



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE Abdelhamid Ibn Badis

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de biologie

Spécialité : génétique fondamentale et appliquée

Mémoire de fin d'études

Présentée par : **BELGACEM Nacéra**

BOUCIF Souhila

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Génétique fondamentale et appliquée

Thème

**LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE
(LLC)**

Président: **CHIBANI Abdewaheb** Professeur Université Mostaganem

Examinatrice : **Mr. BOUZNAD AHCEN** MCB Université Mostaganem

Promoteur : **Mr. GUEDOUAR Youcef** MCA Université Mostaganem

Année universitaire : 2020-2021



REMERCIEMENTS

Au terme de cette recherche, nous tenons à remercier sincèrement M. Guedouar Youcef notre directeur du mémoire pour nous avoir guidé et pour ses conseils et ses directives qu'il nous a fournis afin d'accomplir ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du jury qui ont accepté de lire et d'évaluer notre travail.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont pu m'aider, d'une manière ou d'une autre, à élaborer ce travail



Dédicaces

Je remercie Dieu Tout-Puissant de m'avoir donné l'opportunité de terminer ce projet de fin d'études." Je dédie cet humble travail :

À ma mère et à mon père.

Vos prières et vos bénédictions m'ont beaucoup aidé à terminer mes études. Je vous dédie ce travail en témoignage de mon amour profond .

À mon mari ISSAM

Je ne saurais exprimer ma profonde reconnaissance pour le soutien continu dont tu as toujours fait preuve. Tu m'as toujours encouragé, incité à faire de mon mieux, ton soutien m'a permis de réaliser le rêve tant attendu. .

À mes chères frères et sœurs

youcef ,benouda, amiro, shamess-EL-dine, naremin, halima, ahelm

À mes chers oncles

Racheid ,benouda, kamle,

À mes grand parents, et tout la famille Belgacem ,

Gazzoul, Hairche

Sans oublier mon binôme souhila Boucife et sa famille

Nacéra





Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, je dédie cette thèse de master à :

A ma tendre mère **Mousaoui Fatima** : tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études

A mon très cher père **Bousif Abderrazak** : aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et formation le long de ces années.

Pour les rois de ma âme et chaînés de soleil **Rania Ahlem, Mohamed cherif, Abderrahmane Anes.**

A MON FUTUR HOMME : SAMIR DOUDO

A ma grande sœur et ma binôme **Belgacem nacéra**

De cette mémoire : sa fait un grand plaisir de connaître vous depuis ces 5 ans. Ma chérie ce travail c'est le fruit de notre amitié.

A mes chères amies : **Naima, Fatima, Assia**

, **Fatima, Yassmina, Houria, Chaimaa,**

Yassmin, Marwa, Zwawia, Kaoutar.

Souhila



RESUME

La leucémie lymphoïde chronique est la leucémie la plus fréquente chez l'adulte en occident, avec une nette prédominance masculine .elle résulte d'une prolifération avec accumulation monoclonale maligne de lymphocytes B mature avec envahissement médullaire, sanguin et des autres organes hématopoïétiques . la maladie est liée autant à u défaut d'apoptose qu'à une prolifération excessive.

Ce travail est pour objectif, d'étudier la leucémie lymphoïde chronique LLC et les différentes méthodes de diagnostic en fonction des symptômes et les facteurs pronostiques.

L'importance de l'analyse cytogénétiques caryotype et la FISH pour la détection des différents anomalies chromosomiques pour classer les patients selon leur profil défavorable.

Étude aspect moléculaire de LLC et les anomalies chromosomiques en particulier la délétion 17p13 du gène P53.

Mots clé : LLC : leucémie lymphoïde chronique , FISH, Caryotype ,p53

Abstract

Chronic lymphoid leukemia is the most common leukemia in adults in the West, with a clear predominance of men. It results from proliferation with malignant monoclonal accumulation of mature B lymphocytes with invasion of the bone marrow, blood and other hematopoietic organs. the disease is linked as much to a lack of apoptosis as to excessive proliferation.

The objective of this work is to study CLL chronic lymphocytic leukemia and the different diagnostic methods based on symptoms and prognostic factors.

The importance of karyotype cytogenetic analysis and FISH for the detection of different chromosomal abnormalities to classify patients according to their unfavorable profile.

