



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique
UNIVERSITE MOULOD MAMMERI TIZI-OUZOU

جامعة مولود معمري تيزي وزو

ⵜⴰⵎⴰⵎⵎⵉⵔⵜ ⵜⴰⵔⵉⵣⵉⵔⵜ ⵜⴰⵖⵉⵔⵜ ⵜⴰⵙⵉⵎⵓⵔⵜ

Faculté des sciences Biologiques et sciences Agronomiques
Département Biochimie/Microbiologie

Option : Biochimie Appliquée

THÈME

**Évaluation des profils épidémiologiques et
immunobiologiques des patients atteints de
la Leucémie Lymphoïde Chronique-B
(LLC-B) dans la région de Tizi-Ouzou.**

Soutenu le: 02/07/2024

Réalisé par:

DEGHAIMI Lydia

KADI Nesrine

Membres de jury :

Président de jury : Pr Benahmed Djilali A. Professeur UMMTO

Promoteur: Dr Yezid H. Maître de conférences A UMMTO

Examineur: Mr Tahi Z. Maître assistant A UMMTO

Année universitaire : 2023 – 2024



Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense de joie que je dédie ce modeste travail ;

*À ma mère **Fetta**, pour son affection, sa patience, sa compréhension et son soutien.*

*À mon père **Arezki**, l'homme qui a tellement sacrifié pour moi et qui mérite toute ma reconnaissance.*

*À mes adorables sœurs **Melissa** et **Sarah**, et mon cher petit frère **Rayane** pour leurs encouragements et leurs précieux conseils.*

*À mon cher ami **Menad**, et toute sa famille qui m'ont soutenue constamment.*

*À ma meilleure amie **Faiza** pour son soutien indéfectible et sa précieuse amitié, ainsi qu'à sa famille.*

*À ma chère amie d'enfance **Dalila**, ma meilleure cousine **Mellisa** et ma copine **Lydia**.*

*À ma binôme **Nesrine**, avec qui j'ai partagé les bons et les mauvais moments.*

À tous ceux qui m'ont soutenu, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Lydia...



Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert que je dédie ce modeste travail ;

*À ma chère maman **Zahia**, ma raison de vivre, en témoignage de ma reconnaissance pour sa patience, son amour et ses sacrifices.*

*À mon cher papa **Mustapha**, pour son amour et son dévouement.*

«À vous, mes parents, je dis merci d'avoir fait de moi celui que je suis aujourd'hui. Aucune dédicace ne pourra exprimer mes respects, mes considérations et ma grande admiration pour vous. Puisse ce travail vous témoigne mon affection et mon profond amour».

*À mes chers frères **faycel** et **Aymen**, qui je sais, ma réussite est très importante à leurs yeux, Que Dieu vous garde pour moi.*

*À ma binôme **Lydia**, le travail avec vous a été un véritable plaisir et une source d'inspiration.*

*À ma famille **Kadi** et **Delmi**, mes enseignants et pour ceux qui m'ont donné de l'aide un jour, que Dieu vous paye pour tous vos bienfaits.*

Pour finir, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment, je dédie ce mémoire.



NESRINE...

Remerciement

La première personne que nous tenons à remercier est notre encadrant Dr.YEZID H, pour l'orientation, la confiance et la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Nous tenons à exprimer notre respectueux remerciement aux membres de jury Pr Benahmed Djilali et Dr Tahiri que nous remercions d'avoir accepté de juger ce travail.

Nous remercions également tout le personnel du service d'hématologie et hémobiologie au niveau de CHU Tizi-Ouzou spécialement : Ferka Lynda, Taboudjemaths Mohammed, Pr. Allouda, Pr. Ait Sadik, et Dr. Tibani pour leur soutien, gentillesse et bienveillance.

Enfin, on remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AHAI: Anémie hémolytique auto-immune.

ARNm: ARN messenger.

ATM: Ataxie Telangiectasie Muté.

Bax: Bcl-2 associated X protein.

Bcl-2: Lymphome à cellule B 2.

BCR: Récepteur cellule B.

BIRC3: Baculoviral IAP RepeatContaining 3.

BMSC: Cellules stromales de la moelle osseuse.

BR: Bendamustine + Rituximab.

BTK: Bruton Tyrosine Kinase.

CAR: Récepteur antigénique chimérique.

CBA: Analyse Chromosomique par Bandes.

CCL: Chemokine C-C Motif Ligand.

CD: Cluster de différenciation.

CD40L: CD40 ligand.

CG: Centre Germinal.

CLP: Précurseur Lymphoïde Commun.

CMF: Cytométrie de flux.

CSH: Cellule souche hématopoïétique.

CXCL: Chimiokine (C-X motif) ligand.

CXCR: Récepteur de chimiokine.

DC: Cellules dendritiques.

Del: Délétion.

DLEU2: Deleted In Lymphocytic Leukemia 2.

EDTA: Ethylènediaminetétraacétique.

FC: Fludarabine + Cyclophosphamide.

Fc: Fragment Constant.

FCR: Fludarabine, Cyclophosphamide et Rituximab.

NFS: Numérotation formule sanguine.

Ig: Immunoglobuline.

IgHV: Immunoglobuline chaîne lourde.

IGHV-M: Immunoglobuline des chaînes lourde muté.

IGVH-UM: Immunoglobuline des chaînes lourdes non mutées.

IL: Interleukine.

IwCLL: International workshop on chronic lymphocytic leukemia.

LBDCG: Lymphome B diffus à grandes cellules.

LLC: Leucémie lymphoïde chronique.

LNHB: Lymphome Non Hodgkinien B.

MBL: Lymphocytose B monoclonales.

MGG: May- Grünwald Giesma.

NLC: Nurse-like cells.

SG: Survie globale.

PBMC: Cellules mononucléaire du sang périphérique.

PBS: phosphate buffered saline.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

RAG: Recombination activating genes.

RFC: Fludarabine cyclophosphamide rituximab.

CD: Cluster de différenciation.

SR: Syndrome de Richter.

TDL: Temps de dédoublement lymphocytaire.

TK: Thymidine Kinase.

TP53: Protéine Tumorale 53.

ZAP-70: Zeta-chain-associated-protein kinase.

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique-B (LLC-B) est une prolifération monoclonale de lymphocytes B matures envahissant progressivement le sang, les organes lymphoïdes et la moelle osseuse. Ces cellules expriment des marqueurs tels que CD19 et CD20, mais anormalement CD5, un marqueur typique des lymphocytes T, et présentent une faible expression des immunoglobulines de surface. Des mutations et anomalies chromosomiques sont fréquentes, et la prolifération des LLC-B est liée à un défaut d'apoptose. Cette étude épidémiologique et immunobiologique sur la LLC-B dans la région de Tizi-Ouzou concerne 31 sujets suivis au CHU Nedir Mohamed de 2022 à 2024. Les données montrent une prédominance masculine (74.19 %), un âge moyen de 64 ans, et 61 % des patients au stade C de la classification de Binet. Un score de Matutes de 5/5 est observé chez 61.29 % des malades. Le marqueur CD38, associé à un mauvais pronostic, est retrouvé chez plus de la moitié des patients, tandis que la délétion 17p (mauvais pronostic) est présente chez 6.5 % et la délétion 13q (favorable) chez 20 %. La deuxième partie de l'étude examine les variations morphologiques, cytologiques et immunophénotypiques des patients à différents stades de la maladie. Enfin, les cellules LLC-B sont purifiées à partir du sang des patients, leur viabilité est mesurée, et l'ADN génomique est extrait pour des analyses moléculaires ultérieures.

Mots clés : Leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B), épidémiologie, Frottis sanguin, immunophénotypage, Cytométrie en flux, PBMC, purification LLC-B.

Summary

Chronic lymphocytic leukemia-B (CLL-B) is a monoclonal proliferation of mature B lymphocytes that gradually invade the blood, lymphoid organs, and bone marrow. These cells express markers such as CD19 and CD20, but abnormally express CD5, a typical T-lymphocyte marker, and exhibit low surface immunoglobulin expression. Mutations and chromosomal abnormalities are common, and CLL-B proliferation is associated with a defect in apoptosis. This epidemiological and immunobiological study on CLL-B in the Tizi-Ouzou region involves 31 subjects followed at the Nedir Mohamed University Hospital from 2022 to 2024. The data show a male predominance (74.19%), an average age of 64 years, and 61% of patients at stage C of the Binet classification. A Matutes score of 5/5 is observed in 61.29% of patients. The CD38 marker, associated with poor prognosis, is found in more than half of the patients, while the 17p deletion (poor prognosis) is present in 6.5% and the 13q deletion (favorable) in 20%. The second part of the study examines the morphological, cytological, and immunophenotypic variations of patients at different stages of the disease. Finally, CLL-B cells are purified from the patients' blood, their viability is measured, and genomic DNA is extracted for further molecular analyses.

Keywords: Chronic lymphocytic leukemia, epidemiology, immunophenotyping, Flow cytometry, PBMC, B-CLL isolation.

Liste des figures

Figure 1: Schéma illustrant les différentes étapes de la différenciation des lymphocytes B.....	5
Figure 2: Structure du récepteur des cellules B (BCR).....	8
Figure 3: Observation microscopique d'un frottis sanguin issus d'un patient atteint de LLC.....	10
Figure 4: Immunophénotypage de la LCC par cytométrie en flux.....	12
Figure 5: Représentation du Récepteur d'antigénique chimérique (CAR).....	23
Figure 6: Schématisation des approches de prise en charge des patients atteints de LLC.....	27
Figure 7: Origines cellulaires des cellules LLC.....	29
Figure 8: Récepteur des lymphocytes B (BCR) et ses voies en aval.....	33
Figure 9: Statut mutationnel et signalisation BCR de la LLC.....	35
Figure 10: Influence du microenvironnement et les interactions des cellules LLC dans les organes lymphoïdes (GL/MO).....	39
Figure 11: Schéma représentant la voie extrinsèque de l'apoptose.....	41
Figure 12: Schéma représentant l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose.....	41
Figure 13: Représentation des protéines de la famille Bcl-2.....	42
Figure 14: Représentation schématique de l'altération de l'apoptose dépendante des mitochondries dans les cellules LLC.....	43
Figure 15: Schéma représentant les différents composants du microenvironnement tumoral (TME).....	46
Figure 16: Étapes évolutives et dynamique de croissance de la leucémie lymphoïde chronique.....	48
Figure 17: Gènes et voies de signalisation mutés dans la LLC.....	49

Figure 18: Schéma représentant la voie de Signalisation de NOTCH.....	50
Figure 19: Organisation du gène TP53 et répartition des mutations par codon observées dans la LLC.....	52
Figure 20: Mutations affectant le gène SF3B1 dans la LLC.....	53
Figure 21: Schéma illustrant la région minimale de gain 2p54 dans la LLC.....	59
Figure 22: Schéma représentant les translocations chromosomiques.....	60
Figure 23: Les principales anomalies génétiques ayant une signification pronostique connue dans la LLC.....	62
Figure 24: Représentation schématisée de la production des miRs.....	64
Figure 25: Le réseau PPI pour les gènes régulés négativement.....	67
Figure 26: Représentation en réseau de gènes à variabilité accrue dans l'U-CLL dans le contexte d'un réseau spécifique des cellules B.....	69
Figure 27: Photographie d'un automate de coloration (Aerospray®Hematologypro).....	72
Figure 28: Les éléments quantifiés par NFS.....	73
Figure 29: Photographie d'un appareil de NFS de marque Sysmex (XP-300).....	74
Figure 30: Photographie d'un résultat d'isolement des PBMC par Ficoll.....	78
Figure 31: Photographie d'une cellule de Nageotte.....	78
Figure 32: Répartition des patients LLC selon la région.....	80
Figure 33: Répartition des patients LLC-B selon la tranche d'âge.....	81
Figure 34: Répartition des patients LLC-B selon le sexe.....	82
Figure 35: Répartition des patients LLC-B selon le stade de Binet.....	83
Figure 36: Représentation graphique de la répartition des patients LLC-B suivant le score de Matutes.....	84
Figure 37: Suivi de la présence de facteurs pronostiques chez les patients LLC-B selon le stade de Binet.....	85

Figure 38: Répartition des patients suivant les symptômes de la LLC-B.....	86
Figure 39: Répartition des patients LLC-B suivant le traitement suivi en fonction de leur âge.....	87
Figure 40: Résultat de la Numérotation de la formule sanguine d'un échantillon LLC.....	88
Figure 41: Observation microscopique du frottis sanguin coloré au MGG. Gx100. (A) patient de stade A, (B) patient de stade B, (C) patient de stade C.....	89
Figure 42: Observation microscopique d'un frottis médullaire de la moelle osseuse coloré au MGG Gx40. (A) patient atteint de la LLC, (B) patient sain	90
Figure 43: Observation microscopique sur la cellule de Nageotte des cellules PBMC isolées par Ficoll à partir d'un échantillon sain dilué 1/20 (grossissement X 40).....	91
Figure 44: Observation microscopique sur cellule de Nageotte de PBMC isolées par Ficoll à partir d'un échantillon LLC dilué 1/100 (grossissement X40).....	92

Liste des Tableaux

Tableau I: Calcul du score de Moreau/Matutes.....	12
Tableau II: Classification de Rai.....	17
Tableau III: Classification de Binet.....	17
Tableau IV: Représentation de matériel utilisé lors de notre travail.....	70
Tableau V: Normes de référence d'une formule de numérotation sanguine.....	74
Tableau VI: Valeurs normales d'un myélogramme (Frottis médullaire).....	90
Tableau VII: Comparaison du nombre de cellules et concentration cellulaire des deux échantillons.....	93
Tableau VIII: Résultats de la cytométrie en flux.....	93

Table des matières

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

Introduction Générale 1

Chapitre I : Généralités sur la LLC-B

1. Leucémies.....2

1.1. Définition.....2

1.2. Types de leucémies.....2

1.2.1. Leucémies aiguës 2

1.2.2. Leucémie chronique.....2

2. Rappels sur la différenciation des lymphocytes B (indépendante de l'antigène).....3

2.1. Lymphopoïèse B.....3

2.2. Cellules souches hématopoïétiques (CSH) 4

2.3. Stade pro-B 4

2.4. Stade pré-B 4

2.5. Lymphocyte B immature 5

2.6. Lymphocyte B mature.....5

3. épidémiologie de la leucémie lymphoïde chronique 6

4. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique 7

5. Les principales molécules de surface caractéristiques de la lignée lymphoïde B.....7

5.1. B Cell Receptor (BCR) 7

5.2. CD23.....8

5.3. FMC7.....	8
5.4. CD22	9
5.5. CD72.....	9
6. Facteurs de risque de la leucémie lymphoïde chronique.....	9
7. Diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique.....	10
7.1. Formule sanguine ou hémogramme.....	10
7.2. Frottis sanguin.....	10
7.3. Examen de la moelle osseuse.....	11
7.4. Immunophénotypage par cytométrie en flux.....	11
8. Symptômes de la LLC.....	13
9. Complications.....	13
9.1. Manifestations auto-immunes.....	13
9.2. Risque d'infection accru.....	13
9.3. Seconds cancers	14
9.4. Syndrome de Richter (SR).....	14
10. Marqueurs pronostiques.....	14
10.1. Mutations somatiques des gènes de la région variable de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgHV).....	15
10.2. Autres mutations géniques	14
10.3. Aberrations chromosomiques	15
10.4. Les altérations dans les micro-ARN (miRs)	16
10.5. Marqueurs de la prolifération	15
10.6. Les marqueurs sériques	16
10.7. Stades cliniques de la LLC (Rai et Binet).....	16

10.8. Autres marqueurs pronostiques	17
11. Stratégies thérapeutiques de la leucémie lymphoïde chronique.....	18
11.1. Chimiothérapie.....	18
11.2. Immunothérapie.....	19
11.3. Inhibiteurs de la signalisation du récepteur BCR.....	20
11.4. Inhibiteurs des récepteurs inhibiteurs de la co-stimulation PD-1.....	22
11.5. Thérapie CAR-T	22
11.6. Thérapie CAR-NK.....	23
11.7. Greffe de cellules souches (greffe allogénique)	24
12. Algorithme de traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC).....	24
12.1. Cas des patients répondant aux critères iwCLL2018 (traitement de première ligne).....	25

Chapitre II : Biologie de la LLC-B

1. Origine cellulaire de la LLC.....	28
2. Statut mutationnel IGHV.....	30
2.1. LLC mutée (M-CLL).....	31
2.2. LLC non mutés (U-CLL).....	31
3. Signalisation du récepteurs BCR dans les lymphocytes B normaux.....	32
4. Signalisation du BCR dans la LLC.....	33
4.1. La prolifération des cellules LLC est induite par le BCR.....	33
4.2. Signalisation dysfonctionnelle de BCR.....	34
4.3. BCR non-muté de la LLC	36
4.4. Signalisation tonique du BCR dans la LLC.....	36
5. ZAP-70.....	37
6. Expression membranaire du CD38.....	38
7. Défaut de la mort cellulaire programmée (apoptose) dans la LLC.....	39
7.1. Définition.....	39
7.2. Les différents mécanismes du processus d'apoptose.....	40

7.3. Cause de la défaillance de l'apoptose dans la LLC.....	42
8. Microenvironnement tumoral de la LLC.....	43
9. Prolifération des LB dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC).....	47
10. Génétique de la LLC.....	48
10.1. Anomalies génétiques de la LLC.....	48
10.2. Anomalies cytogénétiques (chromosomiques) (AC).....	56
10.3. Les microARNs (miRs).....	63
11. Profils d'expression génique dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC)	66
11.1. Variabilité de l'expression génique dans les sous-types de la LLC.....	67

Chapitre III : Matériel et Méthodes

1. Matériel	70
2. Méthodes.....	70
2.1. Etude rétrospective.....	70
2.2. Le frottis sanguin.....	70
2.2.1. Principe.....	70
2.2.2. Mode opératoire.....	71
2.3. Coloration du frottis sanguin.....	71
2.4. Numérotation de la Formule Sanguine (NFS).....	73
2.5. Cytométrie en flux.....	74
2.6. Ponction de la moelle osseuse.....	76
2.7. Isolement des cellules mononucléaire du sang périphérique (PBMC) par la méthode Ficoll.....	77

Chapitre IV : Résultats et Discussion

1. Étude épidémiologique de la LLC-B.....	80
1.1. Répartition des patients selon la région.....	80
1.2 Répartition des patients selon l'âge.....	81
1.3. Répartition des patients selon le sexe.....	82
1.4. Répartition des patients selon le stade (Classification de Binet).....	83
1.5. Répartition des patients selon le score de Matutes.....	84
1.6. Répartition des facteurs pronostiques des patients selon le stade de Binet.....	85
1.7. Répartition des patients selon les symptômes.....	86
1.8. Répartition selon le traitement.....	87
2. Etude des paramètres biologiques de la LLC.....	87
2.1. Numérotation de la Formule Sanguine (NFS).....	88

2.2. Le frottis sanguin.....	88
2.3. Le frottis médullaire	89
2.4. Isolement des cellules PBMC enrichi de LLC-B par la méthode de Ficoll	91
2.5. Cytométrie en flux.....	93
Discussion et perspectives	94
Conclusion.....	95
Références bibliographiques.....	96
Annexes	

Introduction

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un cancer qui prend naissance dans les cellules souches hématopoïétiques. L'accumulation d'anomalies génétiques et la transformation oncogénique ultérieure au niveau de ces cellules B monoclonales conduisent à la génération de la leucémie lymphoïde chronique. Les cellules LLC prennent naissance des cellules souches lymphoïdes anormales et se développe lentement au fil des années, dans 95 % des cas de LLC, ces cellules anormales se transforment en lymphocytes B malins, cette maladie présente trois stades proportionnel à son agressivité (Binet *et al.*, 1981). Le diagnostic est réalisé par plusieurs méthodes tel que le frottis sanguin, NFS, immunophénotypage par cytométrie en flux. La prise de décision d'entamer le traitement de la LLC dépend des symptômes et du risque de progression de la maladie, il est généralement indiqué chez les patients présentant une maladie symptomatique ou active, et par la présence des marqueurs pronostics comme les mutations géniques exemple P53, les aberrations chromosomiques, les marqueurs sériques (Gauthier, 2022).

L'objectif du présent travail réalisé au niveau du service d'Hématologie du CHU Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou est d'évaluer les caractéristiques épidémiologiques et immunobiologiques des patients LLC-B suivi dans le service s'étalant sur la période allant de l'année 2022 jusqu'à 2024 afin de mieux définir les profils de patients LLC-B de la région. La deuxième partie de notre travail est consacré à l'évaluation de la variation des caractéristiques morphologiques, cytologiques et immuno-phénotypiques des patients LLC-B situés à différents stades d'évolution de la maladie (stade A, B et C de la classification de Binet). Dans la dernière partie de notre travail, nous allons purifiés les cellules LLC-B à partir de sang de patients et évaluer leur taux de viabilité *in vitro* après marquage au bleu de Trypan. Enfin, nous allons extraire de l'ADN génomique à partir de ces cellules pour analyses moléculaires ultérieures.

Chapitre I

Généralités sur la LLC-B

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

1. Leucémies

1.1. Définition

La leucémie est un groupe de malignités hématologiques causées par la production rapide de globules blancs anormaux qui se multiplient et deviennent plus nombreux que les cellules normales. Ils empêchent ainsi leur fonctionnement adéquat. Il existe deux types de leucémie distinguées en fonction du degré de maturité cellulaire avant la transformation carcinogène. On distingue ainsi les leucémies aiguës et les leucémies chroniques (Nemkov *et al.*, 2019).

1.2. Types de leucémies

1.2.1. Leucémies aiguës

Les leucémies aiguës sont des malignités de cellules hématopoïétiques immatures. Elles se caractérisent par l'accumulation dans la moelle osseuse, le sang périphérique ou les autres tissus. Selon la différenciation de ces cellules, la leucémie aiguë est soit myéloïde (LMA), soit lymphoblastique (LLA) (Nemkov *et al.*, 2019).

1.2.1.1. Leucémie myéloïde aiguë

La leucémie myéloïde aiguë (LAM) est une forme de cancer hématologique qui se développe spécifiquement dans la lignée myéloïde des cellules hématopoïétiques et entraîne l'accumulation de myéloblastes immatures, clonales, prolifératives qui ont un blocage dans la différenciation cellulaire en aval, ces myéloblastes se caractérisent par leur infiltration de la moelle osseuse, du sang et d'autres tissus (Döhner, *et al.*, 2015).

1.2.1.2. Leucémie lymphoïde aiguë

La leucémie lymphocytaire fait référence à la transformation des cellules progénitrices de la moelle osseuse qui deviennent des lymphocytes malins, elle concerne les cellules NK, LT et LB (Nemkov *et al.*, 2019).

1.2.2. Leucémie chronique

Les leucémies chroniques sont caractérisées par la transformation des cellules hématopoïétiques qui progressent plus lentement que les leucémies aiguës.

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

1.2.2.1. Leucémie myéloïde chronique

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un cancer causé par les cellules myéloïdes transformées dérivées d'une cellule souche pluripotente anormale de la moelle Osseuse. Elle est caractérisée par une translocation entre les chromosomes 9 et 22 au niveau des cellules souches de la moelle osseuse, provoquant l'apparition d'un petit chromosome anormal, le chromosome Philadelphie (du nom de la ville des Etats-Unis où travaillaient les deux chercheurs qui l'ont découvert dans les années 60) (Welner *et al.*, 2015).

1.2.2.2. Leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est caractérisée par la prolifération clonale et l'accumulation de lymphocytes B matures et monoclonaux généralement CD5 positifs, Les sites primaires de la maladie comprennent le sang périphérique, la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques. Les symptômes peuvent être absents mais aussi comprendre des adénopathies, des hépatomégalies, des fièvres, une perte de poids non intentionnelle et une satiété précoce (Kikushige *et al.*, 2011). Son incidence augmente avec l'âge (présentant un âge médian de 67 à 72 ans) et touche deux fois plus les hommes que les femmes. Les cellules LLC conservent de nombreuses propriétés fonctionnelles des cellules B normales, y compris les voies de signalisation clés telles que la signalisation du récepteur des cellules B (BCR) et la cascade de signalisation en aval qui organise normalement la sélection et la prolifération des cellules B dans le cadre des réponses immunitaires adaptatives (Burger & Wiestner, 2018).

2. Rappels sur la différenciation des lymphocytes B (indépendante de l'antigène)

2.1. Lymphopoïèse B

La lymphopoïèse B s'effectue dans la moelle osseuse, organe lymphoïde primaire de la différenciation lymphoïde B à partir des cellules souches hématopoïétiques (Voir la figure1). Les cellules stromales de la moelle osseuse fournissent à la fois les contacts intercellulaires ainsi que les facteurs de croissance et cytokines nécessaires au développement des lymphocytes B. Ces interactions aboutissent à une expression régulée de facteurs de transcription qui permettent l'expression de produits des gènes des immunoglobulines et de molécules de surface qui interagiront en retour avec le microenvironnement (Baba *et al.*, 2004).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

2.2. Cellules souches hématopoïétiques (CSH)

Les cellules souches multipotentes, qui possèdent la capacité d'auto-renouvellement, sont en contact avec les travées osseuses. Lorsqu'elles interrompent leur contact avec les ostéoblastes en surface des travées, elles perdent leur capacité d'autorenouvellement et commencent à se différencier jusqu'à la maturation, les cellules matures seront libérées dans la circulation sanguine (Medina *et al.*, 2004). La cellule souche hématopoïétique (CSH) devenue un progéniteur multipotent après la perte de la capacité d'autorenouvellement (Welinder *et al.*, 2011). Ces cellules se différencient en Progéniteurs multipotents lymphoïdes (LMP). Deux enzymes RAG1 et RAG2 sont responsables des processus de réarrangement des différents segments des gènes codant pour les chaînes d'immunoglobulines. Lorsque RAG est exprimé, la cellule commence à réarranger les segments V, D et J du gène de la chaîne lourde. Cette cellule peut alors donner soit un progéniteur T précoce qui rejoindra le thymus, soit un progéniteur lymphoïde commun, qui est encore capable de se différencier en lymphocyte B, T, NK ou en cellule dendritique. La voie de différenciation B comprend donc la perte graduelle de différenciation en cellules myéloïdes, puis NK, finalement la perte du potentiel T, le tout avant que CD19 ne soit exprimé sur la surface (Welinder *et al.*, 2011).

2.3. Stade pro-B

Les cellules Pro-B expriment des marqueurs de surface spécifiques comme CD19. Elles vont subir des réarrangements géniques des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH), qui impliquent les segments de gènes V, D et J situés dans le locus IgH. Lorsque le réarrangement est productif, la chaîne lourde complète μ est synthétisée dans la cellule pro-B tardive. Les chaînes légères sont encore en configuration « germline », c'est-à-dire non réarrangées. L'expression de la chaîne μ est accompagnée par l'expression transitoire de VpreB et de $\lambda 5$. Ces deux protéines font partie du complexe multimoléculaire appelé le récepteur pré-B, dont l'expression en surface caractérise le passage au stade pré-B (Hendriks & Middendorp, 2004). Pour dépasser le stade pro-B, un facteur de transcription appelé EBF-1 est nécessaire. Il va persister sous forme active jusqu'au stade de plasmocyte (Vale & Schroeder, 2010).

2.4. Stade pré-B

A ce stade, les cellules pré-B subissent un blocage de la prolifération associé à la réorganisation des gènes d'immunoglobulines. Ce blocage permet de sélectionner les cellules

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

exprimant un récepteur pré-B fonctionnel. L'étape suivante comprend 4 à 6 cycles de divisions cellulaires associées à une réduction progressive en taille de la cellule, qui commence à réarranger les segments V et J de la chaîne légère. Lorsque ce réarrangement est productif, cela génère la cellule B immature, exprimant en surface une immunoglobuline M complète (IgM), composé de 2 chaînes lourdes et 2 légères. L'expression du pré-BCR effectuée dans ce stade, conditionne le passage au stade B immature (Vale & Schroeder, 2010).

2.5. Lymphocyte B immature

L'expression de surface d'un BCR complet est nécessaire à la survie durant ce stade, cette cellule exprimant une immunoglobuline complète subit à cette étape la sélection négative visant à éliminer les cellules ayant un BCR potentiellement auto-réactif. Dans le même temps, l'épissage alternatif permettra la Co-expression en surface d'IgM et d'IgD qui caractérise le stade B mature (naïf). Le LB mature généré sort de la moelle et circule dans le sang et les organes lymphoïdes secondaires (Schatz & Ji, 2011).

2.6. Lymphocyte B mature

Les lymphocytes B matures acquièrent l'IgM, de IgD membranaires et alternent la circulation entre les OLS comme la rate ou les ganglions lymphatiques, dans l'attente d'une rencontre avec l'antigène et ce déplacement est sous l'influence des protéines d'adhésions et les chimiokines comme CXCL13. De plus, on note l'expression sur le LB des molécules comme CD23 durant ce stade de maturation (Batista *et al.*, 2009).

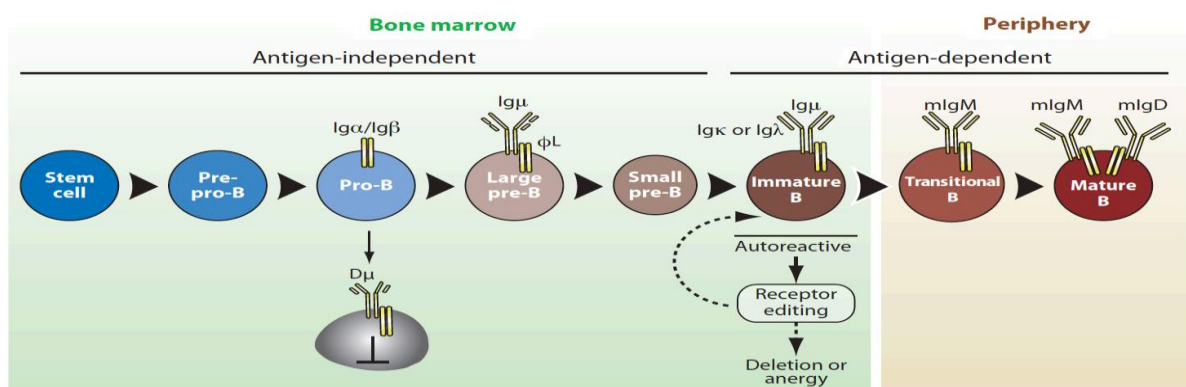


Figure 1: Schéma illustrant les différentes étapes de la différenciation des lymphocytes B et du réarrangement des gènes des chaînes lourdes ($Ig\mu$) et des chaînes légères ($Ig\kappa$ ou $Ig\lambda$) des

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

immunoglobulines sont schématisées. ΦL : pseudo-chaîne légère composée de V μ préB et $\lambda 5$ (Kurosaki *et al.*, 2009).

3. Épidémiologie de la leucémie lymphoïde chronique

Les aspects épidémiologiques de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) sont de mieux en mieux connus. L'incidence moyenne de la LLC varie entre les individus dans différentes régions géographiques du monde, elle est plus fréquente dans les pays occidentaux (Hallek *et al.*, 2018). Le taux d'incidence est similaire entre l'Europe et les États-Unis et se situe entre 4 et 6 cas pour 100 000 personnes par an. Selon le programme de surveillance d'épidémiologie et de résultats finaux de l'Institut national du cancer SEER (National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results Program), le nombre estimé de nouveaux cas de LLC aux États-Unis en 2018 était de 20 940 personnes diagnostiquées (Chiorazzi *et al.*, 2021), et qu'en 2023, environ 18 740 personnes recevront un diagnostic de LLC aux États-Unis et 4490 mourront de cette maladie (Nasnas *et al.*, 2023). En revanche, l'incidence de la LLC chez les personnes originaires de pays d'Afrique, des Caraïbes et d'Asie est de $\sim 1,4$ nouveau cas pour 100 000 individus, ce qui suggère que des facteurs génétiques jouent un rôle dans cette disparité raciale (Wuet *et al.*, 2016). En Corée du sud, 56 patients reçoivent un nouveau diagnostic de LLC chaque année, le taux brut de prévalence de la LLC est de 0,61 pour 100 000 d'après la base de données nationale sur l'incidence du cancer en Corée du sud. La population de patients coréens a été limitée, mais selon quelques données rapportées d'un seul centre, les patients coréens diagnostiqués avec une LLC ont un immunophénotype plus atypique avec des fréquences élevées de FMC7+ et une forte présentation de CD22+ et il est plus agressif que celui des populations occidentales (Jeon & Cho, 2016).

Le risque de développement de la LCC est environ deux fois plus élevé pour les hommes que pour les femmes et augmente avec l'âge; L'âge médian au diagnostic varie de 70 à 72 ans (Pulte *et al.*, 2015). Le programme de surveillance, d'épidémiologie et de résultats finaux de l'Institut national du cancer des États-Unis a estimé que le nombre de nouveaux cas de LLC soit 6,3 pour 100 000 hommes et 3,3 pour 100 000 femmes. L'incidence dans les populations blanches est estimée à 6,8 pour 100 000 hommes et 3,5 000 pour 100 000 femmes, elle est de 4,9 pour 100 000 hommes et 2,000 pour 100 000 femmes chez les populations Afro-américaines, et 1,7 pour 100 000 hommes et 0,3 par 100 000 femmes chez les personnes d'origine asiatique (Stevenson *et al.*, 2017). Le taux d'incidence en Algérie est faible par

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

rapport à celui des autres pays. L'âge moyen au diagnostic est de 67,5 ans. Cependant, 30,1% des cas incidents sont observés chez les patients de plus de 75 ans en Algérie contre 45 à 50% des cas incidents en Europe et cela peut s'expliquer par le jeune âge de notre population. Donc la LLC touche comme dans les autres pays les personnes âgées avec une prédominance masculine (Dali *et al.*, 2015).

4. Physiopathologie de la leucémie lymphoïde chronique

Dans la leucémie lymphocytaire chronique, en majorité, c'est les cellules B CD5+ qui subissent une transformation maligne. Ces cellules B sont activées après acquisition de mutations qui induisent une lymphocytose monoclonale des LB. L'accumulation supplémentaire d'anomalies génétiques et la transformation oncogénique ultérieure des cellules B monoclonales conduisent à la génération de la leucémie lymphoïde chronique. Les lymphocytes s'accumulent initialement dans la moelle osseuse, puis diffusent vers les ganglions lymphatiques et d'autres tissus lymphoïdes, induisant des splénomégalias, des hépatomégalias ainsi que des symptômes systémiques. À mesure que la leucémie lymphoïde chronique progresse, les troubles de l'hématopoïèse apparaissent induisant ainsi l'anémie, la neutropénie, la thrombopénie et la diminution de la production d'immunoglobulines. Une hypo-gammaglobulinémie peut survenir chez environ deux tiers des patients, ce qui augmente le risque d'apparition de complications infectieuses. La LLC peut évoluer en leucémie prolymphocytaire à cellules B et se transformer en un cancer de grade supérieur. Environ 2 à 10% des cas de leucémie lymphoïde chronique se transforment en lymphome diffus à grandes cellules B (appelée transformation de Richter) (Ashkan *et al.*, 2023).

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

5.1. B CellReceptor (BCR)

Le BCR correspond au récepteur d'immunoglobuline exprimé sur la membrane (mIg) des LB. Il est associé aux 2 chaînes Ig-alpha (CD79a) et l'Ig-bêta (CD79b) (Voir la figure2). Ces dernières contiennent des motifs ITAM (Motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine) ayant pour rôle la transmission des signaux d'activation de la surface cellulaire au cytoplasme du LB (Sathe & Cusick, 2020; Vaillant *et al.*, 2023).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

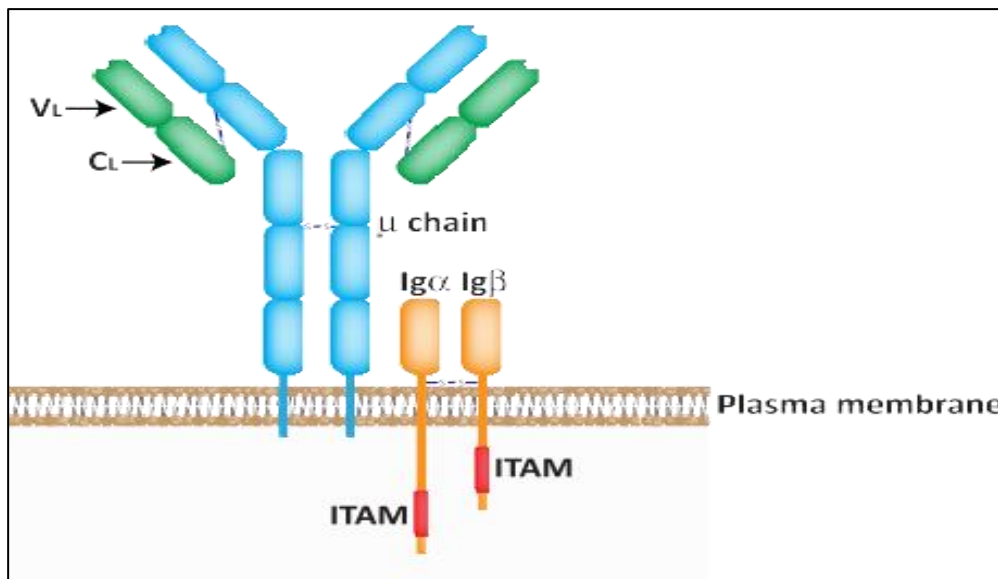


Figure 2: Structure du récepteur des cellules B (BCR).

Le BCR se compose de l'immunoglobuline membranaire (mIg) qui possède des domaines de la chaîne lourde (VH) et la chaîne légère (VL) qui se combinent pour former le site de liaison à l'antigène, dont chaque mIg possède deux sites de liaison à l'antigène identiques et de la sous-unité de signalisation Igα/Igβ associée de manière non covalente et qui contiennent des motifs d'activation immunorécepteur tyrosine-based (ITAM) (Abraham *et al.*, 2016).

5.2. CD23

C'est une glycoprotéine transmembranaire de type II d'environ 45 kDa moléculaire, il est codé par un gène de 11 exons, FCER2, situé sur le chromosome 19p13.3. Le CD23, en se liant aux IgE, peut influencer l'activation et la différenciation des LB, cela peut conduire à une augmentation de la production d'IgE par les LB activés (Engeroff & Vogel, 2021).

5.3. FMC7

C'est un anticorps monoclonal glycoprotéique, d'environ 105 kd, découvert en 1981, il est exprimé dans la plupart des lymphocytes B matures normaux (Deans & Polyak, 2008), et il est utilisé pour détecter les cellules B malignes, notamment dans des maladies lymphoïdes comme la leucémie lymphoïde chronique (LLC-B) (Yikilmaz *et al.*, 2020).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

5.4. CD22

C'est une protéine membranaire de type I de 140 KDa (Walker *et al.*, 2008), il est exprimé tôt au cours de l'ontogenèse des cellules B dans la moelle osseuse et la rate, il joue un rôle clé dans la modulation négative de la signalisation des lymphocytes B, en inhibant les signaux induits par le récepteur des lymphocytes B (BCR), ce qui limite leur activation et leur prolifération (Lanza *et al.*, 2020).

5.5. CD72

C'est un co-récepteur transmembranaire de type II de 45 kDa, principalement exprimée par cellules de la lignée B dans tous stades de développement des lymphocytes B, à l'exception des plasmocytes. La stimulation du CD72 améliore la croissance et la différenciation des cellules B (Wu & Bondada, 2002).

6. Facteurs de risque de la leucémie lymphoïde chronique

Les facteurs de risque de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) comprennent :

- Incidence plus élevée chez les personnes âgées et les hommes (Cramer & Hallek, 2011).
- Exposition aux irradiations, notamment pendant le traitement du cancer du sein et des lymphomes.
- La LLC à cellules B est plus fréquente chez les personnes d'origine russe et européenne et ne se développe que rarement chez les personnes originaires de Chine, du Japon ou des pays d'Asie du Sud-Est. Cela se produit également fréquemment chez les Noirs (Cramer & Hallek, 2011).
- L'utilisation des agents pharmacologiques comme les Alkylants et Cyclophosphamides, ces agents sont responsables de l'augmentation de la fréquence des leucémies (Sébahoun, 2005).
- Les lymphocytoses monoclonales à cellule-B sont définies comme des conditions asymptomatiques (Marti *et al.*, 2005). Dans cette condition, les LB se multiplient de manière incontrôlée, La majorité des MBL présentent un phénotype de LLC et pour cela elles sont nommées « CLL-likeMBL » (Rawstron, 2013). Elles sont détectées par la présence d'une population monoclonale de lymphocytes B persistant pendant au moins 3 mois avec un nombre absolu de lymphocytes < 5 000 cellules B monoclonales/ μ l (Marti *et al.*, 2005).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

7. Diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique

Le diagnostic est l'une des étapes les plus importantes pour le traitement du cancer, car il aide à concevoir et à choisir une meilleure approche thérapeutique.

