H. E., HSU, L. Y., FREEDMAN, T. S. & WEISS, A. 2010. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a002279.
- WANG, L., LAWRENCE, M. S., WAN, Y., STOJANOV, P., SOUGNEZ, C., STEVENSON, K., WERNER, L., SIVACHENKO, A., DELUCA, D. S., ZHANG, L., ZHANG, W., VARTANOV, A. R., FERNANDES, S. M., GOLDSTEIN, N. R., FOLCO, E. G., CIBULSKIS, K., TESAR, B., SIEVERS, Q. L., SHEFLER, E., GABRIEL, S.,

- HACOHEN, N., REED, R., MEYERSON, M., GOLUB, T. R., LANDER, E. S., NEUBERG, D., BROWN, J. R., GETZ, G. & WU, C. J. 2011. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 365, 2497-506.
- WOYACH, J. A., JOHNSON, A. J. & BYRD, J. C. 2012. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*, 120, 1175-84.
- YEH, C. H., BELLON, M. & NICOT, C. 2018. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol Cancer*, 17, 115.
- YUMIMOTO, K. & NAKAYAMA, K. I. 2020. Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor. *Semin Cancer Biol*, 67, 1-15.
- ZENZ, T., HABE, S., DENZEL, T., MOHR, J., WINKLER, D., BUHLER, A., SARNO, A., GRONER, S., MERTENS, D., BUSCH, R., HALLEK, M., DOHNER, H. & STILGENBAUER, S. 2009. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*, 114, 2589-97.
- ZENZ, T., KROBER, A., SCHERER, K., HABE, S., BUHLER, A., BENNER, A., DENZEL, T., WINKLER, D., EDELMANN, J., SCHWANEN, C., DOHNER, H. & STILGENBAUER, S. 2008. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, 112, 3322-9.
- ZENZ, T., MERTENS, D., KUPPERS, R., DOHNER, H. & STILGENBAUER, S. 2010. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 10, 37-50.
- ZUCCHETTO, A., CALDANA, C., BENEDETTI, D., TISSINO, E., ROSSI, F. M., HUTTERER, E., POZZO, F., BOMBEN, R., DAL BO, M., D'ARENA, G., ZAJA, F., POZZATO, G., DI RAIMONDO, F., HARTMANN, T. N., ROSSI, D., GAIDANO, G., DEL POETA, G. & GATTEI, V. 2013. CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood*, 122, 3317-21.

Revue et thèses :

- ACHARYA, M., BORLAND, G., EDKINS, A. L., MACLELLAN, L. M., MATHESON, J., OZANNE, B. W. & CUSHLEY, W. 2010. CD23/FcepsilonRII: molecular multi-tasking. *Clin Exp Immunol*, 162, 12-23.
- AHMED, M., LI, L., PINNIX, C., DABAJA, B., NOMIE, K., LAM, L. & WANG, M. 2016. ATM mutation and radiosensitivity: An opportunity in the therapy of mantle cell lymphoma. *Crit Rev Oncol Hematol*, 107, 14-19.
- ANDERSON, M. A., HUANG, D. & ROBERTS, A. 2014. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. *Semin Hematol*, 51, 219-27.
- AQEILAN, R. I., CALIN, G. A. & CROCE, C. M. 2010. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ*, 17, 215-20.
- BAILLY, S., CARTRON, G., CHAGANTI, S., CORDOBA, R., CORRADINI, P., DULL, J., FERRARINI, I., OSBORNE, W., ROSENWALD, A., SANCHO, J. M., TILLY, H., VAN DEN NESTE, E., VIARDOT, A. & VISCO, C. 2022. Targeting CD19 in diffuse large B-cell lymphoma: An expert opinion paper. *Hematol Oncol*, 40, 505-517.
- BINET, J. L., AUQUIER, A., DIGHIRO, G., CHASTANG, C., PIGUET, H., GOASGUEN, J., VAUGIER, G., POTRON, G., COLONA, P., OBERLING, F., THOMAS, M., TCHERNIA, G., JACQUILLAT, C., BOIVIN, P., LESTY, C., DUAULT, M. T., MONCONDUIT, M., BELABBES, S. & GREMY, F. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival

- analysis. *Cancer*, 48, 198-206.
- BOSCH, F. & DALLA-FAVERA, R. 2019. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*, 16, 684-701.
- BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A. & JEMAL, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 68, 394-424.
- BURGER, J. A., LI, K. W., KEATING, M. J., SIVINA, M., AMER, A. M., GARG, N., FERRAJOLI, A., HUANG, X., KANTARJIAN, H., WIERDA, W. G., O'BRIEN, S., HELLERSTEIN, M. K., TURNER, S. M., EMSON, C. L., CHEN, S. S., YAN, X. J., WODARZ, D. & CHIORAZZI, N. 2017. Leukemia cell proliferation and death in chronic lymphocytic leukemia patients on therapy with the BTK inhibitor ibrutinib. *JCI Insight*, 2, e89904.
- CALISSANO, C., DAMLE, R. N., HAYES, G., MURPHY, E. J., HELLERSTEIN, M. K., MORENO, C., SISON, C., KAUFMAN, M. S., KOLITZ, J. E., ALLEN, S. L., RAI, K. R. & CHIORAZZI, N. 2009. In vivo intraclonal and interclonal kinetic heterogeneity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 114, 4832-42.
- CHAPIRO, E., LEPORRIER, N., RADFORD-WEISS, I., BASTARD, C., MOSSAFA, H., LEROUX, D., TIGAUD, I., DE BRAEKELEER, M., TERRE, C., BRIZARD, F., CALLET-BAUCHU, E., STRUSKI, S., VERONESE, L., FERT-FERRER, S., TAVIAUX, S., LESTY, C., DAVI, F., MERLE-BERAL, H., BERNARD, O. A., SUTTON, L., RAYNAUD, S. D. & NGUYEN-KHAC, F. 2010. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leuk Res*, 34, 63-8.
- CHAUZEIX, J., LAFORET, M. P., DEVEZA, M., CROWTHER, L., MARCELLAUD, E., DEROUAULT, P., LIA, A. S., BOYER, F., BARGUES, N., OLOMBEL, G., JACCARD, A., FEUILLARD, J., GACHARD, N. & RIZZO, D. 2018. Normal serum protein electrophoresis and mutated IGHV genes detect very slowly evolving chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Med*, 7, 2621-2628.
- CHEN, J., SATHIASEELAN, V., MOORE, A., TAN, S., CHILAMAKURI, C. S. R., ROAMIO FRANKLIN, V. N., SHAHSAVARI, A., JAKWERTH, C. A., HAKE, S. B., WARREN, A. J., MOHORIANU, I., D'SANTOS, C. & RINGSHAUSEN, I. 2021. ZAP-70 constitutively regulates gene expression and protein synthesis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 137, 3629-3640.
- CHIORAZZI, N., HATZI, K. & ALBESIANO, E. 2005. B-cell chronic lymphocytic leukemia, a clonal disease of B lymphocytes with receptors that vary in specificity for (auto)antigens. *Ann N Y Acad Sci*, 1062, 1-12.
- CHOI, J., ZHOU, N. & BUSINO, L. 2019. KLHL6 is a tumor suppressor gene in diffuse large B-cell lymphoma. *Cell Cycle*, 18, 249-256.
- CILLONI, D., ITRI, F., BONUOMO, V. & PETITI, J. 2022. SF3B1 Mutations in Hematological Malignancies. *Cancers (Basel)*, 14.
- COSSON, A., CHAPIRO, E., BOUGACHA, N., LAMBERT, J., HERBI, L., CUNG, H. A., ALGRIN, C., KEREN, B., DAMM, F., GABILLAUD, C., BRUNELLE-NAVAS, M. N., DAVI, F., MERLE-BERAL, H., LE GARFF-TAVERNIER, M., ROOS-WEIL, D., CHOQUET, S., UZUNOV, M., MOREL, V., LEBLOND, V., MALOUM, K., LEPRETRE, S., FEUGIER, P., LESTY, C., LEJEUNE, J., SUTTON, L., LANDESMAN, Y., SUSIN, S. A. & NGUYEN-KHAC, F. 2017. Gain in the short arm of chromosome 2 (2p+) induces gene overexpression and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: analysis of the central role of XPO1. *Leukemia*, 31, 1625-1629.
- CRAMER, P. & HALLEK, M. 2011. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol*, 8, 38-47.
- CROMBIE, J. & DAVIDS, M. S. 2017. IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic

- leukemia. *Am J Hematol*, 92, 1393-1397.
- DAMLE, R. N., TEMBURNI, S., CALISSANO, C., YANCOPOULOS, S., BANAPOUR, T., SISON, C., ALLEN, S. L., RAI, K. R. & CHIORAZZI, N. 2007. CD38 expression labels an activated subset within chronic lymphocytic leukemia clones enriched in proliferating B cells. *Blood*, 110, 3352-9.
- DECKER, T., SCHNELLER, F., HIPPEL, S., MIETHING, C., JAHN, T., DUYSER, J. & PESCHEL, C. 2002. Cell cycle progression of chronic lymphocytic leukemia cells is controlled by cyclin D2, cyclin D3, cyclin-dependent kinase (cdk) 4 and the cdk inhibitor p27. *Leukemia*, 16, 327-34.
- DEFOICHE, J., DEBACQ, C., ASQUITH, B., ZHANG, Y., BURNY, A., BRON, D., LAGNEAUX, L., MACALLAN, D. & WILLEMS, L. 2008. Reduction of B cell turnover in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 143, 240-7.
- DELGADO, J., NADEU, F., COLOMER, D. & CAMPO, E. 2020. Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*, 105, 2205-2217.
- DHALLA, F., LUCAS, M., SCHUH, A., BHOLE, M., JAIN, R., PATEL, S. Y., MISBAH, S. & CHAPEL, H. 2014. Antibody deficiency secondary to chronic lymphocytic leukemia: Should patients be treated with prophylactic replacement immunoglobulin? *J Clin Immunol*, 34, 277-82.
- DICKER, F., HERHOLZ, H., SCHNITTGER, S., NAKAO, A., PATTEN, N., WU, L., KERN, W., HAFERLACH, T. & HAFERLACH, C. 2009. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*, 23, 117-24.
- DIERLAMM, J., MICHAUX, L., CRIEL, A., WLODARSKA, I., VAN DEN BERGHE, H. & HOSSFELD, D. K. 1997. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and their clinical and prognostic implications. *Cancer Genet Cytogenet*, 94, 27-35.
- DOHNER, H., STILGENBAUER, S., BENNER, A., LEUPOLT, E., KROBER, A., BULLINGER, L., DOHNER, K., BENTZ, M. & LICHTER, P. 2000. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343, 1910-6.
- DREGER, P., SCHNAITER, A., ZENZ, T., BOTTCHER, S., ROSSI, M., PASCHKA, P., BUHLER, A., DIETRICH, S., BUSCH, R., RITGEN, M., BUNJES, D., ZEIS, M., STADLER, M., UHAREK, L., SCHEID, C., HEGENBART, U., HALLEK, M., KNEBA, M., SCHMITZ, N., DOHNER, H. & STILGENBAUER, S. 2013. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood*, 121, 3284-8.
- DURIG, J., NUCKEL, H., CREMER, M., FUHRER, A., HALFMEYER, K., FANDREY, J., MOROY, T., KLEIN-HITPASS, L. & DUHRSEN, U. 2003. ZAP-70 expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 17, 2426-34.
- EDELMANN, J., HOLZMANN, K., MILLER, F., WINKLER, D., BUHLER, A., ZENZ, T., BULLINGER, L., KUHN, M. W., GERHARDINGER, A., BLOEHDORN, J., RADTKE, I., SU, X., MA, J., POUNDS, S., HALLEK, M., LICHTER, P., KORBEL, J., BUSCH, R., MERTENS, D., DOWNING, J. R., STILGENBAUER, S. & DOHNER, H. 2012. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*, 120, 4783-94.
- FABBRI, G. & DALLA-FAVERA, R. 2016. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 16, 145-62.
- FARHANA, A. & LAPPIN, S. L. 2023. Biochemistry, Lactate Dehydrogenase. *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Sarah Lappin declares no relevant financial relationships with ineligible companies.
- FEY, M. F. 2007. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol*, 18 Suppl 1, i9-i13.