Study molecular aspect of LLC and chromosomal abnormalities in particular the 17p13 deletion of the P53 gene.

Keywords: LLC: chronic lymphocytic leukemia, FISH, Karyotype, p53

ملخص :

ابيضاض الدم الليمفاوي المزمن هو أكثر أنواع اللوكيميا شيوعاً بين البالغين في الغرب ، مع غلبة واضحة بين الرجال ، وينتج عن تكاثر الخلايا الليمفاوية البائية الخبيثة وحيدة النسيلة مع غزو نخاع العظام والدم والأعضاء المكونة للدم الأخرى. المرض مرتبط بنقص الاستماتة بقدر ما يرتبط بالانتشار المفرط.

الهدف من هذا العمل هو دراسة ابيضاض الدم الليمفاوي المزمن CLL وطرق التشخيص المختلفة بناءً على الأعراض وعوامل الإنذار.

أهمية التحليل الوراثي الخلوي للنمط النووي و FISH للكشف عن تشوهات الكروموسومات المختلفة لتصنيف المرضى وفقاً لمفهم الشخصي غير المواتي.

دراسة الجانب الجزيئي لـ LLC والتشوهات الكروموسومية على وجه الخصوص حذف p1317 من الجين P53.

الكلمات المفتاحية: LLC: ابيضاض الدم الليمفاوي المزمن ، FISH ، النمط النووي ، p53

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

CHAPITRE I

1. Généralité sur le sang	2
2. Moelle et hématopoïèse	2
2.1. Définition moelle	2
2.2. Définition hématopoïèse	3
2.2.1. Les compartiments de moelle osseuse hématopoïétique	3
2.3. Régulation de l'hématopoïèse	4
2.3.1. Régulation des leucocytes	4
2.3.2. Régulation des globules rouges	4
3. Généralité sur les leucémies	4
3.1. Différents types leucémies Lymphoblastique :	4
3.1.1. Leucémie aigüe Lymphoblastique LAL :	4
3.1.2. Leucémie lymphoïde chronique LLC:	5
4. Epidémiologie	5
4.1. Fréquence	5
4.2. Sexe /ratio	5
4.3. Age	5
5. Diagnostic	6
5.1. Diagnostic positif	6
5.1.1. Les circonstances de découverte	6
5.1.2. Les éléments du diagnostic	6
5.1.2.1. La numération formule sanguine met en évidence une hyper lymphocytose :	6
5.1.2.1. En cas de syndrome tumoral	6
5.2. Diagnostic différentiel	7
5.3. Diagnostic cytologique	7

6 .Symptôme.....	8
7. Traitement.....	9
7.1. Chimiothérapie	9
7.2. Radiothérapie	9
7.3. Chirurgie	9
7.4. Traitement de la LLC récidivante et réfractaire.....	9
7.4.1. Leucémie réfractaire.....	9
7.4.2. Leucémie récidivante.....	10
7.5. Effets secondaires de traitement	10
7.5.1. Effets secondaires courants.....	10
7.5.2. Effets à long terme et effets tardifs.....	10
7.6.Suivi après le traitement de la leucémie lymphoïde chronique.....	11

CHAPITRE I

8. Aspect morphologique de LLC	12
8.1. Lymphocytes LLC	12
8.2. Prolymphocytes	12
8.3. Lymphocytes présentant des noyaux encochés.....	13
8.4.Cellules lésées / ombres de Gumprecht.....	13
8.5. Formule érythrocytaire et réticulocytes.....	14
9. Aspect physiopathologique	15
9.1. Origine cellulaire de la LLC.....	15
9.2. Résistance à l'apoptose	16
9.2.1 Voies de l'apoptose	16
9.2.2. Apoptose chimio -induite	17
10. Facteur.....	18
10.1. Facteurs environnementaux.....	18
10.2. Facteurs héréditaires.....	18
11. Aspect moléculaire et anomalie chromosomique.....	18
11.1. Anomalies chromosomiques et Mutations	18
11.1. 2. Délétion 13q14	19
11.1. 3 Trisomie 12	20
11.1.4. Délétion 11q22-23	20
11.1.5. Délétion 17p13	20
11.2. Mutations	21
11.2.1. Mutation P53.....	21
11.2.1.1. Rôle de p53.....	22