7.1. Formule sanguine ou hémogramme

Cette méthode met en évidence l'hyperleucocytose, permet de savoir si le nombre de lymphocytes dans le sang dépasse les normes, ce qui est défini comme une lymphocytose B anormale ≥ 5000 lymphocytes/ μ l persistante pendant plus de 3 mois (Troussar *et al.*, 2011).

7.2. Frottis sanguin

Cet examen permet d'évaluer la morphologie des cellules lymphoïdes par observation au microscope optique (par la coloration de Wright ou May-Grunwald-Giemsa) (Voir la figure3). Dans la forme typique de la LLC, les cellules lymphoïdes sont petites, avec un noyau entouré d'un anneau de cytoplasme peu étendu. Le cytoplasme est homogène, faiblement basophile et sans granulations. Les nucléoles ne sont généralement pas visibles. On note la présence des cellules écrasées ou ombres de Gümprécht, qui sont des cellules lymphoïdes cassées résultant de la fragilité des lymphocytes, ces cellules présentent un cytoplasme non intact et une membrane nucléaire interrompue, leur formation est inversement corrélée à l'expression de la vimentine, une protéine du cytosquelette essentielle pour le maintien de la rigidité et l'intégrité du lymphocyte. Le pourcentage de ombres de Gümprécht dans le sang peut avoir un impact sur le pronostic de la LLC (Johansson *et al.*, 2010; Nowakowski *et al.*, 2009).

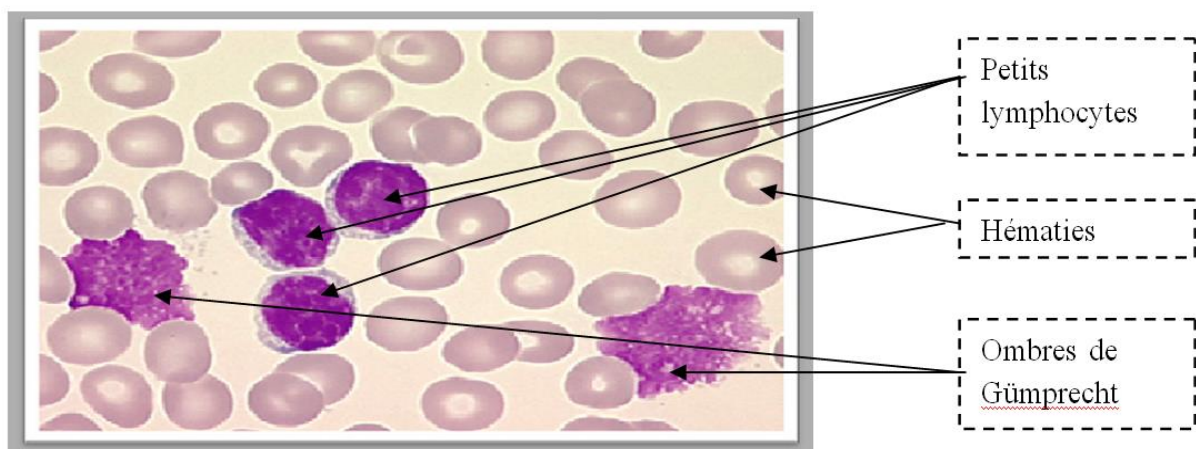


Figure 3: Frottis sanguin coloré au May-Grunwald-Giemsa (MGG) montrant l'aspect morphologique de la leucémie lymphoïde chronique B, grossissement x 100 (Merle-Béral, 2012).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

7.3. Examen de la moelle osseuse

Le prélèvement de la moelle osseuse sert à dénombrer les cellules sanguines et à évaluer leur aspect afin d'affiner le diagnostic. La ponction consiste à aspirer à l'aide d'une aiguille une petite quantité de moelle osseuse pour l'analyser. Pour compléter l'examen et préciser le diagnostic, le médecin prélève souvent un échantillon de tissu un peu plus grand (biopsie) (Broccard & Durrer, 2005).

7.4. Immunophénotypage par cytométrie en flux

Cette technique permet d'identifier certains marqueurs de surface des lymphocytes issus du sang périphérique ou de la moelle osseuse, elle est réalisée par cytométrie en flux (CMF) (Voir la figure 4) (Broccard & Durrer, 2005). Le diagnostic de la LLC est souvent basé sur un score immunophénotypique appelé le score de Moreau/Matutes qui est basé sur l'expression de cinq marqueurs, une valeur de 1 est attribuée en cas d'expression faible des immunoglobulines de surface, de l'expression faible ou négative du CD22, de l'expression positive du CD5 et du CD23 et enfin d'une expression négative du FMC7 (Matutes *et al.*, 1994). Ce score varie de 0 à 5. Cependant, il existe des variantes de LLC, comme la LLC atypiques, où certains marqueurs peuvent être présents de manière différente. Dans tels cas, d'autres marqueurs peuvent être nécessaires pour affiner le diagnostic, comme CD79b, CD43, CD200, CD81, CD10, CD38, et ROR1 (Rawstron *et al.*, 2018). Le CD200 et le CD43 sont fortement exprimés à la surface des cellules LLC, tandis que le CD81 est faiblement exprimé, ce qui peut aider à distinguer la LLC des autres syndromes lymphoprolifératifs (Sandes *et al.*, 2014). Enfin, les cellules de la LLC de la plupart des patients expriment l'antigène de surface onco embryonnaire ROR1 (Fukuda *et al.*, 2008). L'utilisation du CD79b au lieu de CD22 permet de mieux distinguer la leucémie lymphoïde chronique des autres syndromes lymphoprolifératifs (Moreau *et al.*, 1997) (voir le tableau-I).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

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

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

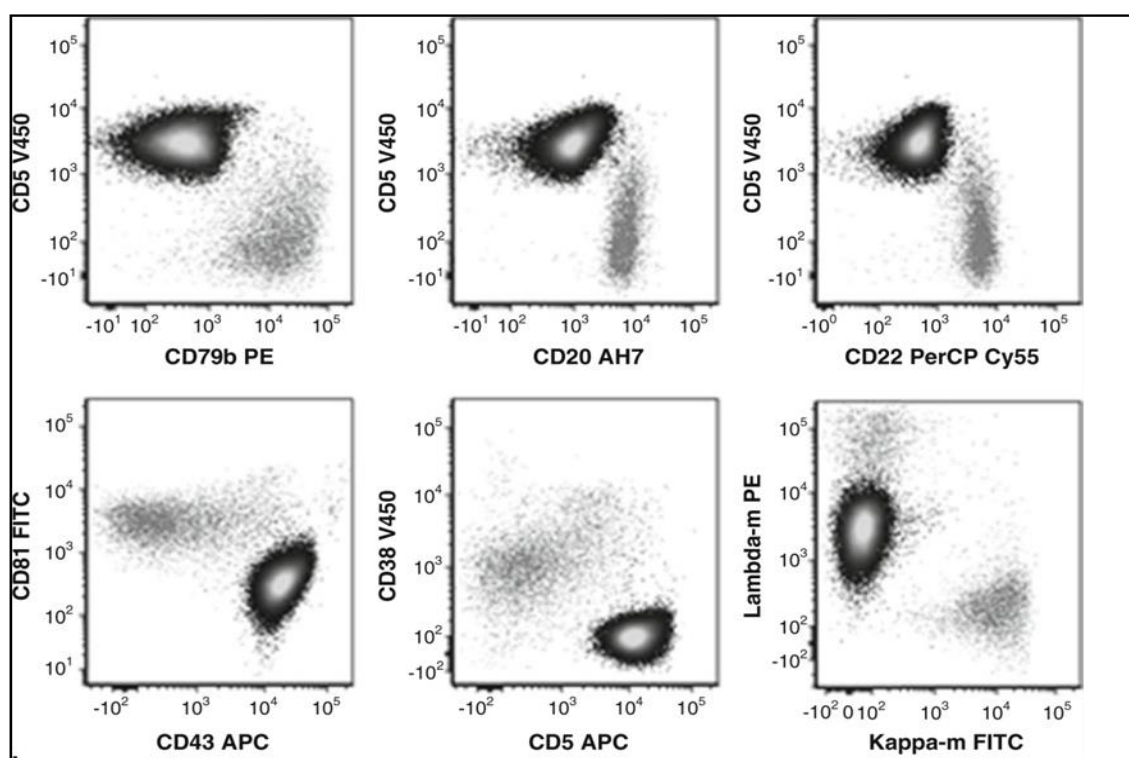


Figure 4: Immunophénotypage de la LLC par cytométrie en flux.

Les cellules lymphocytaires anormales (représentées en noir) et les cellules B normales (représentées en gris) sont observées, toutes les deux sont isolées par le marqueur CD19 qui est une protéine présente à la surface des cellules B normales ou malignes, en isolant les cellules par le marqueur CD19, on peut cibler spécifiquement les cellules B dans un échantillon. Les cellules lymphocytaires anormales présentent une positivité pour le CD5 et la chaîne légère lambda, une forte expression du CD43, et des niveaux faibles de CD79b, CD20, CD22, CD81, avec l'absence de la chaîne légère kappa et de marqueur CD38 (Salem & Stetler-Stevenson, 2019).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

8. Symptômes de la LLC

La plupart des patients atteints de la LLC sont asymptomatiques au moment du diagnostic, avec des taux de lymphocytes augmentés découverts incidemment lors des évaluations sanguines de routine. Certains patients peuvent présenter :

- des lymphadénopathies palpables et/ou splénomégalie.
- fièvre d'origine inconnue supérieure à 38°C pendant ≥ 2 semaines sans d'autres signes d'infection, une perte de poids, les sueurs nocturnes sont rares.
- Les patients se trouvant à un stade avancé peuvent ressentir de la fatigue et une intolérance à l'exercice physique en raison de l'anémie secondaire due à l'infiltration de la moelle osseuse (Scarfò *et al.*, 2016).

9. Complications

9.1. Manifestations auto-immunes

Il s'agit essentiellement de cytopénies auto-immunes (Grignano *et al.*, 2017), où le système immunitaire attaque les cellules sanguines du corps. L'anémie hémolytique auto-immune (AHAI) est la forme la plus courante de cytopénie auto-immune. Elle se caractérise par une destruction des globules rouges par le système immunitaire. Les patients présentant un état avancé de la maladie, et présentant le statut non-muté du gène codant à la région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines avec expression élevée de la protéine kinase 70 associée à cette chaîne (ZAP-70) sont à haut risque de développer une AHA, des thrombopénies immunologiques et de l'érythroblastopénie auto-immune (Gauthier, 2022; Jeon & Cho, 2016).

9.2. Risque d'infection accru

Les patients atteints de LLC présentent un risque accru d'apparition de complications infectieuses en raison de défauts immunitaires inhérents à la maladie elle-même ainsi qu'à l'immunosuppression liée au traitement (Scarfò *et al.*, 2016). Ce risque est encore plus élevé après certains traitements, comme les analogues de purines, les anticorps monoclonaux (Alemtuzumab et Rituximab), les agents alkylants ou les combinaisons de ces médicaments. Les infections sont généralement bactériennes et touchent fréquemment les voies

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

respiratoires, mais les infections fongiques et herpétiques sont également fréquentes (Isidoro *et al.*, 2014).

9.3. Seconds cancers

Les patients atteints de la LLC présentent un risque accru de développer d'autres cancers comparativement aux personnes qui ne sont pas atteintes de la LLC. Des études épidémiologiques ont trouvé un risque de survenue de seconds cancers tel que les cancers de la peau, de la prostate, du sein, de mélanome, des lymphomes et cancer du poumon étant les plus fréquents. En plus d'un risque accru d'apparition de ces cancers, le diagnostic de la LLC semble également conférer un pronostic défavorable aux patients atteints de seconds cancers (Benjamini *et al.*, 2015).

9.4. Syndrome de Richter (SR)

C'est une complication rare de la LLC dans laquelle la maladie se transforme en lymphome agressif, généralement au lymphome B diffus à grandes cellules (LBDCG), ou plus rarement en lymphome de Hodgkin (Stevenson *et al.*, 2017). Les facteurs favorisant le développement du syndrome de Richter comprennent la présence de mutations de la protéine TP53, présence de mutations de NOTCH1, ainsi que l'utilisation spécifique par les cellules B malignes des allèles du gène (IGHV4-39) qui est de la famille des gènes (IGHV) pour la production de la chaîne variable lourde d'immunoglobuline (IGHV) (Bosch & Dalla-Favera, 2019). Les signes qui peuvent faire suspecter un SR incluent une croissance rapide et asymétrique de la tumeur, une élévation des LDH et la présence d'un envahissement extra-nodal. Le diagnostic peut être confirmé par l'examen anatomopathologique d'une biopsie, et le PET-scanner. Il n'existe pas de prise en charge standard pour le SR, mais les patients bénéficient souvent d'une immunochimiothérapie suivie d'une greffe de cellules souches autologues ou allogéniques. Le pronostic reste sombre, surtout en cas de SR lié à la LLC (Falchi *et al.*, 2014).

10. Marqueurs pronostiques

Ils correspondent aux différentes caractéristiques biologiques, génétiques ou cliniques qui permettent de prédire la progression de la maladie, le délai avant le premier traitement et la réponse au traitement (Gowda & Byrd, 2006).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.1. Mutations somatiques des gènes de la région variable de la chaîne lourde d'immunoglobuline (IgHV)

Les patients dont les cellules LLC expriment un gène IgHV non muté ont généralement une maladie plus agressive que les patients dont les cellules LLC expriment un gène IgHV muté. De plus, il a été démontré que la positivité pour CD38 ou ZAP-70 associés à un statut IGHV non muté est un indicateur d'un pronostic défavorable (Stevenson *et al.*, 2017). Ces marqueurs sont souvent associés à un stade avancé de la maladie et une présence de progression tumorale plus rapide (García *et al.*, 2012).

10.2. Autres mutations géniques

Un nombre de mutations géniques sont détectée chez les patients LLC par séquençage de nouvelle génération. On trouve les mutations de TP53, les mutations du gène NOTCH1 et de SF3B1 (Scarfò *et al.*, 2016) qui ont montrés un effet négatif sur la survie globale, aussi les mutations du gènes BIRC3 sont associées à un pronostic très sombre, similaire à celui observé chez les patients avec TP53 mutés (Rossi *et al.*, 2014).

10.3. Aberrations chromosomiques

L'analyse cytogénétique par la technique Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) a permis la détection de la présence d'aberrations chromosomiques chez environ 80 % des patients atteints de LLC, ils sont porteurs au moins d'une des quatre altérations chromosomiques décrites ci-dessous (Stevenson *et al.*, 2017)

-Del13q14 : Elle est associée à un pronostic favorable (Scarfò *et al.*, 2016), car dans ce cas est supprimé la région de localisation du cluster DLEU2 – miR-15-16, qui régule l'expression de protéines capables d'inhiber l'apoptose et impliquées dans la progression du cycle cellulaire (Stevenson *et al.*, 2017).

-Trisomie 12 : Elle est associée à une évolution clinique moins favorable (Scarfò *et al.*, 2016).

-Del11q22-23 : Elle est retrouvée chez 18 % des patients. Elle est un marqueur de mauvais pronostic car souvent associé à l'altérations du gène ATM qui code pour une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN (Van Dyke *et al.*, 2016). Les patients porteurs de cette anomalie présentent souvent des lymphadénopathies volumineuses et évolution clinique agressive, avec survie globale réduite.

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

-Del17p13: Elle implique le gène suppresseur de tumeur TP53. Cette aberration est associée à des mutations de TP53. Cette altération est liée à un résultat clinique très défavorable dans la LLC (Scarfò *et al.*, 2016).

10.4. Les altérations dans les micro-ARN (miRs)

Les miRs jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans la survie cellulaire, la prolifération et la progression de la maladie. miR-15a et miR-16-1 sont souvent altérés chez les patients atteints de LLC, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques comme BCL2 et MCL1. De plus, d'autres miRs, comme miR-29a/b, miR-29c, miR-34b et miR-181b, peuvent cibler des gènes tels que TCL1A, favorisant le développement de la maladie. Aussi l'expression accrue de miR-155 est associée à une signalisation intense des cellules B, donc une forte prolifération cellulaire synonyme d'agressivité de la LLC (Stevenson *et al.*, 2017).

10.5. Marqueurs de la prolifération

Ils fournissent des informations supplémentaires sur la progression de la maladie pour guider les décisions thérapeutiques. Parmi ces marqueurs: temps de dédoublement lymphocytaire (TDL) qui est utilisé pour évaluer la vitesse de multiplication des cellules leucémiques, dont un TDL court est associé à un pronostic défavorable, la thymidine kinase sérique (Stk) qui est considérée comme un indicateur de la prolifération cellulaire, avec des niveaux élevés liés à un stade avancé de la maladie, les télomères et l'activité de la télomérase, dont les télomères courts sont associés à un pronostic plus défavorable, avec une survie plus courte chez les patients présentant ces caractéristique (Van Bockstaele *et al.*, 2009).

10.6. Les marqueurs sériques

Ces marqueurs fournissent des indications sur la charge de la morbidité et l'activité cellulaire. Parmi ces marqueurs, la LDH, la β 2-microglobuline, les CD solubles (sCD23, sCD27, sCD44), les CD20 circulants (cCD20) et certaines interleukines et la thrombopoïétine (TPO) sont étudiés (Van Bockstaele *et al.*, 2009).

10.7. Stades cliniques de la LLC (Rai et Binet)

Les deux systèmes historiques de Rai et Binet de classification de la LLC présentent de nombreux avantages car faciles à définir, et ils constituent d'importants indicateurs pronostiques.

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.7.1. Système de classification de Rai

La classification originale proposée en 1975 différencie 5 groupes, elle est régulièrement utilisée aux États-Unis (voir le tableau III).

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

Risque	Stade	Caractéristiques	Survie médiane
Faible	0	Uniquement lymphocytose dans le sang périphérique et infiltration de la moelle osseuse.	>150 mois
Intermédiaire	I	Lymphocytose + adénopathie.	101 mois
	II	Lymphocytose + splénomégalie et ou hépatomégalie.	71 mois
Élevé	III	Lymphocytose + anémie (hb< 11 g/dl).	19 mois
	IV	Lymphocytose + thrombopénie (Plt<100,000/mm ³).	19 mois

10.7.2. Système de classification Binet

Elle est adoptée en Europe et définit 3 catégories de risque (voir le tableau IV).

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

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

10.8. Autres marqueurs pronostic

L'expression accrue des gènes de multi-résistance aux médicaments MDR1 et MDR3 et une faible expression du récepteur à la chimiokine CXCR3 sont associés à de mauvais pronostiques. Par contre, la faible expression de HLA-G sur les cellules LLC est associée à une augmentation de la survie sans progression de la maladie (Van Bockstaele *et al.*, 2009).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

11. Stratégies thérapeutiques de la leucémie lymphoïde chronique

La décision d'entamer le traitement de la LLC dépend des symptômes chez le patient et du risque de progression de la maladie. Le traitement est généralement indiqué chez les patients présentant une maladie symptomatique ou active, mais pas chez ceux qui ne présentent aucun symptôme, comme indiqué dans les lignes directrices de l'International Workshop on CLL (iwCLL) (Hallek, 2019).

11.1. Chimiothérapie

C'est un traitement médicamenteux à base d'agents chimiques utilisé pour détruire les cellules leucémiques et contrôler la progression de la maladie. Parmi ces médicaments il y'a la Fludarabine, qui est un analogue de nucléotide de type purine. Il inhibe la synthèse de l'ADN en incorporant des analogues de nucléotides, ce qui entraîne une apoptose des cellules leucémiques, elle est administrée généralement par voie intraveineuse (Hallek, 2019). La monothérapie de Fludarabine produit des taux de réponse globalement supérieure par rapport aux autres régimes de traitement contenant des agents alkylants ou des corticostéroïdes (Rai et al., 2000). Il a été utilisé en Allemagne de l'Est pour traiter une variété de cancers et il est devenu disponible en Allemagne de l'Ouest après 1990 (Knauf *et al.*, 2009). Le Cyclophosphamide est un agent alkylant liant l'ADN et interfère avec sa réplication, il entraîne en conséquence l'apoptose des cellules LB cancéreuses, Il est peu efficace en monothérapie et il est souvent associé à un anticorps monoclonal (Id, 2021). La Bendamustine qui est un agent alkylant dont la structure est intermédiaire entre les agents alkylants et les analogues puriques, avec l'avantage d'une toxicité hématologique plus faible (Sánchez Suárez *et al.*, 2023), il induit la formation de liaison covalente des brins de l'ADN et inhibe la synthèse de l'ADN, ce qui entraîne une apoptose des cellules leucémiques. Une étude comparative entre la Bendamustine et le Chlorambucil a montré que la Bendamustine produit des réponses améliorées mais avec une certaine toxicité. La réponse globale et les taux de SSP médianes étaient respectivement de 67% et 22 mois pour la Bendamustine contre 30 % ET 8 mois pour le Chlorambucil, ces résultats suggèrent que la Bendamustine est un agent unique puissant pour le traitement de la LCC (Hallek, 2019; Knauf *et al.*, 2009).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

11.2. Immunothérapie

11.2.1. Le Rituximab (Rituxan®)

Le Rituximab (Mabthera®, Rituxan®) est un anticorps monoclonal chimérique anti CD20, Il a été démontré que le Rituximab prolonge la survie sans progression chez les patients atteints de diverses tumeurs malignes à cellules B, tout en ayant un profil d'innocuité bien établi et gérable et une large fenêtre thérapeutique. L'activité anti-tumorale de ce traitement est médiée par plusieurs mécanismes, notamment la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, la cytotoxicité dépendante du complément ou par l'activation des cellules NK, l'induction de l'apoptose et la phagocytose de cibles opsonisées par les phagocytes, tels que les macrophages. En plus des effets anti-tumoraux directs, il semble agir en synergie avec d'autres agents chimio-thérapeutiques, sensibilisant les cellules tumorales à une variété d'agents, notamment la Bendamustine, il est administré en injection sous-cutanée ou en perfusion intraveineuse (Davies *et al.*, 2017).

11.2.2. Obinutuzumab ou GA101 (Gazyvaro®)

Il s'agit d'un anticorps humanisé de 2^{ème} génération anti-CD20, il est utilisé en association avec le Chlorambucil chez des patients n'ayant reçu aucun traitement et qui en même temps souffrent d'autres maladies comme exemple les maladies cardiaques (Goede *et al.*, 2015).

11.2.3. Ofatumumab (Arzerra®)

L'Ofatumumab est un anticorps entièrement humanisé ciblant un épitope unique de la molécule CD20 exprimé sur les lymphocytes B. Il en résulte un taux de dissociation prolongé et une augmentation de la destruction cellulaire en raison d'une activité de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante (ADCC) similaire à celle du Rituximab mais amélioré pour être plus stable et ayant plus d'affinité pour le CD20. Il est utilisé lorsque la LLC ne répond pas aux autres traitements comme la chimiothérapie (Hallek, 2019).

11.2.4. Alemtuzumab

Alemtuzumab est un anticorps monoclonal recombinant, entièrement humanisé et dirigé contre l'antigène CD52 qui est exprimé sur la surface des LB normaux et ceux atteints de LLC. La monothérapie avec Alemtuzumab a produit des taux de réponse de 33% à 53%, avec

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

une durée médiane de réponse allant de 8,7 à 15,4 mois, et cela chez des patients atteints de LLC avancée préalablement traités sans succès avec des agents alkylants (Hallek, 2019).

11.2.5. Les anticorps bispécifiques

Les anticorps bispécifiques sont capables de se lier à 2 épitopes distincts, ce qui permet une double capacité de ciblage. Il permet le développement d'anticorps avec de nouveaux mécanismes d'action, tels que le rapprochement de 2 types de cellules (l'engagement des cellules immunitaires et tumorales), l'administration de doses efficaces aux cellules cibles, ou pour l'engagement ou le blocage de 2 antigènes différents sur la même cellule. Un exemple d'anticorps bispécifique qui est le Blinatumomab, il se lie à la fois au CD19 et au CD3 et provoque une activation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) contre les cellules tumorales LLC exprimant le CD19. Un deuxième exemple est le Plamotamab, qui se lie à la fois au CD3 et au CD20, il est actuellement testé dans le cadre d'une première étude clinique de phase 1 chez des patients atteints de LLC (Suurs *et al.*, 2019).

11.3. Inhibiteurs de la signalisation du récepteur BCR

11.3.1. Inhibition de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK)

Les inhibiteurs de BTK sont devenus une option de traitement de première ligne recommandée chez les patients atteints de LLC qui présentent ou non un dysfonctionnement de la TP53, et que leur maladie ait ou non récidivé ou soit devenue réfractaire sous d'autres traitements. Ibrutinib est un inhibiteur irréversible de la protéine BTK qui inhibe fortement la signalisation du BCR, il se lie de manière covalente au groupe sulfhydryle du résidu C481 sur le site actif de BTK, conduisant à une diminution de la prolifération, de l'adhérence et du homing des lymphocytes tumoraux (Hendriks *et al.*, 2014). Plus de 80 % des patients ont une résistance acquise à l'Ibrutinib, ils présentent des mutations récurrentes impliquant le site de liaison de l'Ibrutinib à BTK (BTKC481S) ou le gène de signalisation BCR PLC γ 2 (Woyach *et al.*, 2017). En raison de son mécanisme d'action, il est actif contre les sous-types de LLC présentant des lésions génétiques traditionnellement associées à la résistance à la chimio-immunothérapie (TP53 notamment) (Stephens & Byrd, 2021). Cet inhibiteur a été approuvé aux États-Unis et en Europe pour une utilisation de première ligne, ainsi que chez les patients atteints de rechute (Byrd *et al.*, 2014). Ses effets toxiques courants sont la diarrhée, la myalgie, et les ecchymoses, les complications infectieuses surviennent le plus souvent au

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

début du traitement et diminuent avec le temps (Wu *et al.*, 2016). Orelabrutinib est un autre inhibiteur irréversible très sélectif de la BTK et qui est également en cours de développement, il a été approuvé en Chine pour le traitement des patients atteints de LLC récidivante (réfractaire), y compris ceux présentant des anomalies chromosomiques del(17p), del(11q), des mutations de TP53 ou avec statut IGHV non mutée (Xu *et al.*, 2020). L'Acalabrutinib, un inhibiteur covalent de BTK de deuxième génération, a une sélectivité plus élevée que l'Ibrutinib vers BTK. Ces effets secondaires sont similaires à ceux de l'Ibrutinib mais leurs fréquences sont réduites en raison d'une sélectivité plus élevée à BTK (Byrd *et al.*, 2016).

11.3.2. Inhibition de la phosphatidylinositol-3 kinase δ (PI3K- δ)

L'Idelalisib (Zydelig®) est une petite molécule inhibitrice sélective de l'isoforme δ de la sous-unité catalytique PI3K, qui est spécifiquement exprimée dans le compartiment hématopoïétique, cet inhibiteur est actif dans le cas de LLC présentant des mutations de la protéine TP53 (Furman *et al.*, 2014). Bien que l'Idelalisib soit très efficace en association avec le Rituximab, son utilisation comme traitement de première ligne provoque des hépatotoxicités sévères à médiation immunitaire, et son utilisation comme traitement de deuxième ligne ou plus est à l'origine de l'apparition de nombreuses infections graves (Lampson *et al.*, 2016).

11.3.3. Inhibiteur de Bcl-2

Le Venetoclax (Venclyxto®) est une molécule qui agit sur la voie de l'apoptose. Il fonctionne comme un peptide mimétique BH3 pour inhiber sélectivement la liaison de Bcl-2 (anti-apoptotique) à Bim qui est un médiateur de la mort cellulaire, ce dernier se liant ensuite à Bax induit la mort cellulaire (Souers *et al.*, 2013). Il a été le premier inhibiteur de Bcl-2 approuvé pour le traitement des patients atteints de LLC à haut risque de rechute. Il a été initialement approuvé en avril 2016 pour le traitement des patients atteints de LLC présentant des mutations du gène TP53 et la délétion del17p (Stilgenbauer *et al.*, 2016). Les toxicités du Venetoclax comprennent les troubles gastro-intestinaux, la neutropénie et le syndrome de lyse tumorale qui résulte de la destruction rapide des cellules cancéreuses et la libération de leur contenu cellulaire dans le sang. Au début du traitement, Venetoclax est administré à faible dose quotidienne, elle est augmentée chaque semaine pendant les 5 semaines de prise (Roberts *et al.*, 2016).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

11.4. Inhibiteurs des récepteurs inhibiteurs de la co-stimulation PD-1

Les ligands de ces récepteurs sont des protéines exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes qui régulent le système immunitaire en fournissant des signaux co-stimulants ou co-inhibiteurs aux récepteurs exprimés sur les lymphocytes T et d'autres cellules effectrices du système immunitaire. Le récepteur inhibiteur de la co-stimulation PD-1 est le récepteur impliqué dans la suppression de l'activation de la réponse immune cellulaire médiée par les cellules CTL. Les cellules LLC expriment des niveaux élevés de PD-L1 et PD-L2 qui sont des ligands du récepteur PD-1 et peuvent ainsi supprimer les réponses des lymphocytes T effectrices, conduisant à un phénotype de lymphocytes T non-réactif (Ramsay *et al.*, 2012). Un nombre d'inhibiteurs des récepteurs de régulation négative de la co-stimulation sont évalués dans le traitement des patients atteints de LLC, et comme exemple les anticorps monoclonaux dirigé contre PD-1 comme Pembrolizumab qui bloque le récepteur PD-1. Des études ont démontré que les inhibiteurs de PD-1 peuvent réactiver les cellules effectrices immunitaires pour qu'elles aient une activité anti-LLC (Mc *et al.*, 2015).

11.5. Thérapie CAR-T

Les lymphocytes T modifiés exprimant le récepteur d'antigène chimérique (CAR) sont des lymphocytes T qui ont été génétiquement modifiés *ex vivo* pour exprimer des fragments d'immunoglobulines, fusionnés aux domaines intracellulaires de signalisation des cellules T connus sous le nom de récepteurs d'antigène chimériques, pour cibler les cellules cancéreuses, elles sont cultivées *in vitro* et réintroduites au patient pour le traitement de la LLC ; Les fragments variables de l'immunoglobuline, spécifiques au CD19 de la LLC, permettent la reconnaissance de la cellule tumorale par la cellule CAR-T, conduisant à l'activation du lymphocyte T et induction de la cytotoxicité vis-à-vis de ces cellules LLC (Porter *et al.*, 2015). Bien que la thérapie CAR-T ait montré une efficacité remarquable dans la LLC, il peut y avoir des problèmes importants de toxicité liée à ce traitement. Les effets indésirables courants comprennent le syndrome de libération de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6. Le blocage du récepteur à l'IL-6 par les anticorps monoclonaux réduit cet effet indésirable (Lee *et al.*, 2014). L'aplasie des cellules B normales, la neuro-toxicité et l'infection sont aussi des effets indésirables courants (Brudno & Kochenderfer, 2019). Les CAR-T utilisent des anticorps anti-lymphocytes B pour éliminer les cellules LLC-B cibles, les lymphocytes B normaux sont également éliminés, ce qui entraîne une

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

hypogammaglobulinémie (Kochenderfer *et al.*, 2010). En plus des toxicités, la fabrication de ces thérapies spécifiques aux patients est coûteuse et prend beaucoup de temps, ce qui limite potentiellement le nombre de patients qui peuvent être traités. Des recherches visant à améliorer la plate-forme de production CAR-T sont en cours de développement (Makit *et al.*, 2019).

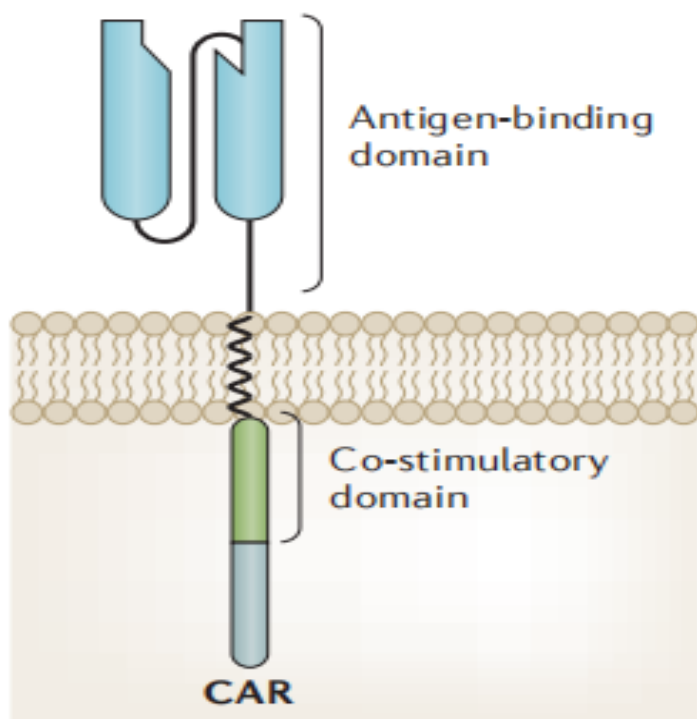


Figure 5: Représentation du Récepteur d'antigénique chimérique (CAR).

Il est composé d'un domaine de liaison à l'antigène, d'une région pédonculaire et transmembranaire, d'un domaine de signalisation co-stimulateur intracellulaire et de CD3 et la chaîne ζ . Les domaines de signalisation co-stimulateurs comprennent CD28 et CD137, qui fournissent le « deuxième signal » pour activer complètement les lymphocytes T lors de la liaison à l'antigène. Les vecteurs rétroviraux sont utilisés pour introduire le gène CAR dans les lymphocytes T, qui s'intègre dans le génome du lymphocyte T pour une expression stable. Lorsque les cellules CAR-T sont exposées à l'antigène respectif, la liaison à l'antigène déclenche l'activation et l'expansion des cellules CAR-T et élimine les cellules avec l'antigène cible. Le domaine de liaison de CAR peut être dirigé contre n'importe quel antigène de surface (Jackson *et al.*, 2016).

11.6. Thérapie CAR-NK

Les cellules tueuses naturelles (Naturel Killer) peuvent également être modifiées pour exprimer les CAR. Elles jouent un rôle clé dans le système immunitaire inné en ciblant les

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

cellules cancéreuses et les cellules infectées par les virus. Les cellules NK provenant d'une source allogénique peuvent être administrées sans qu'il soit nécessaire d'apparier complètement l'antigène leucocytaire humain, ce qui élimine la nécessité d'une production spécifique pour chaque patient, comme l'exigent la plupart des thérapies cellulaires CAR-T. Des essais de phase I d'un traitement par CAR-NK spécifique au CD19 chez des patients atteints de LLC ont montré des réponses sans toxicité (Liu *et al.*, 2020).

11.7. Greffe de cellules souches (greffe allogénique)

La greffe allogénique des cellules souches est une option de traitement pour les personnes atteintes de LLC récidivante ou réfractaire à risque élevé et il reste le seul traitement potentiellement curatif, les cellules souches nouvellement greffées peuvent aider à reconstituer le système immunitaire normal, parmi les risques courant de cette pratique est le rejet du greffon par l'attaque des cellules transplantées. La procédure de greffe doit être soigneusement discutée avec les patients, étant donné que la transplantation précoce dans la LLC à haut risque est soutenue par la coexistence d'une LLC récidivante/réfractaire et présence d'anomalies génétiques défavorables (del17, mutation TP53, del11q), un âge plus jeune et l'absence de comorbidités pertinentes, ainsi que la disponibilité d'un donneur bien compatible. Avant la greffe, le patient reçoit une chimiothérapie intensive parfois associée à une irradiation corporelle totale pour éliminer les cellules cancéreuses restantes et le système immunitaire (Böttcher *et al.*, 2011).

12. Algorithme de traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Seuls les patients répondant aux critères de l'iwCLL de 2018 reçoivent des traitements, étant donné que la majorité des patients présente une maladie asymptomatique située à un stade précoce. Tous les patients doivent donc subir des tests pour l'évaluation de l'index du CLL International Prognostic Index (CLL-IPI), qui identifie quatre groupes de différents niveaux de risque en se basant sur cinq facteurs associés à la survie. Les patients à faible risque ou intermédiaire devraient bénéficier d'un suivi tous les 6 à 12 mois, tandis que ceux à risque élevé ou très élevé devraient être surveillés tous les 3 à 6 mois. Pour les patients à haut risque, l'accès à des essais cliniques précoces, comme celui utilisant l'Ibrutinib, peut être proposé. Tous les patients, quel que soit leur risque CLL-IPI, doivent être informés sur les risques accrus d'infections, de survenue de cancers non hématologiques et de cancers de la peau.

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

12.1. Cas des patients répondant aux critères iwCLL2018 (traitement de première ligne)

Ces patients doivent se voir proposer une thérapie, quel que soit leur groupe de risque CLL-IPI. Compte tenu des observations constantes d'une amélioration de la survie sans progression de la maladie (SSP) et de la survie globale (SG) avec l'utilisation de nouveaux agents par rapport à la chimiothérapie classique, il est recommandé d'utiliser de manière systématique le FCR, BR ou Chlorambucil en première ligne dans la prise en charge du patient LLC. La chimio-immunothérapie peut être considérée comme une option de traitement appropriée pour les patients ayant un profil cytogénétique à faible risque, des gènes IGHV mutés. Les tests cytogénétiques par la technique FISH de la LLC et le séquençage de Sanger ou le séquençage de nouvelle génération doivent être effectués pour détecter la délétion del17p13 et les mutations de TP53. Les patients présentant des mutations de TP53 affichent une SSP et une SG réduites avec les régimes de chimio-immunothérapie standard. En absence de modification de TP53, les traitements à base de Venetoclax et de BTKi sont d'excellentes options, préférables à la chimio-immunothérapie, indépendamment du statut de mutation de IGHV, ce qui suggère qu'un traitement continu à base d'inhibiteur BTK est utile en présence de mutations de TP53. Dans une étude réalisée pour la comparaison du traitement au Venetoclax et Obinutuzumab avec Chlorambucil-Obinutuzumab chez des patients atteints de LLC jamais traités, les résultats ont montré une meilleure SSP avec le Venetoclax + Obinutuzumab par rapport à d'autres combinaisons, confirmant l'efficacité de l'Obinutuzumab en association avec le Venetoclax (Fischer *et al.*, 2019). Les études cliniques RESONATE-2 et Alliance A041202 ont démontrés l'efficacité de l'Ibrutinib seul ou en combinaison avec Rituximab chez les patients sans délétion del17p (Shanafelt *et al.*, 2022; Woyach *et al.*, 2021). Il est important de noter que les patients portant des gènes IGHV mutés présentaient une amélioration avec Ibrutinib-Rituximab comparativement à la FCR. Pour les patients sans modification de TP53 qui nécessitent une réponse rapide, la combinaison d'Ibrutinib et de Venetoclax montre des résultats prometteurs pour atteindre une maladie résiduelle minimale indétectable (uMRD) (Hampel & Parikh, 2022).

12.2. Cas des patients atteints de LLC en rechute

La progression de la maladie ne constitue pas toujours une indication immédiate pour commencer un traitement ou changer le traitement actuel, tant que les patients ne répondent pas aux critères iw-CLL de 2018 de thérapie. Une évaluation complète de l'état de la maladie

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

est nécessaire, comprenant une biopsie de la moelle osseuse ainsi que des images thorax/abdomen/bassin. Le test de mutation TP53 et le panel cytogénétique par FISH de la LLC doivent être réalisés. Pour les patients en rechute sans traitement préalable au BTKi ou Venetoclax, il n'y a pas de place au traitement par chimio-immunothérapie à l'heure actuelle. Les options de traitement à base de BTKi et de Venetoclax ont montré l'efficacité étendues chez les patients ayant reçu précédemment une chimio-immunothérapie et sont naïfs aux nouveaux agents. L'étude RESONATE de phase 3 a comparé l'utilisation quotidienne d'Ibrutinib de façon continue sur 24 semaines avec Ofatumumab chez 391 patients atteints de LLC en rechute. L'analyse la plus récente du suivi sur 74 mois montre que le SSP médian et l'OS étaient respectivement de 44 et 68 mois avec Ibrutinib, et de 8 et 65 mois avec Ofatumumab (Byrd *et al.*, 2014; Munir *et al.*, 2019). L'étude ASCEND, une autre étude clinique de phase 3, portée sur 398 patients atteints de LLC précédemment traités à l'Acalabrutinib ou au Idelalisib (en continu) plus Rituximab ou BR (6 cycles). Le suivi médian d'environ 4 ans, les taux de SSP et d'SG à 42 mois avec l'Acalabrutinib étaient respectivement de 62% et 78%, contre 19% et 65% dans le cas Idelalisib plus Rituximab ou BR (Jurczak *et al.*, 2022). L'arrêt du traitement par les BTKi est souvent dû à des toxicités, telles que des arthralgies, des saignements, dans ce cas la réduction de la dose peut être une option, ainsi que le traitement avec un autre BTKi covalent alternatif pouvant prolonger l'efficacité du traitement. Les patients dont la LLC progresse pendant le traitement au BTKi sont atteints d'une maladie résistante et nécessitent une approche thérapeutique différente. Les mécanismes de résistance sont similaires entre les BTKi covalents (qui partagent le même site de liaison impliquant la cystéine 481) et, par conséquent, l'utilisation d'un BTKi covalent alternatif n'apportera aucun bénéfice clinique dans ce contexte. Les patients ayant reçu séquentiellement un BTKi covalent et du Venetoclax ("double-exposés") doivent participer à des essais cliniques, pour envisager de nouvelles options de traitement telles que les BTKi non covalents et la thérapie par cellules CAR-T qui sont en cours de développement. L'évaluation de la thérapie cellulaire, notamment de la greffe de cellules souches hématopoïétiques allo géniques, peut être envisagée chez les patients présentant une rémission après un second traitement ciblé, étant donné le mauvais pronostic et le manque d'options efficaces pour ces patients doublement réfractaires (Hampel & Parikh, 2022) (Voir la figure 6).