- FLETCHER, S. 2019. MCL-1 inhibitors - where are we now (2019)? *Expert Opin Ther Pat*, 29, 909-919.
- FLORES-ROMERO, H., HOHORST, L., JOHN, M., ALBERT, M. C., KING, L. E., BECKMANN, L., SZABO, T., HERTLEIN, V., LUO, X., VILLUNGER, A., FRENZEL, L. P., KASHKAR, H. & GARCIA-SAEZ, A. J. 2022. BCL-2-family protein tBID can act as a BAX-like effector of apoptosis. *EMBO J*, 41, e108690.
- FORCONI, F. & MOSS, P. 2015. Perturbation of the normal immune system in patients with CLL. *Blood*, 126, 573-81.
- FRAZZI, R. 2021. BIRC3 and BIRC5: multi-faceted inhibitors in cancer. *Cell Biosci*, 11, 8.
- GASSNER, F. J., WEISS, L., GEISBERGER, R., HOFBAUER, J. P., EGLE, A., HARTMANN, T. N., GREIL, R. & TINHOFER, I. 2011. Fludarabine modulates composition and function of the T cell pool in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Immunol Immunother*, 60, 75-85.
- GENTILE, M., SHANAFELT, T. D., ROSSI, D., LAURENTI, L., MAURO, F. R., MOLICA, S., CUTRONA, G., UCCELLO, G., CAMPANELLI, M., VIGNA, E., TRIPEPI, G., CHAFFEE, K. G., PARIKH, S. A., BOSSIO, S., RECCHIA, A. G., INNOCENTI, I., PASQUALE, R., NERI, A., FERRARINI, M., GAIDANO, G., FOA, R. & MORABITO, F. 2016. Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood*, 128, 2093-2095.
- GHAMLOUCH, H., NGUYEN-KHAC, F. & BERNARD, O. A. 2017. Chronic lymphocytic leukaemia genomics and the precision medicine era. *Br J Haematol*, 178, 852-870.
- GRELIER, A., LE GARFF-TAVERNIER, M., NAUWELAERS, F., SARFATI, M. & MERLEBERAL, H. 2014. Soluble CD23 measurement by CBA: a convenient and reliable quantification method in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*, 86, 91-7.
- HAFERLACH, C., DICKER, F., SCHNITTGER, S., KERN, W. & HAFERLACH, T. 2007. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia*, 21, 2442-51.
- HALLEK, M. 2017. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*, 92, 946-965.
- HALLEK, M., CHESON, B. D., CATOVSKY, D., CALIGARIS-CAPPIO, F., DIGHIRO, G., DOHNER, H., HILLMEN, P., KEATING, M., MONTSERRAT, E., CHIORAZZI, N., STILGENBAUER, S., RAI, K. R., BYRD, J. C., EICHHORST, B., O'BRIEN, S., ROBAK, T., SEYMOUR, J. F. & KIPPS, T. J. 2018. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, 131, 2745-2760.
- HALLEK, M., LANGENMAYER, I., NERL, C., KNAUF, W., DIETZFELBINGER, H., ADORF, D., OSTWALD, M., BUSCH, R., KUHN-HALLEK, I., THIEL, E. & EMMERICH, B. 1999. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 93, 1732-7.
- HALLEK, M., WANDERS, L., OSTWALD, M., BUSCH, R., SENEKOWITSCH, R., STERN, S., SCHICK, H. D., KUHN-HALLEK, I. & EMMERICH, B. 1996. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma*, 22, 439-47.
- HERNDON, T. M., CHEN, S. S., SABA, N. S., VALDEZ, J., EMSON, C., GATMAITAN, M., TIAN, X., HUGHES, T. E., SUN, C., ARTHUR, D. C., STETLER-STEVENSON, M., YUAN, C. M., NIEMANN, C. U., MARTI, G. E., AUE, G., SOTO, S., FAROOQUI, M. Z. H., HERMAN, S. E. M., CHIORAZZI, N. & WIESTNER, A. 2017. Direct in vivo