11.2.1.1.1. Contrôle du cycle cellulaire	22
11.2.2.2. Inactivation de p53 au cours de la LLC	23
11.2.2.2.1. Au niveau génomique.....	23
11.2.2.2.2. Au niveau de l'ARN	24
11.2.2. Mutations du gène ATM	24
11.2.3. Mutations de SF3B1(SF3B1 Splicing factor 3b, subunit 1) :	25
11.3. Classification	26
11.3.1. Classification de Rai	26
11.3.2. Classification de Binet.....	26
11.3.3. Classification de Rossi.....	27
11.4. Marquer	28
11.4.1. IG VH.....	28
11.4.2. ZAP 70.....	28
11.4.3. CD49d	28
11.4.4. La Thymidine Kinase (TK).....	29
11.4.5. CD23 soluble	29
11.5. Les indicateur de l'analyse cytogénétique dans LLC.....	29
11.5.1. Caryotype	29
11.5.1.1. Avantage de caryotype.....	30
11.5.1.2. Inconvénient de caryotype.....	30
11.5.2. FISH.....	30
11.5.2.1. Avantage.....	31
11.5.2.2. Inconvénient.....	31
12. complications et Transformation	31
12.1. Transformations	31
13. Techniques d'analyses en biologie moléculaire.....	32
13.1. Matériels.....	32
13.2. Méthodes	33
13.2.1. Formule numérique sanguine	34
13.2.2. Réalisation du frottis sanguin.....	35
13.2.3. Technique de la cytométrie en flux.....	36
13.2.4. Les étapes de préparation de l'échantillon	36
13.2.5. Principe de caryotype et FISH.....	37
13.2.5.1. Principe de caryotype.....	37
13.2.5.2. Principe de FISH.....	37

Conclusion

Références

List abréviation

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATM Ataxia: telangiectasia mutated

BCL2L1: BCL2-like 1

BID BH3: interacting domain death agonist

BIRC3 : Baculoviral IAP repeat containing 3

CD: Cluster Differentiation.

CFU: ColonyForming Unit

DLEU2 : deleted in lymphocytic leukemia

EPO : erythropoietin

FAB : Franco-Americano-Britannique

FISH : hybridation in situ en fluorescence

Ig: antigène

Ig : immunoglobulines

IgD : L'immunoglobuline D

IgVH : Région variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines

IL-2 : interleukine 2

LA : Les leucémies aiguës

LAL : Leucémie aigüe lymphoblastique

LAM : La leucémie aigüe myéloblastique

LBDGC : lymphome B Diffus à Grandes

LDH : Lactico-déshydrogénase

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LT : La leucémie à tricholeucocytes

MBL: Monoclonal B-cellymphocytosis

MCL1 : Myeloid Cell Leukemia

mi-ARN : Micro AR

MO : Moelleuseuse

MYD88 : myeloid differentiation primary response gene 88,

NK ; natural killer

P53: tumor protein 53

SF3B1 : Splicing factor 3b, subunit 1

SNP : Single Nucléotidepolymorphisme

UTR : Untranslated Transcribed Region)

XPO1: Exportine 1

ZAP-70 : Zeta-associated protein-70

Liste des Tableaux :

Tableau 01 : Classification de Rai selon Rai.....	26
Tableau 02 : Classification de Rai modifiée selon scarfo.....	26
Tableau 03 : Classification de Binet selon Binet.....	27
Tableau 04 : Classification de Rossi selon Rossi.....	27
Tableau 05 : Matériels et produits chimique utilise pour les analyse de LLC.....	33
Tableau06 : Les différents types de prélèvements.....	34

