

**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 rétrospective et caractérisation immunophénotypique de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) dans la région de Tizi-Ouzou.**

**Réalisé par:**

- Oumerabet Zahra
- Bakiri Fatima
- Hadj ali Lynda

**Membre de jury :**

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

2021-2022

## *Remerciement*

En tout premier lieu, on remercie le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Nous tenons à remercier l'ensemble de la faculté BMC.

À notre Promoteur Dr Yezid H Maitre-assistant en faculté BMC à l'UMMTO :

Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation. Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles. 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 pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

On n'oublie pas d'associer à nos remerciements tout le personnel du laboratoire d'hémobiologie et du service d'hématologie spécialement: Lynda, Mohammed et Dalila, pour leur soutien, gentillesse et bienveillance.

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



## *Dédicaces*

*J'ai l'immense plaisir de dédier ce travail :*

*À la mémoire de mon père Arezki, qui a tout fait pour ce que je ne manque de rien et que je sois la meilleur dans mes études et qui, je suis sûre, aurait aimé me voir arriver jusque là. Que dieu l'accueil dans son très vaste paradis.*

*À ma mère Djamila qui a tout sacrifiée pour nous, et nous a donné l'envie, mais surtout le courage de réussir. Aucun mot si sacré soit-il, ne suffit à apprécier à sa juste valeur, le soutien, les sacrifices que vous ne m'avez cessés de déployer.*

*À mon frère Younes et ma sœur Zineb pour leur amour et leur soutien.*

*À mes chers oncles et tentes ainsi leurs enfants et à toute la famille Bakiri et la famille Hareb.*

*À tous mes amies, en souvenir de l'amitié et de ce que nous avons partagé en particulier : Lynda, Zahra, Katia et Fazia, Karima, Sara*

*À tous ceux qui nous sont chers et proches, à nos familles et à toutes les amies que nous aimons beaucoup*

*Spéciale dédicace et pensée pour toutes ces personnes qui se battent tous les jours contre cette maladie. Pensées lumineuses pour vous ainsi que pour tous vos proches, qui se battent à vos côtés.*

*À toutes celles et ceux qui me donnent des raisons d'être ce que je suis...*



## *Dédicaces*

*A ma très chère mère ; quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai comment te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et présence à mes coté a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.*

*A mon cher père ; tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir, que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir pour te remercier profondément pour tes grands sacrifices.*

*A mon frère Madjid et mes sœurs Kahina, Sabrina, Tassadit, Samia et Diana ; que le Dieu tout puissant vous protèges et vous garde pour moi.*

*A mes grands-parents Ali et Ouardia et aussi Houria.*

*A mes deux très chères trinômes Fatima et Zahra, et mes meilleures amies Katia, Fazia et Souad.*

*Je dédie spécifiquement ce travail à Hassane YAMRANENE pour son grand soutien et sa patience.*

*A tous mes proches et tous ceux qui m'aime et qui me souhaite plus de succès.*



## Dédicaces :

*Je dédie ce travail :*

*En tout premier lieu pour le bon **Dieu** tout puissant et miséricordieux, car grâce à lui que j'ai pu surpasser toutes les difficultés et ne pas avoir abandonné aux moments sombres et aujourd'hui j'ai pu profiter de ce moment et de ce travail alors merci infiniment mon Dieu.*

*À la femme la plus forte et gentille qui a tout donné et tout fait sans épargner un effort pour me soutenir et m'encourager avec toutes les formes d'encouragement ma sublime, mon exemple, maman **Mezhoura** Dieu la garde en bonne santé et lui offre une longue vie.*

*À mon cher père **Ferhat** plein de douceur et de bonté pour sa présence à tout moment Dieu le garde en bonne santé et lui offre une longue vie.*

*À mes frères pour leur soutien et gentillesse : **Abd el karim, Ali, Smail, Rabah, Mhand, Amokrane, Hocine.***

*À mes sœurs pour leurs cœurs pleins d'amour et de bonté envers moi : **Lila, Zaina, Smina, Karima, Karima.***

*À mes chers petits enfants (nièces et neveux) : **Rachel, Alice, Manassi, Ayoub.***

*À tous mes amis surtout les proches : **Sara, Siham, Randja, Dihia, Koukou, Nina, Yasmina.***

*À **Aab Ilyas** : pour ces efforts, son soutien, ces souhaits et sa patience.*

*À mes chères copines/binômes **Lynda HA** et **Fatima B**, je leurs remercie pour leur patience et gentillesse et surtout leur compréhension tout au long de ce travail.*

*À **Zahra** qui n'a pas abandonner malgré toutes les difficultés et les obstacles.*

## Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : adénosine diphosphate

ALL-T: Tcell acute lymphoblastic leukaemia

AP-1 : protéine activatrice

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messagers

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

Bax: Bcl-2 associated X protein

BCAP :b cell adaptor for PI3K

Bcl-2 : B-cell CLL/lymphoma 2

Bcl-xl : B-cell lymphoma extra-large

Bcl-xs : B-cell lymphoma

BCR: B Cell Receptor

BH3:trihydridoborane

BIRC3: Baculoviral IAP Repeat Containing 3

BLNK:b cell linker protein

BR: Bendamustine + Rituximab

BTK: Bruton Tyrosine Kinase

CD : Cluster de différenciation

CD40L : CD40 ligand

CG : Centre Germinale

CIN85 :Cbl interacting protein 85kd

CMF : cytométrie de flux

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CSA :cyclosporine

CSH :cellule souche hématopoïétique

DAG :diacylglycérol

DC : Cellules dendritiques

Del : délétion

DLEU-1 : deleted in leukemia 1

DLEU-2 :deleted in leukemia2

EDTA : **E**thylène**d**iamin**e**tétra**a**cétique

EGF : Epidermal growth factor  
EPP : électrophorèse des protéines  
ERK : Extracellular signal-Regulated kinase  
FasL : Fas ligand  
FC : Fludarabine + Cyclophosphamide  
Fc : Fragment constant  
FCR : Fludarabine, cyclophosphamide et rituximab  
FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence  
FITC : Fluorescéine isothiocyanate-5  
FNS : Formule numérotation sanguine  
GB : globule blanc  
GR : globule rouge  
IAP : Inhibiteurs de l'apoptose  
IgD : immunoglobuline D  
IgE : immunoglobuline E  
IgHV : Immunoglobulin Heavy Chain  
IGHV-M : immunoglobuline des chaînes lourde muté  
IgM : immunoglobuline M  
IGVH-UM : immunoglobuline des chaînes lourdes non mutées  
IKB : I kappaB kinase  
IKK : I kappa kinase  
IL-7 : Interleukine 7  
IP3 : inositol triphosphate  
IRAK : kinase 1 associée au récepteurs de l'interleukine  
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
ITIM : immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif  
IwCLL : International workshop on chronic lymphocytic leukaemia  
LAL-T : Leucémie aiguë lymphoblastique T  
LB : lymphocyte B  
LDT : Temps de doublement des lymphocytes  
LLC : Leucémie lymphoïde chronique  
LLC-B : leucémie lymphoïde chronique de type B  
LT : lymphocyte T  
LYN : tyrosine kinase lyn

MG : May Grünwald  
MGG : May Grünwald Giemsa  
miARN :Micro Acide ribonucléique  
mTOR :mechanistic target of rapamycin  
MYD88 : Myeloid differentiation primary response 88  
NFAT : Nuclear factor of Activated T-cells  
NF-κB : Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
NK : Natural killer  
NLC : Nurse-like cells  
OS : Survie globale  
PBS: phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)  
PDGF : Platelet-derived growth factor  
PECAM1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule 1  
PEST :proline glutamic acid serine and thréonine rich  
PI3K :phosphoinositol 3 kinase  
PIP2 :Phosphatidyl inositol biphosphate  
PLCy :phospholipase c y  
PRR : Pattern Recognition Receptors  
RFC : Fludarabine cyclophosphamide rituximab  
SF3B1 : Splicing Factor 3b subunit 1 155kDa  
SR :Syndrome de Ritcher  
SYK : Spleen tyrosine kinase  
TLR:toll like receptor  
TNF: Tumor necrosis factor  
TP53: Tumor protein p53  
TRAIL: Tumor-necrosis factor related apoptosis inducing ligand  
VCAM-1: Vascular-cell adhesion molecule 1  
VDJ: Variable diversity joining  
VEGF-A: Vascular endothelial growth factor A  
VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor  
ZAP-70: Zeta-chain-associated-protein kinase  
β2m : β2 microglobuline

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Représentation schématique des différentes étapes de la lymphopoïèse et les marqueurs caractéristiques présents à chaque stade.....	<b>8</b>
<b>Figure 2:</b> Schéma de la structure du récepteur aux lymphocytes B (BCR), le BCR est composé d'une immunoglobuline de surface constituée de 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères portant le site de reconnaissance à l'antigène et d'une unité de signalisation. ....	<b>9</b>
<b>Figure 3:</b> Observation au microscope de lymphocytes leucémiques (LLC) sur un frottis sanguin. (d'après Evrard et al., 2005) .a: polynucléaire éosinophile; b: plaquette; c :hématie.	<b>12</b>
<b>Figure 4:</b> Cytogramme d'un sujet atteint de leucémie lymphoïde chronique. a : marqueurs fixés au cellule lymphocytaire. / b : pourcentage d'expression des marqueurs sur la cellule LLC. / c : cytogramme. / d : population lymphocytaire exprimer selon le paramètre de taille et granularité cellulaire. ....	<b>13</b>
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique de la voie de signalisation du récepteur BCR, BCR :B-cell receptor ;les kinases sous forme ovale ;les facteurs de transcription sont sous formes de rectangle ; les adaptateurs sous forme d'hexagones.....	<b>28</b>
<b>Figure 6:</b> Schéma récapitulant le principe de fonctionnement d'un cytomètre.....	<b>40</b>
<b>Figure 7:</b> Evolution de la LLC selon l'année de 2016-2021 .....	<b>43</b>
<b>Figure 8:</b> Répartition des patients selon l'âge. ....	<b>44</b>
<b>Figure 9:</b> Répartition des patients LLC selon le sexe. ....	<b>44</b>
<b>Figure 10:</b> Classification des patients selon le score de matutes. ....	<b>45</b>
<b>Figure 11:</b> Distribution des patients suivant la classification de Binet. ....	<b>46</b>
<b>Figure 12:</b> Devenir des patients atteints de la LLC. ....	<b>46</b>
<b>Figure 13:</b> Syndrome tumoral au diagnostic. ....	<b>47</b>
<b>Figure 14:</b> Étalement sanguin chez un homme présentant une leucémie lymphoïde chronique. (LLC positif) 1 et 2-lymphocyte atteint de LLC/ 3-Ombre de Gumprecht /4-éosinophile /5 –polynucléaire neutrophile/6- monocyte. ....	<b>48</b>
<b>Figure 15:</b> Frottis sanguin d'un sujet sain. 1:Lymphocyte normal, 2:plaquettes, 3:globule rouge.....	<b>48</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I:</b> Système de score de Matutes pour le diagnostic de la LLC (D'après Herishanu and Polliack, 2005).....	<b>13</b>
<b>Tableau II:</b> Classification de Rai .....	<b>14</b>
<b>Tableau III:</b> Classification de Binet : .....	<b>15</b>
<b>Tableau IV:</b> Aanticorps et les marqueurs utiliser dans la CMF.....	<b>38</b>
<b>Tableau V:</b> Répartition des patients atteint de LLC suivant la région. ....	<b>44</b>
<b>Tableau VI:</b> Tableau récapitulatif de l'ensemble des données de marquage.....	<b>47</b>
<b>Tableau VII:</b> Comparaison immunophénotypique entre deux types de cancers (LLC-B versus Lymphome Non Hodgkinien B(LNHB) .....	<b>49</b>

## Sommaire

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Résumé

Abstract

Introduction générale..... 02

**Chapitre I : Généralité sur la LLC**..... 04

1 Définitions ..... 05

1.1 Définition des leucémies : ..... 05

1.2 Définition de la leucémie lymphoïde chronique..... 05

2. Généralités..... 05

3. Epidémiologie ..... 06

4. Physiopathologie ..... 07

4.1 Rappel sur l'hématopoïèse..... 07

4.1.1 Définition ..... 07

4.1.2 Les étapes de la lymphopoïèse..... 07

4.2. Etapes de la lymphopoïèse B..... 07

4.3. Les principales molécules de surface caractérisant la lignée lymphoïde B..... 08

4.3.1. Le récepteur des lymphocytes B (BCR).....08

4.3.2. Les marqueurs des lymphocytes B .....09

5. Les Facteurs de risque de la LLC ..... 09

5.1 Les facteurs constitutionnels ..... 10

5.1.1 Les antécédents familiaux..... 10

5.1.2 L'âge..... 10

5.1.3 La race..... 10

5.2 Les facteurs environnementaux ..... 10



5. Mutations IGVH.....	30
6. Mécanismes physiopathologiques de la LLC.....	30
6.1. Défaut de l'apoptose.....	30
6.2. Anomalies de prolifération: .....	31
6.3. Facteur anti-apoptotique Bcl-2 .....	31
6.4. Régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose .....	31
6.5. Mutation du gène Notch1 .....	32
6.6. Trisomie 12.....	33
6.7. Délétion 13q14 .....	33
6.8. Délétion 11q22-23 .....	33
6.9. Délétion 6q .....	33
6.10. Délétion de la région 17p.....	34
6.11. La mutation TP53 .....	34
6.12. Réponse aux dommages causés à l'ADN .....	34
6.13. Les facteurs de transcription.....	35
6.14. Voie inflammatoire et activation constitutive de NF-κB.....	35
<b>Chapitre III : Matériel et méthodes.....</b>	<b>37</b>
1 Matériel .....	38
1.1 Anticorps .....	38
2 Méthodes : .....	38
2.1 Etude rétrospective : .....	38
2.2 Formule numérotation sanguine FNS : .....	38
2.2.1 Principe: .....	38
2.2.2 Protocole : .....	39
3 Frottis sanguin .....	39
3.1 Principe: .....	39
3.2 Protocole : .....	39

4 Immunophénotypage des lymphocytes sanguins : .....	40
4.1 Principe:.....	40
4.2 Protocole : .....	41
<b>Chapitre IV : Résultats et discussions</b> .....	<b>42</b>
1. Epidémiologie de la LLC : .....	43
1.1. Evolution de la LLC de 2016-2021 .....	43
1.2. Age .....	43
1.3. Sexe .....	44
1.4. Région .....	44
1.5. Répartition des patients suivant le classement de Matutes .....	45
1.6. Distribution des patients suivant la classification de Binet .....	45
1.7 Complications .....	46
1.8 Devenir des patients.....	46
1.9 Caractérisation Immunophénotipique des patient .....	47
2. Étude morphologique de la LLC.....	48
3. Immunophynotypage de la LLC-B.....	49
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	<b>51</b>
<b>LA BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>53</b>

## Résumé

La Leucémie lymphoïde chronique (LLC) est le type de leucémie le plus courant dans les pays développés. Elle est caractérisée par l'accumulation des lymphocytes B CD5+ dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et le sang de patients atteints de cette pathologie. Elle est indiquée généralement en présence d'une hyperlymphocytose B > 5 000/mm<sup>3</sup> isolée, persistante de plus de 3 mois, chez un sujet adulte, et nécessite une analyse hématologique complémentaire. Le choix des traitements est défini en fonction de la présence de symptômes et de l'évolutivité de la maladie. La prise en charge des patients à haut risque est possible grâce aux traitements immuno-chimiothérapeutiques. Notre présente étude est réalisée au niveau du service d'Hématologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou. Nous nous sommes intéressés à la description des caractéristiques épidémiologiques et biologiques des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) provenant de la région de Tizi-Ouzou et environs. Dans un premier temps, Nous avons mené une étude rétrospective couvrant la période de 2016-2021(5 ans) avec un total de 76 dossiers de patients analysés. La moyenne d'âge des patients est de 67 ans (24-87 ans). La majorité des patients présentent des symptômes caractéristiques tel que adénopathies splénomégalie et anémie. Ensuite nous nous sommes intéressés à l'étude de la morphologie des cellules LLC-B par observation des frottis issus de patients atteints de LLC-B. la dernière partie de notre travail a été consacré à la réalisation d'une étude comparative des caractéristiques immunophénotypes d'une Leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) versus lymphome Non-Hodgkinien B (LNHB).

**Mots clés:** Leucémie lymphoïde chronique (LLC), immunophénotypage, facteurs de risque, épidémiologie, CD5 positif.

## **Abstract**

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common type of leukemia in developed countries. It is characterized by the accumulation of CD5+ B lymphocytes in the bone marrow, lymph nodes and peripheral blood of patients with this disease. It is generally indicated in the presence of isolated B lymphocytosis  $> 5,000/\text{mm}^3$ , persistent for more than 3 months, in an adult subject, and requires additional hematological analysis. The choice of treatments is defined according to the presence of symptoms and the evolution of the disease. The management of high-risk patients is possible after the development of the immuno-chemotherapy treatments. Our present study was carried out in the Hematology Department of the Nedir Mohamed University Hospital in Tizi-Ouzou. We are interested in the description of the epidemiological and biological characteristics of patients with B-CLL from the region of Tizi-Ouzou and surroundings. Initially, we conducted a retrospective study covering the period of 2016-2021(5 years) with a total of 76 patient records analyzed. The average age of the patients was 67 years (24-87 years). The majority of patients presented with characteristic symptoms such as adenopathy-splenomegaly and anemia. Then we were focused to the study of the morphology of B-CLL cells by observation of smears from B-CLL patients. The last part of our work was devoted to the realization of a comparative study of the immunophenotyping characteristics of a B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) versus Non-Hodgkin's lymphoma B (NHLB).