Chapitre I : Généralité sur la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

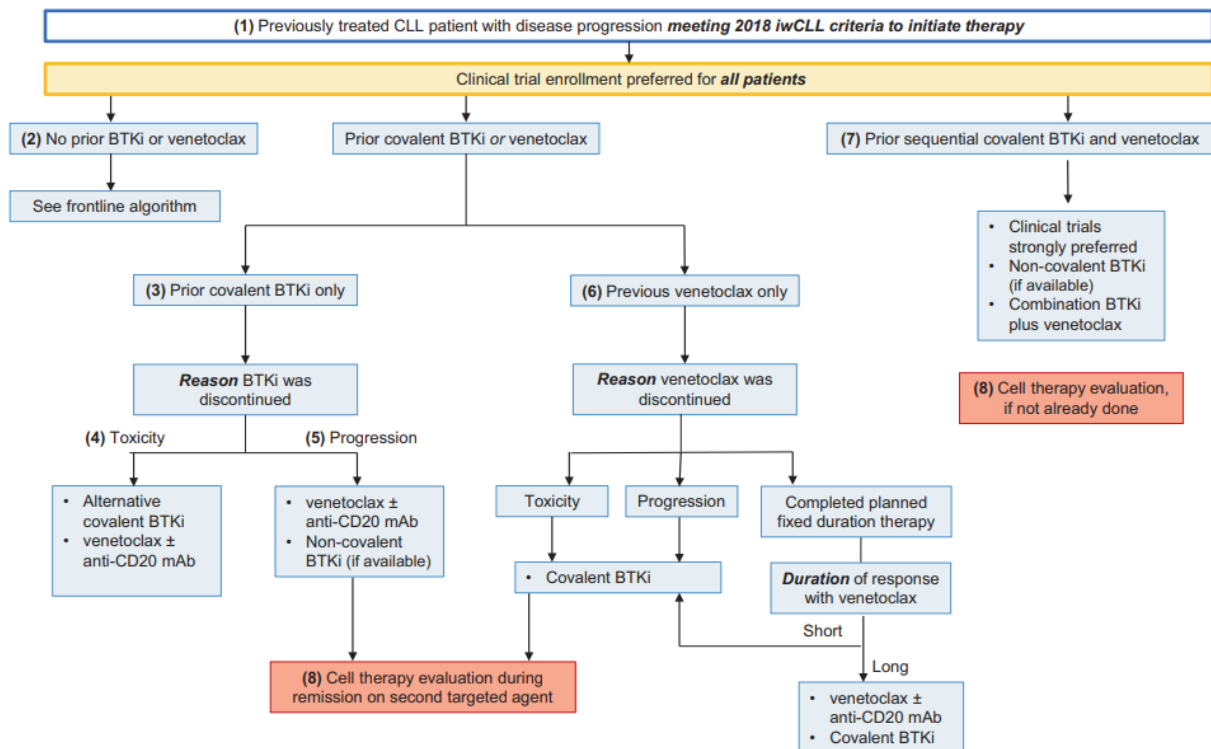


Figure 6: Schématisation des approches de prise en charge des patients atteints de LLC en rechute qui répondent aux critères thérapeutiques d'iwCLL de 2018 (International Workshop for Chronic Lymphocytic Leukemia).

Inhibiteurs de la tyrosine kinase BTKi Bruton, gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline IGHV, anticorps monoclonal mAb (Hampel & Parikh, 2022).

Chapitre II

Biologie de la LLC

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

1. Origine cellulaire de la LLC

La cellule d'origine de la LLC fait l'objet de controverse, notamment en ce qui concerne le type de cellule où les premières altérations génétiques se produisent (cellule souche hématopoïétique CSH versus cellule B mature). Sur la base de l'amélioration progressive de la compréhension de la biologie et de la différenciation des cellules B, et le type spécifique de cellule B mature (pré-CG, post-CG ou CG-indépendant) à partir duquel l'expansion clonale peut découler. La présence de réarrangements clonaux des gènes d'Ig ainsi que l'expression de marqueurs de surface cellulaire spécifiques ont établi que la LLC est dérivée d'une cellule B mature. Elle est caractérisée par une faible expression des immunoglobulines membranaires de surface, du CD19 et du CD20, une positivité du CD23 et CD5 (Swerdlow *et al.*, 2016). L'expression du CD5 a fait supposer que la LLC est dérivée de la lignée B1 IgM-sécrétante qui contribue à l'immunité innée, par opposition à la lignée B2, qui est impliquée dans l'immunité adaptative (Bosch & Dalla-Favera, 2019). Les cellules B1 humaines ont été comparées à une population de cellules B non mutées, notamment en ce qui concerne leur phénotype similaire exprimant des marqueurs tels que le CD20 et ZAP-70. Bien que ces cellules B1 normales partagent des caractéristiques avec les cellules malignes de la LLC, telles que l'expression de CD50, leur longueur de la région CDR3 plus courte et l'utilisation d'un IGHV différent constituent des arguments contre leur origine dans la LLC, néanmoins, certains suggèrent que des cellules B1 pourraient évoluer vers des cellules B leucémiques, ce qui pourrait expliquer la présence de cellules B non mutées dans la LLC (García-Muñoz *et al.*, 2012).

Les cellules LLC qui expriment un IGHV non muté (IGHV-UM) proviennent des cellules B pré-GC ou de cellules B ayant eu un contact antigénique mais CG-indépendantes. Ce lymphocyte B n'a pas subi de différenciation dans les centres germinatifs, qui sont les zones des ganglions lymphatiques où les lymphocytes B subissent une hypermutation somatique dans leurs gènes codants aux régions variables des immunoglobulines et de sélection au cours du développement réponse immunitaire en vis-à-vis d'un antigène. Les cellules LLC avec IGHV muté (IGHV-M) proviennent d'un lymphocyte B du centre post-germinal qui exprime l'immunoglobuline qui a déjà subi des hypermutations somatiques après rencontre avec un antigène spécifique et dans certains cas, on observe un changement d'isotype de l'immunoglobuline. Les LLC mutées sont dérivées de cellules B qui ont transité par le centre germinal (CG) des organes lymphoïdes secondaires, site des hyper-mutations somatiques des

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

Ig (Stevenson *et al.*, 2017). En fait, les sous-types IGHV-M et IGHV-UM sont similaires aux cellules B CD27⁺ mémoires, ce qui suggère que les deux sous-types de LLC proviennent de cellules CD27⁺ B ayant eu contact avec l'antigène, les sous-types IGHV-M et IGHV-UM dérivant respectivement de cellules post-CG ou CG-indépendantes (Bosch & Dalla-Favera, 2019). Les événements génétiques et épigénétiques très précoces qui conduisent à la survenue d'une LLC se produisent très vraisemblablement dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH), des lésions spécifiques dans les gènes impliqués dans les tumeurs lymphoïdes (par exemple Notch1, SF3B1 et EGR) ont été trouvées dans les CSH purifiés de certains patients atteints de LLC (Damm *et al.*, 2014). Dans l'ensemble, la conclusion selon laquelle les lésions génétiques initiales favorisant le développement de la LLC pourraient se produire dans les CSH reste controversée, en particulier compte tenu des difficultés à purifier les populations de CSH sans LLC de la moelle osseuse (Marsilio *et al.*, 2018). Dans l'ensemble, la cellule d'origine de la LLC fait l'objet d'un débat continu, tant en ce qui concerne le type de cellule dans lequel la première lésion génétique se produit que le type de cellule B mature à partir duquel l'expansion clonale de la LLC se manifeste (Bosch & Dalla-Favera, 2019) (Voir la figure7).

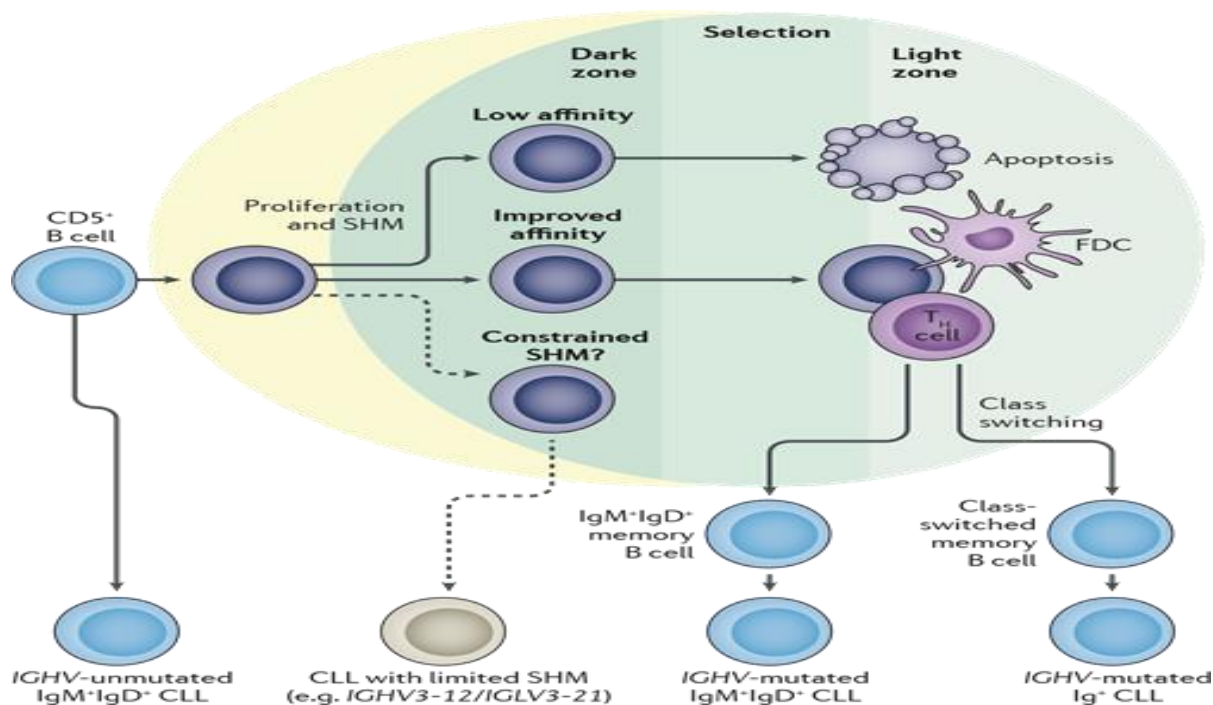


Figure 7 : Origines cellulaires des cellules LLC.

Les lymphocytes B naïfs normaux qui ont subi une recombinaison V(D) J et qui expriment des récepteurs fonctionnels des lymphocytes B capables de se lier à l'antigène coopèrent avec les lymphocytes T CD4⁺ pour former des follicules secondaires qui deviennent des centres germinatifs.

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

Le centre germinal est formé d'une zone sombre, comprenant des cellules B en division rapide, et une zone claire, comprenant des cellules B et des cellules dendritiques folliculaires (FDC), des macrophages et des cellules T auxiliaires folliculaires (cellules ThF). Les lymphocytes B pénètrent dans la zone sombre du centre germinatif où ils subissent une prolifération rapide et des hypermutations somatiques (SHM) dans les gènes codant pour les régions variables des immunoglobulines de la chaîne lourde (IGHV) et de la chaîne légère (IGVL). Au fur et à mesure qu'ils traversent la zone claire, les lymphocytes B qui expriment les récepteurs des lymphocytes B les plus aptes pour la liaison de l'antigène sont sélectionnés et peuvent subir une commutation de classe de l'immunoglobuline. Les cellules leucémiques lymphoïdes chroniques (LLC) à IGHV non muté proviennent apparemment des lymphocytes B CD5+ avant le déroulement des SHM, tandis que les cellules LLC à IGHV muté proviennent très probablement des cellules B CD5+ qui ont traversé le centre germinatif et se sont différenciées dans celui-ci (Stevenson *et al.*, 2017).

2. Statut mutationnel IGHV

Les sites de liaison à l'antigène des immunoglobulines (Ig) résultent de la recombinaison des segments des gènes V, D, J pour les chaînes lourdes et des segments V et J pour les chaînes légères, processus qui peut être ultérieurement modifié dans le centre germinal par la mutation somatique. Au fil des années, une évaluation du degré des hypermutations somatiques des segments de gènes variables à chaîne lourde (IGHV) des Igs a été mise en place, émergeant comme l'un des marqueurs pronostiques les plus pertinents dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Sur la base du statut d'hypermutation somatique (SHM) dans la région variable du gène de la chaîne lourde Ig (IGHV), la LLC peut être classée en deux principaux types de maladie: la LLC non mutée (U-CLL) et la LLC mutée (M-CLL), la LLC avec IGHV non mutée, représentant environ 40 % de tous les cas, où les cellules LLC n'ont pas subi la réaction dans les centres germinatifs (GC), et la LLC avec IGHV mutée, représentant 60 % de tous les cas, où les cellules LLC ont subi cette réaction avec présence du processus d'hypermutation somatique (Sánchez Suárez *et al.*, 2023). Des études ont révélés une médiane de survie de 24 ans pour les patients présentant un statut IGVH muté, comparativement à seulement 8 ans pour ceux avec un statut non muté. De plus, le locus IGVH non muté est fréquemment associé à la résistance à la chimiothérapie et à la présence des anomalies chromosomiques défavorables telles que la délétion 11q, entraînant une maladie plus agressive (Crombie & Davids, 2017). Le répertoire CLL-Ig est caractérisé par la forte représentation de gènes codant pour l'IGHV, appelés IGHV1-69, IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-7 et IGHV4-34. Le gène IGHV1-69 est le plus souvent sélectionné dans le groupe U-LLC, tandis que les gènes IGHV3-21, IGHV3-23, IGHV3-7 et IGHV4-34 sont généralement associés à une charge mutationnelle élevée (Schmid & Hobeika, 2024).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

2.1. LLC mutée (M-CLL)

Les patients M-LLC présentent une similarité de séquence < 98 % de la séquence germinale de l'IGHV (Preetesh Jain *et al.*, 2018), et sont caractérisés par une progression plus lente de la maladie. Le statut IGVH muté est souvent lié à un stade A de Binet et à la présence de la délétion 13q, contribuant à une évolution plus favorable de la maladie, les cellules M-LLC sont sélectionnées et développées par liaison de forte affinité à des groupes restreints d'épitopes antigéniques rares dans l'organisme parce qu'ils sont sur des antigènes étrangers et parce qu'ils induisent l'état d'anergie due à la forte affinité de liaison au récepteur BCR (Burger & Chiorazzi, 2013). Le clone M-CLL reste globalement stable et se développe à un rythme plus lent dans lequel le BCR est mono-réactif. Un exemple de réactivité restreinte des BCR de la M-CLL est la liaison au b-(1,6)-glucane, un déterminant antigénique de levures (Burger & Chiorazzi, 2013). Des études ont démontré l'importance de la capacité de signalisation du BCR dans l'évolutivité de la LLC. La stimulation *in vitro* par exposition des cellules M-CLL à un anticorps anti-IgM montre que les cellules leucémiques mutées ne répondent pas ou très peu à la stimulation *in vitro* du BCR, montrant une faible activité métabolique, une réponse à l'apoptose non modifiée et associées dans la majorité des cas une maladie indolente (Deglesne *et al.*, 2006).

2.2. LLC non mutés (U-CLL)

Les patients U-LLC présentent une divergence de séquence < 2 % à la séquence germinale de l'IGHV (Chiorazzi, 2012) (Preetesh Jain *et al.*, 2018). Cette similitude est liée à une évolution clinique plus défavorable, caractérisée par une progression plus rapide de la maladie et une survie plus courte. La liaison du BCR peut se produire plus fréquemment chez les patients U-LLC, ce qui pourrait entraîner une augmentation de la capacité de signalisation du BCR, associée à une expression plus élevée de ZAP-70, expriment des BCR poly-réactifs de faible affinité, capables de reconnaître plusieurs antigènes poly-spécifiques de nature non protéique et divers facteurs environnementaux et auto-antigènes, tels que la vimentine, la myosine ou les facteurs rhumatoïdes présents dans le microenvironnement tissulaire (Burger & Chiorazzi, 2013; Hoogeboom *et al.*, 2013). L'affinité des cellules leucémiques pour l'antigène est associée à une activité métabolique accrue et une inhibition de l'apoptose spontanée, conduisant à l'activation des effecteurs du BCR et donc à l'augmentation de la survie cellulaire et la progression de la maladie (Deglesne *et al.*, 2006).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

3. Signalisation du récepteurs BCR dans les lymphocytes B normaux

Le BCR est une immunoglobuline présente à la surface du lymphocyte B qui joue un rôle de récepteur membranaire. La fixation de l'antigène sur le BCR va engendrer une cascade de phosphorylations et d'activation de molécules effectrices conduisant à l'activation des lymphocytes B. Le domaine de reconnaissance de l'antigène est couplé au CD79A et CD79B qui forment la queue cytoplasmique du BCR (Niemann & Wiestner, 2013).

L'initiation de la signalisation suppose une clusterisation de plusieurs molécules BCR provoquant à leur tour une activation de tyrosine kinases de la famille Src (proto-oncogène tyrosine-protein kinase). Par une cascade de phosphorylation successives de protéines associées au BCR, les protéines Syk (Spleen Tyrosine Kinase) et Btk « Bruton tyrosine kinase » vont pouvoir être recrutées. Elles vont permettre la formation autour du BCR d'un complexe appelé « signalosome » associant différentes protéines membranaires (CD19), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et phospholipase $\text{Cy}2$ ($\text{PLC}\gamma 2$), ce signalosome active plusieurs effecteurs secondaires. La $\text{PLC-}\gamma 2$ induit alors l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) de la membrane plasmique en diacylglycerol (DAG) et en inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3), qui induisent respectivement la libération de Ca^{2+} et activent la protéine kinase C, cette dernière induit par la suite l'activation des facteurs de transcription, y compris le nuclear factor- kB (NF- kB), nuclear factor of activated T cells (NFAT).

La $\text{PLC-}\gamma 2$ est également impliqué dans l'activation des voies de la protéine kinase activée par les mitogènes, y compris la kinase 1/2 régulée par le signal extracellulaire (ERK1/2), la modulation de plusieurs régulateurs en aval, interviennent finalement dans les changements dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Pierce & Liu, 2010).

Les régulateurs négatifs de la signalisation du signalosome BCR, tels que CD22, SHIP, CD5 sont essentiels pour contrôler la durée et l'intensité du signal BCR. Ces récepteurs contiennent des motifs d'inhibition à base de tyrosine immunorécepteur (ITIM), qui sont phosphorylés par LYN lors de la stimulation BCR. Cela conduit au recrutement de phosphatases inhibitrices, telles que la tyrosine phosphatase-1. Par conséquent, LYN régule à la fois positivement et négativement la transduction du signal via le BCR (voir la figure 8) (Stevenson *et al.*, 2011).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

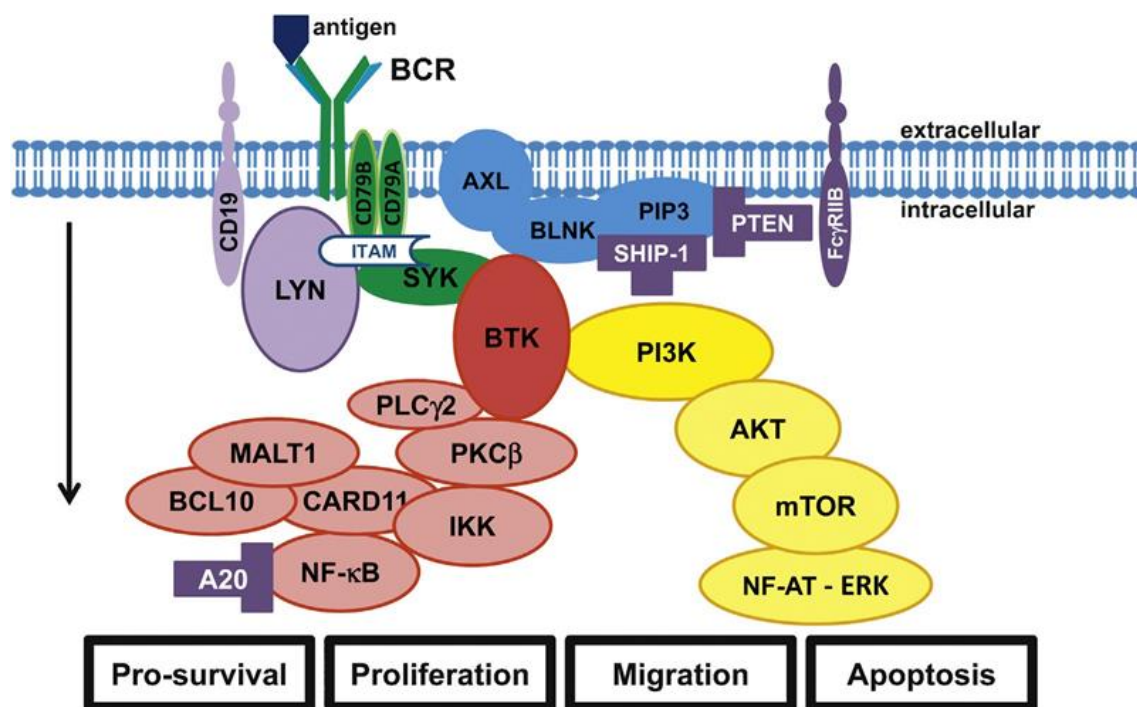


Figure 8 : Récepteur des lymphocytes B (BCR) et ses voies en aval.

La flèche indique la direction de la signalisation de la membrane plasmique vers les effecteurs. La liaison à l'antigène active la BCR, ce qui entraîne la phosphorylation des ITAM dans les domaines cytoplasmiques de CD79A et CD79B. SYK amplifie le signal initial par autophosphorylation et phosphorylation supplémentaire des ITAM (le complexe d'amplification initial est marqué en vert). LYN a une double fonction d'initiation et de terminaison de la signalisation BCR en fonction de l'interaction avec CD19 (molécules inhibitrices marquées en violet, molécules bifonctionnelles en violet clair). SYK active également PI3K de la voie (marqué en jaune). Le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) est phosphorylé par PI3K en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). PIP3, AXL et BLNK forment un centre de signalisation qui recrute la partie supérieure de la voie BCR vers la membrane plasmique. AKT et mTOR relaient l'activation PI3K en fonction des cibles en aval et de la régulation du cycle cellulaire. Le bras BTK de la voie (marqué en rouge) est initié par le recrutement de BTK vers le centre de signalisation de la membrane plasmique. PLC2 est activé en aval de BTK, conduisant à l'activation ultérieure de PKC. La PKC phosphoryle l'IKK pour activer les facteurs de transcription NF- κ B qui régulent l'expression génique de plusieurs facteurs de survie. Le complexe de CARD11, MALT1 et BCL10 est une partie importante de la voie d'activation de NF- κ B tandis que A20 est un régulateur négatif de NF- κ B. Les effecteurs en aval peuvent être modulés vers le bras NF-AT – ERK pro-apoptotique ou le bras NF- κ B pro-survie en fonction de l'équilibre des cascades de signalisation (Niemann & Wiestner, 2013).

4. Signalisation du BCR dans la LLC

4.1. La prolifération des cellules LLC est induite par le BCR

Dans le microenvironnement ganglionnaire, la signalisation BCR est activée dans les cellules LLC, ce qui entraîne une prolifération des cellules leucémiques. Parmi les preuves de cette prolifération, l'architecture pseudo-folliculaire et l'engagement des cellules LLC proliférantes avec les cellules T auxiliaires activées et spécifiquement avec les Tfh reflète

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

l'architecture cellulaire des follicules normaux des cellules B, des études de l'expression génique ont démontré que l'activation du BCR et du NF- κ B est exclusivement activée dans les cellules LLC isolées de ganglions lymphatiques, mais pas dans le sang ou les cellules LLC de la moelle osseuse. Enfin, l'inhibition de la signalisation BCR avec des inhibiteurs de kinases, tels que l'ibrutinib, entraîne une abrogation immédiate et presque complète de la prolifération des cellules LLC (Koehrer & Burger, 2024).

4.2. Signalisation dysfonctionnelle de BCR

La signalisation du récepteur de l'antigène des lymphocytes B (BCR) représente un aspect crucial dans la croissance et la survie des lymphocytes B, qu'ils soient normaux ou malins. Cette signalisation joue un rôle fondamental dans la pathogenèse de la LLC, comme en témoignent de multiples études (Schmid & Hobeika, 2024). Elle engendre l'activation de diverses kinases telles que LYN, SYK, BTK, et PI3K. Ces cascades de signalisation activées, notamment via ERK et NF- κ B. Ces composants fonctionnent comme des biomarqueurs plasmatiques lorsqu'ils ciblent des protéines telles que BTK ou PI3K. Des observations telles que la baisse de l'expression de CD79b et celle des immunoglobulines de surface suggèrent une stimulation antigénique dans la LLC, cela a suscité des recherches pour identifier les antigènes potentiels stimulateurs de la LLC, en particulier chez les patients présentant un BCR non-muté, car ces clones sont probablement sélectionnés par les antigènes (Koehrer & Burger, 2024). La signalisation du BCR est initiée par l'activation enzymatique des kinases de la famille Src (SFK) associées aux récepteurs, comme LYN. Les SFK activées stimulent la phosphorylation des motifs tyrosine d'activation (ITAM) des immuno-récepteurs situés dans la sous-unité de signalisation cytoplasmique Ig α /Ig β du BCR. LYN, en tant que régulateur clé de la voie de signalisation BCR, est surexprimé chez les patients atteints de LLC, et des niveaux élevés de la protéine LYN sont corrélés à une survie très courte en absence de traitement (Wang *et al.*, 2013). Par exemple, le déficit du gène LYN dans les macrophages réduit leur capacité à soutenir la survie des cellules LLC (Nguyen *et al.*, 2016). La tyrosine kinase SYK qui phosphoryle un grand nombre de tyrosines ITAM des BCR adjacents et engendre une boucle de rétroaction positive qui amplifie la transduction du signal BCR, elle est fortement exprimée dans les cellules LLC. Son inhibition induit l'apoptose des cellules malignes en bloquant l'activité de facteurs pro-survie tels que ERK. Les clones de LLC-U réagissent à divers antigènes, ce qui déclenche une signalisation BCR robuste. En revanche, la LLC-M présente une affinité plus sélective pour un nombre d'antigènes restreints, entraînant

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

une signalisation BCR moins active. Par conséquent, les clones de LLC-M évoluent à un rythme plus lent ou restent stables par rapport aux clones de LLC-U (Burger, 2020). Les LLC IGHV-UM tendent à exprimer des BCR de faible affinité, poly-réactifs et auto-réactifs capables de reconnaître plusieurs antigènes, qu'ils soient auto-antigènes ou d'origine microbienne. En revanche, les LLC IGHV-M expriment plus fréquemment des BCR oligo-réactifs ou monoréactifs, reconnaissant des antigènes protéiques spécifiques (Fabbri & Dalla-Favera, 2016). Le microenvironnement joue également un rôle essentiel dans la survie et la prolifération des lymphocytes B et donc dans le développement et la progression de la maladie. L'activation du BCR entraîne la down régulation de certains récepteurs de chimiokines sur les cellules de LLC, tel que CXCR4. Des inhibiteurs ciblant des protéines clés de la voie de signalisation BCR, tels que Syk, Btk et PI3K δ , ont montré des résultats prometteurs dans le traitement de la LLC en inhibant ces cascades de signalisation (Schmid & Hobeika, 2024) (Voir la figure9).

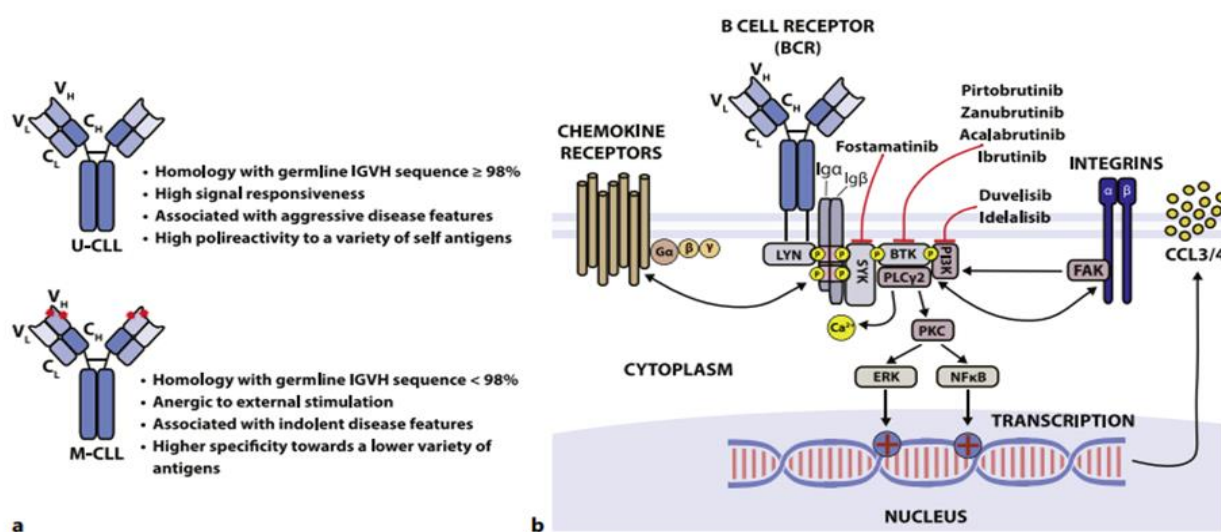


Figure 9: Statut mutationnel et signalisation BCR de la LLC.

a. Les patients atteints de LLC peuvent être distingués en fonction du statut mutationnel des séquences du gène IGHV avec la région variable des chaînes lourdes (VH) du BCR et classés en U-CLL ou M-CLL, ils diffèrent en termes de propriétés d'activation et d'affinité et de sélectivité antigéniques. b. L'engagement du BCR entraîne l'activation des kinases associées aux récepteurs LYN et SYK qui propagent le signal via BTK, PI3K et PLC γ 2. Cela se traduit finalement par l'activation d'ERK et de NF κ B et la modulation de leurs cibles transcriptionnelles. Les kinases associées à la BCR servent également de plaques tournantes importantes pour les signaux émanant de récepteurs autres que la BCR, tels que les récepteurs de l'intégrine et des chimiokines. SYK, PI3K et BTK sont des cibles pour les inhibiteurs de kinases à petites molécules, y compris l'inhibiteur de SYK, les inhibiteurs de la kinase BTK ibrutinib, acalabrutinib, et les inhibiteurs de PI3K idélalisib et duvelisib (Koehrer & Burger, 2024).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

4.3. BCR non-muté de la LLC

La découverte de séquences de la région variable de la chaîne lourde du BCR presque identiques chez des patients atteints de LLC a renforcé le concept d'antigènes communs à l'origine du développement et de la progression de la LLC. Les BCR non-mutés dans la LLC ont été décrits pour la première fois en 2003 où des cas des gènes BCR codées par l'allèle IGHV3-21 sont avérés porteurs de séquences d'acides aminés fortement identiques de la région variable de la chaîne lourde 3 (VH CDR3) et présentaient une utilisation très restreinte de l'allèle IGLV3-21. Peu de temps après, d'autres cas sont été identifiées dans la LLC-M et la LLC-U à l'aide d'autres gènes IGHV (Koehrer & Burger, 2024). Environ 30 % des patients atteints de LLC, principalement de type IGHV-UM, sont porteurs de BCR qui peuvent être classés dans les d'Ig non-mutés de BCR en fonction des similitudes structurelles de leurs régions CDR, qui sont presque identiques chez ~1 % des patients ; À ce jour, ~200 populations de différents BCR non-muté de LLC ont été identifiés, dont 19 représentant ~10 % de toutes les LLC (Fabbri & Dalla-Favera, 2016 ; Vardi *et al.*, 2014).

4.4. Signalisation tonique du BCR dans la LLC

La signalisation autonome et indépendante de l'antigène du récepteur BCR a été identifiée comme étant la base mécanistique de la signalisation BCR maligne dans la plupart des cas de LLC. Cette auto-activation constitue un facteur important dans la progression de la maladie, elle peut se produire lorsque deux récepteurs BCR s'engagent, et induit par la capacité des BCR à interagir avec leurs propres épitopes BCR définis, cette propriété est spécifiques à certains types de LLC (Iacovelli *et al.*, 2015). Chaque cas de LLC peut acquérir des BCR auto-réactifs spécifiques par le biais de processus de maturation de l'affinité distincts, y compris l'incorporation de mutations somatiques distinctes et la commutation de classe. Les patients atteints de LLC porteurs de l'allèle de la chaîne légère IGHV3-21*01 présentent un risque plus élevé de développer une LLC, cet allèle spécifique facilite l'acquisition de la mutation maligne G110R, qui favorise l'apparition d'une forte interaction BCR-BCR initiant ainsi une signalisation BCR dirigé contre le soi (Maity *et al.*, 2020). Cette signalisation autonome entraîne une augmentation du signal calcique basal (Ca²⁺) et une augmentation de l'activité des facteurs de signalisation en aval du BCR, tels que la BTK, la tyrosine kinase de la rate (SYK) et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Muggen *et al.*, 2015) (Schmid & Hobeika, 2024).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

5. ZAP-70

La tyrosine kinase ZAP-70 est une protéine tyrosine kinase (PTK) appartenant à la famille des protéines kinases Src. Cette kinase phosphoryle les motifs tyrosine de la chaîne zêta et du CD3 associé au récepteur TCR des lymphocytes T et intervient dans la transduction du signal. ZAP-70 phosphoryle aussi les récepteurs aux fragments Fc des IgG (CD16) exprimés sur les cellules NK. Cette protéine n'a pas été identifiée chez les lymphocytes B normaux du sang périphérique, ces cellules utilisent la kinase Syk pour la phosphorylation des substrats intracellulaires lors de l'activation cellulaire. Dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), une augmentation de l'expression de ZAP-70 est observée, corrélée à un pronostic plus sombre en termes de survie globale, il constitue un marqueur pronostique, les patients LLC peuvent être divisés en deux groupes en fonction de l'absence ou de la présence de l'expression de ZAP-70, ceux qui ont une LLC à ZAP-70 positif ou bien ZAP-70 négatif. Les patients atteints de LLC à ZAP-70 positif ont tendance à avoir un pronostic plus défavorable avec une progression plus rapide de la maladie et une survie globale plus courte par rapport à ceux avec une LLC à ZAP-70 négatif. Plusieurs méthodes, telles que la polymérase chaîne réaction (PCR), l'immunohistochimie et la cytométrie en flux, sont utilisées pour quantifier ZAP-70. La cytométrie en flux est avantageuse car elle permet d'évaluer séparément la présence de ZAP-70 sur les clones de LLC, les lymphocytes T et les cellules NK (Vroblova *et al.*, 2012).

La kinase ZAP-70 joue un rôle crucial dans la leucémie lymphoïde chronique à IGHV non mutée (LLC-U). Des recherches récentes suggèrent que ZAP-70 supprime largement la signalisation du BCR médiée par SYK et dirige plutôt cette signalisation vers l'activation de la voie de signalisation PI3K, facilitant ainsi l'échappement des clones lymphocytaires B anergique induit par NFAT de passer par la sélection négative qui conduirait normalement à l'élimination des lymphocytes B auto-réactifs ou pré-oncogènes, ce qui favorise la transformation maligne des lymphocytes B médiée par les BCR (Schmid & Hobeika, 2024). Des études ont montré que ZAP-70 peut augmenter la signalisation du récepteur BCR en agissant principalement comme une protéine adaptatrice, elle est associée à une phosphorylation d'autres composants de la voie de signalisation BCR, comme Syk et Toll-like, et à une activation des signaux de migration des cellules B de la LLC (Liu *et al.*, 2018). De plus, l'expression de ZAP-70 régule la transcription des facteurs régulant le recrutement et l'activation des lymphocytes T, tels que CCL3, CCL4, ces chimiokines stimulent le

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

recrutement des lymphocytes T dans les centres de prolifération, où elles fournissent un microenvironnement favorable et la survie cellulaire, les interactions avec le microenvironnement et la synthèse des protéines dans les cellules LLC, ce qui est susceptible de favoriser la progression de la maladie (Chen *et al.*, 2021).

6. Expression membranaire du CD38

CD38 est une glycoprotéine de 45 kDa et une ectoenzyme transmembranaire de type II de la famille des adénosines 59-diphosphate-ribosyl transférase, il est associé à un mauvais pronostic de la LLC, indépendamment du statut mutationnel du gène de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgVH), des niveaux d'expression élevés de CD38 sont associés à une migration cellulaire accrue, mais la base moléculaire de cette observation reste inconnue (Mele *et al.*, 2018). Le gène humain CD38, localisé sur le chromosome 4p15, est constitué de 8 exons, son premier exon code pour les parties cytoplasmique et transmembranaire ainsi qu'une partie du domaine extracellulaire de la protéine CD38, ce domaine est une enzyme qui convertit le nicotinamide adénine dinucléotide en adénosine 59-diphosphate-ribose (ADPR) et en ADP-ribose cyclique (cADPR), et le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate en acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate (NAADP). Ces produits peuvent induire une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et stimule la migration des cellules LLC avec ou sans stimulation par les chimiokines, ce qui augmente l'activité de la GTPase Rap1 de la famille Ras, qui est à son tour régulée par le facteur d'échange de guanine nucléotides à Rap1 sensible au Ca^{2+} , RasGRP2. Rap1 et RasGRP2 sont tous deux nécessaires à la migration des cellules LLC. Ces résultats indiquent que CD38 favorise l'adhésion et la migration des cellules LLC médiées par Ras GRP2/Rap1 en augmentant le niveau intracellulaire de Ca^{2+} .

Dans les cellules LLC, CD38 s'associe au complexe BCR pour la transduction du signal, comme dans les cellules B normales, il peut également s'intégrer dans le complexe d'intégrine CD49a/CD29, améliorant ainsi l'adhésion des cellules LLC aux cellules exprimant les ligands correspondants. De plus, il a été démontré que CD38 augmente le homing médié par CXCL12 via le CXCR4, il peut également augmenter l'expression de la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9), qui est impliquée dans la migration cellulaire en détruisant et en réorganisant la matrice extracellulaire. Ces observations soutiennent en outre le rôle de CD38 dans le trafic et la localisation de la LLC. Des études ont également montré des niveaux plus élevés de CD38 chez les cellules LLC se trouvant dans les centres de prolifération au niveau

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

des ganglions lymphatiques par rapport aux cellules localisées dans le sang périphérique. Cependant, cela pourrait simplement refléter un phénotype plus activé des cellules LLC dans ces centres en raison de l'interaction avec le microenvironnement tumoral. CD38 est considéré comme une cible thérapeutique potentielle chez les patients atteints de LLC, que ce soit par utilisation d'anticorps neutralisants ou d'inhibiteurs enzymatiques. Ou bien en utilisant des récepteurs antigéniques chimériques (CAR) (Voir la figure 10) (Burgler, 2015).