- evidence for increased proliferation of CLL cells in lymph nodes compared to bone marrow and peripheral blood. *Leukemia*, 31, 1340-1347.
- HISADA, M., BIGGAR, R. J., GREENE, M. H., FRAUMENI, J. F., JR. & TRAVIS, L. B. 2001. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 98, 1979-81.
- HOELLENRIEGEL, J., COFFEY, G. P., SINHA, U., PANDEY, A., SIVINA, M., FERRAJOLI, A., RAVANDI, F., WIERDA, W. G., O'BRIEN, S., KEATING, M. J. & BURGER, J. A. 2012. Selective, novel spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitors suppress chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and migration. *Leukemia*, 26, 1576-83.
- HUSBY, S. & GRONBAEK, K. 2017. Mature lymphoid malignancies: origin, stem cells, and chronicity. *Blood Adv*, 1, 2444-2455.
- JAGLOWSKI, S. M., RUPPERT, A. S., HEEREMA, N. A., BINGMAN, A., FLYNN, J. M., GREVER, M. R., JONES, J. A., ELDER, P., DEVINE, S. M., BYRD, J. C. & ANDRITSOS, L. A. 2012. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 159, 82-7.
- JAIN, P., KANAGAL-SHAMANNA, R., WIERDA, W., KEATING, M., SARWARI, N., ROZOVSKI, U., THOMPSON, P., BURGER, J., KANTARJIAN, H., PATEL, K. P., MEDEIROS, L. J., LUTHRA, R. & ESTROV, Z. 2016. Clinical and molecular characteristics of XPO1 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, 91, E478-E479.
- JOHNSON, G. G., SHERRINGTON, P. D., CARTER, A., LIN, K., LILOGLOU, T., FIELD, J. K. & PETTITT, A. R. 2009. A novel type of p53 pathway dysfunction in chronic lymphocytic leukemia resulting from two interacting single nucleotide polymorphisms within the p21 gene. *Cancer Res*, 69, 5210-7.
- JONES, J. A., MATO, A. R., WIERDA, W. G., DAVIDS, M. S., CHOI, M., CHESON, B. D., FURMAN, R. R., LAMANNA, N., BARR, P. M., ZHOU, L., CHYLA, B., SALEM, A. H., VERDUGO, M., HUMERICKHOUSE, R. A., POTLURI, J., COUTRE, S., WOYACH, J. & BYRD, J. C. 2018. Venetoclax for chronic lymphocytic leukaemia progressing after ibrutinib: an interim analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 19, 65-75.
- KANG, C. & BLAIR, H. A. 2022. Ofatumumab: A Review in Relapsing Forms of Multiple Sclerosis. *Drugs*, 82, 55-62.
- KIM, J. & CHAN, J. J. 2017. Cyclophosphamide in dermatology. *Australas J Dermatol*, 58, 5-17.
- KIPPS, T. J., STEVENSON, F. K., WU, C. J., CROCE, C. M., PACKHAM, G., WIERDA, W. G., O'BRIEN, S., GRIBBEN, J. & RAI, K. 2017. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 16096.
- KLEIN, U., TU, Y., STOLOVITZKY, G. A., MATTIOLI, M., CATTORETTI, G., HUSSON, H., FREEDMAN, A., INGHIRAMI, G., CRO, L., BALDINI, L., NERI, A., CALIFANO, A. & DALLA-FAVERA, R. 2001. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*, 194, 1625-38.
- KOJIMA, K., DUVVURI, S., RUVOLO, V., SAMANIEGO, F., YOUNES, A. & ANDREEFF, M. 2012. Decreased sensitivity of 17p-deleted chronic lymphocytic leukemia cells to a small molecule BCL-2 antagonist ABT-737. *Cancer*, 118, 1023-31.
- LANASA, M. C. 2010. Novel insights into the biology of CLL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2010, 70-6.
- LANZA, F., MAFFINI, E., RONDONI, M., MASSARI, E., FAINI, A. C. & MALAVASI, F. 2020. CD22 Expression in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biological Significance and Implications for Inotuzumab Therapy in Adults. *Cancers (Basel)*, 12.
- LE GUYADER-PEYROU, S., BELOT, A., MAYNADIE, M., BINDER-FOUCARD, F.,