**Keywords:** Chronic lymphocytic leukemia (LLC), immunophenotyping, risk factors, epidemiology, CD5positive.

# ***Introduction***

## Introduction

La Leucémie lymphoïde chronique (LLC) est le type de leucémie le plus observé en Occident. C'est une maladie hématologique maligne qui se manifeste par une évolution clonale de petits lymphocytes B de morphologie mature et d'immunophénotypage caractéristique, qui s'accumulent dans la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et le sang périphérique. Cette maladie touche ainsi principalement les patients âgés.

La LLC est une maladie fortement hétérogène dont l'évolution clinique peut durer quelques années en fonction des facteurs de risque que peut présenter le patient. Elle reste incurable à moins d'avoir recours à une greffe allogénique, qui n'est pas une option thérapeutique pour la majorité des patients, en raison de leur âge et la performance de leur corps.

Dans la plupart des cas, les patients sont asymptomatiques et la LLC se diagnostique après une prise de sang fortuite qui met en évidence des anomalies hématologiques (hyperleucocytose, lymphocytose, anémie, thrombopénie...etc.). Certains patients consultent parce qu'ils présentent des antécédents d'infections chroniques, des saignements, des adénopathies, une hépatomégalie ou une splénomégalie et plus rarement des symptômes de type B (fièvre, perte de poids, sudations nocturnes).

Plusieurs facteurs de risque vont avoir une répercussion importante sur l'évolution de la maladie. Plus le patient est âgé, plus sa LLC est de stade avancé (p. ex. stade III ou IV selon les critères de Rai, ou stade C selon les critères de Binet) et plus son statut de performance est pauvre, plus la maladie évoluera rapidement).

Certaines délétions chromosomiques sont des facteurs de mauvais pronostic, comme les délétions 17p souvent associée à une inhibition du gène suppresseur TP53 et 11q. D'autres marqueurs qui peuvent avoir un effet négatif sur l'évolution de la maladie sont la surexpression de CD38, la présence de la protéine ZAP-70, la présence du gène de l'IgVH (immunoglobulin heavy chain variable) non muté et des mutations du gène Notch-1.

Le traitement de la LLC reposait sur la chimiothérapie avec l'utilisation des agents alkylants (Chlorambucil, le Cyclophosphamide...etc.), puis sur l'arrivée des analogues de la purine (ex, la Fludarabine) et l'immunothérapie avec les anticorps monoclonaux et les associations entre ces derniers, qui ont permis d'obtenir une augmentation des taux de réponse, ainsi qu'une répercussion positive sur la survie sans progression de la maladie.

Cependant, il reste des besoins thérapeutiques non comblés et le choix d'un traitement devient de plus en plus difficile car certains patients ne peuvent pas recevoir une thérapie

optimale, donc le mieux est de personnaliser la thérapie en prenant en considération le coût du traitement, le profil de toxicité des agents choisis et le statut de performance sur le patient.

Depuis quelques années, plusieurs nouvelles molécules se sont montrées efficaces pour le traitement de la LLC avec l'arrivée des thérapies ciblées comme les inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton (BTK) et d'autres molécules.

Au cours de ce travail, nous avons réalisé une étude rétrospective couvrant la période de 2016-2021 (5 ans) dans le service d'Hématologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou. Cette étude épidémiologique s'est portée sur 76 patients atteints de LLC issus de la région de Tizi-Ouzou et environs. Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons suivi les caractéristiques biologiques des cellules LLC. A savoir l'observation morphologique des cellules LLC au microscope optique, ensuite à travers la réalisation d'une comparaison des propriétés immunophénotypique d'une LLC-B avec des cellules de lymphomes Non-Hodgkinien B (LNHB).

***Chapitre I : Généralités sur la  
LLC***

## 1 .Définitions

### 1.1 Définition des leucémies

Le terme « leucémie » désigne toute maladie (cancers) des tissus sanguins impliquant des cellules sanguines indifférenciées se trouvant dans la moelle osseuse ou dans la circulation sanguine.

Leucémie : du grecque leukos signifie blanc et haima signifie sang. Cette maladie débute généralement par des anomalies dans la formation des cellules sanguines de la moelle osseuse qui se multiplient à un nombre supérieur par rapport à celui des cellules normales, empêchant ainsi leur fonctionnement adéquat. Il existe différents types des leucémies, on peut les classifier selon les cellules souche à partir desquelles elles se développent et la rapidité d'évolution de la maladie, on trouve les lymphomes, les leucémies myéloïdes chronique et aiguë, les leucémies lymphoïdes chronique et aiguë...etc.

### 1.2. Définition de la leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une prolifération lymphoïde monoclonale (syndrome lymphoprolifératif), caractérisé par une prolifération monoclonale maligne de lymphocytes morphologiquement matures appartenant à la lignée B dans plus de 95% des cas et plus rarement à la lignée T < 5%, elle est responsable d'une infiltration de la moelle, des organes lymphoïdes secondaires (ganglions et rate) et du sang périphérique avec des degrés d'évolution variables au cours de la maladie. La leucémie lymphoïde chronique est la plus fréquente des leucémies de l'adulte. Quatre-vingt pour cent des patients sont asymptomatiques au diagnostic et un tiers n'aura jamais besoin de traitement (Jacque and Leblond 2019).

## 2. Généralités

La LLC est le plus souvent découverte en l'absence de tout symptôme clinique, à partir du résultat d'une analyse sanguine. Elle est parfois suspectée en présence des adénopathies superficielles, une splénomégalie, beaucoup plus rarement avec la présence d'une complication infectieuse ou auto-immune. Elle est indiquée généralement en présence d'une hyperlymphocytose isolée, persistante de plus de 3 mois, chez un sujet adulte, cela évoque le diagnostic d'une LLC et nécessite une analyse hématologique. La confirmation du diagnostic est biologique et ne nécessite qu'un prélèvement sanguin (hémogramme et immunophénotypage des lymphocytes) : la présence d'une lymphocytose B > 5 000/mm<sup>3</sup> et la présence de marqueurs de surface caractéristiques est nécessaire et suffisante pour poser le

diagnostic. Après la réalisation du diagnostic, les cliniciens effectuent les examens nécessaires pour le choix des traitements (imagerie, biologie) qui sont réalisés au moment où se pose l'indication du traitement, celles si sont définies en fonction du stade de la classification de Binet, de la présence de symptômes et de l'évolutivité de la maladie, avant l'indication du traitement, on doit déterminer le statut mutationnel IGVH (immunoglobuline heavy chain), Le statut non muté de cette chaîne s'accompagne d'un pronostic défavorable et oriente vers des thérapies ciblées .Il est demandé de rechercher l'éventuelle présence de la délétion 17p par la technique FISH «hybridation in situ» ainsi que la possible présence de mutations de la protéine p53 par la technique de séquençage. Les traitements ciblés de la LLC sont de plus en plus utilisés, parfois en première ligne et surtout en rechute et permettent d'envisager dans l'avenir des traitements sans recours à la chimiothérapie pour l'ensemble des patients. Les patients asymptomatiques avec une maladie stable confirmée par le spécialiste peuvent être surveillés par le médecin traitant avec un hémogramme et un examen clinique une à deux fois par an. La LLC présente 3 types de complication : infectieuse, auto-immune, transformation en lymphome de haut grade de malignité : le syndrome de Richter (SR). Le suivi de la LLC est continu tout au long de la vie du patient et repose sur l'examen clinique et les examens biologiques, elle est incurable pour une large majorité des patients.

### 3. Epidémiologie

La leucémie lymphoïde chronique est la maladie la plus fréquente des leucémies dans les pays occidentaux, avec 3.5nouveaux cas /100000 habitants par ans aux États-Unis d'Amérique et 4000 nouveaux cas /ans en France (incidence =4.2/100000habitants).

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte en France. Elle touche le plus souvent les personnes âgées (âge moyen au diagnostic : 70 ans), avec une prédominance masculine (2/3 des cas). L'espérance de vie des patients est variable, mais pour la plupart des malades, elle est peu modifiée par la maladie.

La leucémie lymphoïde chronique représente 8.5% des hémopathies malignes en Algérie selon une étude réalisée sur 3 années (2011-2013). L'incidence en Algérie a été évaluée sur une période de 5 ans (2007-2011) à travers le territoire national, elle présente une valeur d'environ 0.63/100000 habitants. L'incidence moyenne annuelle est de 0.57/100000 habitants (revue algérienne d'hématologie 2015). C'est une maladie du sujet âgé de plus de 50 ans, avec un âge médian à 72 ans, son évolution est lente et indolente, avec un pic de

fréquence à 65 ans. Le sexe ratio de 2 H/F met en évidence une prédominance masculine (Revue algérienne d'hématologie 2015).

## 4. Physiopathologie

### 4.1. Rappel sur l'hématopoïèse

#### 4.1.1 Définition

Hématopoïèse : C'est le processus physiologique de génération des cellules sanguines et des plaquettes.

Lymphopoïèse : Elle désigne le processus de développement hématopoïétique, dans lequel les lymphocytes et les cellules Natural killer sont formés à partir des cellules souches hématopoïétiques. Chacune des lignées cellulaires générées suit un processus de genèse et de maturation indépendant.

#### 4.1.2 Etapes de la lymphopoïèse

La lymphopoïèse comporte deux étapes essentielles : la lymphopoïèse primitive et la lymphopoïèse secondaire.

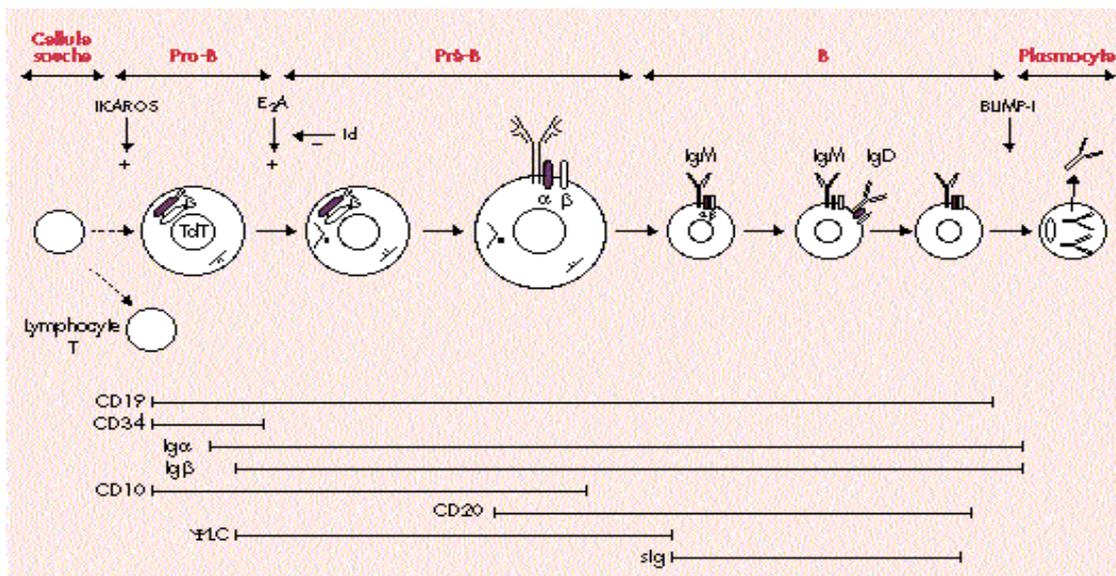
**La lymphopoïèse primitive** : Il s'agit de la production des cellules lymphoïdes nécessaire aux besoins de l'organisme, elle se déroule dans la moelle osseuse pour les lymphocytes B et majoritairement dans le thymus dans le cas des lymphocytes T.

**La lymphopoïèse secondaire** : C'est la multiplication et la différenciation des cellules matures suite à leur activation antigénique qui se fait dans les organes lymphoïdes périphériques (ganglions, Rate, amygdales...etc.).

### 4.2 Etapes de la lymphopoïèse B

La lymphopoïèse B primitive comporte quatre étapes indépendantes à la présence d'un antigène et qui aboutit à la production de lymphocytes B ayant une immunoglobuline de surface (BCR : B Cell Receptor) voir Figure-1. Le premier progéniteur lymphoïde B prolifère et se différencie en présence d'IL-7, comme suit:

- Stade pro B, présence des marqueurs CD19, CD22 et CD79b.
- Stade pré B, présence en plus du marqueur CD10.
- Stade immature B, première apparition d'une immunoglobuline de surface sous forme IgM à la surface du LB immature ainsi que l'expression du marqueur CD20.
- Stade B mature, présence de récepteur BCR mature sous forme d'IgM et IgD.



**Figure 1:** Représentation schématique des différentes étapes de la lymphopoïèse et les marqueurs caractéristiques présents à chaque stade.

Les lymphocytes matures naïfs possèdent une IgM et une IgD de surface : ils sont appelés naïfs car ils n'ont jamais rencontré l'Ag spécifique à leur Ig de surface. Ces lymphocytes naïfs quittent la moelle osseuse vers la circulation sanguine puis rejoignent la circulation lymphatique.

Au cours de chacune de ces étapes, les LB sont l'objet de multiples remaniements chromosomiques, Des mutations géniques peuvent survenir au cours de ces processus. Les cellules concernées sont éliminées par un processus de mort cellulaire programmée (apoptose), parfois ces anomalies peuvent se développer suite à un défaut dans la prolifération et/ou la survie, générant ainsi des pathologies cancéreuses.

### 4.3. Les principales molécules de surface caractérisant la lignée lymphoïde B

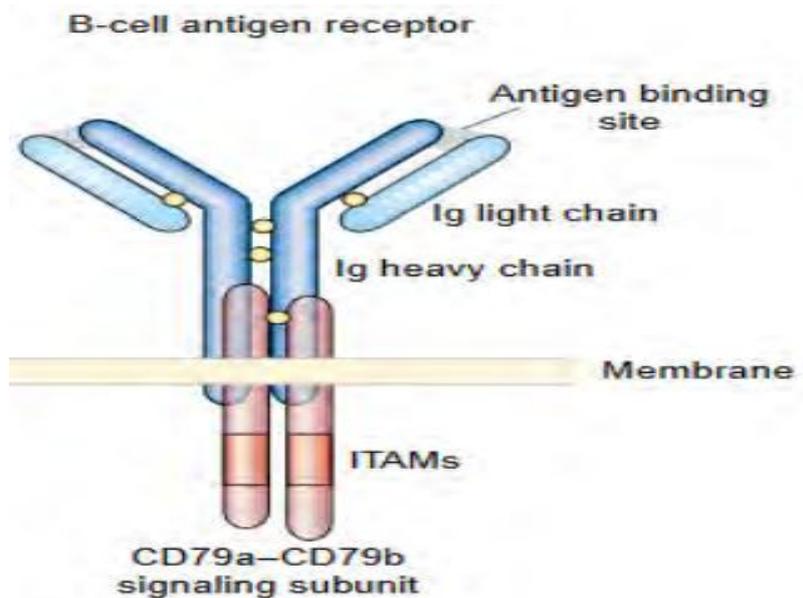
Les cellules lymphoïdes B (LB) sont caractérisées par la présence d'un nombre de molécules de surface dont :

#### 4.3.1. Le récepteur des lymphocytes B (BCR)

C'est un complexe protéique membranaire exprimé à la surface de la membranoplasmique. Il est constitué de :

- Une molécule d'immunoglobuline formée de 2 chaînes H (lourde) et 2 chaînes L (légère)
- CD79a et CD79b qui sont des protéines dont la partie intracellulaire est responsable de la transduction du signal après fixation spécifique de l'antigène sur le BCR.

Ces deux marqueurs sont présents à tous les stades de différenciation des lymphocytes B ainsi que sur tous les lymphocytes B matures.



**Figure 2:** Schéma de la structure du récepteur des lymphocytes B (BCR), le BCR est composé d'une immunoglobuline de surface constituée de 2 chaînes lourdes et de 2 chaînes légères comportant le site de reconnaissance à l'antigène et d'une unité de signalisation.

#### 4.3.2. Les marqueurs des lymphocytes B

CD19: protéine stabilisatrice du récepteur BCR.

CD22: impliqué dans la transduction du signal du BCR et joue le rôle de stabilisateur.

Ces deux molécules sont présentes à tous les stades de différenciation des LB.

Il existe d'autres marqueurs exprimés plus tardivement sur le lymphocyte B :

CD20: Molécule sous forme de canal calcique présente sur les LB matures.

CD23: CD23a est spécifique aux cellules B et CD23b qui est une molécule inducible sur diverses cellules (LB, LT, NK, PN...etc.). Ce récepteur peut être clivé et retrouvé dans le plasma.

CD10 : Cette molécule est exprimée pendant les stades immatures des LB dans la moelle osseuse.

CD21: Il régule les réponses prolifératives des LB après rencontre avec l'antigène spécifique.

## 5. Facteurs de risque de la LLC

La Leucémie Lymphoïde chronique (LLC) ne présente pas de facteur de risque bien défini. Cependant, certains facteurs ont été décrits comme étant associés à cette maladie, ainsi on trouve :

## 5.1 Les facteurs constitutionnels

### 5.1.1. Les antécédents familiaux

Chez environ 10 % des patients, il existe une histoire familiale de la LLC. Des études montrent que le risque de développer une LLC dans les familles dont un des membres ont été affectés par une LLC est élevé. Cette hypothèse est confirmée par la publication des résultats d'une étude suédoise portée sur 9 717 patients comparés à un groupe témoin (1 malade pour 4 cas témoins). Le risque relatif de LLC chez les parents de premier degré des patients atteints de LLC a été estimé à 8,5 %. Dans ces familles, la LLC apparaît plus précocement dans la vie et le même type cellulaire de LLC peut-être retrouvé sur plusieurs générations. Son cours d'évolution s'avère plus sévère. Plusieurs études ont montré la présence de populations clonales ayant les caractéristiques cellulaires de la LLC chez des sujets normaux, surtout dans l'entourage familial des malades.

### 5.1.2. L'âge

C'est le facteur de risque principal de la maladie. De fait, l'âge moyen, au moment du diagnostic, est de 70 ans chez les hommes et de 72 ans chez les femmes.