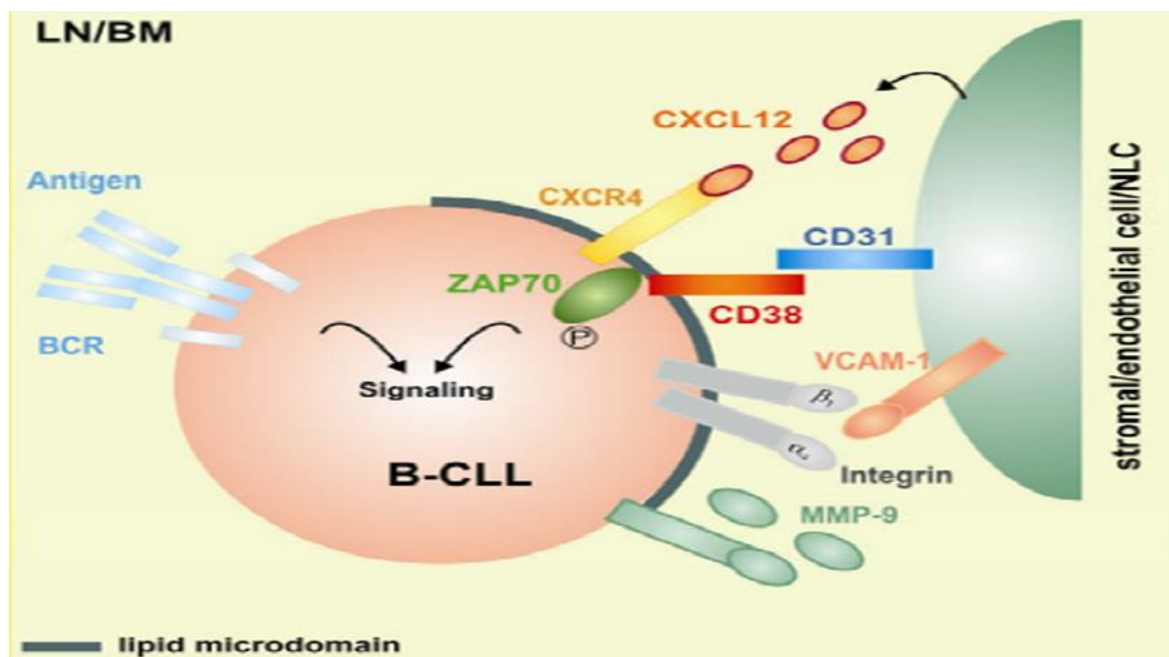


Figure 10: Influence du microenvironnement et des interactions des cellules LLC dans les organes lymphoïdes (GL/MO).

Selon ce modèle, CD38 est un élément central d'un grand complexe supramoléculaire qui comprend des récepteurs aux chimiokines, des molécules d'adhésion et des métalloprotéases matricielles, entre autres. Les tissus lymphoïdes permettent d'accéder aux ligands des différentes molécules, en activant ce circuit. Le résultat final est une propension accrue de la cellule leucémique à répondre aux signaux médiés par l'antigène (Deaglio *et al.*, 2011).

7. Défaut de la mort cellulaire programmée (apoptose) dans la LLC

7.1. Définition

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, essentiel pour le développement et le maintien de l'homéostasie des tissus et de l'immunité. La dérégulation du programme apoptotique est l'une des caractéristiques du cancer tel que la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Tantawy *et al.*, 2023).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

7.2. Les différents mécanismes du processus d'apoptose

Il existe deux types d'apoptose : La voie extrinsèque, elle est déclenchée par la liaison des récepteurs de mort cellulaire (TNF-R, Fas, DR4) par leurs ligands respectifs (TNF, Fas L, TRAIL) suivi de recrutement de molécules adaptatrices, qui activent la caspase-8 (Voir la figure11).

La voie intrinsèque intègre divers signaux intracellulaires au niveau de la membrane mitochondriale, elle est déclenchée par des facteurs de stress extérieurs, dont l'activation de Bax et Bak induit la formation de pores au niveau de la membrane mitochondriale externe et favorise la libération du cytochrome C dans le cytoplasme, ce dernier interagit avec l'adaptateur Apaf-1 qui permet d'activer la caspase-9, qui déclenche l'activation des caspases effectrices (Strasser *et al.*, 2011).

Ensuite il existe des protéines de la famille Bcl2 (Bcl2, Bcl-Xl) et des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP-1, X-IAP, survivine) qui sont présentes afin de réguler la cascade d'activation à différents niveaux (Packham & Stevenson, 2005).

De plus, plusieurs voies de signalisation sont connues pour interférer indirectement avec l'apoptose : la voie du facteur nucléaire-kappa B (NF-kB), lors de leur activation ils régulent positivement l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire en se lient aux régions promotrices de l'ADN, et active la transcription de protéines anti-apoptotiques (telles que Mcl-1, IAP, TRAF1, BCL2 et BCL2L1) ou de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT qui est une voie qui phosphoryle plusieurs cibles protéiques liées à l'apoptose (telles que Bad, BID) (Voir la figure 12) (Reed, 2003).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

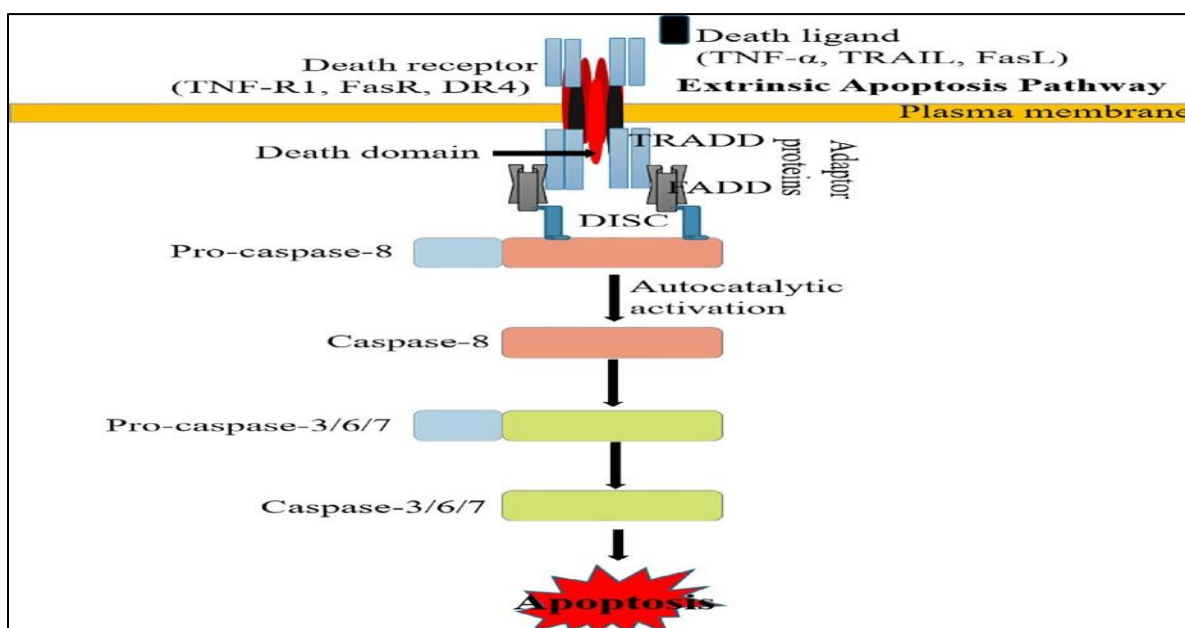


Figure 11: Schéma représentant la voie extrinsèque de l'apoptose.

Les ligands de l'apoptose (TNF- α , TRAIL et FasL) reconnaissent et se lient à leurs récepteurs spécifiques de la mort cellulaire (TNF-R1, FasR et DR4) conduisant au recrutement de protéines adaptatrices (FADD, TRADD) et former le complexe DISC du côté intracellulaire. Le complexe DISC formé induit l'autocatalyse de la pro-caspase-8 en caspase-8 active. Ensuite, la caspase-8 activée est clivée et active la caspase-3, cette dernière induit l'apoptose de la cellule cible (Kashyap *et al.*, 2021).

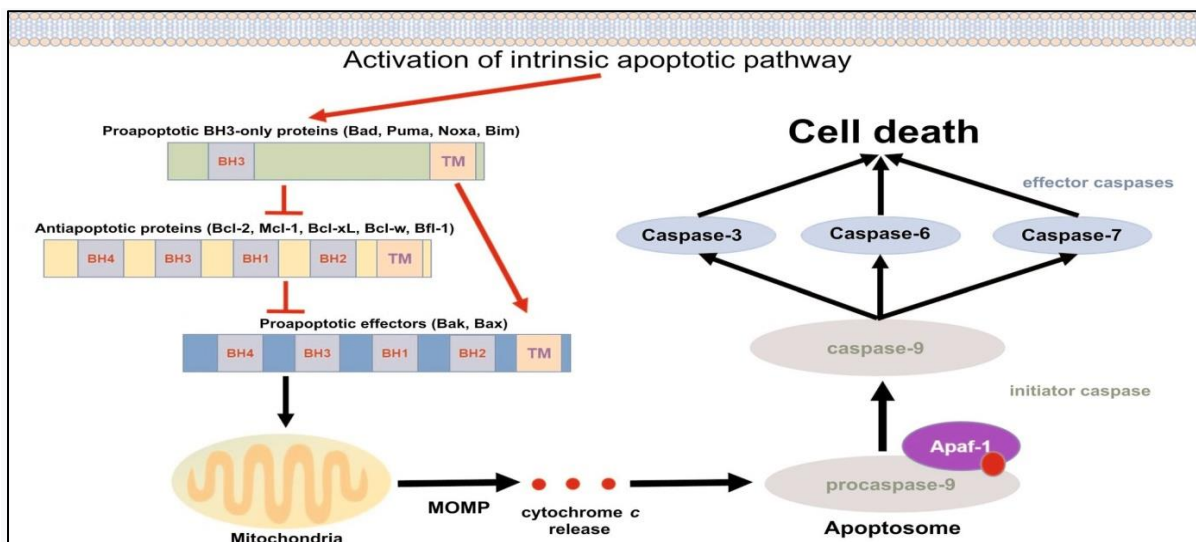


Figure 12: Schéma représentant l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose.

Différents stimuli (tel que, les dommages de l'ADN, la privation en facteurs de croissance ou les effets des médicaments chimiothérapeutiques) peuvent conduire à l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Les protéines proapoptotiques BH conduisent à la neutralisation des protéines anti-apoptotiques et/ou à l'activation directe des protéines effectrices pro-apoptotiques.

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

Les effecteurs, Bak et Bax, provoquent une perméabilisation de la membrane externe des mitochondries (MOMP) en raison de la formation de pores protéiques dans la membrane mitochondriale externe (OMM). La libération du cytochrome C de l'espace intermembranaire mitochondrial conduit à la formation de l'apoptosome qui est le complexe de l'activation de la caspase9 initiateur (procaspase-9), en présence de la protéine Apaf1 (cytosolique apoptosis protéase activating factor1) et d'ATP. La caspase9 induit l'activation supplémentaire de la cascade des caspases, ce qui aboutit finalement à l'activation des caspases effectrices et induction de la mort cellulaire (Senichkin *et al.*, 2020).

7.2.1. Protéines de la famille Bcl2

Les protéines de la famille Bcl-2 partagent un ou plusieurs des 4 domaines BH (Bcl2 Homology) caractéristiques (BH1, BH2, BH3 et BH4). Les protéines Bcl-2 peuvent être classées en protéines anti-apoptotiques (BCL-2, MCL-1, BCL-xL, BFL-1/ BCL-2A1, BCL-W, BCL-B), protéines pro-apoptotiques multidomaines (BAX, BAK, et BOK) et protéines proapoptotiques BH3-only (BIM, BID, BAD, BIK, PUMA, Noxa, HRK, et BMF) (Voir la figure 13) (Tantawy *et al.*, 2023). Les protéines BH3-only affichent une spécificité pour cibler leurs partenaires anti-apoptotiques. Alors que BIM, PUMA et BID agissent comme des agents de liaison généraux non sélectifs aux protéines anti-apoptotiques, BAD se lie spécifiquement à Bcl-2, BCL-xL et BCL-W. En revanche, Noxa se lie sélectivement à MCL-1 et BCL-2A1 (Carrington *et al.*, 2017).

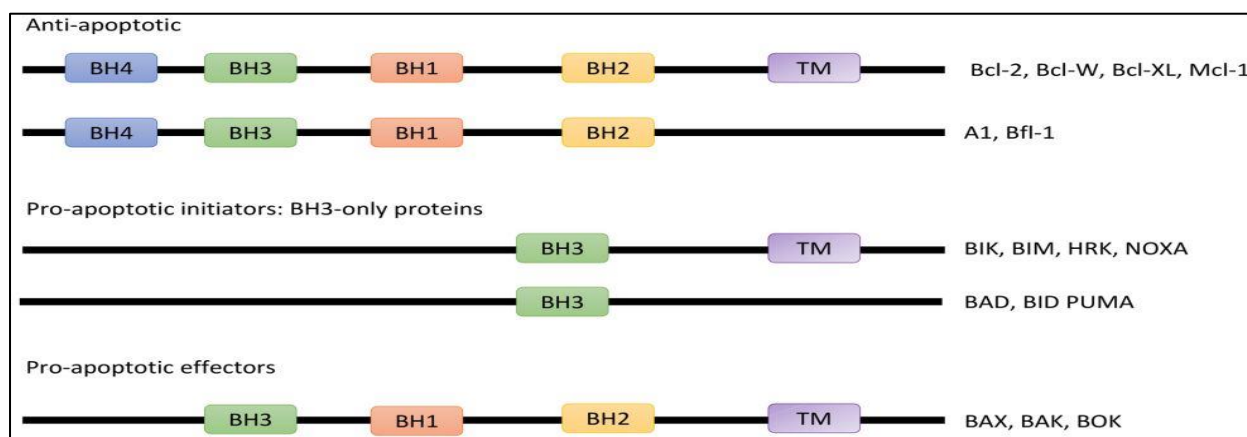


Figure 13: Représentation des protéines de la famille Bcl-2 classées en fonction de la morphologie et de l'homologie à Bcl-2.

Les protéines anti-apoptotiques possèdent quatre domaines d'homologie Bcl-2 (BH). Les protéines pro-apoptotiques contiennent trois à quatre domaines, tandis que les protéines BH3-only possèdent uniquement des domaines BH3 (Ploumaki *et al.*, 2023).

7.3. Cause de la défaillance de l'apoptose dans la LLC

Les cellules stromales de la moelle osseuse, les cellules Nurse-like et les lymphocytes T produisent des chimiokines et des cytokines qui activent les voies de survie telles que NF-kB

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

ou PI3K/AKT. En effet, ces voies sont activées dans les cellules LLC, ce qui conduit à la surexpression de protéines anti-apoptotiques dont plusieurs membres des familles Bcl-2 et IAP. D'autres voies de signalisation sont également impliquées dans la surexpression des protéines anti-apoptotiques dans les cellules LLC (Voir Figure 14) (Billard, 2014).

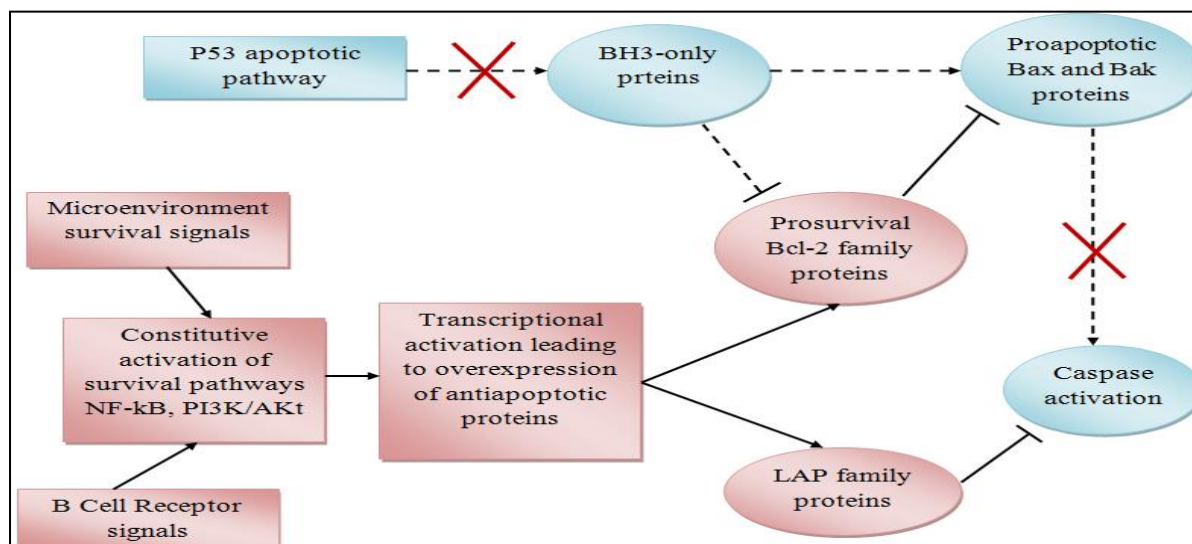


Figure 14: Représentation schématique de l'altération de l'apoptose dépendante des mitochondries dans les cellules LLC.

L'augmentation des facteurs anti-apoptotiques (colorés en rouge) et la diminution des composants pro-apoptotiques (colorés en bleu), résulte de l'activation constitutive des voies de survie provenant des signaux du microenvironnement et la signalisation des BCR, conduisant à une surexpression des facteurs de pro-survie des familles Bcl-2 et IAP qui séquestrent les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, empêchant ainsi la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'activation des caspases. De plus, les protéines IAP inhibent directement les activités des caspases. De plus, les déficiences de la protéine apoptotique p53, fréquemment observées dans la LLC, réduisent ainsi l'expression de protéines BH3-only telles que BID, Puma et Noxa, donc il y'aura augmentation de l'activité anti-apoptotique des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et inhibition de l'activation de Bax et Bak (Billard, 2014).

8. Microenvironnement tumoral de la LLC

Les cellules de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) interagissent avec des cellules des zones nodulaires appelées pseudo-follicules ou centres de prolifération, qui sont localisées dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglion lymphatique et la rate), ils fournissent un environnement propice à la survie et à la prolifération des cellules de LLC, ce qui contribue à la progression de la maladie (Koehrer & Burger, 2024). Dans ces pseudo-follicules, les cellules LLC interagissent avec des cellules non malignes, telles que les cellules stromales mésenchymateuse (MSC), les cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC), les cellules dendritiques folliculaires (FDC), les nurse-like cells (NLC), les cellules endothéliales et les

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

lymphocytes T (Fabbri & Dalla-Favera, 2016). Cependant, au sein de ces centres de proliférations, toutes les cellules de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) sont exposées à des chimiokines, des intégrines, des cytokines et des facteurs de survie (Stevenson *et al.*, 2017).

8.1. Les composants cellulaires du microenvironnement de la LLC

8.1.1. Les nurse-like cells (NLC)

Les "nurse-like cells" (NLC), sont des cellules myéloïdes qui se différencient lorsque les monocytes sanguins entrent en contact avec les cellules de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), et génèrent les NLC. Ils présentent des similitudes avec les macrophages associés aux tumeurs (TAM) de type M2, exprimant des marqueurs de surface comme CD163 et CD68, associés à des fonctions immunosuppressives (Niemann *et al.*, 2016). Elles jouent un rôle essentiel dans la protection des cellules leucémiques de l'apoptose en sécrétant diverses substances, dont les chimiokines CXCL12 et CXCL13, qui activent les récepteurs CXCR4 et CXCR5 sur les cellules LLC, elles produisent d'autres facteurs, tels que le B cell activating factor (BAFF) et A proliferation inducing ligand (APRIL), ainsi que des molécules comme CD31 et plexine-B1 qui contribuent à la survie des cellules leucémiques. Ils expriment également des antigènes tels que la vimentine et la calréticuline, qui peuvent directement activer la signalisation du BCR des cellules LLC. De plus, les NLC sécrètent des interleukines telles que l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10, favorisant ainsi la prolifération et/ou la survie des cellules LLC. Une interaction NLC-LLC induit à la production des chimiokines CCL3 et CCL4, qui attirent les cellules immunitaires favorables à la LLC, notamment les cellules T et les monocytes, dans le microenvironnement tissulaire (Koehrer & Burger, 2024).

8.1.2. Cellules stromales mésenchymateuses (MSC) et cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC)

Elles se trouvent principalement dans la moelle osseuse, où elles sont appelées les cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC) (Rodda *et al.*, 2015), elles sécrètent des chimiokine tel que le stromal cell-derived factor 1 (SDF-1), également connu sous le nom de CXCL12, qui a un rôle d'attraction des cellules de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) via son récepteur CXCR4 et assure la survie des cellules LLC contre l'apoptose spontanée ou induite par la chimiothérapie (Koehrer & Burger, 2024). Les interactions entre les cellules de

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

la leucémie lymphoïde chronique (LLC), les cellules stromales de la moelle osseuse (BMSC) et d'autres cellules du microenvironnement tissulaire dépendent en grande partie des molécules d'adhésion. Par exemple, les intégrines VLA-4 présentes sur les cellules de la LLC peuvent se lier à des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 ou la vimentine, présentes sur les BMSC et dans le microenvironnement tissulaire. Cette interaction active les cellules de la LLC, les protégeant de l'apoptose en régulant positivement l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-X L (Härzschel *et al.*, 2020).

8.1.3. Les lymphocytes T

Chez les patients atteints de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) il y'a une augmentation des populations des lymphocytes T dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques principalement des cellules auxiliaires CD4+, avec une augmentation dans le sang périphérique des populations de lymphocytes T régulateurs (Tregs), ainsi que des lymphocytes T sécrétant de l'interleukine 17 (Th17) et des cellules T auxiliaires folliculaires (Tfh) (Roessner & Seiffert, 2020). Les lymphocytes T chez les patients atteints de la LLC expriment des niveaux élevés de protéines associées au déclin de la réponse immune, telles que PD-1, CTLA-4 et PD-L1, ce qui contribue à compromettre l'immunosurveillance par les cellules T dans la LLC (Koehrer & Burger, 2024).

8.1.4. Les cellules dendritiques folliculaires (FDC)

Ils sont des composants importants des follicules lymphoïdes où elles présentent des antigènes aux cellules B sélectionnées, leur rôle dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) reste mal défini (Tandon *et al.*, 2015), mais des études *in vitro* ont montré que la lignée cellulaire FDC peut protéger les cellules LLC de l'apoptose (Pedersen *et al.*, 2002). De plus, dans le modèle murin Eμ-TCL1 (qui est un modèle de souris génétiquement modifié pour exprimer la protéine TCL1 associé au développement de la LLC chez l'Homme), les cellules leucémiques exprimant CXCR5 migrent vers les FDC sécrétant une protéine CXCL13 pour accéder au microenvironnement folliculaire favorisant la croissance des cellules LLC. En retour, la sécrétion de lymphotoxine alpha bêta (LTαβ) par les cellules LLC permet la production de CXCL13 par les FDC c'est ce qu'on appelle un cercle de rétroaction positif (Heinig *et al.*, 2014) (Voir la figure15).

[illegible]

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

9. Prolifération des LB dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Les cellules de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), autrefois considérées comme peu actives en phase G0/G1 du cycle cellulaire avec un dysfonctionnement des processus apoptotiques, ont été découvertes comme étant prolifératives dans les ganglions lymphatiques des patients atteints de LLC, formant des structures histologiques appelées pseudo-follicules. Des études ont révélé qu'une petite fraction de ces LB-LLC était en fait en état de prolifération. Ces cellules en prolifération sur-expriment des facteurs de croissance tels que ZAP-70, Ki67 et la télomérase à activité accrue (Mohr, 2016), ce qui raccourcit les télomères par rapport aux LB normaux, suggérant des divisions cellulaires répétées (Rampazzo *et al.*, 2012; Sellmann *et al.*, 2011; Véronèse *et al.*, 2013). Une sous population spécifique de LB-LCC appelées CD5^{high}CXCR4^{low}, a été identifiée comme ayant le plus fort potentiel de prolifération. Ces cellules se caractérisent par une faible expression de CXCR4 et une forte expression de CD5 (Calissano *et al.*, 2011). Elles expriment des gènes favorisant la prolifération et l'activation cellulaire, tandis que les cellules CD5^{low} CXCR4^{high}, considérées comme quiescentes, expriment des gènes liés à l'apoptose et à la migration vers les ganglions lymphatiques pour se proliférer, puis, lors de la diminution de l'expression de CXCR4, ces cellules sont libérées dans la circulation sanguine (Talbot, 2018) comme illustré sur la figure 16.

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

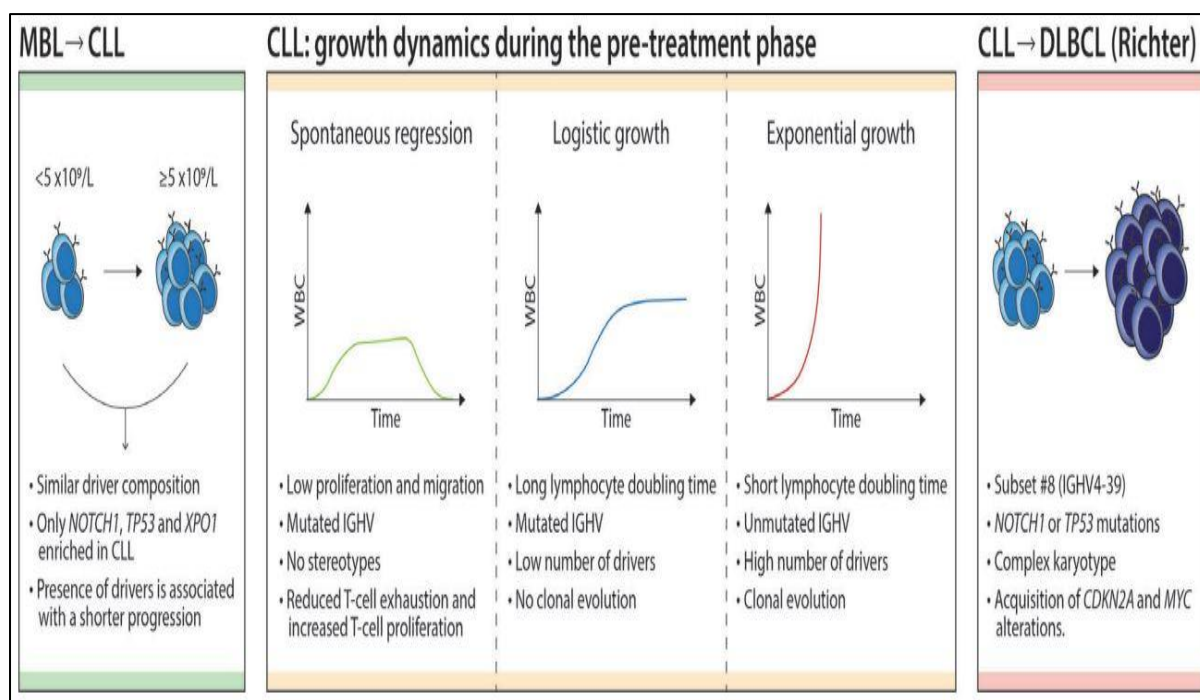


Figure 16 : Étapes évolutives et dynamique de croissance de la leucémie lymphoïde chronique.

(À gauche) La progression de la lymphocytose monoclonale B (MBL) à la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est un processus linéaire discriminé par le nombre total de lymphocytes. La présence d'altérations génétiques déterminantes est associée à une progression rapide. Bien que quelques altérations soient enrichies dans la LLC par rapport à la MBL, les deux phases partagent une composition génétique similaire. (Au milieu) Les principales dynamiques de croissance pendant la phase prétraitement de la LLC sont présentées, notamment la régression spontanée, la croissance logistique et la croissance exponentielle. Les principales caractéristiques associées à chaque modèle sont spécifiées. WBC ; nombre total de globules blancs périphériques. (À droite) La transformation de Richter en lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL) est associée au sous-type IGHV4-39, aux mutations de *NOTCH1* ou *TP53* et au caryotype complexe. Elle suit une évolution linéaire à partir du clone de la LLC à travers l'acquisition récurrente d'altérations de *CDKN2A* et *MYC* (Delgado *et al.*, 2020).

10. Génétique de la LLC

10.1. Anomalies génétiques de la LLC

De nombreuses mutations semblent affecter des gènes appartenant à un certain nombre de voies, observés différemment dans les deux sous-types moléculaires de la LLC définis par le statut mutationnel de l'IGHV (U-LLC et M-LLC). Ainsi, les gènes appartenant à la réponse aux dommages de l'ADN et au contrôle du cycle cellulaire (*TP53* , *ATM* , *BIRC3*), à l'épissage, au traitement et au transport de l'ARNm (*SF3B1* , *XPO1*) et à la signalisation NOTCH (*NOTCH1* , *FBXW7*) se trouvent être plus fréquemment muté dans les cas U-CLL ; au contraire, les lésions génétiques des gènes participant à la réponse inflammatoire innée

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

(MYD88) semblent être plus spécifiques du sous-type M-CLL (Rodríguez *et al.*, 2015) (Voir la figure17).

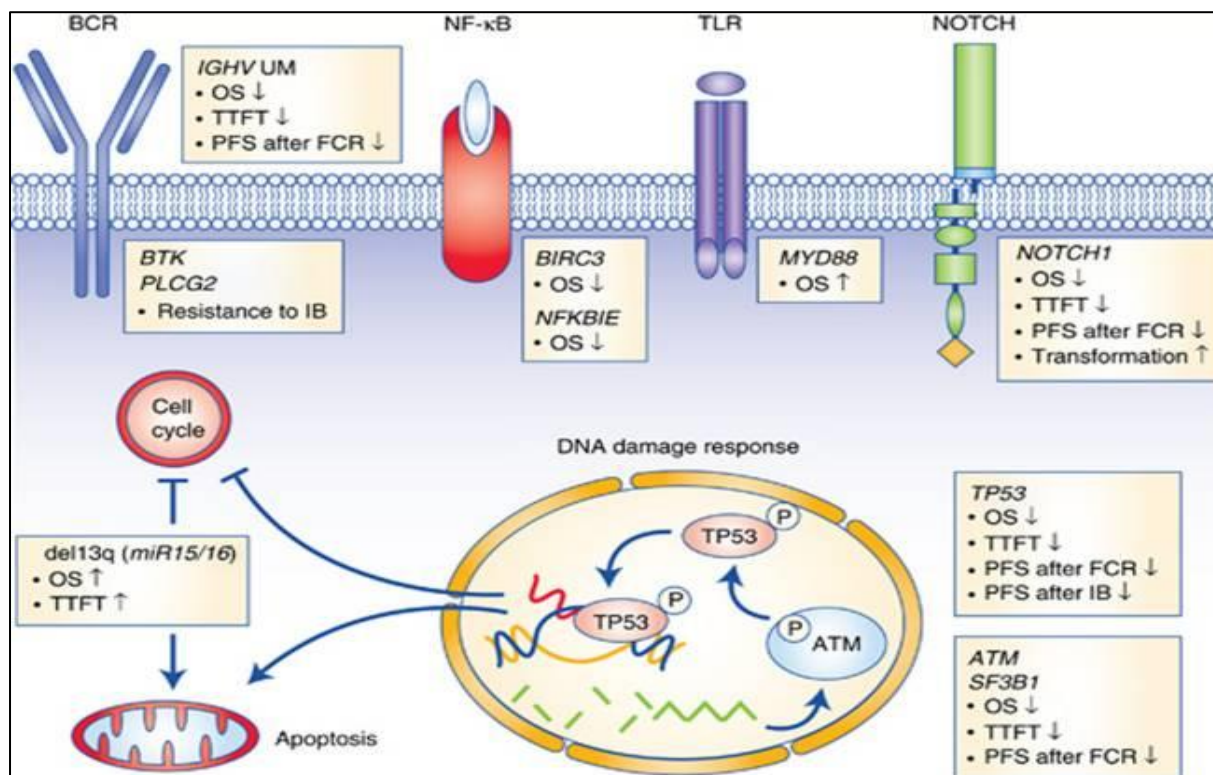


Figure 17: Gènes et voies de signalisation mutés dans la LLC.

Les programmes cellulaires concernés par les lésions moléculaires les plus récurrentes sont représentés. Les encadrés montrent les gènes mutés de manière récurrente dans chaque programme cellulaire et les implications cliniques des mutations génétiques. Les flèches indiquent l'impact pronostique positif ou négatif de ces lésions génétiques (Rossi & Gaidano, 2016).

10.1.1. Mutations de Notch1

Le récepteur NOTCH1 est un hétérodimère transmembranaire composé de plusieurs domaines fonctionnels. Il comprend le domaine extracellulaire (NECD) qui lie le ligand, la région régulatrice négative (NRR) qui contrôle l'activation des récepteurs, et le domaine intracellulaire (NICD) qui exerce des fonctions de régulation de la transcription. Le NECD est principalement constitué de 36 domaines de type facteur de croissance épidermique (EGF) responsables de la liaison au ligand. Le NICD contient un domaine d'activation transcriptionnelle (TAD), et un domaine glutamate, sérine et thréonine (PEST) qui régule la stabilité et la dégradation du NICD (Pozzo *et al.*, 2022). NOTCH1 est traité par protéolyse pour générer le domaine intracellulaire nucléaire à activité transcriptionnelle de NOTCH1 (ICN1), qui trans-active les gènes impliqués dans la prolifération, le métabolisme et la survie,

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

y compris l'activation du proto-oncogène MYC, il est apparu comme le gène le plus fréquemment muté dans la LLC au moment du diagnostic, et sa fréquence augmente avec la progression de la maladie. Les LLC mutées par NOTCH1 ont une diminution de l'expression de surface de CD20, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi ces patients ne profitent pas des thérapies à base d'anti-CD20 (Bosch & Dalla-Favera, 2019). Cette mutation, représentant environ 80 % des cas, consiste en une délétion de décalage de cadre de lecture de 2 pb (CT) localisée dans l'exon 34 qui génère un codon stop prématuré provoquant des troncatures du domaine PEST C-terminal [proline (P), glutamate (E), sérine (S) et thréonine (T)], empêchant ainsi la dégradation dans le protéasome de l'ICN1 par la boîte F de l'ubiquitine ligase et la répétition WD contenant la protéine 7 (FBXW7) (Bosch & Dalla-Favera, 2019), l'élimination de ce domaine altère la dégradation de NOTCH1, ce qui permet l'accumulation de la forme active de NOTCH1 (Zhang & Kipps, 2014), et conduit à une stabilité accrue de ce récepteur et prolonge de manière aberrante son activation, indiquant que des mutations peuvent contribuer à améliorer la signalisation NOTCH1 dans la LLC (Rosati *et al.*, 2018) (Voir la figure18).

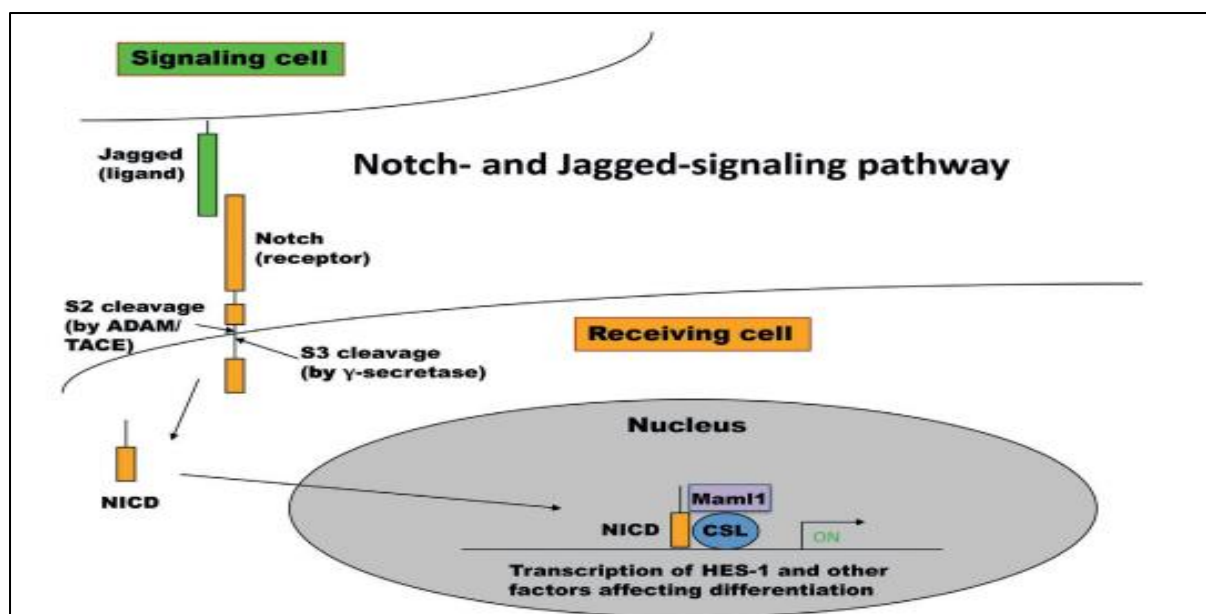


Figure 18 : Schéma représentant la voie de Signalisation de NOTCH.

La signalisation Notch est activée par l'interaction des ligands liés avec des récepteurs Notch sur la membrane. Cette interaction déclenche le clivage séquentiel de Notch par une désintégrine et métalloprotéinase (ADAM)/enzyme de conversion du TNF- α (TACE) et de la γ -sécrétase, entraînant la libération du domaine intracellulaire Notch (NICD), qui se transloque vers le noyau. Dans le noyau, le NICD interagit avec le facteur de transcription CBF1/Su (H)/Lag-1 (CSL) et, avec son coactivateur, mastermind-like 1 (Maml1), active l'activateur de split-1 (Hes-1) et d'autres cibles de la voie Notch (Nejak-Bowen & Monga, 2015).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.1.2. Mutations de TP-53

TP53 est un gène qui code pour la protéine suppressive de tumeur p53, qui a de nombreuses activités cellulaires, notamment la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose, la promotion de la réparation de l'ADN en réponse à des signaux de stress cellulaire tels que les dommages à l'ADN.

Après des dommages à l'ADN, p53 déclenche soit l'apoptose, soit l'arrêt du cycle cellulaire G1 jusqu'à ce que la cellule ait terminé les processus de réparation de l'ADN, empêchant ainsi la réplication d'anomalies génétiques potentiellement dangereuses. TP53 est situé sur la bande 13 du bras court du chromosome 17 (17p13.1), les délétions de ce dernier (del(17p)) entraînant la perte du gène TP53, qui code pour la protéine p53. De plus, les mutations de TP53 sont également associées à un mauvais pronostic par des mutations génétiques indépendamment de la présence de del(17p), y compris des mutations faux-sens, des insertions ou des délétions, des mutations non-sens ou des mutations du site d'épissage. Six codons « hotspots » en particulier (codons 175, 245, 248, 249, 273 et 282) sont touchés à une fréquence élevée (Voir la figure19).

Ceci est conforme à un profil mutationnel TP53 spécifique à la maladie de la LLC, ces mutations peuvent être trouvées dans la LLC mutée et non mutée, mais sont généralement associées à la LLC non mutée. Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans TP53 sont des mutations faux-sens dans la région codante de TP53, qui conduisent à un changement d'acide aminé dans la protéine p53, elles représentent environ 75% des mutations de TP53 identifiées. Le rôle pronostique défavorable des mutations de TP53 et de la délétion 17p a été de plus en plus reconnu et formellement incorporé dans les systèmes de classification et les lignes directrices thérapeutiques (Buccheri *et al.*, 2018), ces aberrations font partie des marqueurs pronostiques et prédictifs les plus puissants guidant les décisions de traitement de la LLC et sont associées à une diminution marquée de la survie et à une altération de la réponse à la chimio-immunothérapie.

A présent, les seuls traitements efficaces sont l'alemtuzumab et la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (Campo *et al.*, 2018).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

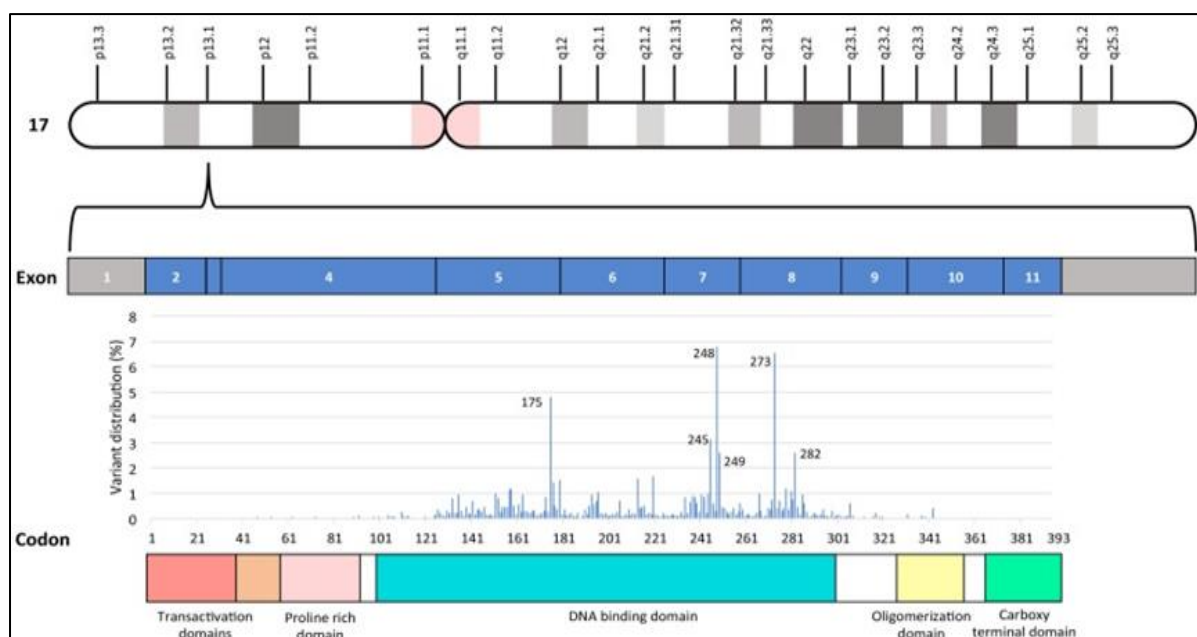


Figure 19: Organisation du gène TP53 et répartition des mutations par codon observées dans la LLC.