- REMONTET, L., TROUSSARD, X., BOSSARD, N., MONNEREAU, A. & FRENCH NETWORK OF CANCER, R. 2016. Cancer incidence in France over the 1980-2012 period: Hematological malignancies. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 64, 103-12.
- LEBIEN, T. W. & TEDDER, T. F. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112, 1570-80.
- MALAVASI, F., DEAGLIO, S., FUNARO, A., FERRERO, E., HORENSTEIN, A. L., ORTOLAN, E., VAISITTI, T. & AYDIN, S. 2008. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*, 88, 841-86.
- MALCIKOVA, J., SMARDOVA, J., ROCNOVA, L., TICHY, B., KUGLIK, P., VRANOVA, V., CEJKOVA, S., SVITAKOVA, M., SKUHROVA FRANCOVA, H., BRYCHTOVA, Y., DOUBEK, M., BREJCHA, M., KLABUSAY, M., MAYER, J., POSPISILOVA, S. & TRBUSEK, M. 2009. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*, 114, 5307-14.
- MAYR, C., SPEICHER, M. R., KOFLER, D. M., BUHMANN, R., STREHL, J., BUSCH, R., HALLEK, M. & WENDTNER, C. M. 2006. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107, 742-51.
- MESSMER, B. T., MESSMER, D., ALLEN, S. L., KOLITZ, J. E., KUDALKAR, P., CESAR, D., MURPHY, E. J., KODURU, P., FERRARINI, M., ZUPO, S., CUTRONA, G., DAMLE, R. N., WASIL, T., RAI, K. R., HELLERSTEIN, M. K. & CHIORAZZI, N. 2005. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest*, 115, 755-64.
- MIAN, M., RINALDI, A., MENSAH, A. A., ROSSI, D., LADETTO, M., FORCONI, F., MARASCA, R., UHR, M., STUSSI, G., KWEE, I., CAVALLI, F., GAIDANO, G., ZUCCA, E. & BERTONI, F. 2013. Large genomic aberrations detected by SNP array are independent prognosticators of a shorter time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia patients with normal FISH. *Ann Oncol*, 24, 1378-84.
- MIRANDA-FILHO, A., PINEROS, M., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., MONNEREAU, A. & BRAY, F. 2018. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*, 5, e14-e24.
- MISHRA, D., SINGH, S. & NARAYAN, G. 2016. Role of B Cell Development Marker CD10 in Cancer Progression and Prognosis. *Mol Biol Int*, 2016, 4328697.
- MORABITO, F., CUTRONA, G., MOSCA, L., D'ANCA, M., MATIS, S., GENTILE, M., VIGNA, E., COLOMBO, M., RECCHIA, A. G., BOSSIO, S., DE STEFANO, L., MAURA, F., MANZONI, M., ILARIUCCI, F., CONSOLI, U., VINCELLI, I., MUSOLINO, C., CORTELEZZI, A., MOLICA, S., FERRARINI, M. & NERI, A. 2015. Surrogate molecular markers for IGHV mutational status in chronic lymphocytic leukemia for predicting time to first treatment. *Leuk Res*, 39, 840-5.
- MOREAU, E. J., MATUTES, E., A'HERN, R. P., MORILLA, A. M., MORILLA, R. M., OWUSU-ANKOMAH, K. A., SEON, B. K. & CATOVSKY, D. 1997. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*, 108, 378-82.
- NGUYEN-KHAC, F., CHAPIRO, E., LESTY, C., GRELIER, A., LUQUET, I., RADFORD-WEISS, I., LEFEBVRE, C., FERT-FERRER, S., CALLET-BAUCHU, E., LIPPERT, E., RAGGUENEAU, V., MICHAUX, L., BARIN, C., COLLONGE-RAME, M. A., MUGNERET, F., ECLACHE, V., TAVIAUX, S., DASTUGUE, N., RICHEBOURG, S., STRUSKI, S., TALMANT, P., BARANGER, L., GACHARD, N., GERVAIS, C., QUILICHINI, B., SETTEGRANA, C., MALOUM, K., DAVI, F. & MERLE-BERAL, H. 2011. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res*, 1, 13-21.
- OUILLETTE, P., ERBA, H., KUJAWSKI, L., KAMINSKI, M., SHEDDEN, K. & MALEK, S.