La LLC est très rare avant 40 ans.

### 5.1.3. La race

La comparaison géographique montre qu'à âge constant, la fréquence d'apparition des différents cancers varie considérablement. La LLC est une maladie très rare chez les Asiatiques, en particulier chez les Japonais, vivants en Asie ou ayant immigrés.

## 5.2 Les facteurs environnementaux

### 5.2.1. Les radiations ionisantes

Les radiations ionisantes ont été reliées près de 100 ans avec une surmortalité et la survenue des hémopathies. Une récente étude française sur les employées du CEA, d'AREVA et d'EDF entre 1968 et 2004 et exposés professionnellement à des radiations (rayons X ou gamma) n'a pas retrouvé d'augmentation du risque relatif d'apparition des LLC contrairement aux tumeurs solides, leucémie myéloïde chronique, leucémies aiguës, et aux maladies cardiovasculaires (Leuraud, Richardson et al. 2015).

### 5.2.2 Les agents chimiques

Des études épidémiologiques ont rapporté une association entre le risque relatif de LLC et les professions agricoles, par exposition des sujets aux composants chimiques utilisés dans l'agriculture.

### 5.2.3 Tabagisme

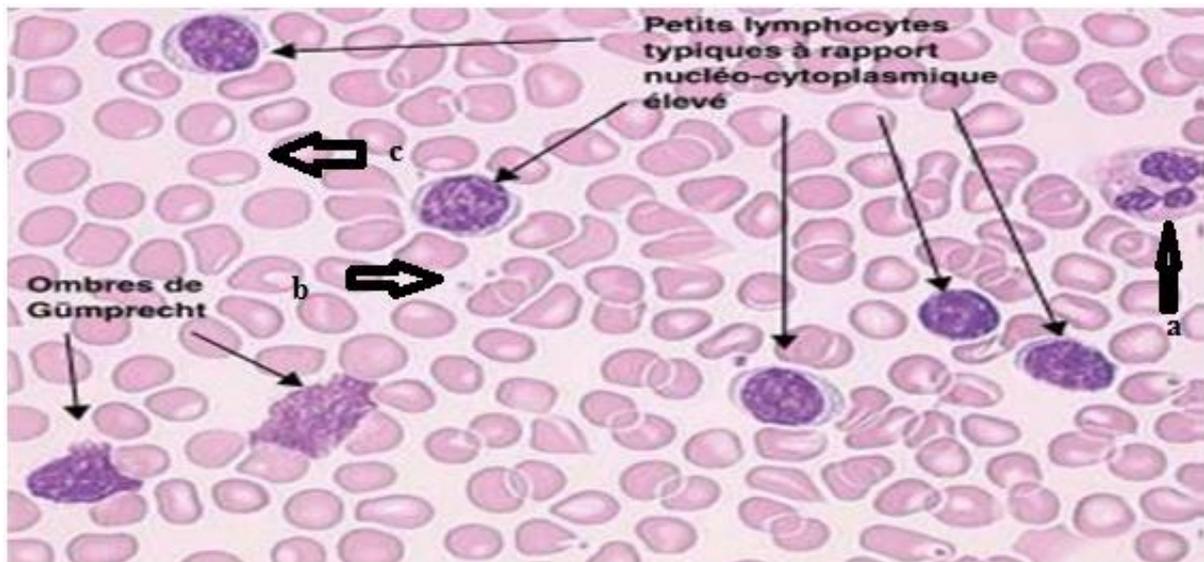
Selon une revue française sur les facteurs de risque liés aux LLC publiée en 2017, la consommation de tabac et l'utilisation de teintures capillaires seraient positivement associées à la maladie.

## 6. Diagnostic

Le diagnostic de la LLC est établi par une numération de la formule sanguine (NFS) montrant une lymphocytose B  $\geq 5000$  lymphocytes/ $\mu\text{l}$  persistant au moins 3 mois, un frottis sanguin présentant de petits lymphocytes morphologiquement matures et un immunophénotypage caractérisé par la co-expression de l'antigène CD5 et les marqueurs de surface des lymphocytes B CD19, CD20 et CD23, ainsi que l'expression des chaînes légères d'immunoglobuline kappa ou lambda. (Cramer, Langerbeins et al. 2016). Ainsi 95% des patients LLC sont diagnostiqués comme étant de type B (LLC-B), tandis que les LLC à lymphocytes T représentent moins de 5% des LLC. (Schriever and Huhn 2003) Dans la majorité des cas, l'hémogramme et l'immunophénotypage suffit au diagnostic de la LLC. (Hallek, Cheson et al. 2008)

### 6.1. Numération formule sanguine (NFS)

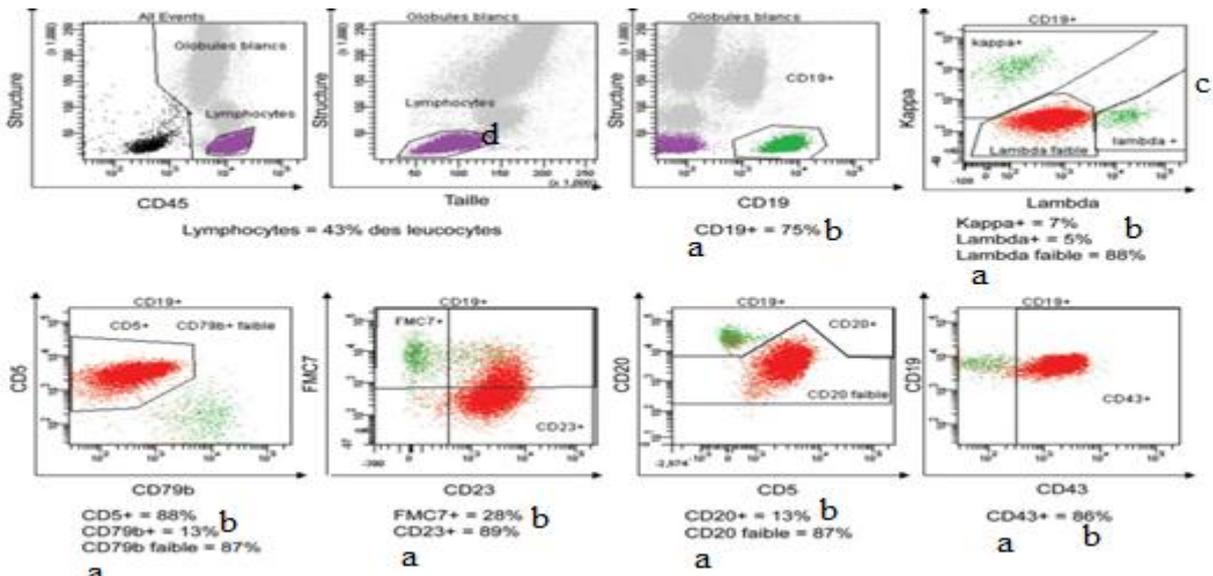
Au niveau de l'hémogramme, une lymphocytose B  $\geq 5000/\mu\text{l}$  sans anémie ni thrombopénie associée sera le plus souvent retrouvée. Cette hémopathie est le plus souvent découverte au cours d'un examen systématique chez un patient sans symptômes apparents. (Kikushige, Ishikawa et al. 2011). Les cellules leucémiques observées sur les frottis sanguins ont les caractéristiques morphologiques de lymphocytes matures de petite taille avec peu de cytoplasme et un noyau dense, sans nucléole, ayant une chromatine partiellement agrégée. (Figure 3). La présence de cellules lysées et réduites à une « ombre nucléaire » ou ombre de Gümprecht, correspondant à un artefact survenant lors de la réalisation des frottis de sang, est caractéristique de la LLC (Hallek, Cheson et al. 2008).



**Figure 3:** Imagerie d'une observation au microscope optique de lymphocytes leucémiques (LLC) sur un frottis sanguin. (Evrard, Gaussem et al. 2005) .a: polynucléaire éosinophile; b: plaquette; c : hématie.

## 6.2. Immunophénotypage

L'immunophénotypage est déterminé à partir des lymphocytes sanguins, par cytométrie en flux. Les cellules leucémiques sont caractérisées par la co-expression de l'antigène CD5 spécifiques aux lymphocytes T, des antigènes de surface CD19, CD20, CD23 des lymphocytes B, ainsi que par l'expression de chaînes légères d'immunoglobulines kappa ou lambda démontrant ainsi le caractère clonal de la LLC. (Cramer, Langerbeins et al. 2016) Ces cellules sont caractérisées par une expression positive de CD19, CD20, CD24, CD23 et CD5, une faible expression des chaînes légères d'immunoglobulines de surface (kappa ou lambda) ainsi que le CD79b et par une absence de l'expression de FMC7. L'expression de CD23 permet de différencier la LLC avec d'autres syndromes lymphoprolifératifs B.



**Figure 4 :** Cytogramme d'un sujet atteint de leucémie lymphoïde chronique. **a :** marqueurs fixés au cellule lymphocytaire. / **b :** pourcentage d'expression des marqueurs sur la cellule LLC. / **c :** cytogramme. / **d :** population lymphocytaire exprimer selon le paramètre de taille et granulose cellulaire.

Le système des scores de Matutes est basé sur la détermination des cinq marqueurs : CD5, CD23, CD79b ou CD22, FMC7 et une immunoglobuline membranaire (Ig) (Matutes, Owusu-Ankomah et al. 1994). Ce score varie de 0 à 5 selon l'expression de ces différents antigènes (Tableau 1). Un score de 4 ou 5 est en faveur du diagnostic de la LLC et élimine les autres causes d'hyperlymphocytose. Un score de 3 correspond généralement à une «LLC atypique». Les scores ≤ 3 permettent de caractériser les autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B. Un score inférieur à 3 exclut formellement le diagnostic de la LLC. (Moreau, Matutes et al. 1997)

**Tableau I :** Système de score de Matutes pour le diagnostic de la LLC. (Herishanu and Polliack 2005).

Antigène	1 point	0 point
Ig de surface monotypique	Expression Faible	Expression Forte
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
FMC7	Négatif	Positif
CD22 ou CD 79b	Expression faible	Expression forte

Une fois le diagnostic établi, la maladie doit être classifiée selon les systèmes de Binet et Rai.

### 6.2.1 Classifications de Rai et de Binet

L'évaluation clinique standard repose sur les classifications introduites par Rai en 1975, très utilisée aux Etats-Unis (tableau 2), et Binet en 1981 largement utilisée en Europe et en Australie (tableau 3). Ces classifications sont basées sur les caractéristiques cliniques déterminables qui semblent être en corrélation avec la charge tumorale et ses effets sur les fonctions de la moelle osseuse. Ces systèmes de classification ont fourni une base pour la prise en charge des patients et les décisions thérapeutiques dans la LLC. Elles permettent également de réaliser une hiérarchisation homogène des groupes de patients pour les essais cliniques. Ces deux systèmes distinguent trois grands groupes de patients ayant des pronostics différents. (Binet, Auquier et al. 1981)

**Tableau II** : Classification de Rai

Pronostic	Stade	Critère de définition	% de LLC	survie médiane (année)
Bon	0	Lymphocytose > 4G/L	31%	>10
Intermédiaire	I	Lymphocytose + adénopathie	35%	9
	II	Lymphocytose + hépato- ou splénomégalie Les adénopathies peuvent ne pas être présentes	26%	5
Mauvais	III	Lymphocytose + Hb < 110g/L Les organomégalie peuvent être ou ne pas être présentes	6%	2
	IV	Lymphocytose + plaquettes < 100 G/L Les organomégalie et l'anémie peuvent être ou ne pas être présentes	2%	2

**Tableau III** : Classification de Binet :

Pronostic	stade	critère de définition	% des LLC	survie médiane (année)
Bon pronostic	A	Lymphocytes > 4 G/L Hb > 100 g/L Plaquettes > 100 G/L Moins de 3 aires lymphoïdes atteintes (1)	63%	>10
Pronostic intermédiaire	B	Lymphocytes > 4 G/L Hb > 100 G/L Plaquettes > 100 G/L Atteintes d'au moins trois <sup>(1)</sup> aires lymphoïdes	30%	5
Mauvais pronostic	C	Lymphocytose > 4 G/L Hémoglobine < 100 g/L et/ou plaquettes < 100G/L, quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes	7%	2

(1) Les aires lymphoïdes considérées sont cervicales, axillaires, inguinales (uni- ou bilatérales), la rate et le foie.

## 7. Traitement de la LLC

Les indications thérapeutiques de la leucémie Lymphoïde Chronique sont définies en fonction du stade de la classification de Binet, de la présence de symptômes et de l'évolutivité de la maladie. Pour les patients sans indication thérapeutique initiale, une surveillance est nécessaire afin de détecter une éventuelle progression de la maladie. Plus de la moitié des patients diagnostiqués au stade A ne seront pas évolutifs et donc non traités ultérieurement. Le but du traitement est d'obtenir une réponse complète (clinique et hématologique). La maladie évolue en phases successives, nécessitant habituellement plusieurs lignes de traitement.

## 7.1 Modalités thérapeutiques

### 7.1.1. Surveillance (abstention thérapeutique)

Pour les patients sans indication thérapeutique initiale, la prise en charge repose sur une surveillance afin de détecter une éventuelle progression de la maladie. Cette surveillance repose sur la clinique et la biologie.

L'examen clinique recherche des complications infectieuses et les critères d'évolutivité, deux voir une fois par an selon l'évolutivité.

Une surveillance biologique est également requise avec plusieurs modalités dont un hémogramme avec numération des réticulocytes un ou deux fois par an selon l'évolutivité, une électrophorèse des protéines sériques en cas de complications infectieuses et enfin un bilan d'hémolyse (haptoglobine, bilirubine libre, LDH, test de Coombs direct) en cas d'apparition d'une anémie. Un suivi de l'analyse phénotypique n'est pas requis. La surveillance sera renforcée si des critères d'évolutivité clinique et biologique apparaissent (Guide ALD. Juin2011. p15.).

### 7.1.2. Traitement symptomatique

- a) Lutte contre le syndrome de lyse.
- b) Traitement des complications infectieuses: antibiothérapie, antiviraux ou antifongiques.
- c) Traitement de l'hypogammaglobulinémie: administrations régulières de gammaglobulines intraveineuses en cas d'hypogammaglobulinémie compliquée par des infections.
- d) Traitement des cytopénies par infiltration médullaire.
- e) Traitement de la cytopénie auto-immune.

### 7.1.3 Traitement des transformations

Le syndrome de Richter est évoqué en cas de croissance rapide d'une ou plusieurs adénopathies volumineuses, asymétriques ou compressives. Le traitement s'inspire de celui des lymphomes de haut grade de malignité.

### 7.1.4 Traitement spécifiques et leurs armes thérapeutiques

Comme pour toute pathologie, l'état général des patients conditionne le traitement. En s'inspirant des classifications proposées dans les tumeurs solides, les Allemands ont proposé de classer les patients suivant trois groupes en fonction de leurs objectifs thérapeutiques:

-Le premier, le groupe « no go » est constitué des patients ayant une survie estimée réduite par de multiples et/ou de sévères comorbidités, qui doivent être traités avec les meilleurs soins palliatifs.

-Le second, le groupe « slow go » est composé de patients ayant une espérance de vie intermédiaire qui doivent être traités pour permettre un bon contrôle des symptômes de la maladie, via des traitements à des doses réduites.

-Enfin, le groupe des patients « go, go » est formé de patients avec un bon état général et ils sont traités par de fortes doses de chimiothérapie en vue d'obtenir de longues rémissions complètes. (Leblond, Hospital et al. 2009)

#### 7.1.4.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie est un pilier du traitement des patients présentant une LLC avancée ou rapidement évolutive. Les principales molécules de chimiothérapie utilisées dans le traitement de la LLC sont les suivantes (Axelle Gilles, la Belgian Hematological Society (BHS). 2018) :

##### >Chlorambucil

Le chlorambucil (Chloraminophène) est un agent alkylant anticancéreux actif par voie orale. Depuis les années 1950, le Chlorambucil était le traitement de référence de la leucémie lymphoïde chronique avant l'arrivée de la Fludarabine dans les années 1990.

Cependant, il est encore recommandé chez les patients de plus de 65 ans selon les recommandations de la Haute Autorité de Santé.

##### >Cyclophosphamide (Endoxan ®)

Agent alkylant bi-fonctionnel, le Cyclophosphamide agit par interaction directe sur l'ADN entraînant des modifications profondes chimiques ou enzymatiques ainsi que la formation de "ponts" alcoyles, avec pour conséquence une inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN aboutissant à la mort cellulaire. Il est indiqué en première intention en association avec d'autres molécules dans le protocole R-FC.

##### >Fludarabine (Fludara ®)

La Fludarabine est un antinéoplasique de la famille des purines, anti métabolite hydrosoluble. Il est établi que ses effets sur la réplication de l'ADN, la transcription de l'ARN et la synthèse des protéines contribuent tous à l'inhibition de la prolifération des cellules leucémiques, l'inhibition de la synthèse de l'ADN étant le facteur principal. Elle est indiquée dans le traitement de la LLC à cellules B chez les patients ayant des réserves médullaires suffisantes mais contre indiqué en cas d'insuffisance rénale avec DFG <30ml/min.

##### >Bendamustine (Levact ®)

La Bendamustine est un agent alkylant anti-tumoral dont la structure comprend un anneau benzimidazole purine; cet anneau lui confère les propriétés cytotoxiques des agents

alkylants et des analogues de la purine, ce qui provoque une « mitose altérée » caractéristique. Cette molécule a été synthétisée pour être moins toxique que les agents alkylants, utilisée en monothérapie ou en association avec le Rituximab.

#### 7.1.4.2 Immunothérapie

L'immunothérapie qui, contrairement à la chimiothérapie, est spécifiquement dirigée contre les cellules malades, en épargnant les cellules saines. L'immunothérapie stimule le système immunitaire afin que celui-ci puisse continuer à combattre les cellules cancéreuses et les détruire (Axelle Gilles et la Belgian Hematological Society (BHS). 2018. p53).