Le gène TP53 est situé sur le locus p13.1 du bras court du chromosome 17 et comprend 11 séquences exons qui codent pour la protéine p53. Alors que la majorité des mutations génétiques se regroupent dans le domaine de liaison à l'ADN (codons 100 à 300, exons 4 à 8), des mutations génétiques ont été détectées dans presque tous les codons. Le séquençage doit donc couvrir au minimum le domaine de liaison à l'ADN et le domaine d'oligomérisation (exons 4 à 10), mais le séquençage de l'ensemble de la région codante (exons 2 à 11) est fortement recommandé (Campo *et al.*, 2018).

10.1.3. Mutations de SF3B1

SF3B1 (facteur d'épissage 3B sous-unité 1) est un composant essentiel de la machinerie d'épissage, qui catalyse l'élimination des introns de l'ARN messager précurseur (ARNm). La mutation SF3B1 est associée à une progression rapide et à une survie plus courte de la LLC, ce qui peut être utilisé comme marqueur pronostique pour améliorer la prédiction de la progression de la maladie. La découverte d'une fréquence élevée de mutations de SF3B1 dans la LLC a mis en évidence l'implication de la voie de la maturation des ARNm par élimination des introns présents sur les ARN messagers précurseurs [pré-ARNm] dans la survenue de la LLC. L'épissage est catalysé par le spliceosome, qui consiste en un ensemble de petites particules de ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP), à savoir U1, U2, U4, U5 et U6, ainsi que de nombreux facteurs d'épissage. SF3B1 est un composant essentiel du snRNP U2. La grande majorité des mutations de SF3B1 sont localisées sur le domaine C-terminal hautement conservé, qui comprend 22 répétitions du facteur d'élongation Huntington 3 (HEAT), la plupart des mutations ont été détectées entre la cinquième et la huitième répétitions HEAT (codées par les exons 14 à 16) (Voir la figure 20) (Wan & Wu, 2013).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

Elle sont généralement représentées par des modifications nucléotidiques faux-sens qui ciblent de manière récurrente les points chauds conservés au cours de l'évolution et localisés sur les domaines HEAT (codons 662, 666, 700, 704, 742), avec une seule substitution d'acide aminé (K700E) représentant environ 50 % de toutes les mutations de SF3B1 (Rossi & Gaidano, 2016). Les mutations SF3B1 surviennent avec une prévalence allant de 7 à 10 % des LLC non sélectionnées, sont enrichies dans les cas hébergeant des gènes IGHV non mutés et ont tendance à coexister avec une délétion ou une mutation ATM. Bien que les aspects mécanistiques précis des mutations de SF3B1 soient encore non-élucidés, l'observation que SF3B1 régule le programme d'épissage alternatif des gènes contrôlant la progression du cycle cellulaire et l'apoptose indique une contribution potentielle des mutations de SF3B1 dans la modulation de la prolifération et de la survie des cellules tumorales. La présence de mutations SF3B1 au moment du diagnostic de la LLC identifie un groupe de patients présentant une maladie à risque intermédiaire (40 % des cas sont en vie à 10 ans, ce qui représente une réduction d'environ 50 % de l'espérance de vie attendue) (Rossi *et al.*, 2013).

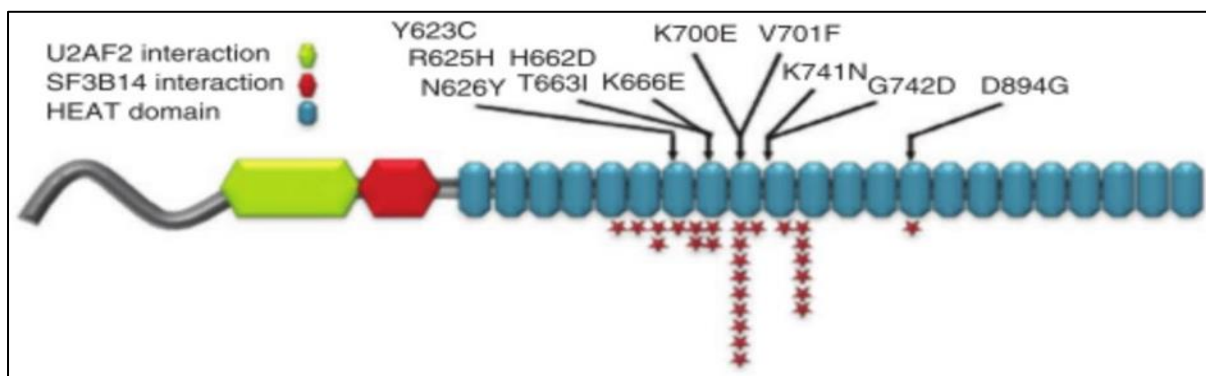


Figure 20 : Mutations affectant le gène SF3B1 dans la LLC.

Représentation schématique de la structure primaire de la protéine SF3B1 humaine, Les localisations des différentes altérations somatiques en haut, les étoiles en bas représentent la fréquence des différentes mutations observées dans l'étude (Quesada *et al.*, 2011).

10.1.4. Mutations de BIRC3

BIRC3 (Baculoviral IAP Repeat Containing 3) est une protéine qui joue un rôle important dans l'épissage de l'ARN, elle induit la dégradation protéasomale de MAP3K14, qui est le principal moteur de l'activation du facteur nucléaire NFκB, c'est un régulateur négatif de la signalisation non canonique de ce dernier, elle est située sur le chromosome 11q22 à proximité de ATM et les délétions 11q incluent le locus BIRC3 dans environ 80 % des cas. À l'état de repos, BIRC3 et son homologue BIRC2, qui partagent certaines fonctions

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

redondantes, servent d'ubiquitine ligase et ciblent NIK pour la dégradation via le protéasome, inhibant ainsi la signalisation NF- κ B. L'induction de la cascade de signalisation non canonique NF- κ B conduit à l'auto-ubiquitination de BIRC2/3 suivie d'une dégradation protéasomale et d'une stabilisation NIK ultérieure. Les complexes Rel-B/p52 nouvellement formés sont transportés vers le noyau et activent les promoteurs non canoniques du gène cible NF- κ B. Des mutations induisant la perte de fonction de BIRC3 ont été identifiées chez 2 à 4 % des patients atteints de LLC dans un stade précoce par séquençage de nouvelle génération et les points chauds de mutation ont été cartographiés sur le domaine de l'ubiquitine ligase (Landau *et al.*, 2015). La perturbation de ce domaine conduit à l'augmentation de la signalisation NF- κ B dans la LLC mutée par BIRC3, une activation indépendante du ligand de la voie constitutive de NF κ B, induisant la prolifération et la survie cellulaire. MAP3K14 pourrait donc être une cible médicamenteuse potentielle pour vaincre la prolifération cellulaire induite par mutation de BIRC3 (Asslaber *et al.*, 2019).

10.1.5. Mutations de ATM

ATM (Ataxie-télangiectasie mutée) est un gène qui code pour une sérine/thréonine kinase nucléaire, il protège l'intégrité du génome en régulant l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G1/S et G2/M pour empêcher le traitement de l'ADN endommagé, et en activant les voies de réparation de l'ADN ou, alternativement, en induisant l'apoptose si les dommages à l'ADN ne peuvent pas être réparés. Comme pour TP53, le gène ATM est inactivé dans la LLC par des mutations de délétion et/ou somatiques, ce qui entraîne une altération des réponses aux dommages de l'ADN. La délétion de 11q22-q23 inclut toujours l'ATM et se produit dans <10 % des LLC nouvellement diagnostiquées, alors que sa prévalence s'élève à ~20 % au moment du premier traitement. Les mutations d'ATM consistent généralement en un mélange de substitutions faux-sens réparties sur la séquence codante de l'ATM, sans points chauds clairs. D'un point de vue clinique, la présence d'une délétion ATM au moment de la présentation de la LLC permet d'identifier un groupe de patients atteints d'une maladie à risque intermédiaire (~40 % des cas sont vivants à 10 ans, ce qui représente une réduction de ~50 % de la survie attendue par rapport à la population générale) (Rossi & Gaidano, 2016; Skowronska *et al.*, 2012).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.1.6. Mutations de MYD88

Le gène MYD88 (Myeloid Differentiation Primary Response 88) est situé sur le chromosome 3p22.2 et code pour une protéine adaptatrice essentielle aux récepteurs Toll-like (TLR), et qui code aussi pour une protéine qui recrute la kinase IRAK4 (interleukin 1 receptor-associated kinase 4), le complexe MYD88: IRAK4 recrute le substrat IRAK4 IRAK2 ou l'IRAK1, formant des médiateurs de signalisation critiques de la superfamille des récepteurs de type TLR/récepteur de l'interleukine-1 (IL-1R). Cette molécule adaptatrice induit la sécrétion de niveaux 5 à 150 fois plus élevés d'antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1, d'interleukine-6 et de ligands 2, 3 et 4 de la chimiokine (motif CC), ce qui a été observé chez 3 à 8 % des patients atteints de LLC. La mutation L265P de MYD88, cette mutation a été identifiée exclusivement dans la LLC avec IGHV muté, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle le gène est un nouveau proto-oncogène (Puente et al., 2011), elle est impliquée dans l'assemblage spontané des complexes mydosomes, ce qui conduit à l'activation de la signalisation NF- κ B, à l'activation de la kinase JAK de STAT3 et à la sécrétion de cytokines (Shuai *et al.*, 2020).

10.1.7. Mutations de XPO1

Le gène XPO1 (exportine) est une caryophérine qui exporte des protéines et des fragments d'ARN du noyau vers le cytoplasme. On pense que le gène XPO1 humain, situé sur le chromosome 2 (2p15), code pour une protéine oncogène puisque de nombreuses molécules exportées par XPO1 dans le cytoplasme sont associées soit à des gènes suppresseurs de tumeurs connus tel que TP53, soit à des facteurs de transcription qui contribuent à la prolifération et à la survie cellulaires tel que STAT3 dont l'accumulation dans le noyau entraîne la mort cellulaire. Une surexpression, une dérégulation ou un dysfonctionnement de XPO1 ont été rapportés dans la LLC ce qui fait d'elle une cible thérapeutique. Le suivi des mutations par séquençage de nouvelle génération (NGS) chez des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) ont démontré que XPO1 est muté de manière récurrente chez <5 % des patients atteints de LLC. Les mutations XPO1 sont fréquemment observées chez les patients présentant un IGHV non muté (79 %), un stade Rai précoce (73 %), une surexpression de CD38, une positivité ZAP-70 et un del(13q). Peu de patients présentaient des mutations TP53 co-existantes (Jain *et al.*, 2016).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.2. Anomalies cytogénétiques (chromosomiques) (AC)

Depuis les années 1970, de nombreuses anomalies chromosomiques (AC) (principalement des gains et des pertes) ont été identifiées grâce à diverses techniques telles que FISH Fluorescent *in situ* Hybridization, l'analyse de bande chromosomiques (CBA), l'hybridation par génomique comparative CGH (Nguyen-Khac *et al.*, 2023), l'analyse microsatellite pour détecter la perte d'hétérozygotie et séquençage de Sanger (Puiggros *et al.*, 2014). Parmi les anomalies chromosomiques les plus récurrentes : les délétions de 13q, 11q, 17p et la trisomie 12 (Baliakas *et al.*, 2014).

10.2.1. Délétion 13q14

La suppression de la région 13q14, est la plus fréquente des anomalies cytogénétiques détectées par la technique d'hybridation *in situ* FISH chez les patients atteints de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Elle a généralement été associée à un pronostic favorable, dans le cas de la del(13q), la région minimale de délétion (MDR) est localisée en 13q14, comprend les miR-15a, miR-16-1, et le gène DLEU7 qui sont considérés comme ayant un rôle de suppresseurs de tumeur dans la LLC (Klein *et al.*, 2010). De plus, des pertes plus importantes de 13q, notamment impliquant le gène RB1 (désignées comme délétions de type I), sont associées à des délais d'attente avant le premier traitement (TTFT) et une survie globale plus courte que les petites délétions englobant uniquement miR-15a et miR16-1 (désignées comme type II), ces dernières sont associées à des résultats cliniques relativement meilleurs. Donc la taille et la composition spécifique des délétions dans la région 13q peuvent avoir un impact sur le pronostic et les résultats cliniques des patients atteints de LLC (Puiggros *et al.*, 2014). Il existe des délétions bialléliques en 13q dans la LLC qui sont généralement petites et n'impliquant pas le gène RB1 (Puiggros *et al.*, 2014), certains pensent que ces pertes rendre la maladie plus agressive (Orlandi *et al.*, 2013), mais d'autres études n'ont pas montré de différences claires (Puiggros *et al.*, 2014; Puiggros *et al.*, 2013), de plus, la région du gène 13q peut être désactivée de différentes manières, tels que des modifications épigénétique (méthylation de l'ADN ou désacétylation des histones), ce qui rend difficile de déterminer l'impact précis des pertes bialléliques (Sampath *et al.*, 2012).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.2.2. Délétion 11q23

La suppression du bras long du chromosome 11 (del(11q)) est la seconde anomalie chromosomique fréquemment observée chez les patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC), où il est rare de trouver des délétions homozygotes de 11q, elle couvre une région supérieure à 20 mégaoctets (Mo) et impliquant la perte de plus d'une centaine de gènes chez la plupart des patients (Nguyen-Khac *et al.*, 2023). La MDR se situe entre les bandes chromosomiques 11q22.3 et 11q23.1, elle contient plusieurs gènes importants, tel que, ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) qui code pour une kinase jouant un rôle central dans la signalisation de la réparation des dommages à l'ADN, sa mutation entraîne un défaut dans cette signalisation, conférant aux cellules une résistance à l'apoptose (Cosson, 2015), et les gènes RDX, FRDX1, RAB39, CUL5, ACAT, NPAT, KDELC2, EXPH2, MRE11, H2AX et BIRC3. Les patients présentant des del(11q) peuvent être classés en deux groupes principaux : les cas de délétion classique ou importante, qui sont plus fréquents, et les cas de délétion atypique ou petite, qui sont moins fréquentes et sont souvent associés à des mutations dans le gène ATM (Marasca *et al.*, 2013). La présence de del(11q) est généralement associée à des pronostics moins favorables, tels qu'un délai d'attente avant le premier traitement (TTFT) court, et une survie globale (SG) plus courte après chimiothérapie standard. Cependant, avec l'avènement de traitements plus récents, comme la chimio-immunothérapie, certains de ces impacts pronostiques peuvent être atténués chez les patients non traités auparavant (Puiggros *et al.*, 2014).

10.2.3. Trisomie 12 (12+)

La trisomie 12 est une aberration chromosomique courante dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), elle présente souvent des caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques atypiques (Abruzzo *et al.*, 2018), ainsi qu'une prévalence accrue de complications telles que la thrombocytopénie, la transformation de Richter et d'autres cancers secondaires (Baliakas *et al.*, 2019; Roos-Weil *et al.*, 2018). Elle est considérée comme l'une des premières mutations dans le développement de la LLC, facilitent l'apparition d'autres aberrations chromosomiques telles que les trisomies 18 et 19, les délétions récurrentes de la LLC (14q, 13q, 11q ou 17p) et les translocations des gènes IGH (Nguyen-Khac *et al.*, 2023). Dans la LLC +12, le gène NOTCH1 est souvent muté, ainsi que la présence d'une forte expression de CD38 ou CD49d, ce qui peut aggraver le pronostic (Balatti *et al.*, 2012; Gattei

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

et al., 2008). Cette anomalie est associée à une régulation positive des gènes P27, CDK4, HIP1R et MDM2, entraînant une régulation anormale du cycle cellulaire, une sous-expression des gènes CD200 et P2RY14 ce qui montre la présence des interactions complexes entre les gènes situés sur le chromosome 12 et d'autres chromosomes. Bien que plusieurs gènes aient été identifiés comme jouant un rôle dans la pathogenèse de la trisomie 12, le mécanisme exact n'est pas encore entièrement élucidé, car la région affectée est l'ensemble du chromosome 12 plutôt qu'une région spécifique, ce qui rend difficile l'identification des gènes candidats directement impliqués (Puiggros *et al.*, 2014).

10.2.4. Délétion 17p13

Cette aberration est l'une des plus fréquentes après traitement, les patients ayant cette délétion sont inclus dans la catégorie pronostique à risque le plus élevé, avec une survie globale (SG) et une survie sans progression (SSP) réduites, cela est dû à la dérégulation du cycle cellulaire causée par la perte du gène TP53 (Nguyen-Khac *et al.*, 2023). Des études récentes ont montré une diversité clinique chez les patients avec cette délétion en fonction de du moment de son apparition : comme événement précoce (*de novo*) ou comme altération secondaire (Landau *et al.*, 2013). Les patients à délétion 17p *de novo* ont une SG médiane plus longue que ceux qui l'acquièrent plus tard au cours de l'évolution de la maladie. Le pourcentage de noyaux modifiés par analyse FISH est un autre facteur important pour classer les patients, avec des seuils prédictifs de résultats moins bons variant de 3% à 25%. Les mutations de TP53 sont détectées chez les patients avec délétion 17p, à cause de la surexpression de MDM2 qui inhibe TP53 entraînant une répression de miARN-43a qui est impliqué dans la régulation de processus cellulaires tel que la sénescence, l'apoptose, ce qui peut favoriser l'agressivité de la maladie. Les patients avec 17p- présentent un immunophénotype atypique (intensité plus élevée de CD20, FMC7, CD79b et Ig de surface), et sont associés à une complexité génétique plus élevée, avec une instabilité génétique remarquable (Puiggros *et al.*, 2014). Le traitement standard de la LLC ne fonctionne pas efficacement chez les patients avec délétion 17p ou mutations TP53. De nouveaux médicaments ciblant des voies spécifiques dans les cellules B tumorales, tels que les inhibiteurs de CDK, de BTK et de Bcl-2, ont montré une activité significative. L'ibrutinib est particulièrement prometteur (Cheng *et al.*, 2014; Davids *et al.*, 2013). La greffe allogénique

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

de cellules souches est la stratégie recommandée pour les patients avec 17p-, mais avec l'efficacité démontrée de l'ibrutinib, cette approche doit être réévaluée (Puiggros *et al.*, 2014).

10.2.5. Le gain 2p

Le gain 2p est une anomalie chromosomique fréquente dans la LLC avancée, elle est associée à des facteurs de mauvais pronostic, comme la del(11q), le statut non-muté des IGHV, l'expression de ZAP70 (Cosson, 2015). Dans le gain 2p deux régions minimales de gain (MDR) sont identifiées: 2p24 contient le gène MYCN et 2p15-16 contient les gènes REL et XPO1. Le gain 2p peut ne pas être visible par la technique de caryotype standard (CK) et l'analyse chromosomique par bandes (CBA), mais la technique FISH est recommandée pour sa détection, ciblant les gènes REL ou XPO1 (Voir la figure 21) (Nguyen-Khac *et al.*, 2023).

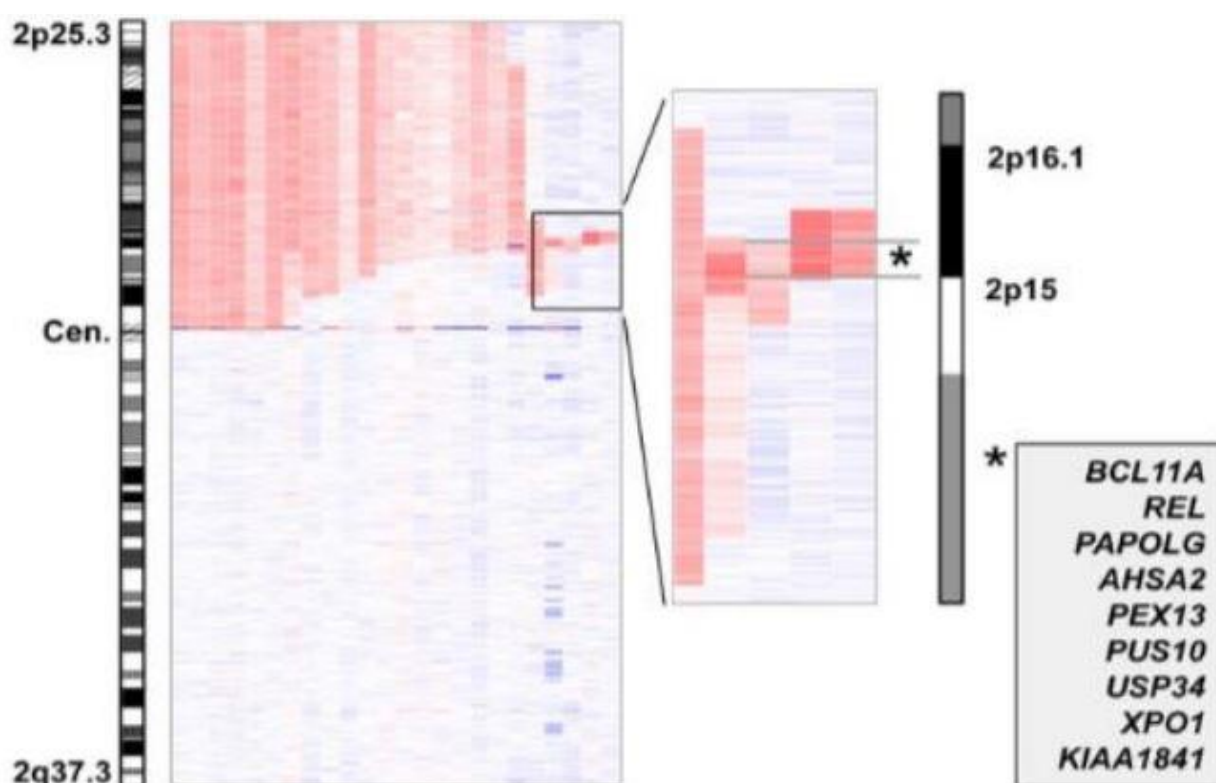


Figure 21: Schéma illustrant la région minimale de gain 2p54 dans la LLC.

La valeur pronostique de cette anomalie n'est pas complètement définie, et bien qu'une région minimale comprenant un nombre limité de gènes ait été identifiée, aucune étude fonctionnelle n'a permis d'identifier clairement un (ou plusieurs) gène(s) candidat(s) pour cette anomalie. Cependant, si l'on se réfère aux différentes études portant sur le 2p, au moins quatre gènes pourraient jouer un rôle important dans la LLC, les oncogènes MYCN, REL et BCL11A, et le gène XPO1, qui a été décrit comme muté de façon récurrente dans la LLC (Cosson, 2015).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.2.6. Translocations chromosomique

C'est un échange de matériel génétique entre deux chromosomes hétérologues, elles peuvent être classées en deux catégories : Les translocations réciproques Où deux chromosomes non homologues échangent des segments entre eux, et Les translocations Robertsoniennes, qui mènent à une perte de matériel génétique, car la cassure a lieu dans les régions juxta-centromériques et entraîne ainsi une fusion centrique (Voir la figure 17) (Babin, 2019). Les translocations chromosomiques dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) sont diverses et leur signification pronostique est controversée. Certaines translocations, telles que celles impliquant les gènes IGH/BCL2 et les réarrangements équilibrés en 13q, sont associées à un pronostic favorable. En revanche, d'autres, tel que l'IGH/BCL3 et les translocations impliquant MYC avec des partenaires Igs ou non Igs, sont liée à un pronostic défavorable (Puiggros *et al.*, 2014). Quant aux translocations impliquant TP53, leur effet sur le pronostic peut varier d'un patient à l'autre, ce qui rend leur impact clinique variable (Voir la figure22) (López *et al.*, 2012).

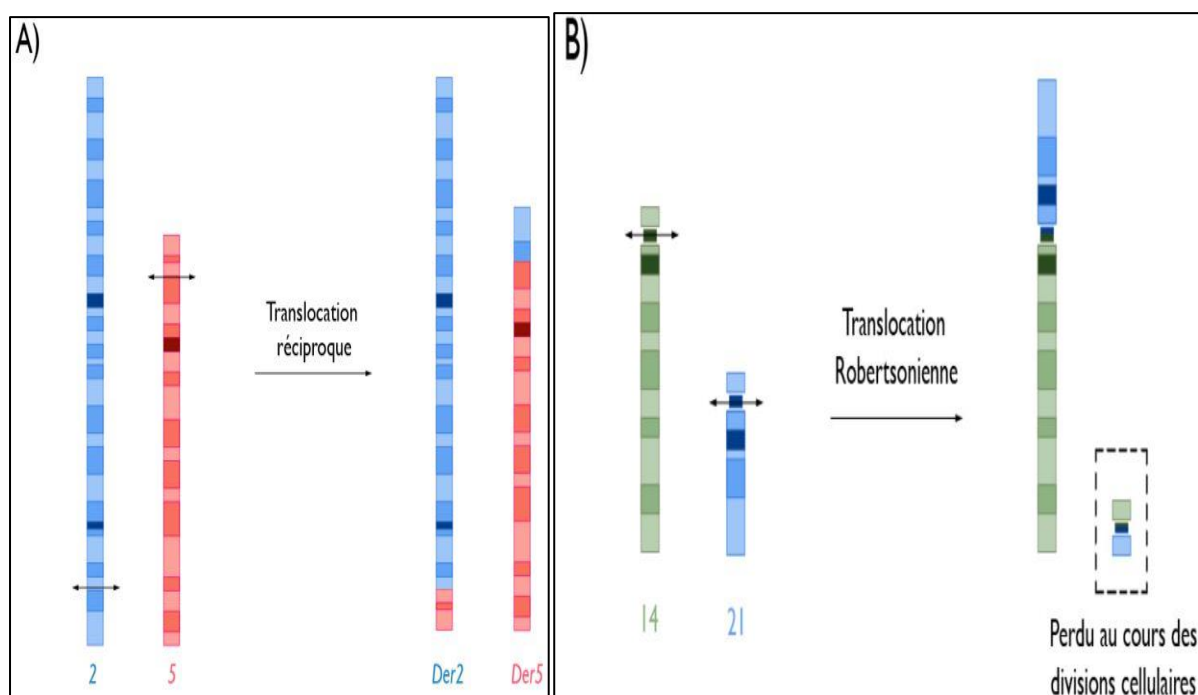


Figure 22: Schéma représentant les translocations chromosomiques.

(A) exemple d'une translocation réciproque entre les chromosomes 2 et 5 menant à la formation de deux chromosomes dérivés Der2 et Der5, sans perte de matériel génétique. (B) exemple d'une translocation Robertsonienne entre les chromosomes acrocentriques 14 et 21. Le chromosome formé des bras courts des chromosomes est généralement perdu au cours des divisions cellulaires (Babin, 2019).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.2.7. Caryotype complexe (CK)

Le caryotype complexe (CK) est défini par la présence d'au moins trois aberrations chromosomiques (CA). Il existe des sous-catégories telles que CK faible (3 CA), CK intermédiaire (4 CA), et caryotype hautement complexe (HCK) avec 5 CA ou plus. Ils sont présents chez 11 à 19 % des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC) non traitée et jusqu'à 40 % des patients traités. Elles sont détectées uniquement par analyse chromosomique conventionnelle (CBA).

Le CK peut inclure des translocations équilibrées et déséquilibrées, des délétions, des monosomies, des trisomies, des insertions, des duplications chromosomiques (Nguyen-Khac *et al.*, 2023). Ils sont associés à des caractéristiques biologiques telles que le statut non muté de la région variable des immunoglobulines (IGHV) et l'expression de CD38.

Sur le plan pronostic, les CK sont liés à des délais d'attente avant le premier traitement (TTFT) court et à une survie globale (SG) réduite chez les patients traités avec différentes thérapies (Woyach *et al.*, 2012) et chez les patients ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques après un conditionnement à faible intensité (Jagłowski *et al.*, 2012).

Même si d'autres méthodes de détection d'anomalies génétiques sont utilisées pour identifier les patients à haut risque, le caryotype complexe reste un facteur important pour prédire le pronostic des patients atteints de la LLC.

Cette complexité génomique de la LLC est due à des altérations dans la réponse de l'ADN, impliquant plusieurs gènes, notamment TP53, ATM et d'autres gènes situés dans des régions chromosomiques spécifiques.

Par conséquent, l'analyse des caryotypes complexes est cruciale pour choisir les meilleures stratégies de traitement en fonction du risque de chaque patient (Puiggros *et al.*, 2014).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

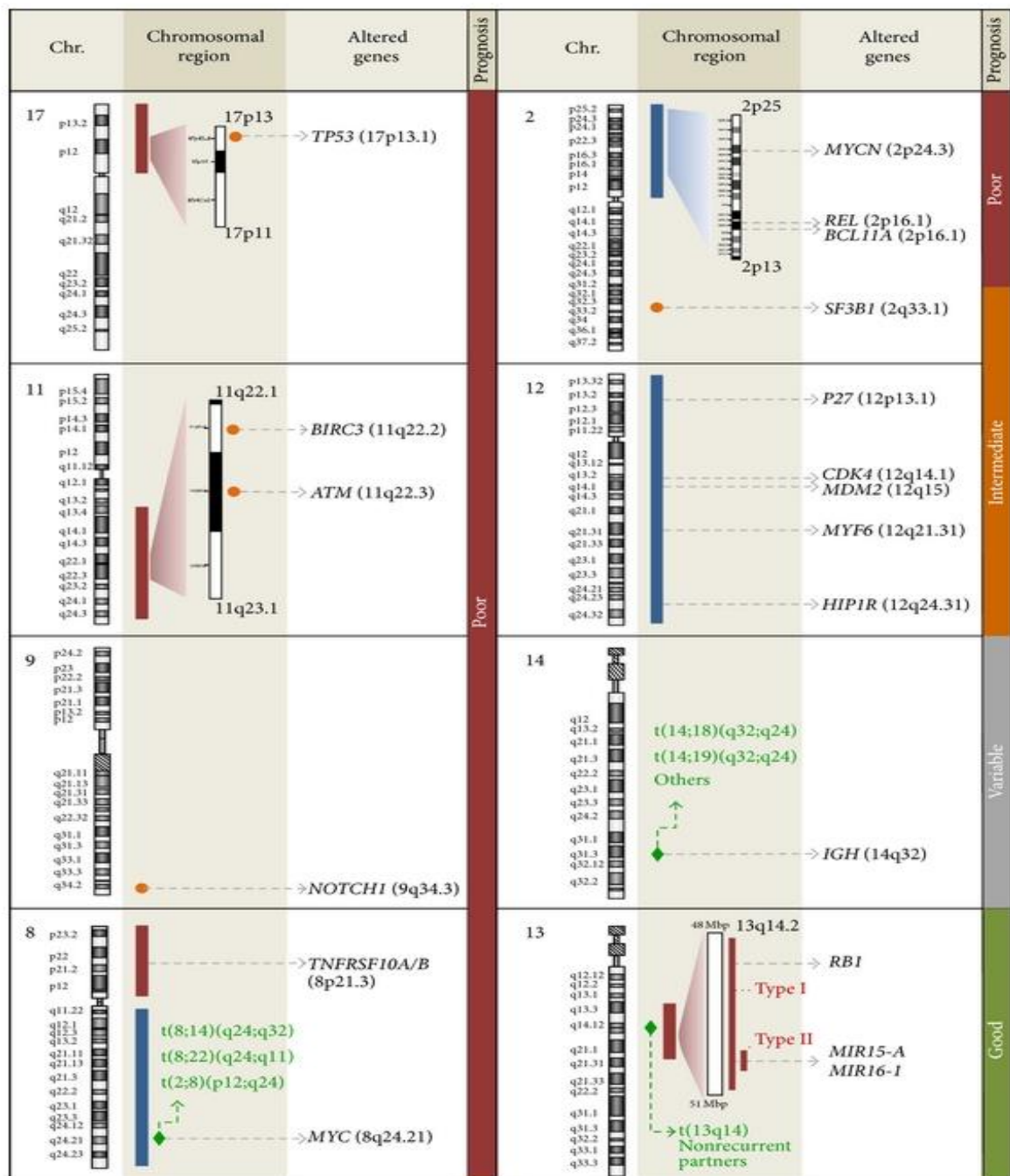


Figure 23 : Les principales anomalies génétiques ayant une signification pronostique connue dans la LLC.

Les anomalies génétiques sont regroupées par chromosomes (Chr). Dans la section des régions chromosomiques, les pertes et les gains sont représentés respectivement par des barres rouges et bleues; les points d'arrêt des translocations sont représentés par des losanges verts; les locus où se trouvent les gènes mutés de manière récurrente sont indiqués dans des cercles orange (Puiggros *et al.*, 2014).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

10.3. Les microARNs (miRs)

10.3.1. Définition

Les microARN (miRs) sont de petites molécules d'ARN non codantes, conservés au cours de l'évolution, qui jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression des gènes. Leur fonction principale est de cibler spécifiquement les ARN messagers cellulaires, ce qui entraîne la dégradation de ces ARN ou l'inhibition de leur traduction en protéines. Cette capacité des miRs à moduler l'expression des gènes permet de contrôler divers processus cellulaires, y compris la prolifération cellulaire, la différenciation, et la mort cellulaire programmée (Mardani *et al.*, 2019). Ils sont produits dans le noyau par l'ARN polymérase II, ensuite soumis à un processus de traitement par le microprocesseur, composé de protéines telles que Drosha et DGCR8. Ce complexe découpe les pré-miRs néoformés, ils sont transportés du noyau vers le cytoplasme de la cellule. Là, une enzyme appelée Dicer intervient, qui est une RNaseIII qui clive l'ARN double brin, divise ensuite les pré-miRs en duplex de 20 à 23 nucléotides. Les miRs matures sont ensuite intégrés dans un complexe de silencing induit par l'ARN, il permet aux miRs de se lier aux régions non traduites 3' (UTR) des ARNm cibles. Cette liaison guide le complexe du silencing à réprimer la traduction ou dégrader ces ARNm, ce qui régule finement l'expression des gènes cibles (Borbet *et al.*, 2021).

10.3.2. Dérégulation de l'expression des miRs dans la leucémie lymphoïde chronique

Les miRs ont également été identifiés comme des marqueurs utiles pour distinguer entre différents sous-types de leucémie et pour prédire la réponse des patients aux traitements (Mardani *et al.*, 2019). Ils présentent plusieurs altérations courantes, notamment le cluster miR-15/16, miR-34b/c, miR-29, miR-181b, miR-17/92, miR-150 et miR-155. Ces changements sont liés à la progression de la maladie, au pronostic et à la résistance aux médicaments (Balatti *et al.*, 2015). En fait, miR-15a/16-1 est souvent sous-exprimé en raison de sa localisation dans une région fréquemment supprimée (locus 13q14.3) chez les patients atteints de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) (Yeh *et al.*, 2016). Cependant, des mécanismes tels que la surexpression des protéines histone désacétylases (HDAC) peuvent contribuer à cette sous-expression (Voir la figure 24) (Sampath *et al.*, 2012).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

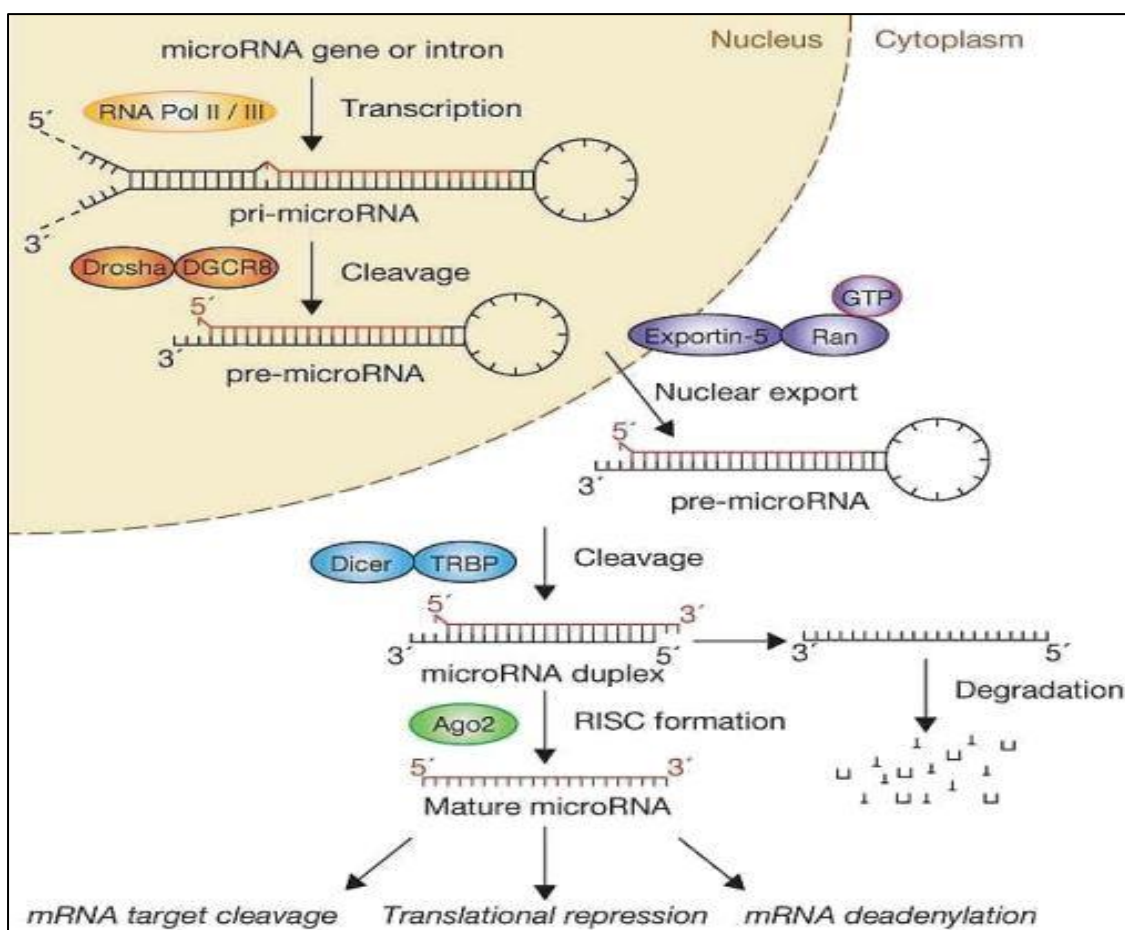


Figure 24 : Représentation schématique de la production des miRs.

Les microARN sont préférentiellement transcrits par la RNA polymérase II sous forme de pré-miR. La première étape de maturation pré-miR est le clivage dans le noyau par la RNase III Drosha. Le produit de ce clivage est le pre-miR, un ARN d'environ 70b ayant une structure tige-boucle qui sera exporté vers le cytoplasme par l'exportine-5 (XPO5). Le pre-miR subit ensuite une étape de maturation qui repose sur l'action de la RNase III Dicer, qui produit une structure de type duplex double brin composé du brin guide (qui deviendra le microARN mature) et du brin passager (ou microARN*). Ce duplex est recruté au sein du complexe RISC, composé des protéines Dicer, TRBP et Ago, où aura lieu la dégradation du brin passager, et l'association du microARN mature avec ses cibles (Espadinha, 2016).

Une corrélation inverse entre le taux de miR-15a/16-1 et l'expression de BCL2 a été rapportée dans la LLC, et l'inhibition de cette expression de ces miRs dans les lignées cellulaires leucémiques a conduit à une augmentation de l'expression de BCL2 et à l'apparition de la résistance aux signaux apoptotiques. D'autres miRs tel que miR-29 qui comprend miR-29a, miR-29b et miR-29c sont également inhibés et associés à un pronostic défavorable. miR-29b cible les isoformes de la DNA méthyltransférase (DNMT) et l'inhibition de l'expression de miR-29b peut conduire à une hyperméthylation et à un silence épigénétique de plusieurs

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

suppresseurs de tumeurs. Une autre région génomique fréquemment supprimée chez les patients atteints de LLC a été trouvée dans la région 11q où un cluster miR-34 est situé, la baisse de ce cluster provoque l'inactivation de p53, accompagnée d'une réponse déficiente aux dommages de l'ADN et une résistance à l'apoptose (Yeh *et al.*, 2016). Le miR-34a inhibe également E2F1 et B-Myb qui sont des protéines impliqués dans la transcription génétique, la perte de l'expression de miR-34a peut augmenter la prolifération des cellules tumorales (Zauli *et al.*, 2011). Tandis que des clusters comme miR-17/92 sont souvent surexprimés, influençant des voies cellulaires importantes en inhibant l'expression du facteur pro-apoptotique Bim et du suppresseur de tumeurs PTEN (phosphatase and TENsin homology) qui régule la prolifération des cellules (Xiao *et al.*, 2008). De plus, dans les cellules LLC, miR-150 cible les protéines impliquées dans la survie cellulaire: (Forkhead Box Protein P1 (FOXP1) et la protéine GRB2- associated binding protein 1 (GAB1)), réduisant ainsi la signalisation du récepteur des cellules B (Mraz *et al.*, 2014). Un autre miR activé, miR-155, surexprimée dans les cellules et dans les microvésicules circulantes des échantillons CLL (Rozovski *et al.*, 2013). L'induction de l'expression de l'onco-miR-155 dans le plasma des patients atteints de CLL est corrélée à une mauvaise réponse au traitement et à la progression de la maladie et, de manière cohérente avec cela, les patients ayant atteint une rémission complète présentaient des niveaux faibles de miR-155 dans le plasma (Balatti *et al.*, 2015). De plus, l'expression de miR-155 augmentait avec la progression de la maladie de la lymphocytose B monoclonale (MBL) à la LLC et était plus élevée dans la MBL et la LLC que dans les témoins normaux (Ferrajoli *et al.*, 2013). Enfin, en ce qui concerne les miRs et la LLC, miR-181b était fréquemment régulé à la baisse chez les patients atteints de LLC avec progression de la maladie, car il cible MCL-1 et BCL2, qui sont importants pour la survie des cellules cancéreuses, et une faible expression de ce miR était associée à un mauvais pronostic, comme indiqué par la survie sans traitement (TFS) (Visone *et al.*, 2012). De manière intéressante, une étude récente basée sur le séquençage complet du génome de patients atteints de LLC a identifié 8 mutations de miR-142 dans cinq cas, bien que le rôle de ces mutants dans la pathogenèse de la LLC ne soit pas clair (Puente *et al.*, 2015).