- N. 2008. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res*, 68, 1012-21.
- PACKHAM, G. & STEVENSON, F. K. 2005. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 114, 441-9.
- PADARO, E., LAYIBO, Y., KUEVIAKOE, I. D. M., AGBETIAFA, K., MAGNANG, H., KOUDOKPO, N. D. A., MAWUSSI, K. & VOVOR, A. 2019. [Characteristics of chronic lymphocytic leukemia in Togo]. *Pan Afr Med J*, 34, 84.
- PALANICHAMY, A., BARNARD, J., ZHENG, B., OWEN, T., QUACH, T., WEI, C., LOONEY, R. J., SANZ, I. & ANOLIK, J. H. 2009. Novel human transitional B cell populations revealed by B cell depletion therapy. *J Immunol*, 182, 5982-93.
- PARIKH, S. A. & SHANAFELT, T. D. 2016. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*, 43, 233-40.
- PAVLASOVA, G. & MRAZ, M. 2020. The regulation and function of CD20: an "enigma" of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*, 105, 1494-1506.
- PERINI, G. F., RIBEIRO, G. N., PINTO NETO, J. V., CAMPOS, L. T. & HAMERSCHLAK, N. 2018. BCL-2 as therapeutic target for hematological malignancies. *J Hematol Oncol*, 11, 65.
- PETITJEAN, A., MATHE, E., KATO, S., ISHIOKA, C., TAVTIGIAN, S. V., HAINAUT, P. & OLIVIER, M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*, 28, 622-9.
- PINTO, E. M., FIGUEIREDO, B. C., CHEN, W., GALVAO, H. C. R., FORMIGA, M. N., FRAGOSO, M., ASHTON-PROLLA, P., RIBEIRO, E., FELIX, G., COSTA, T. E. B., SAVAGE, S. A., YEAGER, M., PALMERO, E. I., VOLC, S., SALVADOR, H., FUSTER-SOLER, J. L., LAVARINO, C., CHANTADA, G., VAUR, D., ODONE-FILHO, V., BRUGIERES, L., ELSE, T., STOFFEL, E. M., MAXWELL, K. N., ACHATZ, M. I., KOWALSKI, L., DE ANDRADE, K. C., PAPPO, A., LETOUZE, E., LATRONICO, A. C., MENDONCA, B. B., ALMEIDA, M. Q., BRONDANI, V. B., BITTAR, C. M., SOARES, E. W. S., MATHIAS, C., RAMOS, C. R. N., MACHADO, M., ZHOU, W., JONES, K., VOGT, A., KLINCHA, P. P., SANTIAGO, K. M., KOMECHEN, H., PARAIZO, M. M., PARISE, I. Z. S., HAMILTON, K. V., WANG, J., RAMPERSAUD, E., CLAY, M. R., MURPHY, A. J., LALLI, E., NICHOLS, K. E., RIBEIRO, R. C., RODRIGUEZ-GALINDO, C., KORBONITS, M., ZHANG, J., THOMAS, M. G., CONNELLY, J. P., PRUETT-MILLER, S., DIEKMANN, Y., NEALE, G., WU, G. & ZAMBETTI, G. P. 2020. XAF1 as a modifier of p53 function and cancer susceptibility. *Sci Adv*, 6, eaba3231.
- PONADER, S., CHEN, S. S., BUGGY, J. J., BALAKRISHNAN, K., GANDHI, V., WIERDA, W. G., KEATING, M. J., O'BRIEN, S., CHIORAZZI, N. & BURGER, J. A. 2012. The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 thwarts chronic lymphocytic leukemia cell survival and tissue homing in vitro and in vivo. *Blood*, 119, 1182-9.
- PUIGGROS, A., BLANCO, G. & ESPINET, B. 2014. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int*, 2014, 435983.
- PUT, N., KONINGS, P., RACK, K., JAMAR, M., VAN ROY, N., LIBOUTON, J. M., VANNUFFEL, P., SARTENAER, D., AMEYE, G., SPELEMAN, F., HERENS, C., POIREL, H. A., MOREAU, Y., HAGEMEIJER, A., VANDENBERGHE, P., MICHAUX, L. & BELGIAN CYTOGENETIC GROUP FOR, H.-O. 2009. Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 843-53.
- PUT, N., VAN ROOSBROECK, K., KONINGS, P., MEEUS, P., BRUSSELMANS, C., RACK, K., GERVAIS, C., NGUYEN-KHAC, F., CHAPIRO, E., RADFORD-WEISS, I.,

- STRUSKI, S., DASTUGUE, N., GACHARD, N., LEFEBVRE, C., BARIN, C., ECLACHE, V., FERT-FERRER, S., LAIBE, S., MOZZICONACCI, M. J., QUILICHINI, B., POIREL, H. A., WLODARSKA, I., HAGEMEIJER, A., MOREAU, Y., VANDENBERGHE, P., MICHAUX, L., BCGHO & THE, G. 2012. Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol*, 91, 863-73.
- PUTOWSKI, M. & GIANNOPOULOS, K. 2021. Perspectives on Precision Medicine in Chronic Lymphocytic Leukemia: Targeting Recurrent Mutations-NOTCH1, SF3B1, MYD88, BIRC3. *J Clin Med*, 10.
- QIAN, S., WEI, Z., YANG, W., HUANG, J., YANG, Y. & WANG, J. 2022. The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Front Oncol*, 12, 985363.
- RADAEV, S., ZOU, Z., TOLAR, P., NGUYEN, K., NGUYEN, A., KRUEGER, P. D., STUTZMAN, N., PIERCE, S. & SUN, P. D. 2010. Structural and functional studies of Igalphabeta and its assembly with the B cell antigen receptor. *Structure*, 18, 934-43.
- RAI, K. R. & JAIN, P. 2016. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol*, 91, 330-40.
- RAI, K. R., SAWITSKY, A., CRONKITE, E. P., CHANANA, A. D., LEVY, R. N. & PASTERNAK, B. S. 1975. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46, 219-34.
- RICHARDSON, S. J., MATTHEWS, C., CATHERWOOD, M. A., ALEXANDER, H. D., CAREY, B. S., FARRUGIA, J., GARDINER, A., MOULD, S., OSCIER, D., COPPLESTONE, J. A. & PRENTICE, A. G. 2006. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 107, 3584-92.
- RODRIGUEZ, A. E., ROBLEDO, C., GARCIA, J. L., GONZALEZ, M., GUTIERREZ, N. C., HERNANDEZ, J. A., SANDOVAL, V., GARCIA DE COCA, A., RECIO, I., RISUENO, A., MARTIN-NUNEZ, G., GARCIA, E., FISAC, R., CONDE, J., DE LAS RIVAS, J. & HERNANDEZ, J. M. 2012. Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Ann Oncol*, 23, 2138-2146.
- ROESSLER, S. & GROSSCHEDL, R. 2006. Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells. *Semin Immunol*, 18, 12-9.
- ROSE-ZERILLI, M. J., FORSTER, J., PARKER, H., PARKER, A., RODRIGUEZ, A. E., CHAPLIN, T., GARDINER, A., STEELE, A. J., COLLINS, A., YOUNG, B. D., SKOWRONSKA, A., CATOVSKY, D., STANKOVIC, T., OSCIER, D. G. & STREFFORD, J. C. 2014. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*, 99, 736-42.
- ROSENQUIST, R., CORTESE, D., BHOI, S., MANSOURI, L. & GUNNARSSON, R. 2013. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma*, 54, 2351-64.
- ROSSI, D., CERRI, M., DEAMBROGI, C., SOZZI, E., CRESTA, S., RASI, S., DE PAOLI, L., SPINA, V., GATTEI, V., CAPELLO, D., FORCONI, F., LAURIA, F. & GAIDANO, G. 2009. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res*, 15, 995-1004.
- ROSSI, D. & GAIDANO, G. 2012. ATM and chronic lymphocytic leukemia: mutations, and not only deletions, matter. *Haematologica*, 97, 5-8.
- ROSSI, D. & GAIDANO, G. 2016. Richter syndrome: pathogenesis and management. *Semin Oncol*, 43, 311-9.
- ROSSI, D., RASI, S., SPINA, V., BRUSCAGGIN, A., MONTI, S., CIARDULLO, C.,