##### >Rituximab (Mabthera ®)

Le Rituximab est un anticorps monoclonal chimérique anti CD20. Le fragment Fab du Rituximab se lie au CD20 exprimé sur la surface des lymphocytes B, le fragment Fc peut générer des fonctions immunitaires effectrices qui entraînent la lyse de ces lymphocytes B. Le mécanisme possible de la lyse cellulaire induite par les effecteurs est l'induction d'une cytotoxicité dépendante du complément. Il a aussi été démontré que le Rituximab induit une mort cellulaire par apoptose des cellules leucémiques. Il est indiqué en association à une chimiothérapie (R-FC, R-Benda) pour le traitement des patients atteints de LLC, non précédemment traités ou en rechute ou réfractaires.

##### >Obinutuzumab

L'obinutuzumab est un anticorps monoclonal qui se lie également à l'antigène CD-20 et détruit encore mieux les cellules LLC. Il est administré sous contrôle strict, en perfusion à l'hôpital. L'obinutuzumab est utilisé en association avec le Chlorambucil chez des patients n'ayant reçu aucun traitement contre la LLC et qui, en même temps, souffrent d'autres maladies, par exemple une maladie cardiaque (Axelle Gilles et la Belgian Hematological Society (BHS). 2018. p54).

#### 7.1.4.3. Les thérapies ciblées

Une thérapie ciblée est un traitement médicamenteux qui bloque la croissance des cellules cancéreuses en interagissant avec les cibles moléculaires spécifiques essentielles à cette croissance.

##### >Idélalisib (Zydelig ®)

L'Idélalisib est un inhibiteur sélectif de la PI3 Kinase (kinases cytoplasmiques similaires aux BTK, enzymes participant au recrutement et à l'activation des différentes enzymes intracellulaires qui régulent la croissance, la différenciation et la survie des cellules).

En inhibant la PI3 Kinase, l'Idélalisib inhibe donc la prolifération, la motilité et l'adhésion cellulaire et promouvoir l'apoptose des cellules cancéreuses.

L'Idélalisib est indiqué en association avec le Rituximab, pour le traitement de patients atteints de LLC en rechute ou en progression après deux lignes de traitement et en première ligne de traitement chez les patients présentant une délétion 17p ou une mutation de TP53 et pour lesquels une chimio-immunothérapie n'est pas appropriée. Cette association, très efficace, améliore la survie sans progression de la maladie. (Gabriel G, Nushin S. 2016).

#### **>Inhibiteur BTK**

La Bruton Tyrosine Kinase (BTK) est une enzyme qui est censée jouer un rôle crucial dans la signalisation par la voie BCR en favorisant la communication entre les cellules leucémiques qui leur permettent de continuer à croître et survivre. La découverte de l'enzyme BTK a conduit à l'élaboration d'une nouvelle classe de médicaments, les inhibiteurs de BTK, qui bloquent l'activité de la BTK et, ainsi, empêchent la prolifération des cellules leucémiques.

#### **>Ibrutinib**

L'Ibrutinib est un inhibiteur de BTK de première génération freinant la prolifération et la survie des cellules LLC. Il est administré en monothérapie à des patients adultes non précédemment traités, ou encore en monothérapie ou combiné à une chimiothérapie à des patients adultes ayant déjà reçu au moins un traitement contre la LLC, ou en monothérapie à des patients porteurs d'une mutation.

#### **>Inhibiteur de BCL2 (Vénétoclax)**

Le Vénétoclax est un médicament inhibiteur de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, médiateur de la survie tumorale. Le Vénétoclax initie la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe conduisant à l'apoptose des LLC. Il est indiqué en cas de présence de la délétion 17p ou des mutations de TP53 chez les patients adultes inéligibles ou en échec à un inhibiteur du récepteur antigénique des LB ; le taux de réponse atteint près de 80%, avec une quasi disparition des cellules leucémiques dans un tiers des cas. Il peut être utilisé en combinaison avec le Rituximab ou avec l'Ibrutinib dans les formes réfractaires.

#### **7.1.4.4. Schémas thérapeutiques**

Le choix d'un traitement pour la LLC est compliqué puisqu'il existe plusieurs nouvelles molécules dont la plupart ne sont pas ou plus commercialisées sur le marché et il n'existe pas de consensus malgré les nombreuses pratiques décrites dans la documentation

scientifique. Plusieurs facteurs doivent être pris en compte avant d'entreprendre un traitement, notamment le stade de la maladie, les symptômes et l'état de santé général du patient, ainsi que les facteurs de risque génétiques de la maladie.

#### **7.1.4.4.1. Traitement de première ligne des patients jeune < 70 ans avec un bon état général :**

- **Sans Dél 17p**

Rituximab + Fludarabine + Cyclophosphamide (R-FC). Il s'agit du traitement le plus agressif mais aussi celui présentant le plus fort taux de réponse ciblant la LLC. Utilisé classiquement chez les patients jeunes et sans comorbidité associée, il se compose de 6 cycles de 28 jours décomposés.

#### **7.1.4.4.2. Traitement de première ligne chez les patients âgés avec un mauvais état général : Rituximab + Bendamustine (RB) :**

Au vu de la toxicité du traitement R-FC et des Comorbidités couramment observées chez les patients âgés, l'utilisation du Rituximab en association avec la bendamustine (RB) est souvent préférée chez ces patients. De plus, avant l'avènement des nouvelles molécules, elle constituait aussi une approche thérapeutique intéressante pour les patients réfractaires à la Fludarabine.

En effet, bien que dans la population globale, le R-FC ait montré sa supériorité vis-à-vis du BR, une étude allemande présentée en 2014 a montré que chez les patients âgés de plus de 65 ans ou ayant des comorbidités (Score CIRS>4) il n'y avait pas de différence entre RFC et BR au niveau de la survie globale sans progression mais que les patients traités par BR présentaient moins d'infections sévères (48,4 % pour RFC vs 26,8 % pour BR). Ce schéma thérapeutique est de 6 cycles.

#### **7.1.4.4.3. Traitement des patients avec mutation de la TP53, en rechute ou réfractaires :**

Avant de faire un choix thérapeutique face à une rechute de la LLC ou à une maladie réfractaire au traitement, il faut réfléchir au genre et à la durée de la réponse que la première ligne de traitement avait entraînée, en règle générale, si le patient avait obtenu une rémission supérieure à 24-36 mois, le traitement de première intention peut être répété, Dans le cas contraire, il faut choisir un autre traitement.

Avec l'arrivée de nouvelles modalités thérapeutiques, l'Ibrutinib, l'Idélalisib en association avec le Rituximab et les associations avec la chimio-immunothérapie (p. ex. FCR

à dose réduite, Bendamustine en association avec le Rituximab, Chlorambucil en association avec Le rituximab) demeurent des options valables.

Le choix d'un traitement devient de plus en plus difficile, le mieux est de personnaliser la thérapie en prenant en considération le coût du traitement, le profil de toxicité des agents choisis et le statut de performance sur le patient. Pour les patients atteints de LLC et porteurs d'une délétion 17p, l'Ibrutinib ou l'association Idélalisib-Rituximab demeurent deux options de choix avec possibilité d'utilisation du Vénétoclax (Gabriel Gazzé. Nushin Sadeghi. 2016 p238).

- **Grefe de moelle « transplantation de cellules souches »**

Cette stratégie thérapeutique prend de plus en plus de place dans la stratégie thérapeutique de la LLC. La greffe fait suite à l'administration d'une immuno-chimiothérapie initiale ou de rattrapage. Tous les patients atteints de LLC ne sont cependant pas traités par une greffe de la moelle.

Ce traitement est réservé à certains patients, en fonction du pronostic et de la sévérité de leur maladie, d'une part, de leur âge et de leur état général, d'autre part.

Le but de la greffe de cellule souche est de détruire l'ensemble des cellules cancéreuses dans la moelle osseuse. Pour ce faire, on administre aux patients une chimiothérapie à fortes doses, soit seule, soit associée à une irradiation du corps. Ces procédures sont très toxiques pour les cellules malignes, mais le sont malheureusement aussi pour les cellules sanguines normales. Après ce traitement, la moelle osseuse n'est plus capable de produire normalement les cellules sanguines normales. C'est pourquoi, après traitement, une certaine quantité de cellules restituées au patient, dites souches, capables de reconstituer une moelle fonctionnelle et de relancer la production de cellules sanguines (Dr Axelle Gilles et la Belgian Hematological Society (BHS). 2018).

Les critères d'indication d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques sont les suivants :

- Absence de réponse ou rechute précoce (dans les 12 mois) suivant une chimiothérapie à base d'analogues de purines.
- Rechute dans les 24 mois après l'obtention d'une réponse par l'association FCR (Fludarabine, Cyclophosphamide et Rituximab).
- LLC évolutive avec délétion 17p après un traitement par Alemtuzumab (Guide ALD n° 30. Juin 2011. p17).

**- Traitements symptomatiques**

Les manifestations cliniques les plus fréquentes, au cours de la LLC, sont un syndrome anémique et un état infectieux. Les adénopathies ne sont pas compressives (sauf en cas de transformation en syndrome de Richter).

- Antibiothérapie en cas de syndrome infectieux,
- Administration régulières de gammaglobulines intraveineuses en cas d'hypogammaglobulinémie compliquée par des infections antérieures.
- Transfusions sanguines en cas d'anémie.
- Traitements aux Corticoïdes.

**- Traitement de complications liées à la LLC****\*Les infections**

Les immunoglobulines polyvalentes injectables peuvent être prescrites en cas d'hypogammaglobulinémie (< 5g/l) associée à des infections répétitives.

La sensibilité aux infections peut justifier l'utilisation de facteurs de croissance granulocytaires en prévention secondaire.

La prévention de certaines de ces infections fait appel aux antiviraux (Acyclovir) et aux sulfamides (Cortimazole). Cette prophylaxie anti-infectieuse est prescrite jusqu'à 6 à 18 mois après traitement par analogues de purines. Le traitement ne sera interrompu qu'avec l'accord du spécialiste hématologue.

A titre préventif, la vaccination antigrippale annuelle est recommandée, ainsi que la vaccination anti-pneumocoque tous les 5ans chez les personnes ayant des antécédents d'infection pulmonaire ou invasive à pneumocoque.

**\*La transformation tumorale**

Le syndrome de Richter est évoqué en cas de croissance rapide d'une ou plusieurs adénopathies volumineuses, asymétriques ou compressives. Le traitement s'inspire de ceux des lymphomes de haut grade de malignité.

**\*L'auto-immunité**

L'apparition de cytopénie auto-immune (anémie, thrombocytopenie, erythroblastopenie), dont la symptomatologie peut être brutale, et qui concerne 10 à 15 % des patients, requiert un avis spécialisé rapide.

## ***Chapitre II : Biologie de la LLC***

## 1. Origine cellulaire de la LLC

L'origine cellulaire de la LLC est très controversée, que ce soit en ce qui concerne le type de cellule où a lieu la première lésion génétique (cellule souche hématopoïétique « CSH » versus cellule B mature), ou bien le type de LB mature originaire de l'expansion clonale (pré-CG (centre germinale), post-CG ou CG-indépendant). La présence de réarrangements clonaux des gènes Ig ainsi que l'expression de marqueurs de surface cellulaire spécifiques ont établi que la LLC est dérivée d'un lymphocyte B mature. Elle est caractérisée par une faible expression des immunoglobulines de surface (ayant des chaînes légères Kappa ou Lambda), du CD19 (cluster de différenciation 19) et du CD20, CD23 positif et des antigènes CD200 et CD5. L'expression du CD5 a fait supposer que la LLC est dérivée de la lignée B1, sécrétrice d'IgM qui contribue à l'immunité innée destinée contre les antigènes de nature non-protéique, par opposition à la lignée B2, impliquée dans l'immunité adaptative. Les LLC mutées IGHV-M (immunoglobuline des chaînes lourde mutée) sont dérivées de cellules B ayant rencontré l'antigène spécifique, et qui ont transité par le centre germinal (CG) des organes lymphoïdes secondaires, qui constitue le site de déroulement des hypermutations somatiques des Igs. Par contre, les LLC non mutées (IGHV-UM) sont dérivées des LB pré-GC (naïves) ou de LB ayant eu un contact antigénique mais CG-indépendants. En fait, les sous-types IGHV-M et IGHV-UM sont similaires aux LB CD27+ mémoires, ce qui suggère que les deux sous-types de LLC proviennent de LB CD27+ ayant eu un contact avec un antigène, les sous-types IGHV-M et IGHV-UM dérivant respectivement de cellules post-CG et CG-indépendantes.

Les événements génétiques et épigénétiques précoces qui conduisent à la survenue de la LLC se produisent très vraisemblablement pendant le stade de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Chez quelques patients ayant bénéficié d'une transplantation allogénique de CSH, des cellules lymphoïdes pré-malignes ont malheureusement été transmises du donneur au receveur, conduisant ensuite au développement d'une LLC. De plus, des CSH de patients présentant une LLC ayant été greffée sur des souris immunodéficientes ont induit des lymphoproliférations B, ce qui n'a pas été le cas avec des CSH de donneurs « sains ». Enfin, des lésions spécifiques dans les gènes impliqués dans les cancers lymphoïdes (par exemple Notch1, SF3B1 et EGR) ont été trouvées dans les CSH purifiés de certains patients atteints de LLC. Cependant, la certitude que les lésions génétiques initiales favorisant le développement de la LLC se produisent dans les CSH demeure

controversée, en particulier compte tenu des difficultés à purifier les populations de CSH de la moelle osseuse. De plus, les personnes âgées en bonne santé présentent parfois une hématopoïèse clonale, qui augmente le risque d'apparition de cancers hématologiques et qui est associée à des lésions génétiques également détectées au cours de la LLC. (Johnstone 1982)

## 2. Marqueurs membranaires de la LLC

Les lymphocytes B monoclonaux ont un niveau d'expression élevé des marqueurs CD19, CD5, CD23, et un niveau d'expression faible en IgM et IgD membranaires et du CD79b. ces marqueurs déterminent le score de Matutes qui nous indique la présence ou l'absence d'une LLC chez un patient après analyse par cytométrie en flux. Les marqueurs membranaires de la LLC sont :

### - **CD20** :

C'est une protéine non glycosylée exprimée à la surface des LB. Il n'existe pas de ligand naturel connu et ses fonctions exactes ne sont pas encore totalement définies, mais il co-localise avec le récepteur des lymphocytes B (BCR) et agit comme un canal calcique participant à l'activation de la signalisation via le BCR. Le CD 20 est ciblé par un anticorps monoclonale chimérique anti-CD20 (Rituximab) qui a un apport thérapeutique majeur dans la LLC. (Cragg, Walshe et al. 2005)

### - **FMC7**

Dans la LLC, l'expression de FMC7 est faible ou absente. Le marqueur FMC7 est utilisé sur le plan diagnostique pour distinguer la LLC des autres troubles des lymphocytes B et correspond à un élément déterminant du système de score de Matutes pour le diagnostic de la LLC. Les anticorps FMC sont des anticorps monoclonaux dirigés contre les déterminants antigéniques des lymphocytes B, ils reconnaissent différents stades de développement des cellules B et/ou des lymphocytes T. C'est un épitope sur la molécule CD20 elle-même. Des études de blocage mutuel montrent une inhibition mutuelle de FMC7 et CD20. La molécule FMC7 se lie donc probablement à un complexe CD20 multimérique, et elle n'est détectée que lorsque l'antigène CD20 est présent à des quantités élevées.

### -**CD38**

Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire de type II, qui a une fonction de récepteur ou d'ectoenzyme. Son activité enzymatique est impliquée dans le métabolisme de l'ADP. Il est physiologiquement présent sur les LB, les LT, les cellules NK et les monocytes.

Sur ces cellules, il peut s'associer avec le CMH de classe III et joue un rôle de corécepteur pour l'activation des lymphocytes T. Dans la LLC, CD38 est à la fois un reflet de l'activité proliférative et de l'interaction avec le microenvironnement. Il est considéré comme un marqueur indépendant de la LLC. Son rôle dans le microenvironnement tumoral est dû à la liaison avec son ligand, le CD31 aussi appelé PECAM1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1). La fixation de ce ligand, exprimé par les cellules stromales et les Nurse-Like Cells (NLC) provoque l'activation d'une cascade de signalisation favorisant la survie des cellules leucémiques. L'expression du CD38 est associée à un mauvais pronostic : stade avancé de la maladie, incidence plus importante d'adénopathies, hépatomégalie, taux de  $\beta 2$  microglobuline et CD23 élevés, LDT court.

#### **-CD5**

C'est une protéine transmembranaire exprimée par les lymphocytes B. Il peut jouer un rôle négatif dans la signalisation BCR. Les lymphocytes B des amygdales normales subissent une apoptose après ligation du CD5. Le CD5 induit une apoptose différentielle chez les patients atteints d'une LLC.

#### **- CD49**

Le CD49 est une molécule de surface dont l'expression induit la prolifération des cellules LLC sous l'effet du microenvironnement. Son expression est associée aux formes progressives de la maladie, et a une survie globale et sans traitement raccourcie. (Vincent, Cawley et al. 1996) Elle est également associée à l'expression du CD38 et de ZAP70. Il peut constituer une cible thérapeutique potentielle (Dal Bo, Tissino et al. 2014).

#### **-CD23**

C'est le récepteur de faible affinité de l'IgE. Il est exprimé à la surface de cellules des LLC. L'augmentation du niveau de son expression est corrélée au temps de dédoublement de la lymphocytose et permet de suivre la progression de la maladie. Le temps de dédoublement permet de distinguer les patients ayant une forme indolente ou agressive. CD23 constitue un marqueur pronostique en terme de survie sans traitement.