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

11. Profils d'expression génique dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC)

Le profil d'expression des gènes (GEP) dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC) permet d'identifier les gènes exprimés de manière différentielle (DEG) associés à la LLC, offrant ainsi une aperçue sur les altérations génétiques importantes présentes dans la maladie (Zhang *et al.*, 2016). En utilisant ces données, des micro-réseaux sont construits pour étudier l'expression génique (Codony *et al.*, 2009), ou des réseaux d'interaction protéine-protéine pour étudier les interactions entre les protéines peuvent être examinées à travers l'analyse des données Array, afin de les rendre accessibles à d'autres chercheurs dans le monde entier. Cela favorise la collaboration, la réutilisation des données et la progression de la recherche dans divers domaines de la biologie moléculaire (Zhang *et al.*, 2016).

De plus, des analyses fonctionnelles ont impliqué la comparaison des gènes d'intérêt, c'est-à-dire ceux identifiés comme différemment exprimés dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC), et comparés avec les informations fonctionnelles des bases de données contenant les descriptifs sur les fonctions biologiques ou des classifications de voies biologiques.

Cette comparaison a permis de déterminer si ces gènes étaient associés de manière significative à des fonctions biologiques spécifiques ou à des voies biologiques particulières, ce qui indiquerait une perturbation ou une implication dans ces processus cellulaires ou voies biologiques. En d'autres termes, cela a permis de comprendre comment les gènes identifiés dans l'étude sont liés aux fonctions biologiques et aux processus cellulaires, fournissant ainsi des informations sur les mécanismes sous-jacents de la LLC.

Cette approche a permis de mettre en lumière les mécanismes moléculaires sous-jacents à la maladie et de découvrir de nouveaux gènes et voies potentiellement perturbés dans la LLC (Zhang *et al.*, 2016). Grâce aux progrès technologiques, il est maintenant possible d'étudier plusieurs aspects de l'expression génique, des mutations de l'ADN, de la méthylation de l'ADN et de la phosphorylation des protéines.

Dans le cas de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), les études sur le profil génique ont permis d'identifier de nouveaux marqueurs pronostiques tels que ZAP-70, LPL et CLLU1. De plus, une meilleure analyse des mutations génomiques a révélé l'importance de certaines anomalies génétiques dans l'apparition de la LLC, comme la délétion 13q14, ainsi que

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

l'importance des délétions sur les chromosomes 13q et 17p dans la réponse au traitement (Codony *et al.*, 2009).

Les chercheurs ont utilisés des données génétiques tel que PPI pour montrer comment des protéines interagissent entre eux, dont, chaque connexion entre les nœuds dans le réseau représente une interaction protéine-protéine, fournissant ainsi une vue sur la manière dont ces protéines interagissent les unes avec les autres dans le contexte de la régulation négative, tel que l'interaction des protéines FOXO1, LYN (qui ont un rôle dans la prolifération cellulaire) avec 13 autres protéines dans le réseau, l'interaction de UBE2I (Ubiquitine-conjugating enzyme E2I qui régule la dégradation des protéines) avec 12 autres protéines et l'interaction des protéines SIRT1 (protéine qui régule l'apoptose), SYK (une kinase impliquer dans la prolifération cellulaire), CXCR4 (un récepteur de la chimiokine impliquer dans le développement de plusieurs cancers) avec 10 autres protéines (Voir la figure 25) (Zhang *et al.*, 2016).

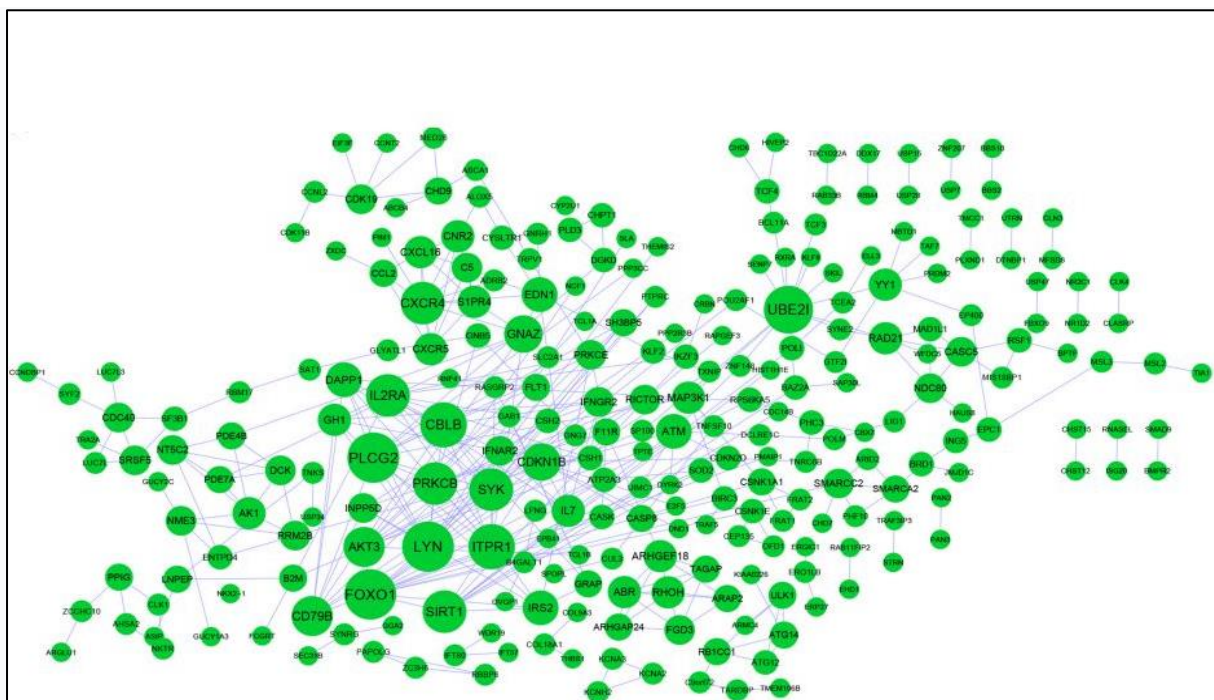


Figure 25: Le réseau PPI pour les gènes régulés négativement, nœuds : protéines codées par des gènes régulés négativement (Zhang *et al.*, 2016).

11.1. Variabilité de l'expression génique dans les sous-types de la LLC

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) présente deux sous-types qui ont des résultats cliniques très différents, la LLC avec mutations IgHV (M-CLL) et la LLC sans mutations

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

IgHV (U-CLL). Des études récentes montrent qu'il existe des variations dans l'expression des gènes et dans la façon dont ils sont activés dans ces deux sous-types, ce qui peut jouer un rôle important dans la progression de la maladie. Des chercheurs ont examiné la variabilité de l'expression génique entre les patients atteints de U-CLL et ceux atteints de M-CLL et ont montré que la variabilité dans l'expression génique était plus élevée chez les patients atteints de la U-CLL. Cela suggère que la variabilité dans l'expression des gènes pourrait être une caractéristique importante pour différencier entre les deux sous-types de la maladie (Ecker *et al.*, 2015).

11.1.1. Variation du profil d'expression des gènes chez les patients U-CLL

Certains processus biologiques sont significativement plus présents chez les patients atteints de U-CLL par rapport à ceux atteints de M-CLL. Les réseaux d'interactions géniques spécifiques aux lymphocytes B permettent d'identifier des modules de gènes fortement connectés : Le premier module de réseau dont le gène le plus connecté est PRKCA (Protein Kinase C Alpha), qui joue un rôle central dans les interactions biologiques qui se produisent dans ce module, tel que, la différenciation et le contrôle du cycle cellulaire. PRKCA est également impliqué dans la croissance et l'invasion des cancers, et il est connu pour son effet anti-apoptotique en phosphorylant le gène BCL2 ce qui le rend moins efficace dans l'inhibition de l'apoptose.

Le deuxième module du réseau est principalement associé à des processus de la synthèse des protéines et la régulation de l'expression génique qui sont liés au ribosome, à la traduction et à la transcription. Le gène le plus connecté dans ce module est POU2F1 (POU class 2 homeobox 1), un facteur de transcription impliqué dans le cycle cellulaire et l'activation des gènes des immunoglobulines.

Le troisième module du réseau, est représenté par les gènes impliqués dans la transduction de signaux et la communication cellulaire. Il met en évidence le gène spécifique CAV1 (Caveolin 1), qui est fortement connecté dans ce module et joue un rôle crucial dans la transduction de signaux, affectant ainsi la fonction des cellules.

Le quatrième module du réseau contient des gènes impliqués dans l'activité des facteurs de transcription et la liaison à l'ADN. Il met en lumière le gène JUND (Jun D Proto-Oncogene), qui est le plus connecté dans ce module, il est impliqué dans la régulation de la prolifération des lymphocytes et a été associé à des processus cellulaires importants tels que la protection

Chapitre II : La biologie de la Leucémie Lymphoïde Chronique B (LLC-B)

contre la sénescence et l'apoptose. D'autres gènes fortement connectés de ce module sont CCL2 (Chemokine C-C Motif Ligand 2), impliqué dans les processus immunitaires et inflammatoires, et STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1), un activateur transcriptionnel jouant un rôle important dans la prolifération et la survie des lymphocytes.

Le cinquième module, est dominé par le gène MYC (V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog), un facteur de transcription qui joue un rôle central dans la régulation de la réplication de l'ADN, la prolifération et la différenciation cellulaire. D'autres gènes fortement connectés de ce module sont FOXM1 (Forkhead box protein M1), ESR1 (Estrogen Receptor 1), RBL2 (Retinoblastoma-Like 2) et le marqueur de la prolifération Ki67, tous impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération cellulaire (Voir la figure 27).

Ces résultats suggèrent que les patients atteints de U-CLL présentent une variabilité accrue dans des processus clés tels que la signalisation cellulaire, la prolifération cellulaire et la différenciation, ce qui pourrait contribuer à la progression de la maladie et à son pronostic clinique défavorable (Ecker *et al.*, 2015).

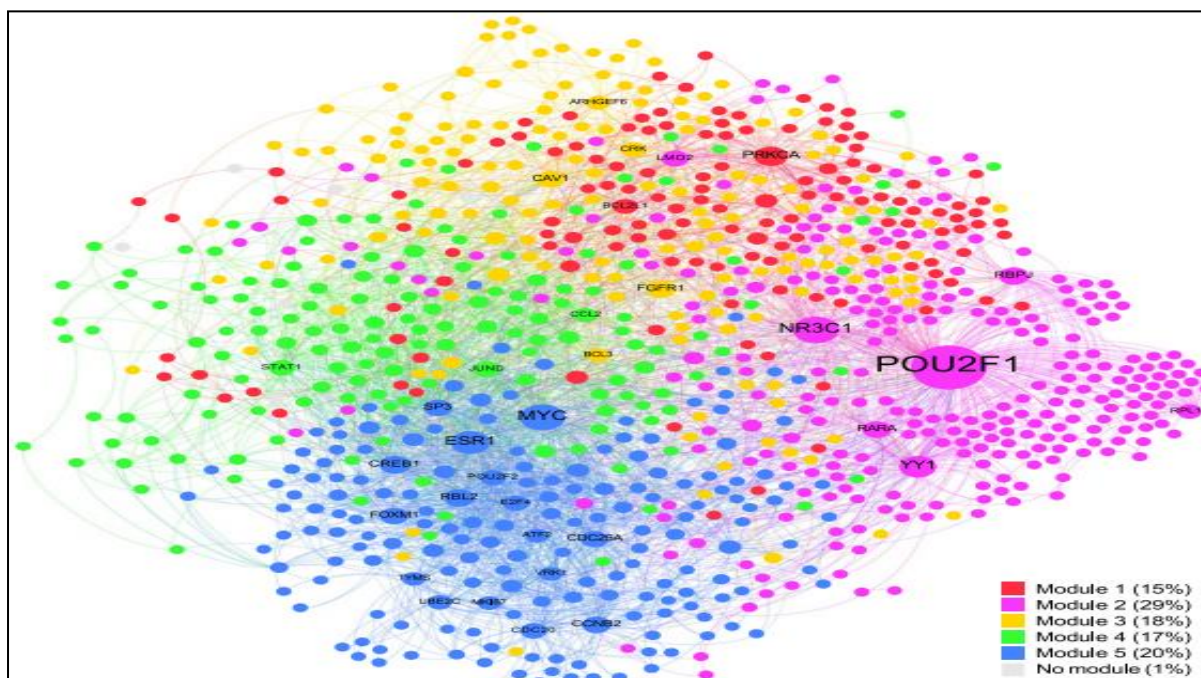


Figure 26: Représentation en réseau de l'expression de gènes à variabilité accrue dans l'U-CLL.

Tailles des nœuds sont déterminées par les degrés des nœuds, c'est-à-dire que les gros nœuds représentent des gènes hautement connectés. Différents modules réseau sont mis en évidence par différentes couleurs (Ecker *et al.*, 2015).

Chapitre III

Matériel et Méthodes

Chapitre III : Matériel et Méthodes

1. Matériel

Dans notre étude, nous avons analysé 31 dossiers de patients de LLC-B dans le cadre d'une étude rétrospective, et nous avons effectué des examens cytologiques sur 3 patients du service d'hématologie du CHU de Tizi-Ouzou

Tableau IV : Liste du Matériel utilisé lors de notre travail

Appareils	Réactifs	Echantillons	Anticops
Automate de coloration du frottis (Aerospray®hematology pro). Microscope optique (LEICA DM 500). Automate de FNS (SYSMEX XP-300). Cellule de Nageotte. Cytomètre	Thiazin stain B Eosine stain C Méthanol Eau distillé PBS Solution Ficoll Bleu de tryopon	Sang total périphérique de patients. Ponction de la moelle osseuse.	FMC7 IgM CD19 CD5 CD79b Kappa et Lambda CD 23 CD 10

2. Méthodes

2.1. Etude rétrospective

La première partie de notre travail consiste à l'étude rétrospective de 31 dossiers de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique (LLC), diagnostiqués au service d'hématologie et au site Casoral du centre hospitalier (CHU) de Tizi-Ouzou, entre l'année 2022 jusqu'à 2024. Nous avons suivi plusieurs paramètres, y compris les données cliniques telles que l'âge, le sexe, le score de Matutes, la classification de Binet et les symptômes, les paramètres biologiques tels que la présence des marqueurs membranaires tel que le CD38, ainsi que la présence d'anomalies cytogénétiques.

2.2. Le frottis sanguin

2.2.1. Principe

Le frottis sanguin est également connu sous le nom de frottis sanguin périphérique, il s'agit de prélever une petite quantité de sang périphérique d'un patient, puis de l'étaler uniformément sur une lame porte objet en verre de manière à obtenir une seule couche de cellules. Ensuite, le sang est fixé par le séchage de la lame par l'air et coloré avec des

Chapitre III : Matériel et Méthodes

colorants spécifiques, puis, il sera examiné au microscope pour observer les différents types de cellules sanguines (les hématies, les thrombocytes (plaquettes), les leucocytes (lymphocytes, monocytes, éosinophiles, polynucléaires neutrophiles et basophiles), évaluer leurs morphologie, compter leurs nombres et leurs distributions, ce qui permet de diagnostiquer diverses conditions médicales, telles que la leucémie lymphoïde chronique, en observant des nombres élevés des lymphocytes, accompagnés de la présence de faibles quantités des plaquettes et la présence des Ombres de Gumprecht.

2.2.2. Mode opératoire

1. Prélèvement du sang périphérique.
2. Déposer une petite goutte de sang à 1 cm du bord de la lame en verre.
3. Etaler la goutte du sang à l'aide d'une autre lame en verre de manière à ce que le sang s'étale uniformément et le frottis doit s'arrêter à environ 1 ou 2 cm de l'autre extrémité de la lame.
4. Séchage le frottis à l'air.
5. Coloration du frottis par un appareil (automate) ou bien coloration manuelle avec le réactif May-Grünwald Giemsa (MGG).
6. Examiner le frottis sur microscope après ajout de quelques gouttes d'huile d'immersion, on commence par un objectif à faible grossissement (10x ou 20x) pour localiser les cellules sanguines, puis passer à un grossissement plus fort (100x) pour examiner les détails.
7. Interpréter les résultats du frottis sanguin en fonction des paramètres cliniques et des normes de laboratoire établies.

2.3. Coloration du frottis sanguin

2.3.1. Coloration manuelle

La coloration selon Pappenheim également connue sous le nom de coloration May-Grünwald Giemsa (MGG), est une méthode de coloration utilisée pour préparer les frottis sanguins. Elle associe deux colorants neutres: le May-Grünwald et le Giemsa, ils ne sont pas actifs en milieu alcoolique, ils se précipitent et se fixent sélectivement sur les constituants cellulaires lorsqu'ils sont libérés dans une solution aqueuse tamponnée.

Chapitre III : Matériel et Méthodes

- Le May-Grünwald, formé d'un colorant acide l'éosine, et d'un colorant basique qui est le bleu de méthylène.
- Le Giemsa, formé aussi d'un colorant acide l'éosine, et un colorant basique l'azur de méthylène.
- Les constituants cellulaires acides, fixeront électivement les colorants basiques. Ces éléments sont qualifiés de basophiles (ADN, cytoplasme des lymphocytes riche en ARN).
- Les constituants cellulaires basiques, fixeront électivement les colorants acides. Ces éléments sont qualifiés d'acidophiles ou d'éosinophiles (cas de l'hémoglobine, protéine basique contenue dans les hématies et des granulations des granulocytes éosinophiles).
- Les constituants fixant les deux types de colorants sont dits neutrophiles.

2.3.2. Coloration sur automate

La coloration automatisée est une méthode moderne rapide, prenant environ 10min pour colorer environ 20 lames. Elle implique l'utilisation d'équipements automatisés pour appliquer les colorants sur des échantillons sanguins étalés sur lames (Voir la figure 27). Les réactifs utilisés comprenant l'éosine, la thiazine, le méthanol et l'eau distillée.



Figure 27: Photographie d'un automate de coloration (Aerospray®Hematologypro).

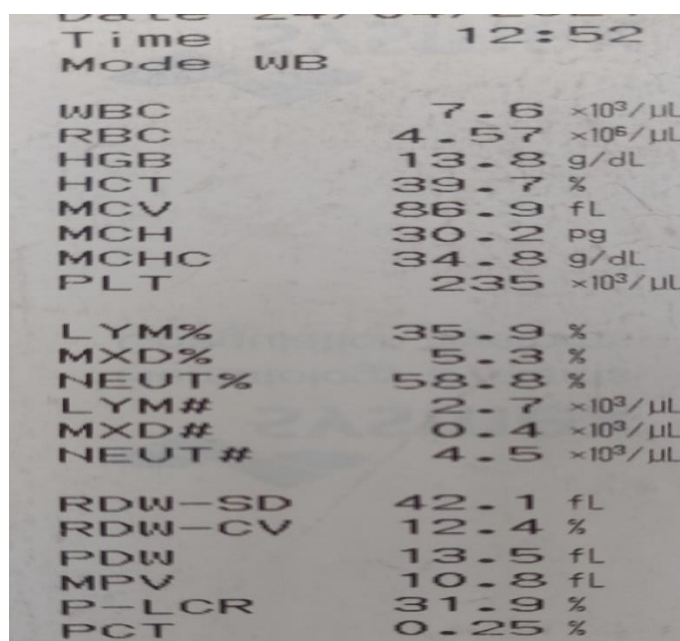
2.3.3. Observation des frottis au microscope optique

- Les noyaux sont en bleu à violet-noir
- Les hématies sont beiges-rosé,
- Les granulations des granulocytes éosinophiles sont orangées.
- Les granulations des granulocytes neutrophiles sont violettes-lilas.
- Les granulations des granulocytes basophiles sont bleues-noir
- Les granulations des grands lymphocytes sont pourpres.

2.4. Numérotation de la formule sanguine (NFS)

2.4.1. Principe

L'hémogramme, aussi appelé numération de la formule sanguine (NFS) est l'analyse quantitative (numération) et qualitative (formule) des éléments figurés du sang. Il s'agit de l'une des analyses biologiques les plus courantes, prescrit dans le cadre d'un bilan sanguin. Il permet d'évaluer l'état de santé général du patient, vise à compter et classer et donner des informations sur les composants du sang (globules rouges, globules blancs, plaquettes) afin de déterminer si leur nombre est suffisant ou excessif. Certains paramètres liés à ces éléments sont mesurés (taux d'hémoglobine, volume globulaire moyen = VGM, hématocrite, teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine = TCMH, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine = CCMH). Il existe 3 catégories de globules blancs qui donnent des indications sur le type d'infection ou de maladie : les polynucléaires, les lymphocytes et les monocytes.



Date	27/07/2021
Time	12:52
Mode	WB
WBC	7.6 $\times 10^3/\mu\text{L}$
RBC	4.57 $\times 10^6/\mu\text{L}$
HGB	13.8 g/dL
HCT	39.7 %
MCV	86.9 fL
MCH	30.2 pg
MCHC	34.8 g/dL
PLT	235 $\times 10^3/\mu\text{L}$
LYM%	35.9 %
MXD%	5.3 %
NEUT%	58.8 %
LYM#	2.7 $\times 10^3/\mu\text{L}$
MXD#	0.4 $\times 10^3/\mu\text{L}$
NEUT#	4.5 $\times 10^3/\mu\text{L}$
RDW-SD	42.1 fL
RDW-CV	12.4 %
PDW	13.5 fL
MPV	10.8 fL
P-LCR	31.9 %
PCT	0.25 %

Figure 28: Les éléments quantifier par NFS.

2.4.2. Mode opératoire

Le prélèvement se réalise par ponction veineuse franche collectée sur un tube EDTA contenant une substance anticoagulante (solution d'EDTA) qui va empêcher le sang de se coaguler, les prélèvements ne doivent pas être réalisés dans une veine perfusée (risque de dilution du sang par le produit de perfusion). Il suffit d'homogénéiser le tube et présenter l'échantillon sous le bec d'aspiration de l'automate et d'appuyer sur la touche placée,

Chapitre III : Matériel et Méthodes

l'automate va prélever seulement 100 µl du sang total, puis un rinçage automatique est effectué afin d'éviter la contamination, l'ensemble des paramètres est fourni et les résultats seront donnés sur une fiche imprimée.



Figure 29: Photographie d'un appareil de NFS de marque Sysmex (XP-300).

Tableau V : Normes de référence d'une formule de numération sanguine.

Composants sanguins	Valeur normal
Leucocytes : Leucocytes / Mm ³	4000-100000
Hématies : Millions /mm ³	4.0-5.5
Plaquettes : Mm ³	150000-450000
Hémoglobine : g /dl	11.5-16
Hématocrite : %	36-47
VGM : µ ³	80-100
Neutrophiles : %	40-70
Eosinophiles : %	<5
Basophiles : %	< 1
Lymphocytes : %	20-40
Monocytes : %	2-13

2.5. Cytométrie en flux

2.5.1. Principe

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'étudier rapidement des caractéristiques d'un grand nombre de cellules (plusieurs dizaines de milliers). Ces dernières

sont entraînées par un flux liquide de façon séparées et très rapide (plusieurs milliers/seconde, cela permet d'énumérer les cellules sanguines et étudier les différentes caractéristiques biologiques des composants du système hématopoïétique, par exemple, pour séparer entre différentes populations de lymphocytes en fonction de leurs marqueurs cellulaires. Les cellules en suspension passent devant un ou plusieurs faisceaux (x) lasers et des détecteurs captent les signaux émis par chaque cellule. On distingue ainsi un détecteur de la lumière aux petits angles (Forward Scatter : FSC) qui renseigne sur la taille des cellules, qui se fait par la mesure de l'intensité du rayon lumineux diffusé vers l'avant. Le détecteur de la lumière diffractée à un angle de 90° (Side Scatter: SSC) renseigne sur la granulosité et la structure interne de chaque cellule, en mesurant l'intensité du rayon lumineux latérale. À l'état naturel les cellules ne sont pas fluorescentes, pour la détection d'un quelconque signal de fluorescence, il est nécessaire au préalable d'effectuer un immuno-marquage d'une ou plusieurs molécules de surface ou intracellulaire des cellules. Les intensités mesurées par les détecteurs SSC, FSC ou de fluorescence sont affichées sur un ordinateur connecté à l'appareil.

Le cytomètre en flux est l'instrument de cette méthode, il dispose d'un système optique avec une source lumineuse laser pour diriger différents signaux vers des détecteurs spécifiques. Ces signaux lumineux sont transformés en signaux électriques, puis digitalisés pour l'analyse informatique. Les résultats sont visualisés sur un intervalle de canaux pour l'interprétation

2.5.2. Mode opératoire de la CMF

Un prélèvement de 5 ml de sang total est réalisé sur tube EDTA pour acheminé au laboratoire d'hémobiologie pour une analyse immunophénotypique par cytométrie en flux.

- Prendre 5 tubes polystyrènes et les numéroter de 1 jusqu'à 5.
- ajouter dans le tube (2) 10µL d'anticorps anti-CD19, anti-FMC7, anti-CD22 et anti-CD5 et dans le tube (4) 10µL d'anti- CD23, anti-CD79b, anti-CD19, et dans le tube (5) mettre 10µl d'anti CD103, anti-CD11C, anti-CD19, anti-CD25.
- Déposer dans ces tubes 100µl de sang total et agiter bien pour mixer.
- Mettre dans le tube (1) 10µL d'anti- CD19, anti-CD20, anti-lambda et anti-kappa, pour le tube (3), 10µL d'anti- IgM, anti-CD10 et anti-CD19, préalablement effectuer 3 lavage du sang total avec du PBS et centrifuger 500 rpm pendant 5 min dans l'objectif d'éliminer les immunoglobulines naturelles circulantes qui interfèrent avec l'étude des chaînes légères et chaînes lourdes des immunoglobulines.

-Prendre 100µl du culot de sang et les déposer dans le tube 1 et 3 et bien agiter. Incuber les tubes à l'obscurité pendant 15 min, ajouter 2ml de tampon de lyse afin d'éliminer les globules rouges puis incuber une autre fois à l'obscurité pendant 10 min.

- Vortexer les tubes et les centrifuger pendant 1 min à 350 rpm.

- Eliminer le surnageant avec pipetage et laver les 5 tubes avec 3ml de PBS et vortexer puis les centrifuger pendant 1 min à 350 rpm et jeter le surnageant et suspendre le culot dans de PBS.

- Lire le résultat au cytomètre

2.6. Ponction de la moelle osseuse

2.6.1. Principe

La moelle osseuse est un tissu mou et spongieux à l'intérieur de la plupart des os, elle produit les différentes cellules du sang à partir des cellules souches hématopoïétiques, tel que les globules rouges, les globules blancs ou les plaquettes.

La ponction de la moelle osseuse est une procédure courante en hématologie utilisée pour prélever des cellules de la moelle osseuse, généralement à partir du bassin (crista) ou parfois du sternum. Avant l'examen, il est recommandé de jeûner, mais si l'examen est réalisé l'après-midi, un petit-déjeuner le matin est autorisé, suivi d'un jeûne. Cependant, certains anticoagulants doivent être arrêtés quelques jours avant l'examen pour éviter une dilution excessive du sang.

2.6.2. Mode opératoire

Le patient se positionne de décubitus dorsal (ponction sternale) ou ventral (ponction iliaque), puis le prélèvement est réalisé aux niveaux suivants : Manubrium sternal, Epine iliaque postéro-supérieure, Crête iliaque antéro-supérieure. Chez l'enfant, les prélèvements sont réalisés en localisation iliaque postérieure ou Antérieure, chez le bébé il est possible de prélever l'extrémité proximale antérieure du tibia sous la grosse tubérosité. Le médecin désinfecte le site de ponction, anesthésie la peau et insère une aiguille dans la cavité médullaire pour prélever des cellules de la moelle osseuse. L'examen dure environ 15 à 20 minutes. Après la procédure, un pansement est appliqué sur le site de ponction et le patient reste allongé pendant une heure. Elles engendrent rarement des problèmes graves, certaines

personnes peuvent constater les effets secondaires suivants l'endroit où l'aiguille a été insérée tel que la sensibilité ou la douleur, saignement, rougeur ou enflure.

- Une coloration de la lame est appliquée, avec la même méthode de coloration du frottis sanguin (soit manuelle ou avec l'automate).
- Une observation avec le microscope est effectuée.

2.7. Isolement des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) par la méthode Ficoll

2.7.1. Principe

La technique d'isolement des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) par la méthode Ficoll est une méthode couramment utilisée en biologie cellulaire et immunologie pour séparer les cellules mononuclées du sang total, le principe repose sur la centrifugation en gradient de densité en présence du Ficoll qui permet de créer un gradient de densité stable lors de la centrifugation. Les cellules se séparent en fonction de la densité, les granulocytes et les érythrocytes ont une densité supérieure à celle du Ficoll, donc ils migrent à travers cette solution au fond du tube et les cellules mononuclées ont une densité légèrement inférieure à celle du Ficoll donc ils forment une couche distincte à l'interface entre le plasma et le ficoll (Voir la figure 28).

2.7.2. Mode opératoire :

Le sang total du patient est d'abord collecté par une ponction veineuse et mélangé avec un anticoagulant EDTA pour prévenir la coagulation, ensuite, 4ml du sang total sont dilués dans 4ml de PBS (Phosphate Buffered Saline) et délicatement déposés sur 2ml de solution de Ficoll (une solution polysaccharide synthétique) préalablement préparée dans un tube Falcon 15ml, ce mélange est ensuite soumis à une centrifugation à une vitesse de 340xg (2000rpm) pendant 20 minutes sans frein. Au cours de cette centrifugation, les composants du sang se séparent en différentes couches en fonction de leur densité, après centrifugation, plusieurs couches distinctes apparaissent, au bas du tube se trouvent les granulocytes et les globules rouges et plaquettes qui sont les plus denses ; au-dessus de cette couche il y a une couche de Ficoll ; juste au-dessus de Ficoll se trouve une couche sous forme d'anneau de PBMC ; et en haut de tube se trouve le plasma (Voir la figure 30). La couche contenant les PBMC est soigneusement prélevée avec une micropipette, puis lavée deux fois avec 2ml de PBS froid et

Chapitre III : Matériel et Méthodes

centrifugée à chaque lavage (300xg, pendant 5min), afin d'éliminer les résidus du Ficoll et débris. Le culot contenant les cellules PBMC est récupéré, puis re-suspendu dans 2ml de PBS.

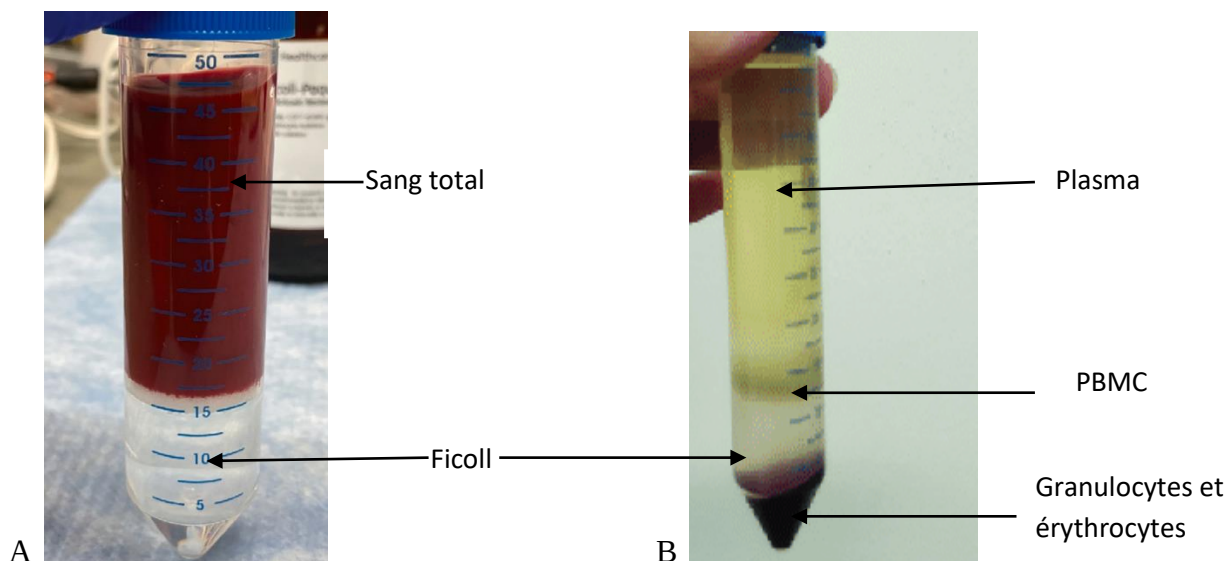


Figure 30: Photographie d'un résultat d'isolement des PBMC par Ficoll. (A) avant l'isolement, (B) après isolement par centrifugation.

2.8. La cellule de Nageotte

La cellule de Nageotte est une lame de verre de microscope utilisée pour compter les cellules en suspension dans une solution. Elle est composée d'un quadrillage constitué de colonnes larges et longues, permettant des mesures précises du volume élémentaire, la profondeur entre lame et lamelle est 0,5 mm avec un volume de la chambre de comptage de 1.25mm^3 .

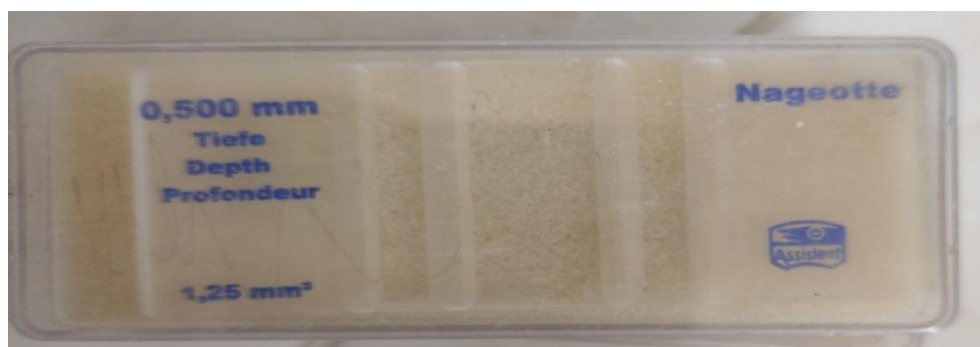


Figure 31: Photographie d'une cellule de Nageotte.

2.8.1. Numération cellulaire et test de viabilité par coloration au bleu de Trypan :

Les cellules PBMC isolées sont diluées au 1/20 et au 1/100 dans le tampon PBS. 100 μ l de cellules diluées sont mélangées avec 100 μ l du colorant bleu de Trypan 0.4%. Enfin, les cellules PBMC sont comptées sur une cellule de Nageotte, la coloration au bleu de Trypan permet de distinguer entre les cellules vivantes des cellules mortes : les cellules vivantes expulsent le colorant et apparaissent en blanc, tandis que les cellules mortes se colorent en bleu foncé.

2.8.2. Principe de la numération des cellules sur la cellule de Nageotte

La numération des cellules sur la cellule de Nageotte repose sur le remplissage de cette chambre de comptage spécialisée, dotée de rainures parallèles ou d'une grille délimitant un volume précis et contenant plusieurs champs de comptage, souvent sous forme de rectangle. La suspension cellulaire est soigneusement déposée dans cette chambre, en s'assurant que la distribution des cellules est homogène. Ensuite, la cellule de Nageotte est placée sous un microscope, grâce aux rainures ou à la grille de la chambre, le volume observé est connu et constant, permettant une estimation précise de la concentration de cellules dans la suspension. Pour obtenir une mesure représentative, le nombre de cellules dans quatre rectangles de cette chambre est calculé, puis divisé sur le volume total de quatre rectangles, qui est de 5 mm³ (chaque rectangle ayant un volume de 1.25 mm³).

Chapitre IV

Résultats et Discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion

1. Etude épidémiologique de la LLC-B

La première partie de notre travail est portée sur l'étude épidémiologique de la LLC-B au niveau du service d'hématologie du CHU de Tizi-Ouzou et au niveau du site de la Casoral, sur un total de 31 dossiers de patients sur une période allant de 2022 jusqu'au début de 2024.

1.1. Répartition des patients selon la région

Parmi les 31 dossiers traités au service d'hématologie et à la Casoral de Tizi-Ouzou, 25 patients (81 %) sont originaires de la wilaya de Tizi-Ouzou. Parmi eux, 3 viennent de Beni Douala, 3 de Larbaâ Nath Irathen, 2 d'Azazga et 2 de Maâtkas. Les autres patients se répartissent ainsi : 4 (13 %) de la wilaya de Boumerdes et 1 (3 %) chacun d'Alger et de Jijel (Voir la figure 32).

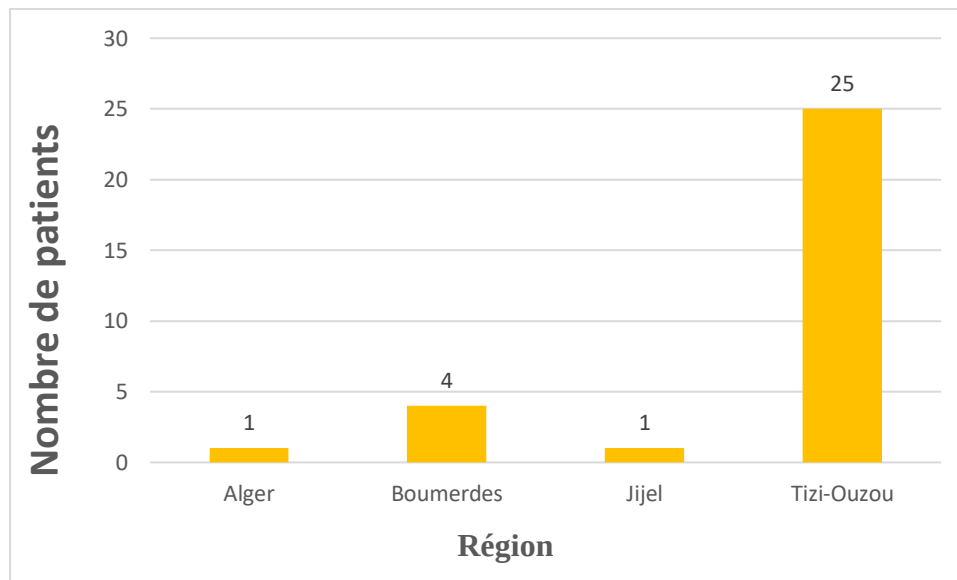


Figure 32: Répartition des patients LLC selon la région.

1.2 Répartition des patients selon l'âge

On constate que l'âge médian du groupe de patients étudié est de 65 ans avec des extrêmes allant de 42 à 86 ans. L'âge moyen regroupant les deux sexes est de 64ans, le sexe masculin seul est de 63 ans alors que l'âge moyen des femmes est de 67 ans. Cette pathologie touche beaucoup plus les personnes de soixantaine situées entre 60 jusqu'à 69 ans avec une fréquence de 35.49% correspondant à 11 malades (Voir la figure 33). Une étude réalisée en Corée en 2016 a montré des résultats proches de notre étude, où l'âge médian est de 59ans (Jeon & Cho, 2016), D'autre part, une étude américaine a estimé que les patients LLC ont un

Chapitre IV : Résultats et discussion

âge médian de 71 ans (Stevenson *et al.*, 2017) et en 2022 la base de données Américaine de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) Surveillance, Epidémiologie, and End Results (SEER) ont montré que l'âge médian des patients est de 72ans (Nasnas *et al.*, 2023).