- DEAMBROGI, C., KHIABANIAN, H., SERRA, R., BERTONI, F., FORCONI, F., LAURENTI, L., MARASCA, R., DAL-BO, M., ROSSI, F. M., BULIAN, P., NOMDEDEU, J., DEL POETA, G., GATTEI, V., PASQUALUCCI, L., RABADAN, R., FOA, R., DALLA-FAVERA, R. & GAIDANO, G. 2013. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121, 1403-12.
- SALAWU, L., BOLARINWA, R. A. & DUROSINMI, M. A. 2010. Chronic lymphocytic leukaemia: a-twenty-years experience and problems in Ile-Ife, South-Western Nigeria. *Afr Health Sci*, 10, 187-92.
- SCARFO, L., FERRERI, A. J. & GHIA, P. 2016. Chronic lymphocytic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 104, 169-82.
- SCHIEBER, M. & MA, S. 2019. The expanding role of venetoclax in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Blood Lymphat Cancer*, 9, 9-17.
- SCHMID, T., MAIER, J., MARTIN, M., TASDOGAN, A., TAUSCH, E., BARTH, T. F. E., STILGENBAUER, S., BLOEHDORN, J., MOLLER, P. & MELLERT, K. 2021. U-RT1 - A new model for Richter transformation. *Neoplasia*, 23, 140-148.
- SCHROEDER, H. W., JR. & CAVACINI, L. 2010. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S41-52.
- SEDLARIKOVA, L., PETRACKOVA, A., PAPAJK, T., TURCSANYI, P. & KRIEGOVA, E. 2020. Resistance-Associated Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia Patients Treated With Novel Agents. *Front Oncol*, 10, 894.
- SENTURK YIKILMAZ, A., AKINCI, S., BAKANAY, S. M., ZENGİN, Z. B. & DILEK, I. 2020. Is Cd11c and Fmc7 Negativity in Chronic Lymphocytic Leukemia Poor Prognostic? *Indian J Hematol Blood Transfus*, 36, 84-90.
- SHIMIZU, K., KONNO, S., OZAKI, M., UMEZAWA, K., YAMASHITA, K., TODO, S. & NISHIMURA, M. 2012. Dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), a novel NF-kappaB inhibitor, inhibits allergic inflammation and airway remodelling in murine models of asthma. *Clin Exp Allergy*, 42, 1273-81.
- SMITH, M. R. 2003. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22, 7359-68.
- STRATI, P., PARIKH, S. A., CHAFFEE, K. G., ACHENBACH, S. J., SLAGER, S. L., CALL, T. G., DING, W., JELINEK, D. F., HANSON, C. A., KAY, N. E. & SHANAFELT, T. D. 2017. CD49d associates with nodal presentation and subsequent development of lymphadenopathy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 178, 99-105.
- TARDIVON, D., ANTOSZEWSKI, M., ZANGGER, N., NKOSI, M., SORDET-DESSIMOZ, J., HENDRIKS, R., KOCH, U. & RADTKE, F. 2021. Notch signaling promotes disease initiation and progression in murine chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 137, 3079-3092.
- TAUSCH, E. & STILGENBAUER, S. 2020. BIRC3 mutations in chronic lymphocytic leukemia - uncommon and unfavorable. *Haematologica*, 105, 255-256.
- TEN HACKEN, E. & BURGER, J. A. 2016. Microenvironment interactions and B-cell receptor signaling in Chronic Lymphocytic Leukemia: Implications for disease pathogenesis and treatment. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 401-413.
- THOMPSON, P. A., O'BRIEN, S. M., WIERDA, W. G., FERRAJOLI, A., STINGO, F., SMITH, S. C., BURGER, J. A., ESTROV, Z., JAIN, N., KANTARJIAN, H. M. & KEATING, M. J. 2015. Complex karyotype is a stronger predictor than del(17p) for an inferior outcome in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*, 121, 3612-21.
- TSANG, M. & PARIKH, S. A. 2017. A Concise Review of Autoimmune Cytopenias in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*, 12, 29-38.