#### **-CD22**

Il correspond à une protéine de surface cellulaire restreinte aux lymphocytes B exprimée à des niveaux élevés uniquement dans les lymphocytes B matures. Après ligation du BCR à son antigène spécifique, la protéine Lyn phosphoryle les résidus tyrosines présents dans les trois séquences ITIM de CD22, permettant la création de sites d'amarrage pour la

protéine phosphatase SHP-1, qui est un régulateur négatif de la signalisation BCR. Les niveaux d'expression de CD22 dans les LLC n'ont pas d'importance pronostique.

#### **-CD72**

L'expression de CD72 est limitée à la lignée lymphocytaire B et désactivée dans les plasmocytes sécrétant des anticorps. Les anticorps antiCD72 délivrent des signaux de co-stimulation aux cellules LLC.

#### **-CD19**

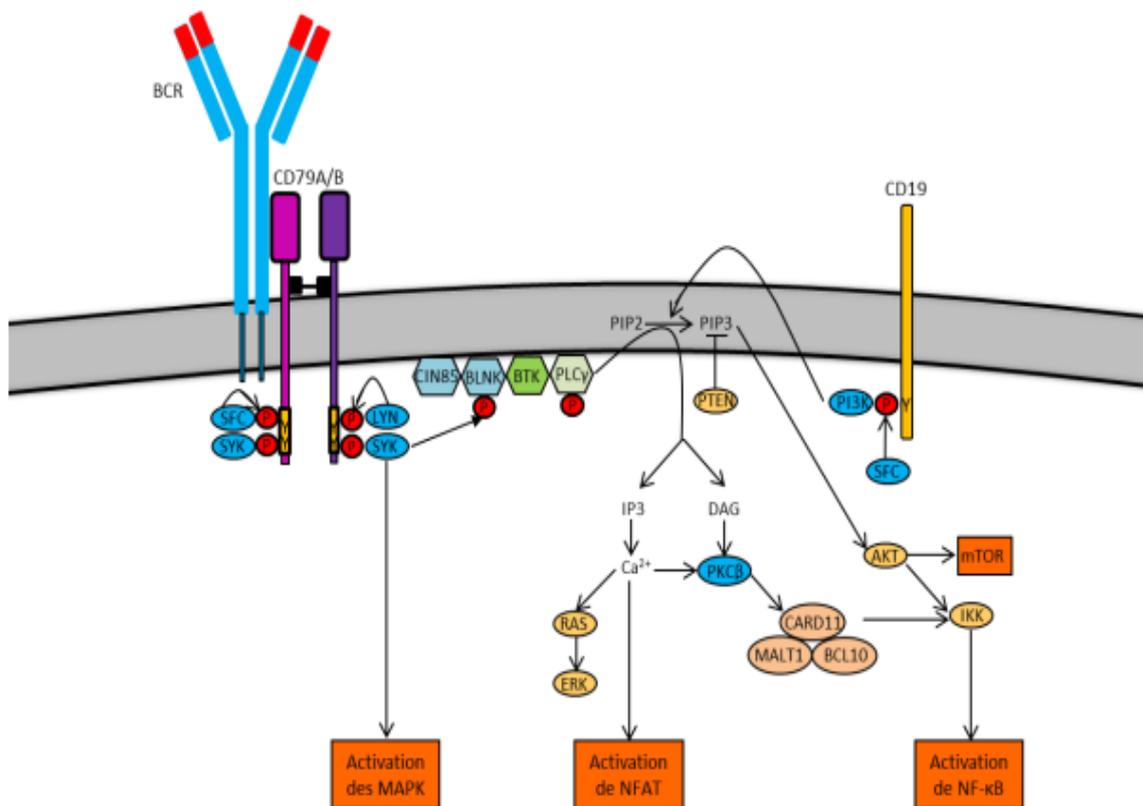
L'antigène CD19 est la protéine la plus omniprésente dans la lignée des lymphocytes B. Il joue un rôle important en oncologie clinique. CD19 est un marqueur universel de cellules B exprimé dans une large gamme pendant les étapes de maturation, y compris les cellules pré-B. La molécule CD19 est exprimée sur 100% des cellules B périphériques telles que définies par l'expression de chaînes légères kappa ou lambda. Le récepteur de CD19 est un important régulateur fonctionnel de la prolifération des lymphocytes B normaux et malins. Il est exprimé dans toutes les leucémies précurseurs des lymphocytes B. Le CD19 est une molécule de surface cellulaire qui s'assemble avec le récepteur d'antigène des lymphocytes B afin de diminuer le seuil de stimulation dépendant du récepteur d'antigène. (Scheuermann and Racila 1995)

### **3. Signalisation du récepteur BCR**

L'agrégation du récepteur (BCR) et son changement de conformation induits par l'antigène entraînent la phosphorylation des motifs ITAMs (Immunoreceptor tyrosine based activation motif) via la kinase LYN, provoquant ainsi le déclenchement de la cascade d'activation du BCR. Cette phosphorylation crée des sites d'ancrage pour les protéines contenant des domaines SH-2, telle que SYK (Spleen Tyrosine Kinase) et un recrutement accru de la kinase LYN. (Young and Staudt 2013) Les protéines SYK et BTK (Bruton Tyrosine Kinase) sont essentielles pour la signalisation : SYK recrute le complexe BLNK (b-cell linker protein) et CIN85 (Cbl interacting protein of 85kd) et active BTK. L'activation de BTK dépend de la phosphorylation de la phosphoinositidine 3-kinase (PI3K) par SYK. Cette phosphorylation est nécessaire pour le recrutement de la PI3K au niveau de la membrane cellulaire. (Seda and Mraz 2015).

Le CD19 et BCAP (b-cell adaptor for PI3K) sont des protéines d'ancrage de PI3K phosphorylé, elles permettent le recrutement et l'assemblage du signalosome du BCR, et l'amplification du signal. La PI3K activée va phosphoryler le phosphatidylinositide

biphosphate (PIP<sub>2</sub>), générant un deuxième message (PIP<sub>3</sub>) servant de site d'ancrage pour recruter d'autres effecteurs tels que BTK et PLC $\gamma$  (phospholipase C  $\gamma$ ). La BTK joue un rôle crucial dans le développement lymphocytaire B. La PLC $\gamma$  va cliver le PIP<sub>2</sub> en diacylglycérol (DAG) et IP<sub>3</sub> (inositol triphosphate) ce qui entraîne une augmentation du calcium intracellulaire. La combinaison de l'augmentation du calcium intracellulaire et la présence de DAG va permettre l'activation de la PKC $\beta$  qui va phosphoryler différents substrats. L'activation du BCR agit sur d'autres voies de signalisation comme la voie ERK/MAPK (extracellular signal-regulated kinase et mitogen activated protein kinases), NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), mTor (mammalian target of rapamycin) et NFAT (nuclear factor of activated t-cell). LYN joue également un rôle régulateur par un contrôle négatif de l'activation du BCR via les phosphatases. La signalisation peut être modulée selon le stade de maturation de la cellule et sa localisation (Seda and Mraz 2015).



**Figure 5:** Représentation schématique de la voie de signalisation du récepteur BCR, BCR :B-cell receptor ;les kinases sous forme ovale ;les facteurs de transcription sont sous formes de rectangle ;les adaptateurs sous forme d'hexagones.

Dans les cellules LLC, la signalisation constitutive du BCR est impliquée dans l'expansion et l'entretien du clone cellulaire et joue ainsi un rôle clé dans la survenue de la

maladie. Après engagement du BCR, les tyrosines kinases associées à des protéines adaptatrices SYK et nouvelle kinase de LCK/YES (LYN) sont recrutées et deviennent phosphorylées. Les kinases activées activent à leur tour les cibles en aval : Bruton tyrosine kinase (BTK) et phosphoinositol-3- kinases (PI3Ks), qui déclenchent alors des cascades de signalisation en aval entraînant l'activation de la protéine kinase AKT, de kinases extracellulaires régulées par le signal ERK1/ 2, et du facteur nucléaire (NF)- $\kappa$ B, et du facteur nucléaire NFAT. En conséquence, des composants clés de la voie de signalisation BCR tels que BTK et PI3K sont des cibles thérapeutiques potentielles de la LLC par le développement d'inhibiteurs sélectifs (Seda and Mraz 2015).

#### **4. Mutation des régions variables des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines et substituts (ZAP-70, CD38)**

Pendant le développement des lymphocytes B, les segments de gènes codant aux régions variables (V) des chaînes Igs sont réarrangés, ils codent pour une partie de la molécule d'Ig responsable de la reconnaissance de l'antigène via le récepteur BCR. Quand un antigène spécifique se lie au récepteur BCR du LB naïf, ce dernier est activé et forme le centre germinal (CG) dans les follicules lymphoïdes, ceci en coopération avec les lymphocytes T helpers. Les segments de gènes codant aux régions variables V des Igs subissent le processus d'hypermutation somatique permettant l'introduction de mutations sur les segments réarrangés des gènes VH DJH et VL JL. De ce fait, seules les LB possédant une forte affinité à l'antigène qui prolifèrent. Le statut mutationnel de gènes des régions variables des chaînes lourdes d'immunoglobuline (IGHV) permet de savoir si les LB ont été exposées à un antigène ou non. Les LLC exprimant des gènes IGHV non muté (IGHV-UM) sont dérivées des LB matures CD5+CD27- naïves, tandis que les LLC avec IGHV-M (muté) proviennent d'une sous-population cellulaire CD5+CD27+ post-CG. Les LLC IGHV-M sont dérivées de LB ayant passées par le CG alors que les LLC IGVH-UM proviennent de cellules B pré-CG naïves ou de LB mémoires CG indépendantes. Le statut mutationnel des gènes IGHV représente un facteur pronostique très important. Les LLC avec IGHV-M ont une évolution clinique bénigne présentant une progression plus longue et une bonne survie globale. Un taux de mutation supérieur ou égal à 2 % par rapport à la séquence ADN des lignées germinales est considéré comme étant significatif pour affirmer le caractère M, ce statut est détecté par séquençage suivant la technique de Sanger ou par séquençage de nouvelle génération(NGS).

Les tests de cytométrie mesurant l'expression de la protéine kinase ZAP-70 (protéine kinase associée à la chaîne zêta) peut être considérée comme un substitut à la détermination du statut mutationnel d'IGHV puisque l'expression de ZAP-70 est directement associée au statut mutationnel, cependant. ZAP-70 reste peu recherchée car la reproductibilité interlaboratoire est controversée. Le statut mutationnel des gènes IGHV reste stable tout au long de la maladie et représente l'un des biomarqueurs pronostiques les plus importants de la LLC. En comparaison avec des patients présentant IGHV-M CLL, ceux avec IGHV-UM sont caractérisés par la présence de lésions génétiques à haut risque, d'une propension accrue à présenter une évolution clonale, et donc un OS défavorable. (Damle, 1999 )

## 5. Mutations IGVH

Le statut mutationnel IGVH permet de mieux en mieux comprendre l'origine cellulaire de la LLC. Un statut IGVH muté traduisant un passage dans le GC. Le séquençage des régions variables de la chaîne lourde des immunoglobulines peut mettre en évidence des polymorphismes. Le statut IGVH s'est révélé être un marqueur pronostique important. Un statut IGVH non muté est associé à une LLC plus agressive et un pronostic péjoratif. A l'inverse, un statut IGVH muté semble prédire une LLC plus indolente (Kuppers 2005).

## 6. Mécanismes physiopathologiques de la LLC

Les deux mécanismes physiopathologiques responsables de la survenue des leucémies lymphoïdes chroniques sont l'apparition de défauts d'apoptose et la survenue d'anomalies dans la prolifération des cellules.

### 6.1. Défaut de l'apoptose

Il est communément admis que les LLC se caractérisent par une dérégulation de l'apoptose conduisant à une accumulation des LB. De façon générale, il existe deux voies principales de l'apoptose :

-La voie intrinsèque : Elle est activée par un large spectre de signaux tels les drogues cytotoxiques, l'irradiation, la privation en facteurs de croissance et les stress cellulaire.

-La voie extrinsèque : Elle est activée par les récepteurs de mort cellulaire, membres de la famille des TNF (facteur nécrose tumorale). Ils sont présents sur la surface cellulaire. Dans les leucémies lymphoïdes chroniques, les mécanismes moléculaires de régulation de l'apoptose ne sont que partiellement élucidés, mais l'importance des protéines pro et anti apoptotiques de

la famille BCL2 est bien mise en évidence. Plusieurs études ont montré l'existence d'un niveau d'expression élevé de la protéine anti-apoptotique BCL2 par rapport à la protéine pro-apoptotique BAX, les ratios BCL2/BAX élevés étant souvent corrélés avec une LLC agressive ou présence d'une mauvaise réponse au traitement (Packham, 2005)

### **6.2. Anomalies de prolifération**

Des études ont révélé que les LLC sont des cellules qui se divisent rapidement. Il existe aussi des compartiments dans l'organisme qui favorisant cette prolifération des LLC, localisés dans la moelle et dans les ganglions et les follicules. Il existe un lien direct entre le taux de croissance cellulaire et la progression de la maladie. Le temps de dédoublement de la lymphocytose est significatif cliniquement, car il reflète la capacité proliférative des cellules leucémiques, ainsi que leur potentiel à promouvoir la survenue de lésion au niveau de l'ADN. La variabilité des présentations cliniques et l'hétérogénéité des marqueurs biologiques à valeur pronostique des LLC, tels que l'augmentation du taux sérique de la thymidine kinase et du CD23 soluble, la présence de facteurs d'activation à la surface cellulaire, en particulier le CD38, et l'expression de la protéine ZAP-70 a été également reliée à l'apparition de ces anomalies de prolifération.(Kuppers 2005)

### **6.3. Facteur anti-apoptotique Bcl-2**

La LLC se caractérise par des niveaux élevés d'expression de la protéine du lymphome à cellules B 2 (Bcl-2) ainsi que l'hypométhylation du promoteur du gène BCL2. La surexpression de la protéine Bcl-2 dans la LLC n'est pas complètement élucidé. Elle résulte de la translocation des gènes vers les loci d'Ig dans seulement 10 % des cas (revue algérienne d'hématologie 2015). Pour les autres cas, une suppression ou une diminution des micro-ARN MIR15A et MIR16-1 pourrait être la cause, car ces micro-ARN sont connus pour être des régulateurs négatifs de l'expression du gène Bcl-2. La surexpression de Bcl-2 ou d'autres protéines anti-apoptotiques (par exemple, Bcl-xl et Mcl-1) entraîne la séquestration des protéines BH3 (Bim et/ou Bid) et les cellules deviennent ainsi résistantes à l'apoptose. Ces observations ont conduit au développement de peptides mimétiques du BH3 pour induire l'apoptose dans les LLC et d'autres cancers Bcl-2-dépendants.

### **6.4. Régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose**

La lésion génétique la plus fréquente dans la LLC est constituée de délétions 13q14 (del13q14), qui sont généralement mono-alléliques et plus répandues dans les LLC IGHV-M que dans les LLC IGHV-UM. Ces anomalies sont souvent uniques, suggérant leur rôle dans

les étapes initiales du développement de la LLC. Bien que la taille de la suppression en 13q14 soit variable, la région minimale supprimée contient deux longues séquences codantes aux ARN non codants (DLEU2 et DLEU1) ainsi que le cluster de gènes des micro-ARNs MIR15A et MIR16-1. En effet, l'implication de ces suppressions a été confirmé sur des souris avec des suppressions dirigées du locus équivalent, entraînant le développement de syndrome lymphoprolifératif clonaux. Des études *in vitro* ont indiqué que les principaux mécanismes par lesquels MIR15A–MIR16-1 influent la pathogénèse sont la dérégulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, en modulant spécifiquement l'expression des gènes impliqués dans le passage du cycle cellulaire G0 /G1 –S, mais aussi sur le gène anti-apoptotique BCL2.

Parmi les différentes anomalies du nombre de copies (del17p, del11q et trisomie 12), la présence d'une del13q14 est associée à un meilleur pronostic. Les patients atteints de LLC avec del13q14 ont tendance à avoir un temps prolongé pour le premier traitement, des mutations dans les gènes IGVH et une survie globale prolongée par rapport aux patients présentant d'autres anomalies génétiques. La del 13q14 serait associée à la mutation de la protéine MYD88.

### 6.5. Mutation du gène Notch1

Le gène le plus fréquemment muté au diagnostic de la LLC est Notch1 avec une prévalence de 4 à 20 %. Notch1 est un oncogène initialement connu pour son association à la leucémie lymphoblastique aiguë des LT (ALL-T). Il code pour un récepteur transmembranaire qui, en se liant à son ligand, est protéolysé pour générer le domaine intracellulaire nucléaire transcriptionnellement actif de Notch1 (ICN1), qui transactive les gènes impliqués dans la prolifération et la survie, y compris l'activation du proto-oncogène MYC. Contrairement aux mutations des LAL-T, les mutations Notch1 de la LLC provoquent la délétion du domaine PEST de la protéine Notch1, empêchant ainsi la dégradation protéasomale d'ICN1 (Puente, Pinyol et al. 2011). Le rôle pathogénétique de Notch1 dans la LLC pourrait ne pas se limiter aux patients porteurs de mutations génétiques, car les cellules LLC dans les ganglions lymphatiques présentent une activité fréquente du gène Notch1 indépendamment de la présence de mutations. La fréquence des mutations Notch1 chez les patients atteints de LLC varie selon l'évolution clinique. En effet, les lésions Notch1 sont très rares chez les patients atteints de LLC ultra-stable, La fréquence de la mutation Notch1 est augmentée chez les patients atteints de LLC à un stade avancé et chez ceux atteints de LLC avec trisomie 12, et environ 80 % des patients porteurs de mutations Notch1 sont IGHV-UM. En outre, leur présence a été associée à une OS défavorable (50-70 % à 5 ans), même dans les

patients avec IGHV-M, et aussi un plus grand risque de syndrome de Richter. Enfin, les LLC Notch-1-mutées ont une expression diminuée de CD20, ce qui pourrait expliquer la limite des thérapies anti-CD20. (Santos, Sarmiento et al. 2007)

### 6.6. Trisomie 12

La trisomie du chromosome 12 est une anomalie observée dans environ 15 % à 25 % des patients au diagnostic. La trisomie 12 a été associée à une morphologie atypique des lymphocytes et un score Matutes de 3, témoin d'une LLC « atypique ». Bien que la trisomie 12 ait été classiquement considérée comme une lésion génétique à risque intermédiaire, les mutations de Notch1 sont associées à de mauvais résultats. Ceci est en accord avec l'observation d'une fréquence accrue de trisomie 12 chez les patients à syndrome de Richter. La trisomie 12 est associée dans la moitié des cas à d'autres anomalies (+18, +19, del14q, t(14 ;18), t(14 ;19), t(8 ;14)...etc.)(Dohner, Stilgenbauer et al. 2000).