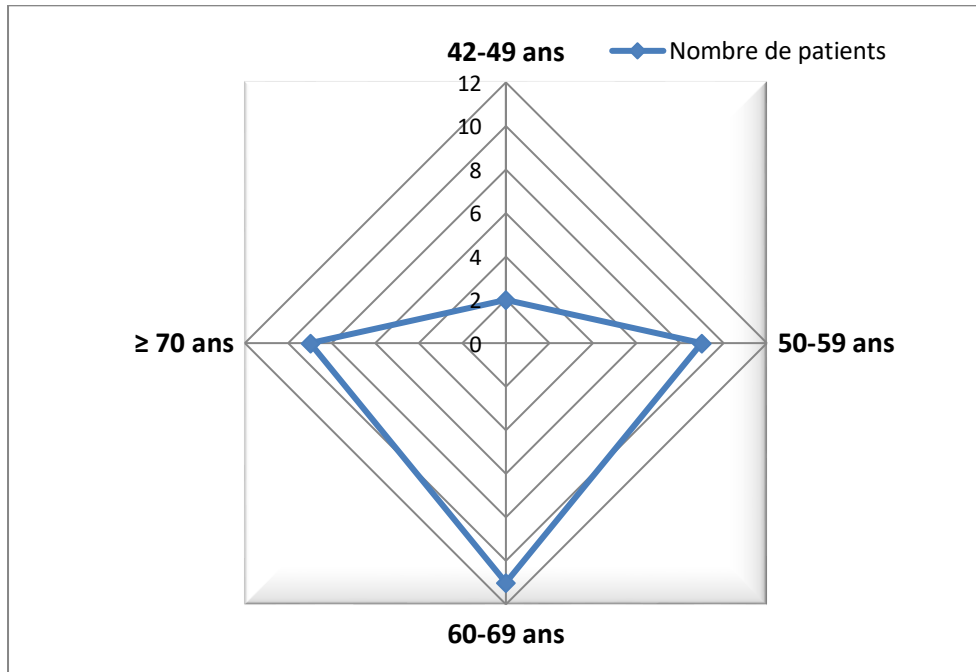


Figure 33: Répartition des patients LLC-B selon la tranche d'âge.

1.3. Répartition des patients LLC-B suivant le sexe

Sur le groupe de 31 patients, on observe une prédominance masculine avec 74,19% des patients étant des hommes, tandis que les femmes ne représentent que 25,81% des cas (Voir la figure34). Ceci représente un sex-ratio Hommes/Femmes de 2,87, indiquant qu'il y a près de trois hommes atteints de leucémie pour chaque femme touchée par cette maladie. Une étude faite en 2016 en Corée du sud, rapporte une prédominance masculine avec un sex-ratio Hommes/Femmes de 1,4 (Jeon & Cho, 2016), et aux USA ce ratio est évalué de 1.5 à 2 (Stevenson *et al.*, 2017) et dans la dernière mise à jour de la base de données SEER de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en 2022 a cité un sex-ratio Hommes/Femmes de 1,9 (Nasnas *et al.*, 2023).

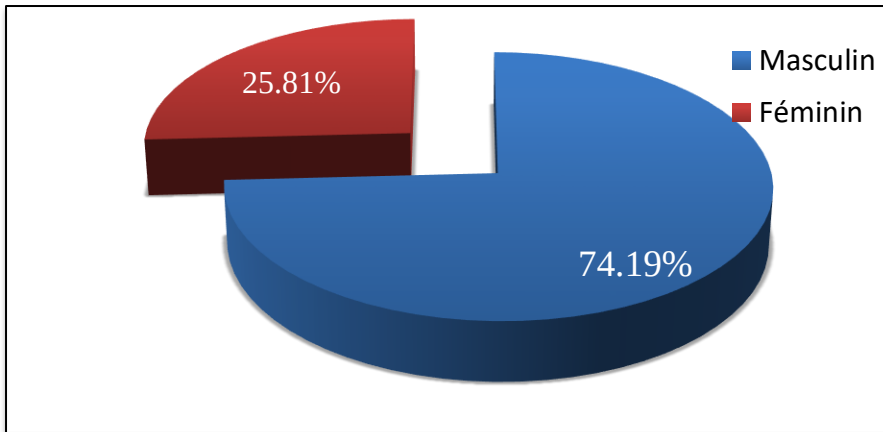


Figure 34: Répartition des patients LLC-B selon le sexe.

1.4. Répartition des patients LLC-B suivant le stade de Binet de la maladie

L'histogramme de la Figure-35 illustre la répartition des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) au CHU de Tizi-Ouzou selon les stades de la maladie suivant la classification de Binet. Il révèle que 14 % des patients sont au Stade A, représentant le stade le plus précoce de la maladie, tandis que près de 25 % sont au Stade B, signalant une progression intermédiaire de la maladie. Cependant, la majorité des patients, environ 61 %, se trouvent au Stade C, correspondant le stade le plus avancé. L'inégalité marquée dans la répartition, avec une concentration significative au Stade C, souligne l'importance d'améliorer les programmes de dépistage pour détecter la maladie plus tôt. En termes de taux de globules blancs dans le sang, au Stade A, les valeurs peuvent légèrement dépasser la concentration normale, variant de 11 000 à 15 000 cellules par microlitre, tandis qu'au Stade B, elles peuvent atteindre 15 000 à 50 000 cellules par microlitre. Au stade C, les valeurs peuvent dépasser largement la normale, souvent au-delà de 50 000 cellules par microlitre, reflétant la progression avancée de la maladie (Voir la figure 35). Une étude réalisée au Togo a montré que 67 patients (77%) étaient au stade C de la classification de Binet, 7 patients (8%) au stade B et 13 patients (15%) au stade A. L'analyse montre que 84% des femmes sont au stade C contre 66% des hommes (Padaro *et al.*, 2019).

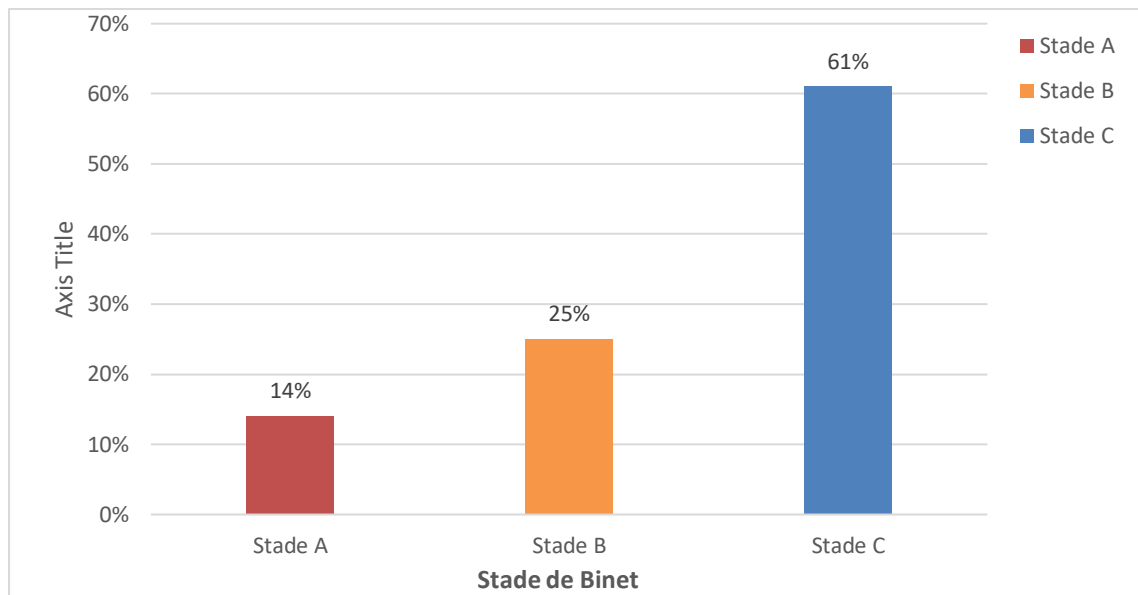


Figure 35: Répartition des patients LLC-B selon le stade de Binet.

1.5. Répartition des patients suivant le score de Matutes

L'immunophénotypage lymphocytaire par la technique de cytométrie en flux a été effectué sur des échantillons prélevés de l'ensemble des 31 patients du service d'hématologie et Casoral du CHU de Tizi Ouzou afin de déterminer le score de Matutes. Ce procédé représente le moyen de confirmation du diagnostic de la LLC, quand le score évalué est $\geq$ à 3/5. Tandis que lorsque ce score est inférieur à 3/5 il indique alors un autre Syndrome lymphoprolifératif B. Le calcul de ce score est basé sur la contribution d'un point pour l'expression positive des marqueurs CD5 et CD23, à la faible expression des Igs de surface, de l'expression de CD22 ou CD79b et une expression faible ou négative de FMC7. L'évaluation du score de Matutes de notre groupe de patients a révélé que 9,68%, des patients avait un score égal à 3/5 soit 3 patients, 29,03% des cas le score était de 4/5 (9 patients), enfin, 61,29% des patients présentaient un score de 5/5 (19 patients) (Voir la figure 36).

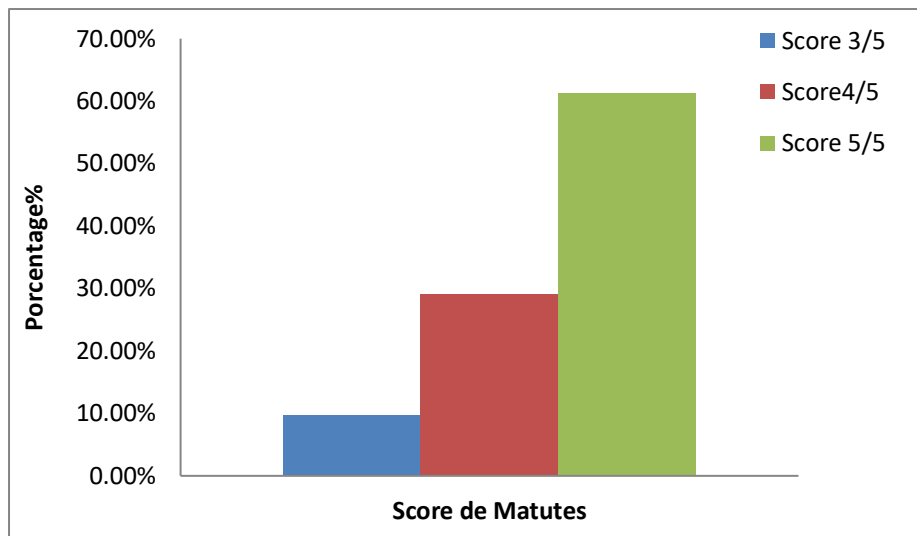


Figure 36: Représentation graphique de la répartition des patients LLC-B suivant le score de Matutes.

1.6. Suivi de la présence des facteurs pronostiques chez les patients LLC-B en fonction du stade de Binet

La recherche de la présence des facteurs pronostic défavorable tel que la délétion 17p qui est une aberration associée à des mutations de gène suppresseur de tumeur TP53, et le marqueur CD38 qui est une enzyme impliquée dans l'activation et la prolifération des cellules B, a été réalisé sur les 31 patients LLC-B, et la recherche des facteurs favorable tel que la délétion 13q qui supprime l'expression de protéines capables d'inhiber l'apoptose, dont un a été réaliser uniquement sur cinq patients du même groupe. Nous avons identifié 19 patients, soit 61,29 % de l'échantillon, présentant l'expression d'au moins un de ces facteurs.

Nous avons ensuite étudié l'expression de ces facteurs en fonction des stades de Binet (A, B et C). Nous avons constaté que le CD38, un marqueur de prolifération cellulaire, était plus fréquemment exprimé dans les stades A (75%) et B (62,5%), alors qu'on remarque une présence moyenne chez les patients du stade C (42,1%). En ce qui concerne les délétions 17p, nous avons trouvé un cas sur 8 situé au stade B (soit 5,26%) et un cas sur 19 au stade C (soit 5,26%) exprimant la délétion. Par ailleurs, un seul patient de stade C sur 5 patients (20,00%) qui a exprimé la délétion 13q (Voir la figure 37).

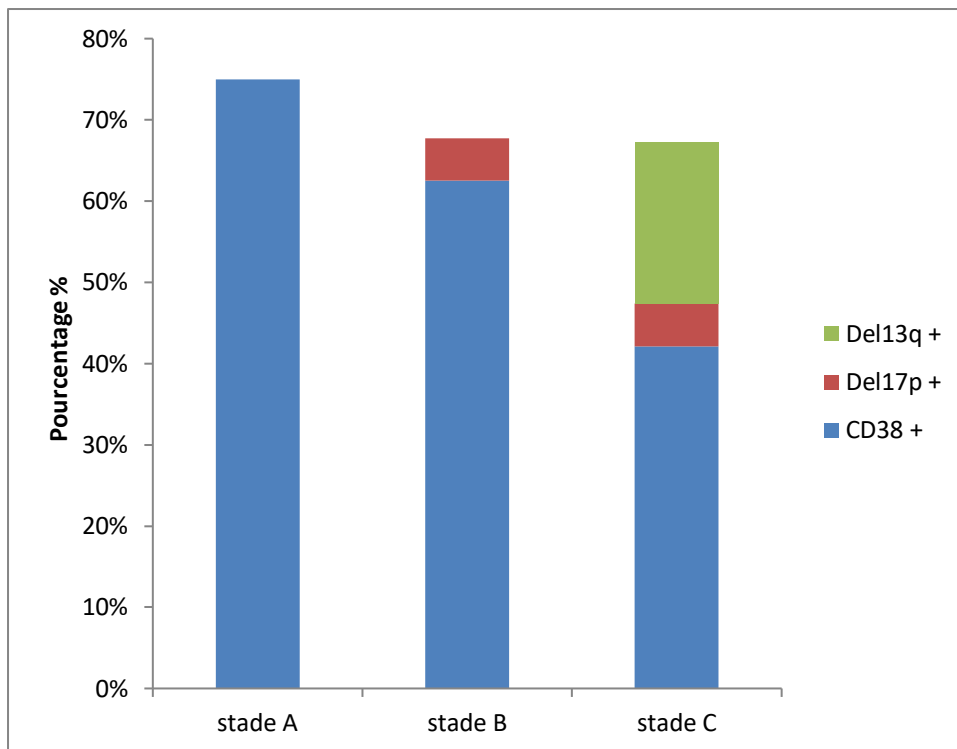


Figure 37: Suivi de la présence de facteurs pronostiques chez les patients LLC-B selon le stade de Binet.

1.7. Répartition des patients selon les symptômes

Au cours de cette étude, nous avons constaté que le syndrome tumoral le plus fréquent était l'adénopathie (74%) suivi par la splénomégalie (68%) (Voir la figure 38). Les adénopathies ont été présents majoritairement chez le groupe de patients ce qui peut s'expliquer par la présence de lymphocytes anormaux qui s'accumulent progressivement dans les ganglions lymphatiques, le même phénomène d'accumulation des lymphocytes peut également être responsable d'un grossissement de la rate appelée splénomégalie. Une étude Togolaise, Soixante-deux patients (71%) avaient une splénomégalie de taille variable, les adénopathies périphériques n'avaient été retrouvées que chez 33 patients (38%) (Padaro *et al.*, 2019).

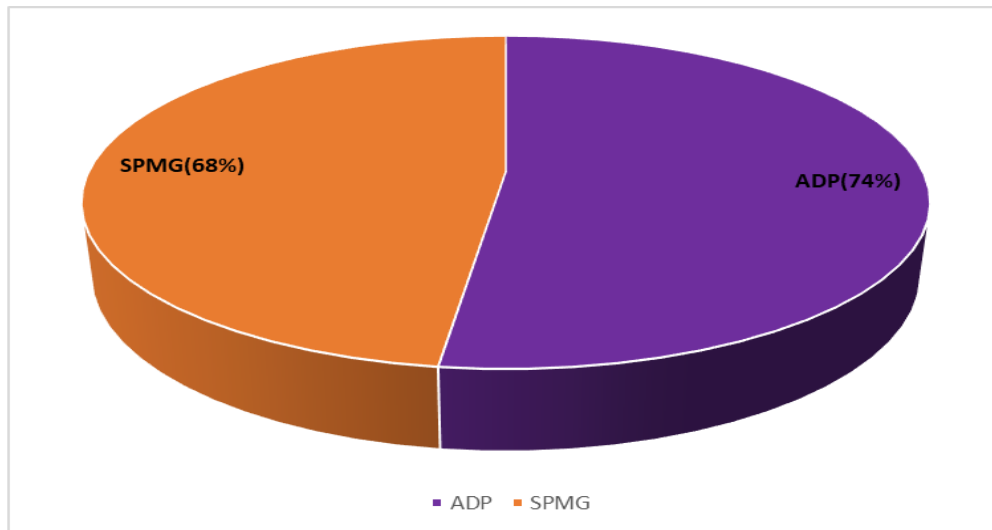


Figure 38: Répartition des patients suivant les symptômes de la LLC-B.

1.8. Répartition des patients LLC-B selon le traitement prescrit

Au niveau du CHU de Tizi-Ouzou, le traitement R-BENDA (Rituximab- Bendamustine) est principalement prescrit aux patients âgés de 64 à 81 ans, tandis que le traitement RFC est plus courant chez les patients plus jeunes, cette observation souligne l'importance de la prise en compte de l'âge et d'autres caractéristiques individuelles lors de la sélection du traitement pour la LLC (Voir la figure 39).

Sur la base des résultats de l'étude FCR300, qui ont montré un taux de réponse globale de 95 %, un taux de réponse complète de 72 % et une survie sans progression de 6 ans, la FCR est devenue la norme de soins, il est considéré comme la meilleure option pour le traitement de première ligne chez les patients jeunes et en bonne santé porteurs de mutations IGHV et sans del17p (Eichhorst *et al.*, 2016), mais il n'est pas bien toléré par les patients âgés de plus de 65 ans ou par ceux présentant des comorbidités, principalement en raison d'effets secondaires tels que les infections. Une meilleure tolérance avec une efficacité comparable chez les patients âgés a été démontrée avec R-BENDA (Sharma & Rai, 2019).

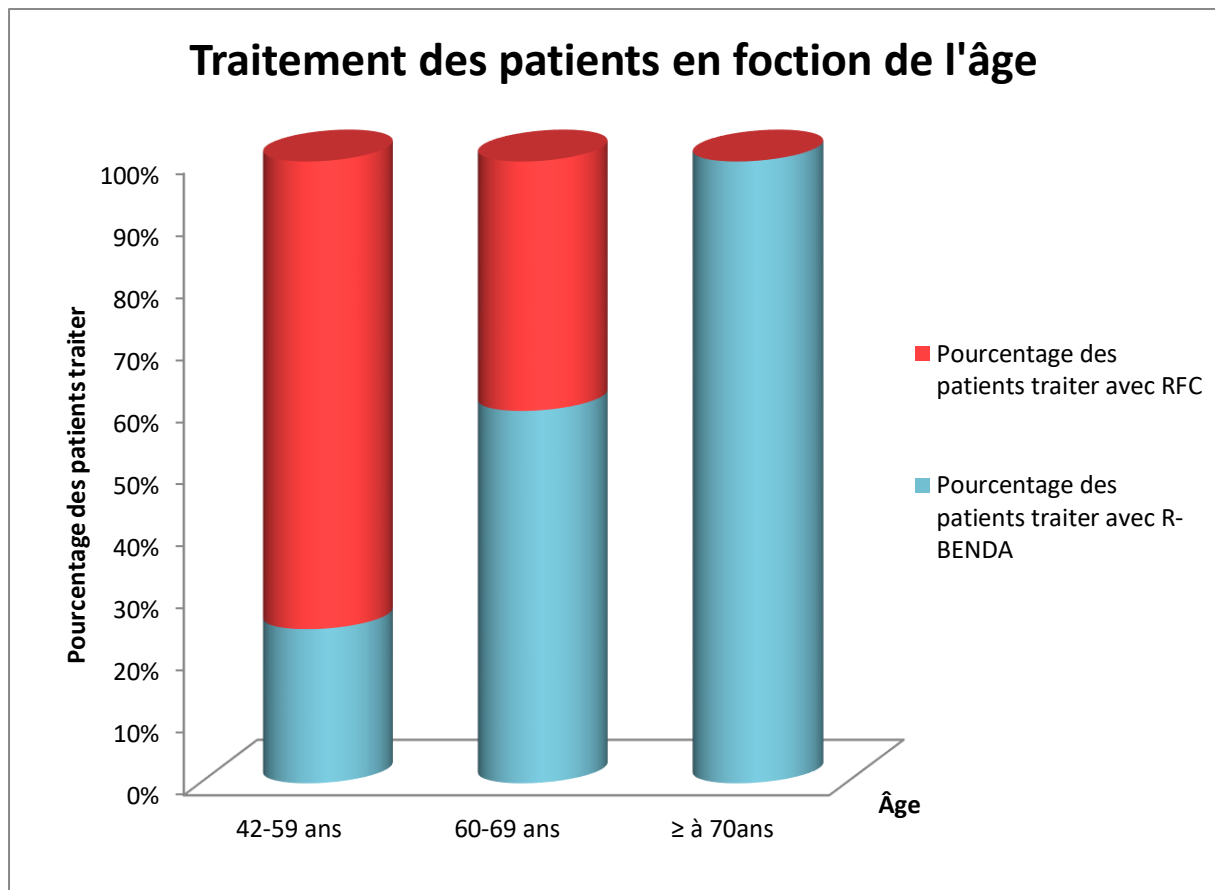


Figure 39: Répartition des patients LLC-B suivant le traitement suivi en fonction de leur âge.

2. Etude des paramètres biologiques de la LLC

2.1. Numérotation de la Formule Sanguine (NFS)

La formule d'un malade LLC montre une hyper-lymphocytose atteignant un pourcentage de 82%, une augmentation anormale des globules blancs, une diminution des globules rouges, d'hémoglobine ce qui indique que le malade souffre d'une anémie, et aussi une diminution progressive des plaquettes ce qui cause une thrombocytopénie (Voir la figure 40).

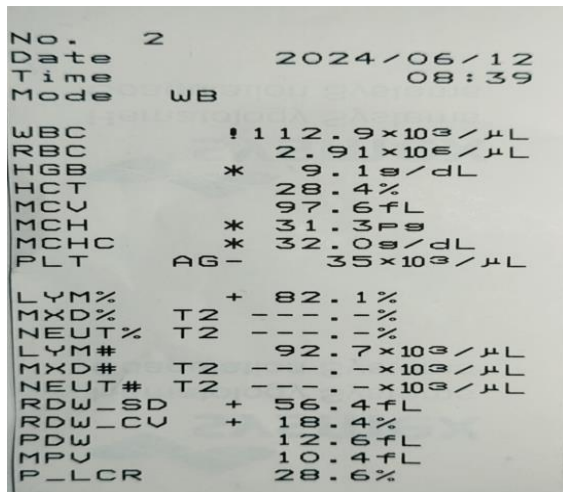


Figure 40: Résultat de la Numérotation de la formule sanguine d'un échantillon LLC.

2.2. Le frottis sanguin

Le frottis sanguin est un outil de diagnostic clé dans le cas de la LLC. Il révèle typiquement une lymphocytose, où une majorité des cellules présentes sont des lymphocytes matures, souvent petits avec des noyaux denses et peu de cytoplasme. Les ombres de Gumprecht sont également caractéristiques de cette maladie. Dans un frottis normal on observe une prédominance des PNN (Polynucléaires Neutrophiles) par rapport aux lymphocytes par contre dans un frottis de LLC, on observe une prédominance de la lignée lymphoïde par rapport à la lignée des granulocytes. Le frottis sanguin dans la LLC montre des caractéristiques communes à tous les stades, mais on peut observer que dans le stade A une lymphocytose sans anomalies significatives des globules rouges ou des plaquettes, au stade B, on observe une lymphocytose plus marquée et au stade C (Voir la figure 41), le frottis révèle souvent des signes d'anémie et de thrombopénie, indiquant une infiltration importante de la moelle osseuse où elle ne peut plus produire suffisamment des cellules sanguines normales, mais le frottis n'est pas suffisant pour distinguer entre les différents stades de la maladie car il est nécessaire de suivre les signes cliniques pour établir la classification de Binet ou de Rai, ainsi que le suivi de l'expression des différents marqueurs membranaires pour calculer le score de Matutes.

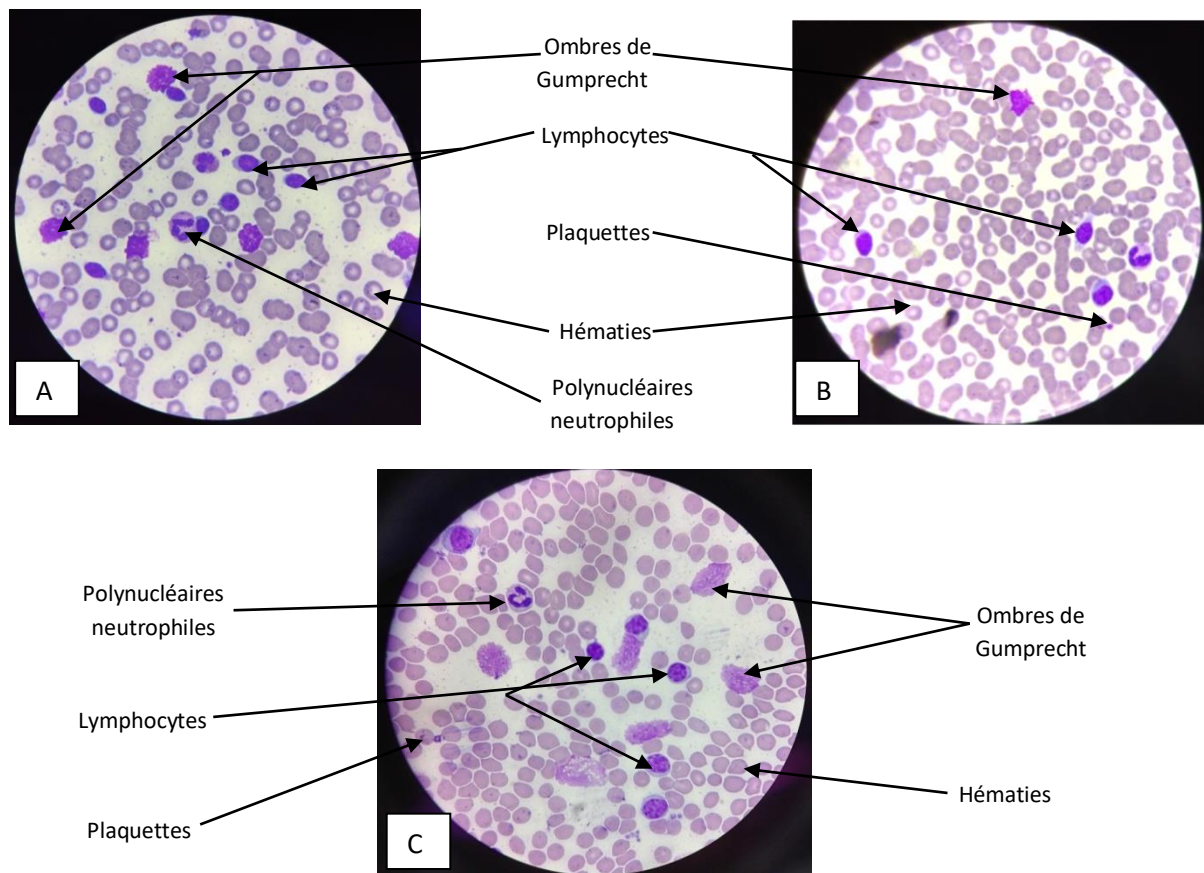


Figure 41: Observation microscopique du frottis sanguin coloré au MGG. Gx100. (A) patient de stade A, (B) patient de stade B, (C) patient de stade C.

2.3. Le Frottis médullaire

La moelle osseuse est le lieu de production des cellules sanguines, y compris les globules blancs, les globules rouges et les plaquettes, en examinant sa composition cellulaire on peut confirmer le diagnostic de la LLC, évaluer la progression de la maladie et surveiller la réponse aux traitements au fil du temps. Dans un frottis de moelle normale on observe une variété de cellules hématopoïétiques dans différents stades de maturation, ce qui donne un aspect polymorphe, en revanche, dans la LLC, elle présente souvent un aspect monomorphe, caractérisé par une prolifération excessive de la lignée lymphoïde. Dans la LLC en présence de thrombopénie, cette méthode est souvent utilisée pour savoir l'origine de cette sous-expression des plaquettes, en cherchant les Mégacaryocytes qui sont des cellules de la moelle osseuse responsable de la production des plaquettes, dans le cas de leurs absence, on dit que la cause de cette thrombopénie est la maladie de la LLC, dont la moelle osseuse est incapable de produire d'autre lignée car elle est pleine en lymphocytes, par contre si il y'a présence des Mégacaryocytes, on conclue que la cause de la thrombopénie est périphérique ou auto-

Chapitre IV : Résultats et discussion

immune (Voir la figure 42). Pour faire le diagnostic on utilise les valeurs normales de myélogramme (Voir le tableau VI).

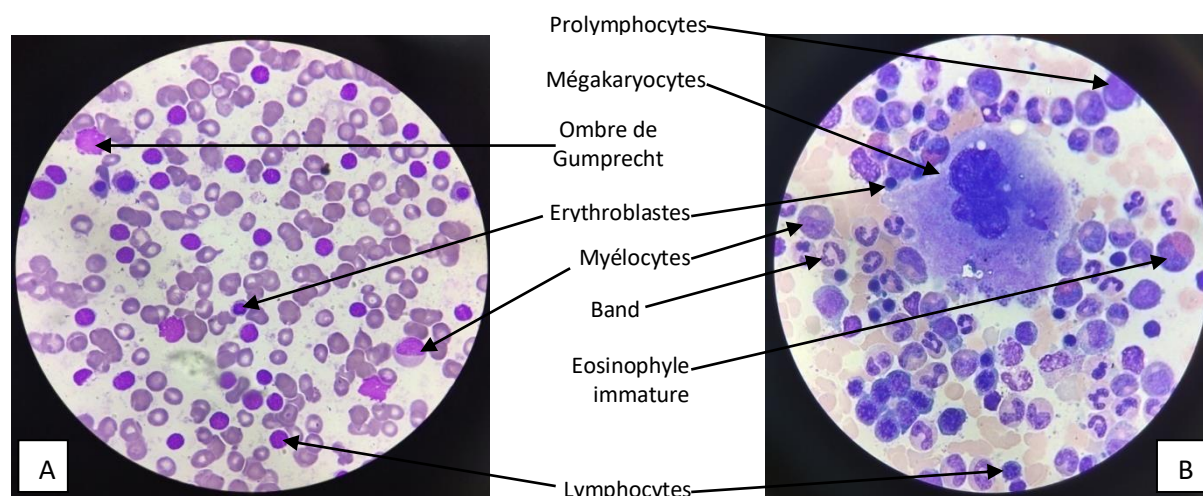


Figure 42: Observation microscopique d'un frottis médullaire de la moelle osseuse coloré au MGG. Gx40. (A) moelle osseuse d'un patient atteint de la LLC. (B) moelle osseuse d'un patient normal.

Tableau VI: valeurs normales d'un myélogramme (Frottis médullaire)

Richesse	Frottis riches
Mégacaryocytes	Normalement présents
Lignée granuleuse	60 à 70 %
Myéloblastes	0 à 2 %
Promyélocytes	1 à 4 %
Myélocytes neutrophiles	10 à 15 %
Myélocytes éosinophiles	0 à 1 %
Métamyélocytes neutrophiles	10 à 20 %
Métamyélocytes éosinophiles	0 à 1 %
Polynucléaires neutrophiles	15 à 25 %
Polynucléaires éosinophiles	0 à 1 %
Polynucléaires basophiles	0 à 1 %
Lignée érythroblastique	15 à 30 %
Proérythroblastes	0 à 2 %
Erythroblastes basophiles	1 à 3 %
Erythroblastes polychromatophiles	5 à 15 %
Erythroblastes acidophiles	5 à 10 %

Chapitre IV : Résultats et discussion

Autres cellules	
Lymphocytes	5 à 20 %
Plasmocytes	0 à 3 %
Monocytes	0 à 2 %

2.4. Isolement des cellules PBMC enrichi de LLC-B par la méthode de Ficoll

2.4.1. Observation microscopique des PBMC

L'observation des lymphocytes B sur le microscope optique de phase normale après l'isolement des PBMC par Ficoll a indiqué que le nombre des LB est plus élevé dans l'échantillon LLC par rapport à un échantillon normal, ce qui confirme le résultat de NFS et le frottis sanguin qui indiquent la présence de hyperlymphocyte.

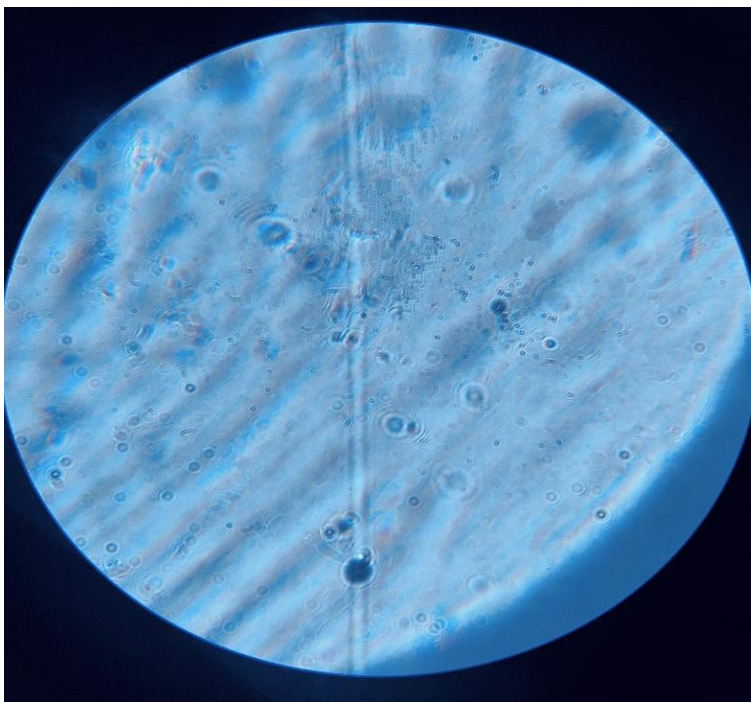


Figure 43: Observation microscopique sur la cellule de Nageotte des cellules PBMC isolées par Ficoll à partir d'un échantillon sain dilué 1/20 (grossissement X 40).

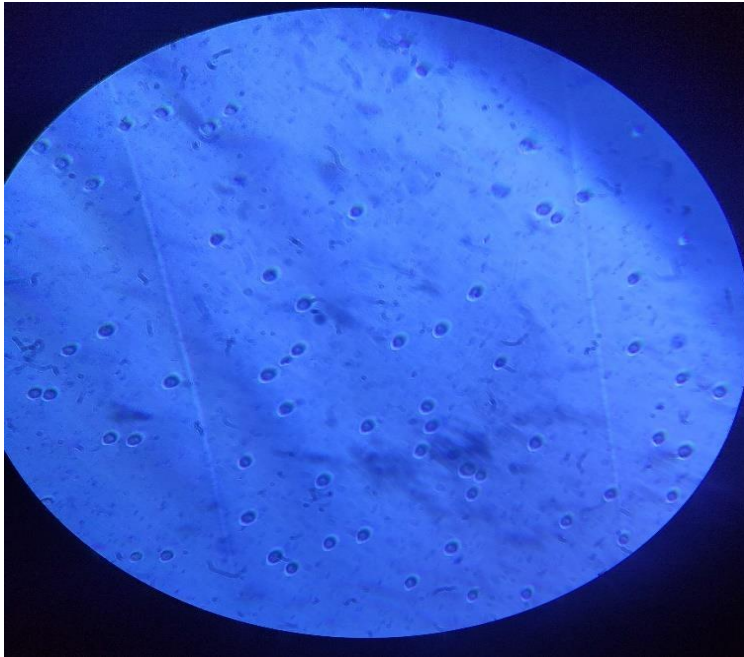


Figure 44: Observation microscopique sur cellule de Nageotte de PBMC isolées par Ficoll à partir d'un échantillon LLC dilué 1/100 (grossissement X40).

2.4.2. Numération des LLC-B viables sur cellule de Nageotte après coloration au Bleu de Trypan

Pour la numération des cellules PBMC, nous avons compté le nombre de cellules présentes dans 4 rectangles quadrillés de façon horizontale à partir duquel on a extrapolé le nombre de cellules par μl .

- **Nombre de cellules vivantes de l'échantillon de patient LLC-B à une dilution 1/100**

$$112+167+131+148= 558 \text{ Cellules}$$

$$558/5\mu\text{l} \approx 112 \text{ cellules } /\mu\text{l}$$

Pour calculer la concentration des cellules dans le tube stock des cellules :

$$\begin{aligned} \text{Concentration} &= 112 \text{ cellules} \times 100 \text{ (le facteur de dilution)} \times 2 \text{ (la dilution par bleu de trypan)} \\ &= 22400 \text{ cellules}/\mu\text{l} = 22,4 \times 10^6 \text{ cellules/ml} \end{aligned}$$

- **Nombre de cellules vivantes de l'échantillon sain à une dilution de 1/20**

$$51+29+59+52= 191$$

$$191/5\mu\text{l} \approx 38 \text{ cellules } /\mu\text{l}$$

$$\text{Concentration tube stock} = 38 \text{ cellules} \times 20 \text{ (le facteur de dilution)} \times 2 = 1520 \text{ cellules}/\mu\text{l}$$

$$\text{Donc } 1,52 \times 10^6 \text{ cellules/ml.}$$

Chapitre IV : Résultats et discussion

Tableau VII: Comparaison du nombre de cellules et concentration cellulaire des deux échantillons.

Patient	Nombre de cellule/mm ³	Concentration cellulaire cellule/mm ³	Concentration cellulaire (millions de cellules/ml)
Patient LLC	112	22,4x10 ³	22.4
Control sain	38	1.52x10 ³	1.52

2.5. Cytométrie en flux

Les résultats de la cytométrie de flux (CMF) montrent, dans le premier échantillon avec un marqueur CD38 positif (indicateur de prolifération), la présence d'une population de lymphocytes B matures (CD19+ / CD5+), avec un score de Matutes de 5 sur 5 indiquant une forte malignité. En revanche, dans le deuxième échantillon, où le marqueur CD38 est absent, le score de Matutes est de 4 sur 5.

Cette différence suggère que l'expression de CD38 pourrait être associée à une plus grande agressivité ou à une phase plus avancée de la prolifération des lymphocytes B malins.

Tableau VIII: Résultats du phénotypage de la LLC-B par cytométrie en flux.

ECHANTILLONS Marqueurs	Echantillon 1 Score de Matutes (5 /5) (CD38Positif)	Echantillon 2 Score de Matutes (4 /5) (CD38 Négatif)
CD5	Positif (91%)	Positif (86%)
CD23	Positif (40%)	Positif (68%)
CD79b	Faible intensité	Faible intensité
FMC7	Négatif	Positif
IgMs	Négatif	Négatif

Discussion et perspectives

La leucémie lymphoïde chronique B (LLC-B) est une pathologie hématologique complexe, due à une prolifération anarchique des lymphocytes B, elle est plus courante dans les pays occidentaux, elle touche principalement les personnes âgées de sexe masculin. Cette pathologie est diagnostiquée par NFS, confirmée et classée par l'immunophénotypage. Dans notre travail, nous avons réalisé une étude rétrospective de 31 patients de la période allant de 2022 jusqu'à 2024 suivi au niveau du service Hématologie et du site Casoral, nous avons constaté que l'âge moyen est de 64 ans, avec une prédominance masculine de 74,19%. La majorité des patients sont de stade C de Binet. Ces patients présentent de nombreuses complications associées à la LLC tel que les adénopathies et splénomégalies, ces complications témoignent de la sévérité de la LLC chez les patients de notre groupe. La majorité des patients possède un immunophénotypage typique de la LLC avec un score 5/5 sur l'échelle de Matutes. De plus, beaucoup de patients présentent une forte expression du marqueur CD38 synonyme d'un mauvais pronostic (51.6%). Ensuite, nous avons suivi la variation des caractéristiques morphologiques, cytologiques et immunophénotypiques des profils de 3 patients situés à différents stades de la maladie. La LLC est diagnostiqué par NFS lorsque le taux de lymphocytes est $> 5g/l$, et nous avons noté la forte présence d'anémie et de thrombocytopénie au niveau des patients avec LLC-B à stade avancée, le frottis sanguin est un outil qui confirme les résultats du NFS, dont il permet l'observation microscopique des lymphocytes B monoclonaux matures contenant un cytoplasme étroit et un noyau dense à chromatine partiellement agrégée ainsi que des ombres de Gumprecht. Le frottis médullaire de la moelle osseuse est réalisé pour savoir l'origine de la thrombopénie si elle est due à la maladie LLC ou une autre maladie comme l'auto-immunité. La cytométrie en flux est essentielle pour le diagnostic, elle permet la classification de la LLC. Concernant le traitement de la LLC utilisé au CHU Tizi Ouzou majoritairement c'est le FCR qui est indiqué aux sujets jeunes et R.Benda pour les personnes âgées. Dans cette étude, nous avons ensuite isolé les cellules PBMC des patients atteint de la LLC par gradient de densité avec le Ficoll, puis nous avons procéder à la réalisation d'une numération cellulaire et estimer la viabilité des cellules LLC in vitro, nous avons constaté une concentration élevée en PBMC chez les patients LLCs par apport aux sujets sains ce qui confirme qu'il y a une lymphocytose qui caractérise cette maladie. A la fin, nous avons purifié l'ADN génomique à partir de ces cellules leucémiques pour réaliser des analyses moléculaires.