- VAN DEN NESTE, E., ROBIN, V., FRANCA, J., HAGEMEIJER, A., STUL, M., VANDENBERGHE, P., DELANNOY, A., SONET, A., DENEYS, V., COSTANTINI, S., FERRANT, A., ROBERT, A. & MICHAUX, L. 2007. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. *Leukemia*, 21, 1715-22.
- WALKER, J. S., HING, Z. A., HARRINGTON, B., BAUMHARDT, J., OZER, H. G., LEHMAN, A., GIACOPELLI, B., BEAVER, L., WILLIAMS, K., SKINNER, J. N., CEMPRE, C. B., SUN, Q., SHACHAM, S., STROMBERG, B. R., SUMMERS, M. K., ABRUZZO, L. V., RASSENTI, L., KIPPS, T. J., PARIKH, S., KAY, N. E., ROGERS, K. A., WOYACH, J. A., COPPOLA, V., CHOOK, Y. M., OAKES, C., BYRD, J. C. & LAPALOMBELLA, R. 2021. Recurrent XPO1 mutations alter pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *J Hematol Oncol*, 14, 17.
- WANG, H., GUO, M., WEI, H. & CHEN, Y. 2021. Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. *J Hematol Oncol*, 14, 67.
- WANG, H., KADLECEK, T. A., AU-YEUNG, B. B., GOODFELLOW, H. E., HSU, L. Y., FREEDMAN, T. S. & WEISS, A. 2010. ZAP-70: an essential kinase in T-cell signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a002279.
- WANG, L., LAWRENCE, M. S., WAN, Y., STOJANOV, P., SOUGNEZ, C., STEVENSON, K., WERNER, L., SIVACHENKO, A., DELUCA, D. S., ZHANG, L., ZHANG, W., VARTANOV, A. R., FERNANDES, S. M., GOLDSTEIN, N. R., FOLCO, E. G., CIBULSKIS, K., TESAR, B., SIEVERS, Q. L., SHEFLER, E., GABRIEL, S., HACHOEN, N., REED, R., MEYERSON, M., GOLUB, T. R., LANDER, E. S., NEUBERG, D., BROWN, J. R., GETZ, G. & WU, C. J. 2011. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 365, 2497-506.
- WOYACH, J. A., JOHNSON, A. J. & BYRD, J. C. 2012. The B-cell receptor signaling pathway as a therapeutic target in CLL. *Blood*, 120, 1175-84.
- YEH, C. H., BELLON, M. & NICOT, C. 2018. FBXW7: a critical tumor suppressor of human cancers. *Mol Cancer*, 17, 115.
- YUMIMOTO, K. & NAKAYAMA, K. I. 2020. Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor. *Semin Cancer Biol*, 67, 1-15.
- ZENZ, T., HABE, S., DENZEL, T., MOHR, J., WINKLER, D., BUHLER, A., SARNO, A., GRONER, S., MERTENS, D., BUSCH, R., HALLEK, M., DOHNER, H. & STILGENBAUER, S. 2009. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*, 114, 2589-97.
- ZENZ, T., KROBER, A., SCHERER, K., HABE, S., BUHLER, A., BENNER, A., DENZEL, T., WINKLER, D., EDELMANN, J., SCHWANEN, C., DOHNER, H. & STILGENBAUER, S. 2008. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*, 112, 3322-9.
- ZENZ, T., MERTENS, D., KUPPERS, R., DOHNER, H. & STILGENBAUER, S. 2010. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*, 10, 37-50.
- ZUCCHETTO, A., CALDANA, C., BENEDETTI, D., TISSINO, E., ROSSI, F. M., HUTTERER, E., POZZO, F., BOMBEN, R., DAL BO, M., D'ARENA, G., ZAJA, F., POZZATO, G., DI RAIMONDO, F., HARTMANN, T. N., ROSSI, D., GAIDANO, G., DEL POETA, G. & GATTEI, V. 2013. CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood*, 122, 3317-21.

Revues et thèses :

EMADI A., Juin 2022. Revue générale des leucémies. University of maryland, school of medecine.

BEKADJA M, A., BOUDJERRA N., HAMDI-LEZZAR S., SAIDI M., DjOUADI K. , AIT-ALI H., RAMAOUN M. , BENAKLI M. , ABAD M, T., DALI N. , AHMED-NACER R. , HAMLADJI R. M., 2022. Impact de l'âge et de la transition démographique sur les hémopathies malignes en Algérie. Etude de Méta-analyse portant sur une période allant de 1992 à 2021 (30 Ans)

GREGORA M., BARGETZIB M., DUCHOSAIC M. A., GOEDED J, S., HEIME D., HELGF C., KORTEG W., LEONCINI L. ,, SOLENTHALERI M., ZENHAUSERNK , R., 2011. Recommandations pour le diagnostic et le traitement de la leucémie lymphoïde chronique en Suisse 1 ere partie : Diagnostic, stadification et facteurs pronostiques.

LE GARFF M. , COSTOPOULOSA M., MERLE-BERAL H., Revue Francophone des Laboratoires Volume 2013, Issue 452. Pages 37-48. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi lymphoprolifératifs B.

JACQUES A., 2015. Thèse de DOCTEUR en PHARMACIE . Pages 120. Intérêt du séquençage dans les typages HLA et la greffe de cellules souches hematopoietiques.

C. R, VENTON, V. IVANOV, C. MERCIER, L. DELASSUS.2018. Leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte.

J. PONT.,2015. Définition par cytométrie en flux des valeurs de référence pour 16 sous-populations de la moelle osseuse en fonction de l'âge et mise au point d'un critère cytométrique d'appréciation de la dilution médullaire par le sang périphérique. Sciences pharmaceutiques de Grenoble.

LEFRANC M.-P. et LEFRANC G.2002 IMGT, the international ImmunoGenetics information system, <http://imgt.cines.fr>, Montpellier, France.

https://en.wikipedia.org/wiki/B-cell_receptor#/media/File:B_cell_singaling.png.