### 6.7. Délétion 13q14

C'est la plus fréquente des anomalies, retrouvée chez 51 % des patients, elle est considérée comme un événement précoce dans la transformation leucémique. Il s'agit d'une délétion cryptique de la bande 13q14.3, le plus souvent hétérozygote. Lors de cette délétion, il y a perte des régions codantes de deux microARN (Acide Ribo Nucléique) miR-15a et miR-16-1 dont l'implication dans la leucémogénèse est prouvée (Klein, Lia et al. 2010). Cette délétion, est associée à un bon pronostic avec un meilleur taux de survie, supérieur à celui des patients ayant un profil cytogénétique normal(Zent and Kay 2010).

### 6.8. Délétion 11q22-23

Elle représente 13 à 19 % des anomalies. Elle s'observe dans des LLC tumorales de mauvais pronostic, elle entraîne la perte du gène ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), qui pourrait être impliqué dans la maladie en régulant le cycle cellulaire par l'activation de la protéine P53, malgré des travaux récents montrant l'existence de mutations de ce gène dans la LLC, ce phénomène n'est observé que dans un nombre marginal de cas. Les patients présentant une dél(11q) ont en général une LLC plus évoluée et plus agressive, avec une survie diminuée (Dohner, Stilgenbauer et al. 2000).

### 6.9. Délétion 6q

Elle est retrouvée dans 6% des cas (Dohner, 2000). Elle touche deux régions, 6q21-q23 ou 6q25-q27. Elle est considérée comme un marqueur de progression de la maladie. (Gunnarsson, Mansouri et al. 2011)

### 6.10. Délétion de la région 17p

Elle se passe sur le chromosome 17, est retrouvée dans 7 % de patients LLC et toujours synonyme des formes graves. Cette mutation pourrait apparaître au cours de l'évolution de la maladie, particulièrement en cas de syndrome de Richter, conférant un avantage prolifératif aux cellules mutées qui deviennent résistantes aux traitements antimétaboliques. Elle est associée à un pronostic sévère et constitue l'anomalie génétique la plus grave observée dans cette maladie. Elle est observée plus fréquemment dans les stades plus avancés de la maladie (Zenz, Benner et al. 2008).

### 6.11. Mutation TP53

Le gène TP53 peut être altéré soit par délétion soit par mutation inactivatrice. Les mutations de TP53 sont retrouvées chez 90% des cas avec del17p. Les anomalies de TP53 sont associées à un mauvais pronostic, avec une survie diminuée et une résistance aux chimiothérapies à base d'analogues de purines tels que la Fludarabine (Zenz, Krober et al. 2008).

### 6.12. Réponse aux dommages causés à l'ADN

Les délétions 17p13 (del17p) sont observées avec des fréquences différentes suivant l'évolution de la LLC. Les del17p impliquent le bras court entier du chromosome 17 et englobent invariablement le locus du gène suppresseur de tumeur TP53 (p53). Dans 80 % des cas de LLC avec dél 17p, l'autre copie sur l'autre allèle est mutée : les mutations dans la deuxième allèle TP53 sont généralement situées dans le domaine de sa liaison à l'ADN. Conformément à l'instabilité génomique accrue causée par l'inactivation TP53, les LLC avec del17p ont un degré plus élevé de complexité génomique que les LLC sans délétion TP53. Les mutations sous-clonales sont associées à la résistance à la Fludarabine par l'apparition de sous-clones résistants. L'implication pronostique de la dérégulation de p53 est liée à son association avec la résistance aux chimiothérapies ciblant l'ADN, avec une OS défavorable. L'inactivation de p53 est donc un déterminant majeur pour les décisions thérapeutiques, favorisant la prescription de thérapies ciblées en première ligne. (Xu-Monette, Medeiros et al. 2012) Les anomalies 17p sont des événements secondaires, apparaissant plus tardivement dans l'évolution de la LLC. Les délétions del11q sont retrouvées chez environ 10 % à 20 % des patients LLC, avec une fréquence accrue chez les patients IGHV-UM. Elle est généralement mono-allélique, de grande taille et est associée à des mutations dans l'autre allèle chez plus d'un tiers de patients. Chez certains patients, les suppressions 11q affectent aussi le gène BIRC3, un régulateur négatif de la voie NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-light-

chain-enhancer of activated B cells). Les del11q et ATM (est un régulateur situé en amont du gène TP53 et localisé dans la région 11q22-23). Elles s'observent dans 20 % des patients au diagnostic, et ces patients ont tendance à être plus jeunes, présentant des ganglions lymphatiques plus volumineux, et une OS plus courte que les patients atteints de del13q, de trisomie 12 ou ceux sans anomalies chromosomiques(Luo, Solimini et al. 2009).

### 6.13. Facteurs de transcription

La famille de facteurs de transcription NF-AT (Nuclear Factor of Activated T-cells) joue un rôle central dans la transcription génique inductible lors des réponses immunitaires et comprend cinq protéines différentes, qui sont toutes des molécules liant l'ADN, et contenant une région d'homologie Rel et une région d'homologie NFAT, qui agissent comme des facteurs de transcription. Dans les lymphocytes non stimulés, NF-AT est présent dans le cytoplasme sous une forme inactive ;après stimulation du BCR, le NFAT est activé en trois étapes séquentielles :déphosphorylation, translocation nucléaire et augmentation de l'affinité pour les séquences de l'ADN cibles(Macian, Lopez-Rodriguez et al. 2001)Le signal de localisation nucléaire (NLS) et une région de reconnaissance de l'ADN sont exposés par déphosphorylation. Toute ces étapes sont bloquées en traitant les cellules avec du CSA (cyclosporine-A), tous deux inhibiteurs spécifiques de la Calcineurine. Dans le noyau, le NF-AT activé coopère avec le facteur de transcription AP-1 pour la liaison à l'ADN et la transcription génique des cytokines et des récepteurs aux cytokines.(Luo, Burgeon et al. 1996)

La famille NF- $\kappa$ B/Rel de facteurs de transcription comprend cinq membres, l'activité de NF- $\kappa$ B est régulée par des protéines inhibitrices I $\kappa$ B qui retiennent le dimère NF- $\kappa$ B /Rel dans le cytoplasme, le gardant inactif. Des signaux déclenchés par le BCR induisent l'activation d'IKK via la PLC et PKC;IKK activé phosphoryle l'I $\kappa$ B et le cible par ubiquitination et induit sa dégradation médiée par le système du protéasome, L'activation de NF- $\kappa$ B avec une exposition conséquente de NLS présent sur NF- $\kappa$ B permet la translocation de ce facteur de transcription vers le noyau ,ou il active la transcription de plusieurs gènes cibles, y compris les cytokines, les molécules anti-apoptotiques ,et des protéines costimulatrices régulant ainsi la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire (Ozes, Mayo et al. 1999).

### 6.14. Voie inflammatoire et activation constitutive de NF- $\kappa$ B

De nombreuses anomalies trouvées lors de séquençage à grande échelle du génome de patients LLC impliquent l'activation du complexe transcriptionnel NF- $\kappa$ B. Des mutations

mono-alléliques de BIRC3 sont trouvées au diagnostic dans environ 5 % des patients et résultent en la perte du domaine RING de la protéine BIRC3, menant à l'activation constitutive de NF- $\kappa$ B. Le gène MYD88 est muté chez 3 % des patients, exclusivement ceux avec IGVH-M. MYD88 est un adaptateur de protéines cytosoliques impliqué dans la signalisation du récepteur TLR (toll-like receptor), Elle possède des fonctions pléiotropes au niveau des cellules B, y compris l'activation de NF- $\kappa$ B. La mutation MYD88 la plus courante au cours des LLC est MYD88L265P, elle est identique à celle observée dans les maladies de Waldenström et des lymphomes diffus à grandes cellules type-ABC. Elle implique une liaison accrue de MYD88 à la kinase IRAK1 et à l'activation ultérieure de NF- $\kappa$ B.

D'autres lésions de gènes impliqués dans la voie inflammatoire (TRAF2, TRAF3 et NFKBIE) sont observées à des fréquences inférieures à 2 % et sont toutes supposées conduire à l'activation NF- $\kappa$ B. Parmi les différentes lésions génétiques qui pourraient activer la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, les anomalies de BIRC3 ont été associées à une maladie réfractaire à la chimiothérapie, aux stades cliniques avancés, à un statut IGHV-UM et à une prévalence accrue de del11q. Les implications pronostiques des lésions de MYD88 restent controversées, vraisemblablement dues à leur faible fréquence.

***Chapitre III : Matériel et  
Méthodes***

## 1. Matériel

- Automate d'examen biologique Sysmex-Kx-21.
- Microscope optique LEICA DM 500.
- Aérospray hématology pro.
- BD FACSCanto II. Implémenté du logiciel BD Facs Diva

### 1.1 Anticorps

**Tableau IV** : Anticorps et les marqueurs utiliser dans la CMF.

Fluorochromes	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC
Anticorps				
1	KAPPA	LAMDA	CD19	CD20
2	FMC7	CD22	CD5	CD19
3	IgM	CD10	/	
4	CD23	CD79b	CD45	

## 2. Méthodes

### 2.1 Etude rétrospective

Nous avons réalisé une étude rétrospective, descriptive et analytique des cas de Leucémie lymphoïde chronique ayant été diagnostiqués durant la période 2016 jusqu'au 2021 au niveau du service d'hématologie du Centre Hospitalo-universitaire Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou. Notre étude a porté sur l'étude des données de dossiers de 79 patients atteints de LLC-B. cette étude est faite sur une population adulte focalisée sur un nombre de paramètres : âge, sexe, les complications, les paramètres cliniques ainsi que biologiques (FNS, Cytométrie, frotti sanguin, immunophénotypage... etc.).

### 2.3 Formule numérotation sanguine FNS

#### 2.3.1 Principe

FNS est le premier examen biologique utilisé pour dépister, explorer et suivre la plupart des hémopathies. Ses indications sont très nombreuses et dépassent largement le cadre des pathologies hématologiques.

Il est réalisé à partir d'un échantillon de sang prélevé par ponction veineuse et recueilli dans un tube contenant un anticoagulant sec l'EDTA. L'hémogramme est un examen automatisé ou bien pratiqué sur une cellule de Malassez. Il a pour but d'apporter des informations quantitatives sur les cellules sanguines mais également des informations qualitatives.

### 2.3.2 Protocole

- Prélèvement sanguin des patients dans des tubes EDTA.
- Homogénéiser les tubes sous homogénéisateur pour éviter la coagulation du sang.
- Ecrire le non du patient tout en homogénéisant manuellement et vérifier le tube avant de le faire passer dans l'appareil
- Passer le tube à l'appareil, attendre quelques minutes et voir le résultat sur l'écran de l'ordinateur.

## 3. Frottis sanguin

### 3.1 Principe

Une goutte de sang, étalée de façon uniforme sur une lame de verre, permet d'obtenir une seule couche de cellules. Un tel frottis, après fixation et coloration, permet la visualisation de la morphologie des éléments sanguins, il peut révéler des anomalies.

### 3.2. Protocole

- Déposer une microgoutte de sang (capillaire ou veineux) à 1 cm de l'extrémité de la lame de verre hématologique
- Etaler la goutte de sang sur la lame.
- Sécher rapidement à l'air.
- Coloration de frottis : la coloration panoptique de May Grünwald Giemsa (MGG) repose sur l'action complémentaire de deux colorants neutres May Grünwald (éosine et bleu de méthylène) et Giemsa (éosine et azurs de méthylène). Ces deux colorants sont en solution dans l'alcool méthylique sous forme inactive, ainsi le MG fixe le frottis par le méthanol, le MG dilué au 1/2 dans l'eau neutre colore les éléments acidophiles et les granulations différenciées Le Giemsa surcolore les noyaux et colore les granulations azurophiles.

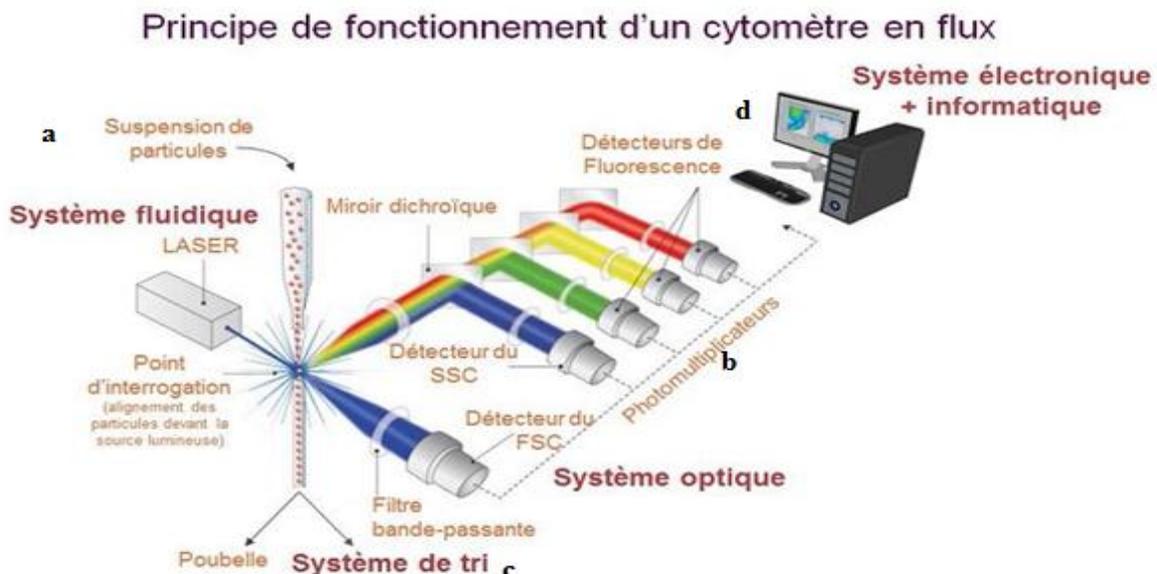
- Observation au microscope (Gx100).

## 4 Immunophénotypage des lymphocytes sanguins

### 4.1 Principe

La cytométrie de flux (CMF) permet de détecter et de quantifier l'expression des antigènes (Ag) à la surface et/ou dans le cytoplasme des cellules hématopoïétiques normales et pathologiques après marquage avec des anticorps fluorescents spécifiques aux antigènes recherchés. Elle constitue une étape essentielle dans le diagnostic, le suivi et de la caractérisation de la majorité des hémopathies malignes.

La CMF permet d'évaluer simultanément différentes caractéristiques d'une cellule ou d'une particule. Les cellules sont préalablement marquées par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. Les mesures sont effectuées pendant que ces cellules défilent une à une, dans un flux liquidien, devant une ou plusieurs sources lumineuses d'excitation (laser). Les cytomètres actuellement disponibles permettent d'analyser deux paramètres indépendants des Ac monoclonaux, apportant des informations < morphologiques > le forward angle scatter (FSC), paramètre de taille et le right angle scatter (SSC ou Sidewards Scatter), paramètre de granulosité cellulaire. Ceci permet de réaliser un fenêtrage (gate) sur la population cellulaire cible.



**Figure 6:** Schéma récapitulant le principe de fonctionnement d'un cytomètre. D'après l'URCACyt 2018. a : tube contenant des GB+ACs marqués / b : les fluorochromes (APC, FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5) / c : fenêtrage des cellules cibles. / d : affichage et stockage des profils de la CMF.

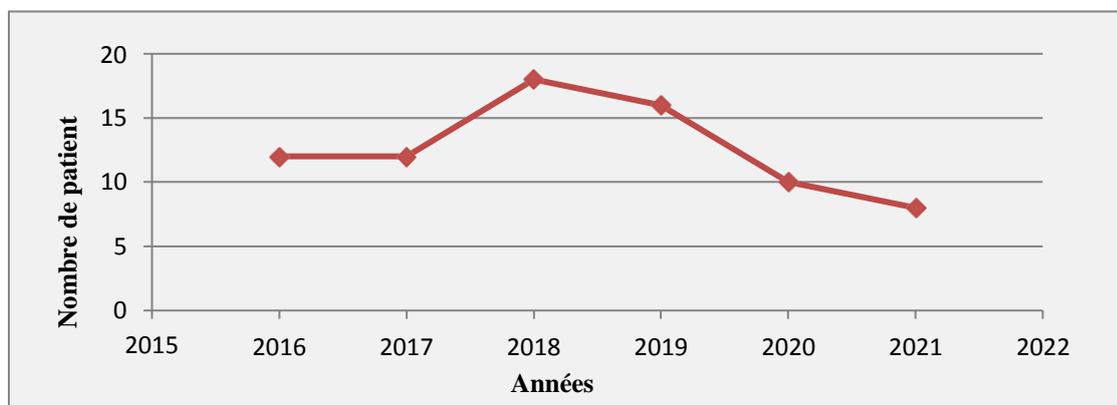
#### 4.2 Protocole

- Déposer 100µl de sang dans 4 tubes EDTA (le volume est variable en fonction du nombre de leucocytes dans l'échantillon),
- Rajouter 1000µl de PBS pour faire des lavages pour les tubes (3 lavages) et à chaque lavage centrifugée 3500g/min pendant 10 min à 36 °C.
- Tube 1 : sang + CD19 + CD20+ lambda+kappa et agiter (10µL pour chaque anticorps ajouté)
- Tube 2 : sang +CD19+ FMC7 +CD22 +CD5et agiter
- Tube 3 : sang + IgM + CD10+ CD19 et agiter
- Tube 4 : sang +CD23 + CD79b + CD19 puis agiter  
Incubation des tubes à l'obscurité pendant 15 min.
- Ajouter 2ml de tampon de lyse (ACK ou chlorure d'ammonium et le bicarbonate de potassium) pour les 4 tubes et agiter et incuber à l'obscurité pendant 10 min pour éliminer les globules rouges.
- Agiter les tubes et centrifuger pour enlever le tampon de lyse.  
Jeter le surnageant et ajouter le PBS pour laver (lavage 3eme fois) et agiter+ centrifuger (3500g/min à 36° C) pendant 10min jusqu'à ce que le liquide soit clair, qui signifie la séparation des GB et GR.
- Lire le résultat de la CMF.