La LLC-B est une anomalie complexe, dont la plupart des patients de sexe masculin d'âge moyen de 64 ans et stade C de Binet. Pour connaître d'avantage les caractéristiques des patients atteints de cette maladie, il faut s'intéresser à l'étude moléculaire tel que le séquençage de TP53, et faire des purifications de l'ADN pour l'étude cytogénétique et immunogénétique.

Références Bibliographiques

- Abraham, L., Wang, J. C., Bolger-Munro, M., & Gold, M. R. (2016). Structure, Function, and Spatial Organization of the B Cell Receptor. In M. J. H. Ratcliffe (Ed.), *Encyclopedia of Immunobiology* (pp. 40-54). Oxford: Academic Press.
- Abruzzo, L. V., Herling, C. D., Calin, G. A., Oakes, C., Barron, L. L., Banks, H. E., . . . Coombes, K. R. (2018). Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia expresses a unique set of activated and targetable pathways. *Haematologica*, 103(12), 2069.
- Asslaber, D., Wacht, N., Leisch, M., Qi, Y., Maeding, N., Hufnagl, C., . . . Hartmann, T. N. (2019). BIRC3 expression predicts CLL progression and defines treatment sensitivity via enhanced NF- κ B nuclear translocation. *Clinical Cancer Research*, 25(6), 1901-1912.
- Baba, Y., Pelayo, R., & Kincade, P. W. (2004). Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *TRENDS in Immunology*, 25(12), 645-649.
- Babin, L. I. (2019). *Etudes des translocations chromosomiques en utilisant les méthodes d'édition du génome: des mécanismes moléculaires à l'oncogénèse*. Université Paris-Saclay (ComUE).
- Balatti, V., Bottoni, A., Palamarchuk, A., Alder, H., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., . . . Croce, C. M. (2012). NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(2), 329-331.
- Balatti, V., Pekarky, Y., & Croce, C. M. (2015). Role of microRNA in chronic lymphocytic leukemia onset and progression. *Journal of hematology & oncology*, 8, 1-6.
- Baliakas, P., Iskas, M., Gardiner, A., Davis, Z., Plevova, K., Nguyen-Khac, F., . . . Mould, S. (2014). Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *American journal of hematology*, 89(3), 249-255.
- Baliakas, P., Jeromin, S., Iskas, M., Puiggros, A., Plevova, K., Nguyen-Khac, F., . . . Xochelli, A. (2019). Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 133(11), 1205-1216.
- Benjamini, O., Jain, P., Trinh, L., Qiao, W., Strom, S. S., Lerner, S., . . . Kantarjian, H. (2015). Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia who received frontline fludarabine, cyclophosphamide and rituximab therapy: distribution and clinical outcomes. *Leukemia & lymphoma*, 56(6), 1643-1650.
- Billard, C. (2014). Apoptosis inducers in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 5(2), 309.
- Binet, J., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguet, H., Goasguen, J., . . . Oberling, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48(1), 198-206.
- Borbet, T. C., Hines, M. J., & Koralov, S. B. (2021). MicroRNA regulation of B cell receptor signaling. *Immunological reviews*, 304(1), 111-125.
- Bosch, F., & Dalla-Favera, R. (2019). Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nature reviews Clinical oncology*, 16(11), 684-701.
- Böttcher, S., Ritgen, M., & Dreger, P. (2011). Allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia: lessons to be learned from minimal residual disease studies. *Blood reviews*, 25(2), 91-96.
- Broccard, N., & Durrer, A. (2005). Les leucémies de l'adulte. 23.
- Brudno, J. N., & Kochenderfer, J. N. (2019). Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. [Review]. *Blood Rev*, 34, 45-55.

- Buccheri, V., Barreto, W. G., Fogliatto, L. M., Capra, M., Marchiani, M., & Rocha, V. (2018). Prognostic and therapeutic stratification in CLL: focus on 17p deletion and p53 mutation. *Annals of hematology*, 97(12), 2269-2278.
- Burger, J. A. (2020). Treatment of chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 383(5), 460-473.
- Burger, J. A., & Chiorazzi, N. (2013). B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *TRENDS in Immunology*, 34(12), 592-601.
- Burger, J. A., & Wiestner, A. (2018). Targeting B cell receptor signalling in cancer: preclinical and clinical advances. *Nature Reviews Cancer*, 18(3), 148-167.
- Burgler, S. (2015). Role of CD38 expression in diagnosis and pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia and its potential as therapeutic target. *Critical Reviews™ in Immunology*, 35(5).
- Byrd, J. C., Brown, J. R., O'Brien, S., Barrientos, J. C., Kay, N. E., Reddy, N. M., . . . Jaeger, U. (2014). Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 371(3), 213-223.
- Byrd, J. C., Harrington, B., O'Brien, S., Jones, J. A., Schuh, A., Devereux, S., . . . Brown, J. R. (2016). Acalabrutinib (ACP-196) in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 374(4), 323-332.
- Calissano, C., Damle, R. N., Marsilio, S., Yan, X.-J., Yancopoulos, S., Hayes, G., . . . Sison, C. (2011). Intraclonal complexity in chronic lymphocytic leukemia: fractions enriched in recently born/divided and older/quiescent cells. *Molecular medicine*, 17, 1374-1382.
- Campo, E., Cymbalista, F., Ghia, P., Jäger, U., Pospisilova, S., Rosenquist, R., . . . Stilgenbauer, S. (2018). TP53 aberrations in chronic lymphocytic leukemia: an overview of the clinical implications of improved diagnostics. *haematologica*, 103(12), 1956.
- Carrington, E. M., Zhan, Y., Brady, J. L., Zhang, J.-G., Sutherland, R. M., Anstee, N. S., . . . Segal, D. (2017). Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death & Differentiation*, 24(5), 878-888.
- Chen, J., Sathiaselan, V., Moore, A., Tan, S., Chilamakuri, C. S. R., Roamio Franklin, V. N., . . . Warren, A. J. (2021). ZAP-70 constitutively regulates gene expression and protein synthesis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 137(26), 3629-3640.
- Cheng, S., Ma, J., Guo, A., Lu, P., Leonard, J., Coleman, M., . . . Wang, Y. (2014). BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*, 28(3), 649-657.
- Chiorazzi, N., Chen, S.-S., & Rai, K. R. (2021). Chronic lymphocytic leukemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 11(2), a035220.
- Codony, C., Crespo, M., Abrisqueta, P., Montserrat, E., & Bosch, F. (2009). Gene expression profiling in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 22(2), 211-222.
- Cosson, A. (2015). *Caractérisation d'anomalies cytogénétiques et moléculaires dans la leucémie lymphoïde chronique*. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
- Cramer, P., & Hallek, M. (2011). Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia—what do we need to know? *Nature reviews Clinical oncology*, 8(1), 38-47.
- Crombie, J., & Davids, M. S. (2017). IGHV mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *American journal of hematology*, 92(12), 1393-1397.
- Dali, N., Ait Ali, H., Tibiche, A., Belhadri, F., Harieche, F., Ahmed Nacer, R., Abad, M. (2015). Epidemiology and clinical features of chronic lymphoid leukemia. Review of

- the Algerian Chronic Lymphoid Leukemia Study Group: American Society of Hematology Washington, DC.
- Damm, F., Mylonas, E., Cosson, A., Yoshida, K., Della Valle, V., Mouly, E., . . . Chiba, K. (2014). Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer discovery*, 4(9), 1088-1101.
- Davids, M. S., Letai, A., & Brown, J. R. (2013). Overcoming stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia through BCL-2 inhibition. *Leukemia & lymphoma*, 54(8), 1823-1825.
- Davies, A., Berge, C., Boehnke, A., Dadabhoy, A., Lugtenburg, P., Rule, S., . . . Badoux, X. (2017). Subcutaneous rituximab for the treatment of B-cell hematologic malignancies: a review of the scientific rationale and clinical development. *Advances in Therapy*, 34, 2210-2231.
- Deaglio, S., Vaisitti, T., Serra, S., Audrito, V., Bologna, C., D'Arena, G., . . . Malavasi, F. (2011). CD38 in chronic lymphocytic leukemia: from bench to bedside? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(6), 503-507.
- Deans, J. P., & Polyak, M. J. (2008). FMC7 is an epitope of CD20. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(4), 2492-2492.
- Deglesne, P.-A., Chevallier, N., Letestu, R., Baran-Marszak, F., Beitar, T., Salanoubat, C., . . . Varin-Blank, N. (2006). Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer research*, 66(14), 7158-7166.
- Delgado, J., Nadeu, F., Colomer, D., & Campo, E. (2020). Chronic lymphocytic leukemia: from molecular pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Haematologica*, 105(9), 2205.
- Döhner, H., Weisdorf, D. J., & Bloomfield, C. D. (2015). Acute Myeloid Leukemia. [Review]. *N Engl J Med*, 373(12), 1136-1152.
- Ecker, S., Pancaldi, V., Rico, D., & Valencia, A. (2015). Higher gene expression variability in the more aggressive subtype of chronic lymphocytic leukemia. *Genome medicine*, 7, 1-12.
- Eichhorst, B., Fink, A. M., Bahlo, J., Busch, R., Kovacs, G., Maurer, C., . . . Hallek, M. (2016). First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. [Clinical Trial, Phase III Comparative Study Multicenter Study Randomized Controlled Trial]. *Lancet Oncol*, 17(7), 928-942.
- Engeroff, P., & Vogel, M. (2021). The role of CD23 in the regulation of allergic responses. *Allergy*, 76(7), 1981-1989.
- Espadinha, A.-S. (2016). *Identification de microARN impliqués dans la leucémogénèse*. Université de Bordeaux.
- Fabbri, G., & Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 16(3), 145-162.
- Falchi, L., Keating, M. J., Marom, E. M., Truong, M. T., Schlette, E. J., Sargent, R. L., . . . Jain, N. (2014). Correlation between FDG/PET, histology, characteristics, and survival in 332 patients with chronic lymphoid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123(18), 2783-2790.
- Ferrajoli, A., Shanafelt, T. D., Ivan, C., Shimizu, M., Rabe, K. G., Nouraei, N., . . . Rassenti, L. Z. (2013). Prognostic value of miR-155 in individuals with monoclonal B-cell lymphocytosis and patients with B chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 122(11), 1891-1899.

- Fischer, K., Al-Sawaf, O., Bahlo, J., Fink, A.-M., Tandon, M., Dixon, M., Samoylova, O. (2019). Venetoclax and obinutuzumab in patients with CLL and coexisting conditions. *New England Journal of Medicine*, 380(23), 2225-2236.
- Fukuda, T., Chen, L., Endo, T., Tang, L., Lu, D., Castro, J. E., . . . Prussak, C. E. (2008). Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 3047-3052.
- Furman, R. R., Sharman, J. P., Coutre, S. E., Cheson, B. D., Pagel, J. M., Hillmen, P., . . . Flinn, I. (2014). Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 370(11), 997-1007.
- García-Muñoz, R., Roldan Galiacho, V., & Llorente, L. (2012). Immunological aspects in chronic lymphocytic leukemia (CLL) development. *Annals of hematology*, 91, 981-996.
- Gattei, V., Bulian, P., Del Principe, M. I., Zucchetto, A., Maurillo, L., Buccisano, F., . . . Rossi, F. M. (2008). Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(2), 865-873.
- Gauthier, M. (2022). La leucémie lymphoïde chronique. *La Revue de Médecine Interne*, 43(6), 356-364.
- Goede, V., Fischer, K., Engelke, A., Schlag, R., Lepretre, S., Montero, L. F., . . . Hallek, M. (2015). *Obinutuzumab as frontline treatment of chronic lymphocytic leukemia: updated results of the CLL11 study*: Leukemia. 2015 Jul;29(7):1602-4. doi: 10.1038/leu.2015.14. Epub 2015 Jan 30.
- Gowda, A., & Byrd, J. C. (2006). Use of prognostic factors in risk stratification at diagnosis and time of treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Current opinion in hematology*, 13(4), 266-272.
- Grignano, E., Mekinian, A., Jachiet, V., Coppo, P., & Fain, O. (2017). Manifestations auto-immunes et inflammatoires des hémopathies lymphoïdes. *La Revue de Médecine Interne*, 38(6), 374-382.
- Hallek, M. (2019). Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *American journal of hematology*, 94(11), 1266-1287.
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., . . . Chiorazzi, N. (2018). iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 131(25), 2745-2760.
- Hampel, P. J., & Parikh, S. A. (2022). Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2022. *Blood cancer journal*, 12(11), 161.
- Härzschel, A., Zucchetto, A., Gattei, V., & Hartmann, T. N. (2020). VLA-4 expression and activation in B cell malignancies: functional and clinical aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2206.
- Heinig, K., Gätjen, M., Grau, M., Stache, V., Anagnostopoulos, I., Gerlach, K., . . . Lenz, P. (2014). Access to follicular dendritic cells is a pivotal step in murine chronic lymphocytic leukemia B-cell activation and proliferation. *Cancer discovery*, 4(12), 1448-1465.
- Hendriks, R. W., & Middendorp, S. (2004). The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *TRENDS in Immunology*, 25(5), 249-256.
- Hendriks, R. W., Yuvaraj, S., & Kil, L. P. (2014). Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nature Reviews Cancer*, 14(4), 219-232.
- Hoogeboom, R., van Kessel, K. P., Hochstenbach, F., Wormhoudt, T. A., Reinten, R. J., Wagner, K., . . . van Noesel, C. J. (2013). A mutated B cell chronic lymphocytic

- leukemia subset that recognizes and responds to fungi. *Journal of Experimental Medicine*, 210(1), 59-70.
- Iacovelli, S., Hug, E., Bennardo, S., Duehren-von Minden, M., Gobessi, S., Rinaldi, A., . . . Eckl-Dorna, J. (2015). Two types of BCR interactions are positively selected during leukemia development in the E μ -TCL1 transgenic mouse model of CLL. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(10), 1578-1588.
- Isidoro, L., Pires, P., Rito, L., & Cordeiro, G. (2014). Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient with chronic lymphocytic leukaemia treated with alemtuzumab. *Case Reports*, 2014, bcr2013201781.
- Jackson, H. J., Rafiq, S., & Brentjens, R. J. (2016). Driving CAR T-cells forward. *Nature reviews Clinical oncology*, 13(6), 370-383.
- Jaglowski, S. M., Ruppert, A. S., Heerema, N. A., Bingman, A., Flynn, J. M., Grever, M. R., . . . Byrd, J. C. (2012). Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology*, 159(1), 82-87.
- Jain, P., Kanagal-Shamanna, R., Wierda, W., Keating, M., Sarwari, N., Rozovski, U., . . . Estrov, Z. (2016). *Clinical and molecular characteristics of XPO1 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia*: Am J Hematol. 2016 Nov;91(11):E478-E479. doi: 10.1002/ajh.24496. Epub 2016 Aug 22.
- Jain, P., Nogueras Gonzalez, G. M., Kanagal-Shamanna, R., Rozovski, U., Sarwari, N., Tam, C., Luthra, R. (2018). The absolute percent deviation of IGHV mutation rather than a 98% cut-off predicts survival of chronic lymphocytic leukaemia patients treated with fludarabine, cyclophosphamide and rituximab. *British journal of haematology*, 180(1), 33-40.
- Jeon, Y.-W., & Cho, S.-G. (2016). Chronic lymphocytic leukemia: a clinical review including Korean cohorts. *The Korean journal of internal medicine*, 31(3), 433.
- Johansson, P., Eisele, L., Klein-Hitpass, L., Sellmann, L., Dührsen, U., Dürig, J., & Nüchel, H. (2010). Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia research*, 34(7), 892-898.
- Jurczak, W., Pluta, A., Wach, M., Lysak, D., Simkovic, M., Kriachok, I., Campbell, P. (2022). Acalabrutinib versus rituximab plus idelalisib or bendamustine in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia: ASCEND results at 4 years of follow-up: American Society of Clinical Oncology.
- Kashyap, D., Garg, V. K., & Goel, N. (2021). Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 125, 73-120.
- Kikushige, Y., Ishikawa, F., Miyamoto, T., Shima, T., Urata, S., Yoshimoto, G., . . . Eto, T. (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., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., Bhagat, G. (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.
- Knauf, W. U., Lissichkov, T., Aldaoud, A., Liberati, A., Loscertales, J., Herbrecht, R., Goranov, S. (2009). Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 27(26), 4378-4384.
- Kochenderfer, J. N., Wilson, W. H., Janik, J. E., Dudley, M. E., Stetler-Stevenson, M., Feldman, S. A., Lanier, B. J. (2010). Eradication of B-lineage cells and regression of lymphoma in a patient treated with autologous T cells genetically engineered to

- recognize CD19. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116(20), 4099-4102.
- Koehrer, S., & Burger, J. A. (2024). Chronic lymphocytic leukemia: disease biology. *Acta Haematol*, 147, 8-21.
- Kurosaki, T., Shinohara, H., & Baba, Y. (2009). B cell signaling and fate decision. *Annual review of immunology*, 28, 21-55.
- Lampson, B. L., Kasar, S. N., Matos, T. R., Morgan, E. A., Rassenti, L., Davids, M. S., Armand, P. (2016). Idelalisib given front-line for treatment of chronic lymphocytic leukemia causes frequent immune-mediated hepatotoxicity. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 128(2), 195-203.
- Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., Wang, L. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 152(4), 714-726.
- Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Böttcher, S. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, 526(7574), 525-530.
- Lanza, F., Maffini, E., Rondoni, M., Massari, E., Faini, A. C., & Malavasi, F. (2020). CD22 expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia: biological significance and implications for inotuzumab therapy in adults. *Cancers*, 12(2), 303.
- Lee, D. W., Gardner, R., Porter, D. L., Louis, C. U., Ahmed, N., Jensen, M., Mackall, C. L. (2014). Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 124(2), 188-195.
- Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Thompson, P., Basar, R., Kaplan, M. (2020). Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors. *New England Journal of Medicine*, 382(6), 545-553.
- Liu, Y., Wang, Y., Yang, J., Bi, Y., & Wang, H. (2018). ZAP-70 in chronic lymphocytic leukemia: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, 483, 82-88.
- López, C., Delgado, J., Costa, D., Conde, L., Ghita, G., Villamor, N., Arias, A. (2012). Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51(9), 881-889.
- Maity, P. C., Bilal, M., Koning, M. T., Young, M., van Bergen, C. A., Renna, V., Barendse, R. S. (2020). IGLV3-21* 01 is an inherited risk factor for CLL through the acquisition of a single-point mutation enabling autonomous BCR signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(8), 4320-4327.
- Makita, S., Imaizumi, K., Kurosawa, S., & Tobinai, K. (2019). Chimeric antigen receptor T-cell therapy for B-cell non-Hodgkin lymphoma: opportunities and challenges. *Drugs in Context*, 8.
- Marasca, R., Maffei, R., Martinelli, S., Fiorcari, S., Bulgarelli, J., Debbia, G., . . . Martinelli, S. (2013). Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematological oncology*, 31(2), 88-95.
- Mardani, R., Jafari Najaf Abadi, M. H., Motieian, M., Taghizadeh-Boroujeni, S., Bayat, A., Farsinezhad, A., Pourghadamyari, H. (2019). MicroRNA in leukemia: Tumor suppressors and oncogenes with prognostic potential. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 8465-8486.
- Marsilio, S., Khiabani, H., Fabbri, G., Vergani, S., Scuoppo, C., Montserrat, E., Rai, K. (2018). Somatic CLL mutations occur at multiple distinct hematopoietic maturation

- stages: documentation and cautionary note regarding cell fraction purity. *Leukemia*, 32(4), 1040-1043.
- Marti, G. E., Rawstron, A. C., Ghia, P., Hillmen, P., Houlston, R. S., Kay, N., Consortium, I. F. C. (2005). Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *British journal of haematology*, 130(3), 325-332.
- Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Houlihan, A., Que, T., & Catovsky, D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8(10), 1640-1645.
- McClanahan, F., Hanna, B., Miller, S., Clear, A. J., Lichter, P., Gribben, J. G., & Seiffert, M. (2015). PD-L1 checkpoint blockade prevents immune dysfunction and leukemia development in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 126(2), 203-211.
- Medina, K. L., Pongubala, J. M., Reddy, K. L., Lancki, D. W., DeKoter, R., Kieslinger, M., Singh, H. (2004). Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Developmental cell*, 7(4), 607-617.
- Mele, S., Devereux, S., Pepper, A. G., Infante, E., & Ridley, A. J. (2018). Calcium-RasGRP2-Rap1 signaling mediates CD38-induced migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood advances*, 2(13), 1551-1561.
- Merle-Béral, H. (2012). Diagnostic cytologique, histologique, phénotypique de la llc. 02.
- Mohr, A. (2016). *Caractérisation des lymphocytes B régulateurs dans la leucémie lymphoïde chronique*. Université de Bretagne occidentale-Brest.
- Moreau, E. J., Matutes, E., A'Hern, R. P., Morilla, A. M., Morilla, R. M., Owusu-Ankomah, K. A., Catovsky, D. (1997). Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American journal of clinical pathology*, 108(4), 378-382.
- Mraz, M., Chen, L., Rassenti, L. Z., Ghia, E. M., Li, H., Jepsen, K., . . . Kipps, T. J. (2014). miR-150 influences B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia by regulating expression of GAB1 and FOXP1. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 124(1), 84-95.
- Muggen, A., Pillai, S., Kil, L., Van Zelm, M., Van Dongen, J., Hendriks, R., & Langerak, A. (2015). Basal Ca²⁺ signaling is particularly increased in mutated chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 29(2), 321-328.
- Munir, T., Brown, J. R., O'Brien, S., Barrientos, J. C., Barr, P. M., Reddy, N. M., Jaeger, U. (2019). Final analysis from RESONATE: Up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *American journal of hematology*, 94(12), 1353-1363.
- Nasnas, P., Cerchione, C., Musuraca, G., Martinelli, G., & Ferrajoli, A. (2023). How I Manage Chronic Lymphocytic Leukemia. *Hematology Reports*, 15(3), 454-464.
- Nejak-Bowen, K. N., & Monga, S. P. S. (2015). Developmental Pathways in Liver Regeneration-I *Liver Regeneration* (pp. 77-101): Elsevier.
- Nemkov, T., D'Alessandro, A., & Reisz, J. A. (2019). Metabolic underpinnings of leukemia pathology and treatment. [Research Support, N I H , Extramural Research Support, Non-U S Gov't Review]. *Cancer Rep*, 2(2), 7.
- Nguyen-Khac, F., Balogh, Z., Chauzeix, J., Veronese, L., & Chapiro, E. (2023). Cytogenetics in the management of chronic lymphocytic leukemia: Guidelines from the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Current Research in Translational Medicine*, 71(4), 103410.

- Nguyen, P.-H., Fedorchenko, O., Rosen, N., Koch, M., Barthel, R., Winarski, T., Hallek, M. (2016). LYN kinase in the tumor microenvironment is essential for the progression of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer cell*, 30(4), 610-622.
- Niemann, C. U., Herman, S. E., Maric, I., Gomez-Rodriguez, J., Biancotto, A., Chang, B. Y., Calvo, K. R. (2016). Disruption of in vivo chronic lymphocytic leukemia tumor–microenvironment interactions by ibrutinib—findings from an investigator-initiated phase II study. *Clinical Cancer Research*, 22(7), 1572-1582.
- Niemann, C. U., & Wiestner, A. (2013). *B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.
- Nowakowski, G. S., Hoyer, J. D., Shanafelt, T. D., Zent, C. S., Call, T. G., Bone, N. D., . . . Jelinek, D. F. (2009). Percentage of smudge cells on routine blood smear predicts survival in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 27(11), 1844.
- Orlandi, E. M., Bernasconi, P., Pascutto, C., Giardini, I., Cavigliano, P. M., Boni, M., . . . Cazzola, M. (2013). Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematological oncology*, 31(3), 136-142.
- Packham, G., & Stevenson, F. K. (2005). Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 114(4), 441-449.
- Padaro, E., Layibo, Y., Kueviakoe, I. D. M., Agbétiafa, K., Magnang, H., Koudokpo, N. D. A., Vovor, A. [Characteristics of chronic lymphocytic leukemia in Togo]: Pan Afr Med J. 2019 Oct 11;34:84. eCollection 2019.
- Pedersen, I. M., Kitada, S., Leoni, L. M., Zapata, J. M., Karras, J. G., Tsukada, N., . . . Reed, J. C. (2002). Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(5), 1795-1801.
- Pierce, S. K., & Liu, W. (2010). The tipping points in the initiation of B cell signalling: how small changes make big differences. *Nature reviews immunology*, 10(11), 767-777.
- Ploumaki, I., Triantafyllou, E., Koumprentziotis, I.-A., Karampinos, K., Drougkas, K., Karavolias, I., Kotteas, E. A. (2023). Bcl-2 pathway inhibition in solid tumors: a review of clinical trials. *Clinical and Translational Oncology*, 25(6), 1554-1578.
- Porter, D. L., Hwang, W.-T., Frey, N. V., Lacey, S. F., Shaw, P. A., Loren, A. W., Gonzalez, V. (2015). Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Science translational medicine*, 7(303), 303ra139-303ra139.
- Pozzo, F., Bittolo, T., Tissino, E., Zucchetto, A., Bomben, R., Polcik, L., Gattei, V. (2022). Multiple mechanisms of NOTCH1 activation in chronic lymphocytic leukemia: NOTCH1 mutations and beyond. *Cancers*, 14(12), 2997.
- Puente, X. S., Beà, S., Valdés-Mas, R., Villamor, N., Gutiérrez-Abril, J., Martín-Subero, J. I., . . . Aymerich, M. (2015). Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 526(7574), 519-524.
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordóñez, G. R., Villamor, N., González-Díaz, M. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475(7354), 101-105.
- Puiggros, A., Blanco, G., & Espinet, B. (2014). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed research international*, 2014.
- Puiggros, A., Delgado, J., Rodriguez-Vicente, A., Collado, R., Aventín, A., Luño, E., Ardanaz, M. (2013). Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic

- lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *British journal of haematology*, 163(1), 47-54.
- Pulte, D., Redaniel, M. T., Bird, J., & Jeffreys, M. (2015). Survival for patients with chronic leukemias in the US and Britain: age-related disparities and changes in the early 21st century. *European journal of haematology*, 94(6), 540-545.
- Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordóñez, G. R., Jares, P., Bassaganyas, L., López-Otín, C. (2011). Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. [Research Support, Non-U S Gov't]. *Nat Genet*, 44(1), 47-52.
- Rai, K. R., Peterson, B. L., Appelbaum, F. R., Kolitz, J., Elias, L., Shepherd, L., Cheson, B. D. (2000). Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 343(24), 1750-1757.
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.
- Rampazzo, E., Bonaldi, L., Trentin, L., Visco, C., Keppel, S., Giunco, S., Giarretta, I. (2012). Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica*, 97(1), 56.
- Ramsay, A. G., Clear, A. J., Fatah, R., & Gribben, J. G. (2012). Multiple inhibitory ligands induce impaired T-cell immunologic synapse function in chronic lymphocytic leukemia that can be blocked with lenalidomide: establishing a reversible immune evasion mechanism in human cancer. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(7), 1412-1421.
- Rawstron, A. C. (2013). Monoclonal B cell lymphocytosis—what does it really mean? *Current hematologic malignancy reports*, 8, 52-59.
- Rawstron, A. C., Kreuzer, K. A., Soosapilla, A., Spacek, M., Stehlikova, O., Gambell, P., Arroz, M. (2018). Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 94(1), 121-128.
- Reed, J. C. (2003). Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer cell*, 3(1), 17-22.
- Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., Gerecitano, J. F., Seymour, J. F. (2016). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. [Clinical Trial, Phase I Multicenter Study Research Support, Non-U S Gov't]. *N Engl J Med*, 374(4), 311-322.
- Rodda, L. B., Bannard, O., Ludewig, B., Nagasawa, T., & Cyster, J. G. (2015). Phenotypic and morphological properties of germinal center dark zone Cxcl12-expressing reticular cells. *The Journal of Immunology*, 195(10), 4781-4791.
- Rodríguez, D., Bretones, G., Arango, J. R., Valdespino, V., Campo, E., Quesada, V., & Lopez-Otin, C. (2015). Molecular pathogenesis of CLL and its evolution. *International journal of hematology*, 101, 219-228.
- Roessner, P. M., & Seiffert, M. (2020). T-cells in chronic lymphocytic leukemia: guardians or drivers of disease? *Leukemia*, 34(8), 2012-2024.
- Roos-Weil, D., Nguyen-Khac, F., Chevret, S., Touzeau, C., Roux, C., Lejeune, J., Leprêtre, S. (2018). Mutational and cytogenetic analyses of 188 CLL patients with trisomy 12: A retrospective study from the French Innovative Leukemia Organization (FILO) working group. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 57(11), 533-540.

- Rosati, E., Baldoni, S., De Falco, F., Del Papa, B., Dorillo, E., Rompietti, C., Sportoletti, P. (2018). NOTCH1 aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Frontiers in Oncology*, 8, 229.
- Rossi, D., & Gaidano, G. (2016). The clinical implications of gene mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Cancer*, 114(8), 849-854.
- Rossi, D., Khiabanian, H., Spina, V., Ciardullo, C., Bruscaggin, A., Famà, R., De Paoli, L. (2014). Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123(14), 2139-2147.
- Rossi, D., Rasi, S., Spina, V., Bruscaggin, A., Monti, S., Ciardullo, C., . . . Bertoni, F. (2013). Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(8), 1403-1412.
- Rozovski, U., Calin, G. A., Setoyama, T., D'Abundo, L., Harris, D. M., Li, P., Faderl, S. (2013). Signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 regulates microRNA gene expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Molecular cancer*, 12, 1-6.
- Salem, D. A., & Stetler-Stevenson, M. (2019). Clinical flow-cytometric testing in chronic lymphocytic leukemia. *Immunophenotyping: Methods and Protocols*, 311-321.
- Sampath, D., Liu, C., Vasan, K., Sulda, M., Puduvali, V. K., Wierda, W. G., & Keating, M. J. (2012). Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(5), 1162-1172.
- Sánchez Suárez, M. D. M., Martín Roldán, A., Alarcón-Payer, C., Rodríguez-Gil, M. Á., Poquet-Jornet, J. E., Puerta Puerta, J. M., & Jiménez Morales, A. (2023). Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia in the Personalized Medicine Era. *Pharmaceutics*, 16(1), 55.
- Sandes, A. F., de Lourdes Chauffaille, M., Oliveira, C. R. M., Maekawa, Y., Tamashiro, N., Takao, T. T., Rizzatti, E. G. (2014). CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 86(2), 98-105.
- Sathe, A., & Cusick, J. K. (2020). Biochemistry, immunoglobulin M.
- Scarfò, L., Ferreri, A. J., & Ghia, P. (2016). Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 104, 169-182.
- Schatz, D. G., & Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V (D) J recombination. *Nature reviews immunology*, 11(4), 251-263.
- Schmid, V. K., & Hobeika, E. (2024). B cell receptor signaling and associated pathways in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Frontiers in Oncology*, 14.
- Sébahoun, G. (2005). *Hématologie clinique et biologique*: Wolters Kluwer France.
- Sellmann, L., de Beer, D., Bartels, M., Opalka, B., Nüchel, H., Dührsen, U., Küppers, R. (2011). Telomeres and prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *International journal of hematology*, 93, 74-82.
- Senichkin, V., Pervushin, N., Zuev, A., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. (2020). Targeting Bcl-2 family proteins: what, where, when? *Biochemistry (Moscow)*, 85, 1210-1226.
- Şentürk Yikilmaz, A., Akinci, S., Bakanay, Ş. M., Zengin, Z. B., & Dilek, İ. (2020). Is Cd11c and Fmc7 Negativity in Chronic Lymphocytic Leukemia Poor Prognostic? *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 36, 84-90.
- Shanafelt, T. D., Wang, X. V., Hanson, C. A., Palletta, E. M., O'Brien, S., Barrientos, J., Zhang, C. C. (2022). Long-term outcomes for ibrutinib–rituximab and chemoimmunotherapy in CLL: updated results of the E1912 trial. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 140(2), 112-120.

- Sharma, S., & Rai, K. R. (2019). Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. *Cancer*, 125(9), 1432-1440.
- Shuai, W., Lin, P., Strati, P., Patel, K. P., Routbort, M. J., Hu, S., Wang, W. (2020). Clinicopathological characterization of chronic lymphocytic leukemia with MYD88 mutations: L265P and non-L265P mutations are associated with different features. *Blood Cancer J*, 10(8), 020-00351.
- Skowronska, A., Parker, A., Ahmed, G., Oldreive, C., Davis, Z., Richards, S., Stankovic, T. (2012). Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. [Randomized Controlled Trial
- Research Support, Non-U S Gov't]. *J Clin Oncol*, 30(36), 4524-4532.
- Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Fairbrother, W. J. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature medicine*, 19(2), 202-208.
- Stephens, D. M., & Byrd, J. C. (2021). Resistance to Bruton tyrosine kinase inhibitors: the Achilles heel of their success story in lymphoid malignancies. [Case Reports Research Support, N I H , Extramural Research Support, Non-U S Gov't Review]. *Blood*, 138(13), 1099-1109.
- Stevenson, F., Wu, C., Croce, C., Packham, G., Wierda, W., Gribben, J., Kipps, T. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia.
- Stevenson, F. K., Krysov, S., Davies, A. J., Steele, A. J., & Packham, G. (2011). B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 118(16), 4313-4320.
- Stevenson, F., Wu, C., Croce, C., Packham, G., Wierda, W., Gribben, J., Kipps, T. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia.
- Stilgenbauer, S., Eichhorst, B., Schetelig, J., Coutre, S., Seymour, J. F., Munir, T., Wierda, W. G. (2016). Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. [Clinical Trial, Phase II Multicenter Study]. *Lancet Oncol*, 17(6), 768-778.
- Strasser, A., Cory, S., & Adams, J. M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO journal*, 30(18), 3667-3683.
- Suurs, F. V., Lub-de Hooge, M. N., de Vries, E. G., & de Groot, D. J. A. (2019). A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges. *Pharmacology & therapeutics*, 201, 103-119.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., . . . Zelenetz, A. D. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(20), 2375-2390.
- Talbot, H. (2018). *Résistance des lymphocytes B à la mort cellulaire au cours de la leucémie lymphoïde chronique: implications d'une neurotrophine, le BDNF, du récepteur de la neurotensine, NTSR2, et des " nurse-like cells"*. Université de Limoges.
- Tandon, B., Swerdlow, S. H., Hasserjian, R. P., Surti, U., & Gibson, S. E. (2015). Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: another neoplasm related to the B-cell follicle? *Leukemia & lymphoma*, 56(12), 3378-3386.
- Tantawy, S. I., Timofeeva, N., Sarkar, A., & Gandhi, V. (2023). Targeting MCL-1 protein to treat cancer: opportunities and challenges. *Frontiers in oncology*, 13.

- Troussard, X., Malet, M., & Cornet, E. (2011). Phase précoce de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et concept de lymphocytose B monoclonale (MBL). *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011(433), 47-53.
- Vaillant, A. A. J., Jamal, Z., Patel, P., & Ramphul, K. (2023). Immunoglobulin *StatPearls [Internet]*: StatPearls Publishing.
- Vale, A. M., & Schroeder Jr, H. W. (2010). Clinical consequences of defects in B-cell development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(4), 778-787.
- Van Bockstaele, F., Verhasselt, B., & Philippe, J. (2009). Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood reviews*, 23(1), 25-47.
- Van Dyke, D. L., Werner, L., Rassenti, L. Z., Neuberg, D., Ghia, E., Heerema, N. A., Greaves, A. W. (2016). The Dohner fluorescence in situ hybridization prognostic classification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL): the CLL Research Consortium experience. *British journal of haematology*, 173(1), 105-113.
- Vardi, A., Agathangelidis, A., Sutton, L.-A., Ghia, P., Rosenquist, R., & Stamatopoulos, K. (2014). Immunogenetic studies of chronic lymphocytic leukemia: revelations and speculations about ontogeny and clinical evolution. *Cancer research*, 74(16), 4211-4216.
- Véronèse, L., Tournilhac, O., Callanan, M., Prie, N., Kwiatkowski, F., Combes, P., Verrelle, P. (2013). Telomeres and chromosomal instability in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 27(2), 490-493.
- Visone, R., Veronese, A., Balatti, V., & Croce, C. M. (2012). MiR-181b: new perspective to evaluate disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*, 3(2), 195.
- Vroblova, V., Smolej, L., & Krejsek, J. (2012). Pitfalls and limitations of ZAP-70 detection in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*, 17(5), 268-274.
- Walker, J. A., & Smith, K. G. (2008). CD22: an inhibitory enigma. *Immunology*, 123(3), 314-325.
- Wan, Y., & Wu, C. J. (2013). SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(23), 4627-4634.
- Wang, Y.-H., Fan, L., Wang, L., Zhang, R., Zou, Z.-J., Fang, C., Xu, W. (2013). Expression levels of Lyn, Syk, PLC γ 2 and ERK in patients with chronic lymphocytic leukemia, and higher levels of Lyn are associated with a shorter treatment-free survival. *Leukemia & lymphoma*, 54(6), 1165-1170.
- Welinder, E., Åhsberg, J., & Sigvardsson, M. (2011). *B-lymphocyte commitment: identifying the point of no return*. Paper presented at the Seminars in immunology.
- Welner, R. S., Amabile, G., Bararia, D., Czibere, A., Yang, H., Zhang, H., Di Ruscio, A. (2015). Treatment of chronic myelogenous leukemia by blocking cytokine alterations found in normal stem and progenitor cells. *Cancer cell*, 27(5), 671-681.
- Woyach, J. A., Lozanski, G., Ruppert, A. S., Lozanski, A., Blum, K. A., Jones, J. A., Heerema, N. A. (2012). Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features. *Leukemia*, 26(6), 1442-1444.
- Woyach, J. A., Ruppert, A. S., Guinn, D., Lehman, A., Blachly, J. S., Lozanski, A., Jones, D. (2017). BTKC481S-mediated resistance to ibrutinib in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 35(13), 1437.
- Woyach, J. A., Ruppert, A. S., Heerema, N. A., Zhao, W., Booth, A. M., Ding, W., Rogers, K. (2021). Long-term results of alliance A041202 show continued advantage of Ibrutinib-based regimens compared with Bendamustine plus Rituximab (BR) chemoimmunotherapy. *Blood*, 138, 639.
- Wu, H.-J., & Bondada, S. (2002). Positive and negative roles of CD72 in B cell function. *Immunologic research*, 25, 155-166.

- Wu, J., Liu, C., Tsui, S. T., & Liu, D. (2016). Second-generation inhibitors of Bruton tyrosine kinase. *Journal of hematology & oncology*, 9, 1-7.
- Xiao, C., Srinivasan, L., Calado, D. P., Patterson, H. C., Zhang, B., Wang, J., Rajewsky, K. (2008). Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nature immunology*, 9(4), 405-414.
- Xu, W., Song, Y., Wang, T., Yang, S., Liu, L., Hu, Y., Ding, K. (2020). Updated results from the phase II study of orelabrutinib monotherapy in Chinese patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia/small cell leukemia. *Blood*, 136, 26-27.
- Yeh, C.-H., Moles, R., & Nicot, C. (2016). Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Molecular cancer*, 15, 1-16.
- Zauli, G., Voltan, R., di Iasio, M. G., Bosco, R., Melloni, E., Sana, M. E., & Secchiero, P. (2011). miR-34a induces the downregulation of both E2F1 and B-Myb oncogenes in leukemic cells. *Clinical Cancer Research*, 17(9), 2712-2724.
- Zhang, L., Liang, A., Zhang, W., Wang, H., & Wang, C. (2016). Bioinformatics analysis of gene expression profiles in chronic lymphocytic leukemia. *Int J Clin Exp Pathol*, 9(9), 9126-9137.
- Zhang, S., & Kipps, T. J. (2014). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 103-118.

Annexe

Annexe

Fiche d'exploration

Numéro du dossier

1. Données épidémiologique

Région.

Sexe.

Age.

Classification de Binet.

Score de Matutes.

2. Données cliniques

Signes cliniques

Splénomégalies	Oui	Non
Adénopathies	Oui	Non

Les facteurs pronostiques

CD38	Oui	Non
Délétion 17p	Oui	Non
Délétion 13q	Oui	Non

Les traitements

RFC	Oui	Non
R-Benda	Oui	Non

Annexe

3. Données biologiques

NFS.

Frottis sanguin.

Frottis médullaire.

Cytométrie en flux.

Isolement des PBMC par Ficoll.