***Chapitre IV : Résultats et  
Discussion***

## 1. Epidémiologie de la LLC

### 1.1. Evolution de la LLC de 2016-2021

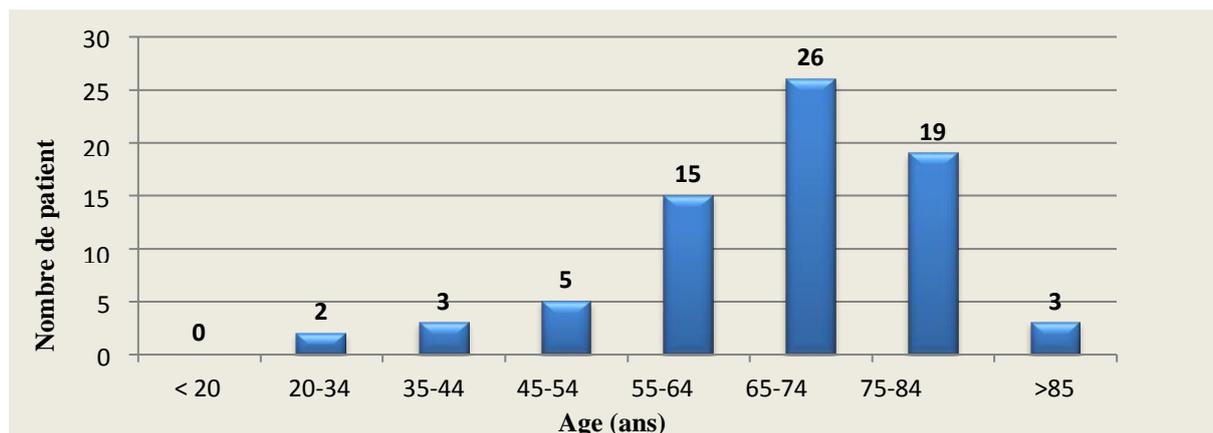


**Figure 7:** Courbe représentative de l'évolution de la LLC de 2016-2021

Nous remarquons d'après la figure 7 qu'à partir de 2017, le nombre de patients atteints de LLC augmente jusqu'à atteindre un nombre maximum en 2018 avec un enregistrement de 18 patients dans le service d'hématologie, Par la suite, le nombre de patients diminue à partir de 2019 affichant un nombre de 12 et 10 enregistrés respectivement pendant les années 2020 et 2021. Cette baisse est probablement due à la pandémie du Covid, qui a largement contribué à la diminution des consultations hospitalières de manière générale.

### 1.2. Age

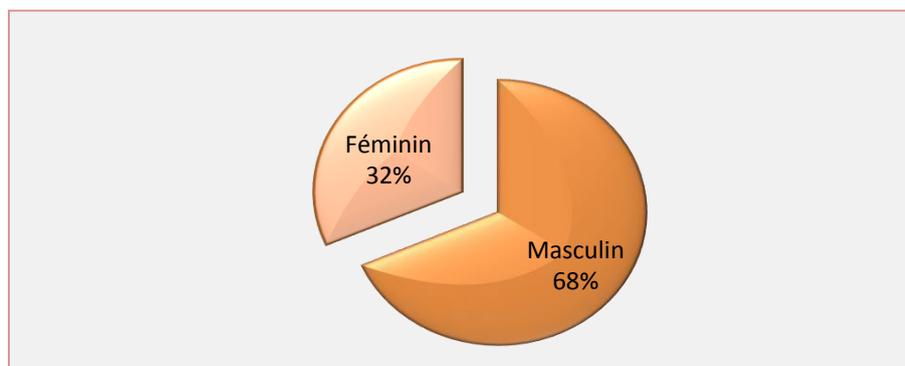
La tranche d'âge la plus touchée est située entre 65-75 ans avec une fréquence calculée de 33.33% qui correspond à 26 malades répertoriés. L'âge moyen des patients du service est de 67.5 ans (Figure 8). Dans les pays développés, l'âge moyen au diagnostic est de 71 ans avec plus de 70% des malades ayant plus de 65 ans. En Asie, l'âge médian est de 62.5ans, en Chine c'est 64 ans. En France (hôpital de Cahors), L'âge médian au diagnostic est de 70 à 72 ans ; aussi au Canada à Manitoba, la moyenne d'âge est de 71,5 ans. Les atteintes de nos patients se font à plus jeune âge comparativement aux patients occidentaux. Ce qui est dû probablement à des considérations de race et l'implication de facteurs génétiques et environnementaux.



**Figure 8:** Représentation de la répartition des patients LLC selon la tranche d'âge.

### 1.3. Sexe

Notre étude comprenait 52 hommes (68,42%) et 24 femmes (31,58%), soit un ratio Hommes/Femmes de 2.16 (Figure 9), ce qui corrèle avec d'autres études effectuées dans d'autre pays. Notamment en France, le sexe ratio H/F est de 2 et aux USA ce ratio est de 1.5 à 2, ce qui met en exergue la prédominance masculine des populations de patients atteints de la LLC dans le monde.



**Figure 9:** Représentation de la répartition des patients LLC selon le sexe.

### 1.4. Région

**Tableau V :** Répartition des patients atteint de LLC suivant la région.

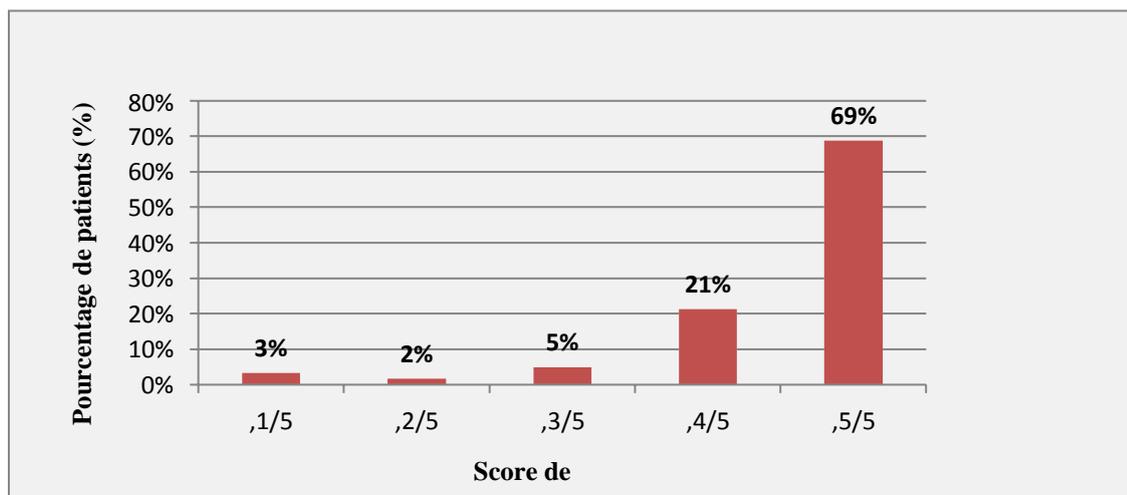
Wilaya	Nombre de patients	Pourcentage %
Tizi-Ouzou	47	<b>61.84</b>
Bouira	17	22.37
Boumerdès	12	15.79

La majorité des patients concernés par cette étude sont originaires de Tizi-Ouzou avec un pourcentage de **61.84%**, suivi des wilayas environnantes : Bouira avec 22.37% et Boumerdès avec 15.79% (Tableau V).

### 1.5. Répartition des patients suivant le classement de Matutes

Tous les patients retenus dans notre étude ont bénéficié d'un procédé d'immunophénotypage par la caractérisation moléculaire des lymphocytes pour identifier les marqueurs membranaires des lymphocytes T et B.

La positivité ou la négativité des marqueurs CD5, CD23, CD22/, CD79b, FMC7 ainsi que l'expression monotypique des immunoglobulines (chaîne kappa/lamda et expression du BCR) nous a permis de calculer le score de Matutes. Ce dernier était de 5 chez 42 patients (68,85%) ; de 4 chez 13 patients (21,31%) ; de 3 chez 3 patient (4.92%) ; de 2 chez 1 patient (1.63 %) et de 1 chez 2 patients (3,28%) (Figure10). La majeure partie des malades sont atteints de LLC-typique.

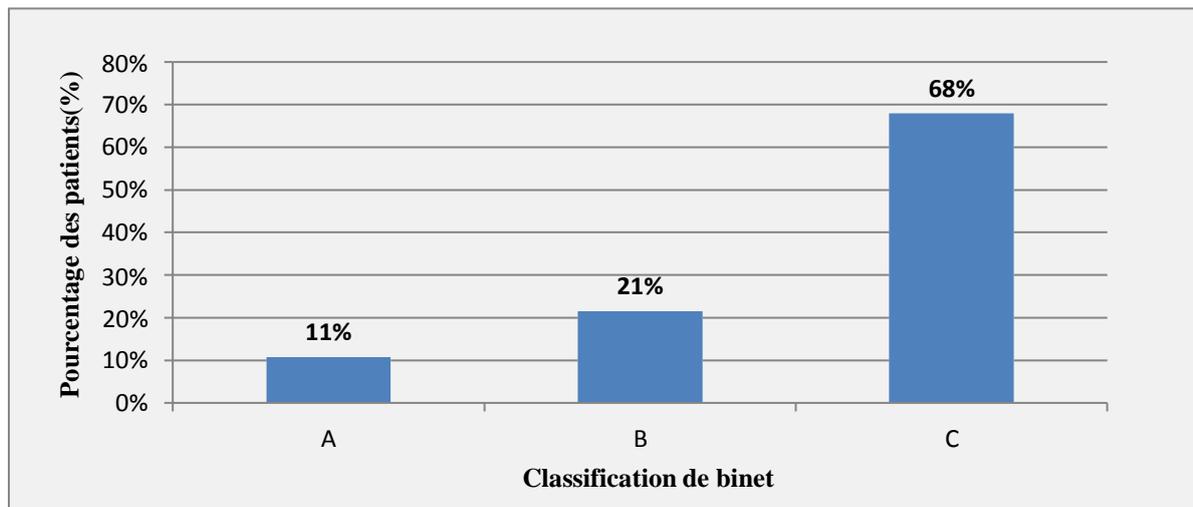


**Figure 10** : Représentation de la répartition des patients LLC suivant le système de classification de Matutes.

### 1.6. Distribution des patients suivant la classification de Binet

Dans notre étude, 6 patients étaient classés Binet A, 12 stades B et 38 stades C soit respectivement 10,71% ; 21,43% et 67,86% (Figure 11). En comparant ces résultats aux études rétrospectives faites dans d'autres pays de l'Afrique comme le sud Tunisien et le Togo, nous trouvons que la majorité des patients sont classés au stade C de la classification de Binet, soit respectivement les résultats suivants {(A : 32%, B : 29%, C: 39%) ; (A: 15%, B: 8%, C: 77%)}. Pour remarque, Ces 2 études ont été réalisées sur un échantillonnage de populations

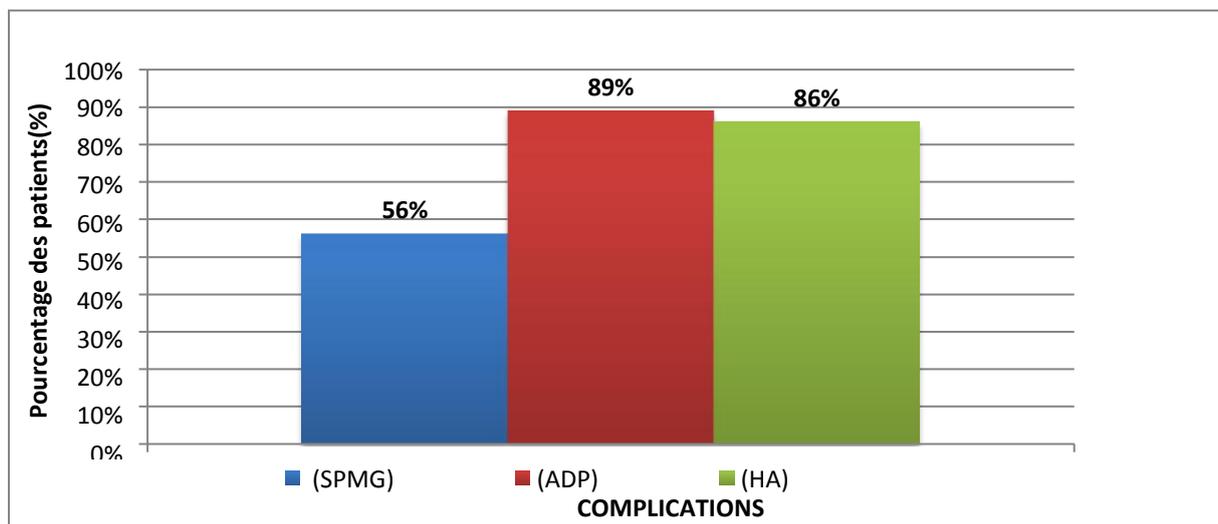
plus larges. A l'inverse, une étude faite en Suède montre que la plupart des patients LLC diagnostiqués sont classés dans le stade A avec (A:50%, B: 23,77%, C: 26,23%).



**Figure 11:** Représentation de la distribution des patients suivant la classification de Binet.

### 1.7 Complications associées à la LLC

Nous observons une forte présence des différentes complications associées à la maladie chez la majorité des patients atteints de la LLC du service, avec des pourcentages élevés **56,06%** des patients souffrent de SPMG, les ADP avec **88,89%** et les HA avec **85,96%** (Figure 12).

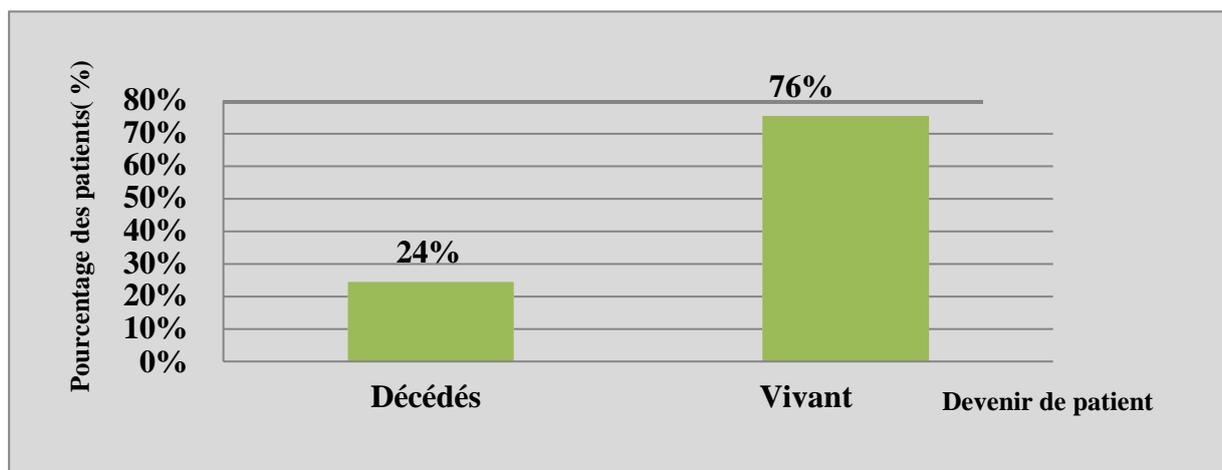


**Figure 12:** Représentation du pourcentage d'apparition de complications associées à la LLC.

### 1.8 Devenir des patients

Parmi les 49 cas étudiés dans notre étude 37 patients sont encore vivants qui représentent 75,51 % et 12 sont décédés qui représentent 24,49 % (Figure 13). En Canada sur

1725 patients diagnostiqués en 2018, 554 patients sont morts correspondant à 32,12%.



**Figure 13:** Devenir des patients atteints de la LLC.

### 1.9 Caractérisation Immunophénotypique des patients

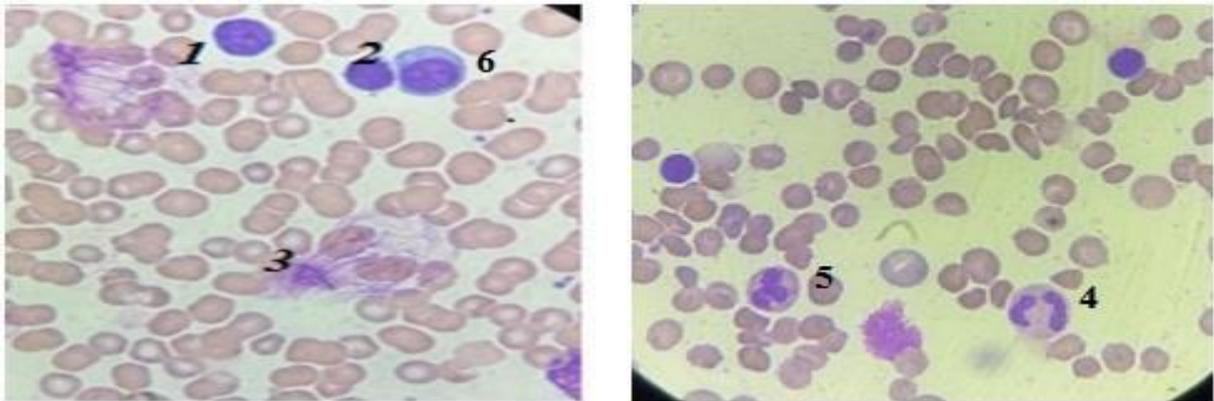
**Tableau VI :** Tableau récapitulatif de l'ensemble des données de marquage.

AC	Nombres des patients testés	positif	%des patients positifs	négatif	%des patients négatifs
CD19	37	36	97,30 %	1	2,70 %
CD5	47	46	97,87 %	1	2,13 %
CD20	62	24	38,70 %	38	61,30 %
CD23	48	41	66,10 %	21	33,90 %
FMC7	46	38	82,61%	8	17,39 %
CD38	35	11	31,43%	24	68,57 %
CD79b	35	19	54,28%	16	45,72%
Kappa/Lamda	62	21	33,90%	41	66,10 %

97% des patients étudiés sont CD19+, un seul des patients est CD19-, 98% des patients CD5+, seul un patient est CD5- catégorisé en LLC atypique. On remarque que les anticorps : CD19+, CD5+, CD23+, FMC7+ et CD79b+, présentent un taux élevé, par rapport à : CD19-, CD5-, FMC7-, CD23- et CD79b-, contrairement à : Kappa+, CD38+ et CD20+ qui présente un taux faible par rapport à : Kappa-, CD38-, et CD20- (Tableau VI).

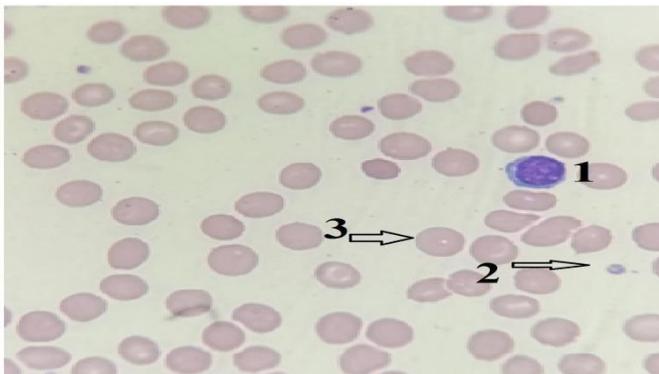
## 2. Etude morphologique de la LLC

La figure 14 représente un frottis sanguin d'un patient atteint d'une LLC. Nous observons de nombreux petits lymphocytes (1 et 2) très proche des lymphocytes normaux. Les cellules sont de petites taille, le noyau et le cytoplasme sont de profil régulier et le nucléole est non visible. Les lymphocytes de la LLC sont très fragiles : les cellules éclatées (3et4) s'appellent ombres de Gumprecht. Contrairement à la figure 15 d'un sujet sain ; représentant des lymphocytes (1) avec cytoplasme bien déterminé et le noyau a une taille normale.



**Figure 14:** Étalement sanguin chez un homme présentant une leucémie lymphoïde chronique. (LLC positif) 1 et 2-lymphocyte atteint de LLC/ 3-Ombre de Gumprecht /4-éosinophile /5 – polynucléaire neutrophile/6- monocyte.

### Sujet sain contrôle :



**Figure 15:** Frottis sanguin d'un sujet sain. 1:Lymphocyte normal, 2:plaquettes, 3:globulerouge.

### 3-Immunophénotypage de la LLC-B

La dernière partie de notre travail a été réservée à la caractérisation immunophénotypique à l'aide de la réalisation d'une étude comparative par cytométrie en flux des immunophénotypes caractérisant les cellules lymphoïdes chroniques avec des cellules appartenant à un autre type de cancer qui est le lymphome Non- Hodgkinien B(LNHB). Les résultats de l'étude de comparaison sont représentés sur le tableau-7.

**Tableau VII:** Comparaison immunophénotypique entre deux types de cancers (LLC-B versus Lymphome Non Hodgkinien B(LNHB)).

Marqueurs	Patients LLC 5/5	Patient LNHB 1/5
CD5	55%	11%
CD23	56%	11%
CD22	94%	100%
CD19	55%	91%
CD79b	56%	100%
Kappa	0%	100%
lambda	30%	15%
FMC7	0%	15%
IgMs	15%	91%

On remarque que la différence majeure distinctive entre les cellules LLC-B et les LNHB est l'expression du marqueur CD5 par les cellules LLC-B alors que les cellules du lymphome Non-Hodgkinien sont CD5 négatif. De plus, le CD23 est remarquablement présents sur les LLC-B alors qu'il est absent dans le cas des LNHB. D'autre part, les cellules LNHB expriment exclusivement la chaîne légère kappa (+++), cette dernière est absente sur les LLC-B. Le CD79b qui est une molécule faisant partie du complexe BCR (B cell receptor) est affiché très fortement exprimée sur les LNHB alors que leur absence est réduite au niveau des LLC-B. Enfin, le suivi de l'expression du récepteur BCR de type IgM montre une très forte expression des LNHB de ce récepteur, alors qu'il est quasi absent au niveau de la LLC-B. La caractérisation des marqueurs membranaires des cellules de ces deux types de cancer permet d'attribuer le score de Matutes correspondant. A savoir 5/5 pour la LLC-B typique et 1/5 au lymphome Non Hodgkinien B(LNHB) à CD5 (Tableau VII).

## ***Conclusion et Perspectives***

### Conclusion et perspectives

La Leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus courante dans les pays occidentaux. Elle touche essentiellement les personnes âgées. En Algérie, l'incidence de la LLC ne cesse de progresser. Dans cette étude, nous avons réalisé une analyse rétrospective de 76 patients atteints de la LLC suivis au service d'hématologie du CHU de Tizi-Ouzou. Les patients pris en charge dans le service sont originaires majoritairement de la wilaya de Tizi-Ouzou, D'autres viennent des wilayas limitrophes : de Bouira et de Boumerdas. Les patients sont de prédominance masculine avec un sexe ratio H/F de 2. L'âge moyen des patients est 67.5 ans. Cet âge est relativement jeune par rapport aux patients LLC américains qui ont un âge moyen de 72 ans. Ces différences d'âges peuvent être attribuées aux facteurs génétiques et environnementaux. De plus, la majorité de nos patients présentent de nombreuses complications associées à la LLC tel que : adénopathie, splénomégalie et hépatomégalie. Ces complications témoignent de la sévérité de la LLC qui affecte nos patients. La sévérité de la pathologie est confirmée à travers la classification de Binet. La majeure partie de nos patients est catégorisé dans le groupe C de cette classification. Contrairement à ce qui est observé en occident par exemple en Suède, où la majorité des patients sont dans la catégorie A de Binet. Les résultats de notre étude mettent en relief une particularité importante de nos patients à savoir la présence d'une sévérité accrue de la maladie LLC touchant des sujets plus jeunes comparativement au monde occidental. Au terme de cette étude, nous pouvons suggérer d'élargir cette enquête épidémiologique sur le territoire Algérien touchant un nombre plus large de CHU afin de standardiser les chiffres et caractériser au mieux la LLC en Algérie. Il est important aussi de mettre en place des plans de sensibilisation des individus à haut risque pour la réalisation des diagnostics précoces. Enfin, en terme de perspective des traitements de la LLC, les thérapies ciblées représentées par plusieurs nouvelles molécules prometteuses, efficaces comme les molécules inhibitrices de la voie de signalisation en aval des récepteurs des cellules B, soit les inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton (BTK), les inhibiteurs de l'isoforme  $\delta$  de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K $\delta$ ), des molécules anti-CD20, l'idélalisib, vénétoclax, ...etc.

## ***Bibliographie***

### LA BIBLIOGRAPHIE

- Binet, J. L., A. Auquier, G. Dighiero, C. Chastang, H. Piguët, J. Goasguen, G. Vaugier, G. Potron, P. Colona, F. Oberling, M. Thomas, G. Tchernia, C. Jacquillat, P. Boivin, C. Lesty, M. T. Duault, M. Monconduit, S. Belabbès and F. Gremy (1981). "A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis." *Cancer* **48**(1): 198-206.
- Cragg, M. S., C. A. Walshe, A. O. Ivanov and M. J. Glennie (2005). "The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy." *Curr Dir Autoimmun* **8**: 140-174.
- Cramer, P., P. Langerbeins, B. Eichhorst and M. Hallek (2016). "Advances in first-line treatment of chronic lymphocytic leukemia: current recommendations on management and first-line treatment by the German CLL Study Group (GCLLSG)." *Eur J Haematol* **96**(1): 9-18.
- cYoung, R. M. and L. M. Staudt (2013). "Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies." *Nat Rev Drug Discov* **12**(3): 229-243.
- Dal Bo, M., E. Tissino, D. Benedetti, C. Caldana, R. Bomben, G. Del Poeta, G. Gaidano, F. M. Rossi, A. Zucchetto and V. Gattei (2014). "Microenvironmental interactions in chronic lymphocytic leukemia: the master role of CD49d." *Semin Hematol* **51**(3): 168-176.
- Damle, R. N., T. Wasil, F. Fais, F. Ghiotto, A. Valetto, S. L. Allen, A. Buchbinder, D. Budman, K. Dittmar, J. Kolitz, S. M. Lichtman, P. Schulman, V. P. Vinciguerra, K. R. Rai, M. Ferrarini and N. Chiorazzi (1999). "Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **94**(6): 1840-1847.
- Dohner, H., S. Stilgenbauer, A. Benner, E. Leupolt, A. Krober, L. Bullinger, K. Dohner, M. Bentz and P. Lichter (2000). "Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia." *N Engl J Med* **343**(26): 1910-1916.
- Dohner, K., R. F. Schlenk, B. A. van der Reijden and H. Dohner (2000). "Deletion of the multidrug resistance-associated protein (MRP1) gene in acute myeloid leukemia with inversion of chromosome 16 has no prognostic impact." *Leukemia* **14**(6): 1154.
- Evrard, S., P. Gaussem, D. Helley and L. Darnige (2005). "[Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: contribution of recent biological markers]." *Ann Biol Clin (Paris)* **63**(6): 589-597.
- Gunnarsson, R., L. Mansouri, A. Isaksson, H. Goransson, N. Cahill, M. Jansson, M. Rasmussen, J. Lundin, S. Norin, A. M. Buhl, K. E. Smedby, H. Hjalgrim, K. Karlsson, J. Jurlander, C. Geisler, G. Juliusson and R. Rosenquist (2011). "Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia." *Haematologica* **96**(8): 1161-1169.
- Hallek, M., B. D. Cheson, D. Catovsky, F. Caligaris-Cappio, G. Dighiero, H. Dohner, P. Hillmen, M. J. Keating, E. Montserrat, K. R. Rai, T. J. Kipps and L. International Workshop on Chronic Lymphocytic (2008). "Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines." *Blood* **111**(12): 5446-5456.
- Herishanu, Y. and A. Polliack (2005). "Chronic lymphocytic leukemia: a review of some new aspects of the biology, factors influencing prognosis and therapeutic options." *Transfus Apher Sci* **32**(1): 85-97.
- Jacque, N. and V. Leblond (2019). "[Chronic lymphocytic leukemia]." *Presse Med* **48**(7-8 Pt 1): 807-815.
- Johnstone, A. P. (1982). "Chronic lymphocytic leukaemia and its relationship to normal B lymphopoiesis." *Immunol Today* **3**(12): 343-348.

- Kikushige, Y., F. Ishikawa, T. Miyamoto, T. Shima, S. Urata, G. Yoshimoto, Y. Mori, T. Iino, T. Yamauchi, T. Eto, H. Niuro, H. Iwasaki, K. Takenaka and K. Akashi (2011). "Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia." *Cancer Cell* **20**(2): 246-259.
- Klein, U., M. Lia, M. Crespo, R. Siegel, Q. Shen, T. Mo, A. Ambesi-Impiombato, A. Califano, A. Migliazza, G. Bhagat and R. Dalla-Favera (2010). "The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia." *Cancer Cell* **17**(1): 28-40.
- Kuppers, R. (2005). "Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis." *Nat Rev Cancer* **5**(4): 251-262.
- Leblond, V., M. A. Hospital, A. Toma and S. Choquet (2009). "[Monoclonal gammopathy: when does the hematologist need the neurologist's help?]." *Bull Acad Natl Med* **193**(5): 1089-1097; discussion 1097.
- Leuraud, K., D. B. Richardson, E. Cardis, R. D. Daniels, M. Gillies, J. A. O'Hagan, G. B. Hamra, R. Haylock, D. Laurier, M. Moissonnier, M. K. Schubauer-Berigan, I. Thierry-Chef and A. Kesminiene (2015). "Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study." *Lancet Haematol* **2**(7): e276-281.
- Luo, C., E. Burgeon and A. Rao (1996). "Mechanisms of transactivation by nuclear factor of activated T cells-1." *J Exp Med* **184**(1): 141-147.
- Luo, J., N. L. Solimini and S. J. Elledge (2009). "Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction." *Cell* **136**(5): 823-837.
- Macian, F., C. Lopez-Rodriguez and A. Rao (2001). "Partners in transcription: NFAT and AP-1." *Oncogene* **20**(19): 2476-2489.
- Matutes, E., K. Owusu-Ankomah, R. Morilla, J. Garcia Marco, A. Houlihan, T. H. Que and D. Catovsky (1994). "The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL." *Leukemia* **8**(10): 1640-1645.
- Moreau, E. J., E. Matutes, R. P. A'Hern, A. M. Morilla, R. M. Morilla, K. A. Owusu-Ankomah, B. K. Seon and D. Catovsky (1997). "Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b)." *Am J Clin Pathol* **108**(4): 378-382.
- Ozes, O. N., L. D. Mayo, J. A. Gustin, S. R. Pfeffer, L. M. Pfeffer and D. B. Donner (1999). "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase." *Nature* **401**(6748): 82-85.
- Packham, G. and F. K. Stevenson (2005). "Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia." *Immunology* **114**(4): 441-449.
- Puente, X. S., M. Pinyol, V. Quesada, L. Conde, G. R. Ordonez, N. Villamor, G. Escaramis, P. Jares, S. Bea, M. Gonzalez-Diaz, L. Bassaganyas, T. Baumann, M. Juan, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, J. M. Tubio, C. Lopez, A. Navarro, C. Tornador, M. Aymerich, M. Rozman, J. M. Hernandez, D. A. Puente, J. M. Freije, G. Velasco, A. Gutierrez-Fernandez, D. Costa, A. Carrio, S. Guijarro, A. Enjuanes, L. Hernandez, J. Yague, P. Nicolas, C. M. Romeo-Casabona, H. Himmelbauer, E. Castillo, J. C. Dohm, S. de Sanjose, M. A. Piris, E. de Alava, J. San Miguel, R. Royo, J. L. Gelpi, D. Torrents, M. Orozco, D. G. Pisano, A. Valencia, R. Guigo, M. Bayes, S. Heath, M. Gut, P. Klatt, J. Marshall, K. Raine, L. A. Stebbings, P. A. Futreal, M. R. Stratton, P. J. Campbell, I. Gut, A. Lopez-Guillermo, X. Estivill, E. Montserrat, C. Lopez-Otin and E. Campo (2011). "Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia." *Nature* **475**(7354): 101-105.
- Santos, M. A., L. M. Sarmiento, M. Rebelo, A. A. Doce, I. Maillard, A. Dumortier, H. Neves, F. Radtke, W. S. Pear, L. Parreira and J. Demengeot (2007). "Notch1 engagement by Delta-

- like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15454-15459.
- Scheuermann, R. H. and E. Racila (1995). "CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy." Leuk Lymphoma **18**(5-6): 385-397.
- Schriever, F. and D. Huhn (2003). "New directions in the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukaemia." Drugs **63**(10): 953-969.
- Seda, V. and M. Mraz (2015). "B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells." Eur J Haematol **94**(3): 193-205.
- Vincent, A. M., J. C. Cawley and J. Burthem (1996). "Integrin function in chronic lymphocytic leukemia." Blood **87**(11): 4780-4788.
- Xu-Monette, Z. Y., L. J. Medeiros, Y. Li, R. Z. Orłowski, M. Andreeff, C. E. Bueso-Ramos, T. C. Greiner, T. J. McDonnell and K. H. Young (2012). "Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies." Blood **119**(16): 3668-3683.
- Zent, C. S. and N. E. Kay (2010). "Autoimmune complications in chronic lymphocytic leukaemia (CLL)." Best Pract Res Clin Haematol **23**(1): 47-59.
- Zenz, T., A. Benner, H. Dohner and S. Stilgenbauer (2008). "Chronic lymphocytic leukemia and treatment resistance in cancer: the role of the p53 pathway." Cell Cycle **7**(24): 3810-3814.
- Gabriel Gazzé, B.Pharm., DPH, Nushin Sadeghi, Pharm.D., M.Sc. Nouveautés thérapeutiques pour le traitement de la leucémie lymphoïde chronique. *Accepté après révision par les pairs le 22 août 2016*
- Guide ALD n° 30 - Affection de longue durée: Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique « Leucémie lymphoïde chronique ». juin 2011.
- Zenz, T., A. Krober, K. Scherer, S. Habe, A. Buhler, A. Benner, T. Denzel, D. Winkler, J. Edelmann, C. Schwanen, H. Dohner and S. Stilgenbauer (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**(8): 3322-3329.

### REVUES :

REVUE algérienne d'hématologie 2015.

REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES - JUIN 2011 - N°433.

REVUE FRANCOPHONE DES LABORATOIRES • N° 532 • MAI 2021.

REVUE Dr Axelle Gilles avec le soutien de la Belgian Hematological Society (BHS), Le guide belge du patient, La leucémie lymphoïde chronique, 2018.