Liste des Figures

Figure 01 :La moelle osseuse hématopoïétique.....	3
Figure 02 : LLC typique : frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa. Petit lymphocyte et ombre de Gumprecht grossissement x100.....	8
Figure 03 : Prolymphocytes.....	8
Figure 04 : lymphocyte LLC	12
Figure 05 : Noyau de structure marbrée.....	12
Figure 06 : prolymphocyte.....	12
Figure 07 : Noyau avec encoches.....	13
Figure 08 : Noyau avec entailles.....	13
Figure 09 : :zone appropriée.....	13
Figure 10 : zone trop mince.....	13
Figure 11 :Cellules lésées / ombres Gumprech.....	14
Figure 12 : Sphérocytes.....	14
Figure 13 : Origine cellulaire des lymphomes à cellules B.....	15
Figure 14 : Un modèle pour l'origine cellulaire de la LLC.....	16
Figure 15 : Représentation schématique des 2 voies de l'apoptose.....	17
Figure 16 : Structure du gène <i>TP53</i> et de la protéine p53.....	22
Figure 17 : Profil mutationnel de <i>TP53</i> au cours de la LLC données issues de la base de d IARC mise à jour en novembre 2012, version R16A/ Répartition des mutations exons et introns. B/ Types de mutations.....	24
Figure 18 : Diagnostic par caryotype Dél 17p(P53)	31
Figure 19 : Diagnostic par FISH Déli 17p (P53)	31
Figure 20 : La réalisation du frottis sanguin.....	35

INTRODUCTION

Introduction

Les leucémies sont des tumeurs qui se développent à partir des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et du système lymphatique. , **(Debod et al, 2008)**.

Les leucémies sont dites myéloïdes ou lymphocytaires selon la lignée atteinte et sont classées en deux catégories évolutives, aiguës ou chroniques, **(Swerdlow, 2016)**. La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une leucémie lymphoïde génétiquement hétérogène. Son origine est d'évolution très variable allant de la survie de quelques mois à plusieurs années.

Des nombreux facteurs sont à l'origine de la maladie : Facteurs génétiques et Facteurs environnementaux. Il existe de nombreuses mutations qui ont un rôle dans l'émergence de la LLC telles que : mutation de gène p53 et les anomalies chromosomiques :les délétions 13q14, la trisomie 12, la délétion 17p13.

Les analyses cytogénétiques détectent les anomalies chromosomiques de la leucémie lymphoïde chronique grâce à plusieurs examens réalisée dans le laboratoire de cytogénétique en utilisant les techniques conventionnelles (caryotype) et surtout moléculaire la FISH dans le but de révéler ces anomalies, **(Debod et al., 2008)**.

Notre travail est divisé en deux chapitres :

Chapitre I : étude bibliographique du sang et ces différents éléments.

Chapitre II : étude moléculaire de LLC et les différentes techniques d'analyses pour la détection de LLC.

CHAPITRE I

1. Généralité sur le sang

C'est un tissu vivant spécialisé d'origine mésenchymateuse, constitué d'un liquide, le plasma, dans lequel se trouvent en suspension des cellules : les globules rouges (ou hématies), les globules blancs (ou leucocytes) et les plaquettes (ou thrombocytes). Le plasma contient de nombreuses protéines aux fonctions multiples, anti-infectieuses (anticorps), antihémorragiques (facteurs de coagulation), hormones, ainsi que des médiateurs ou des produits du catabolisme, **(Laurent, 2001)**

Le sang irrigue tous les tissus et organes, et alimente donc directement ou indirectement toutes les cellules de l'organisme en remplissant ainsi diverses fonctions nécessaires à la vie :

45% de cellules (globules rouges, globules blancs et plaquettes).

55% de plasma (partie liquide).

Oncotique : assurée par le plasma (albumine et électrolytes).

Oxyphorique : assurée par les globules rouges (hémoglobine).

Hémostase : assurée par la paroi vasculaire et les plaquettes sanguines (facteurs) .

Plasmatiques : de la coagulation et molécules d'adhésion cellulaires.

Défense de l'hôte : assurée par le système immunitaire, spécifique et non spécifique (les mononucléaires-macrophages, granulocytes, lymphocytes et immunoglobulines), **(Ferrant, 2004)**.

La pathologie hématologique englobe aussi une importante partie néoplasique (les leucémies, lymphomes et myélomes) où la symptomatologie clinique est marquée par un syndrome anémique, infectieux, hémorragique ou les trois réunis, avec ou non une ou plusieurs organomégalie de la rate, des ganglions et du foie, **(Ferrant , 2004)**.

2. Moelle et hématopoïèse

2.1. Définition moelle

La moelle osseuse (MO) est une substance qui se trouve à l'intérieur des os. est un organe ayant un poids compris entre 1,6kg et 3 kg chez l'adulte,**(Dadoune JP, 1990)** .Une partie de la MO, dite moelle rouge ou tissu hématopoïétique, produit les différentes cellules du sang à partir des cellules souches hématopoïétiques qui la constituent. Ce processus est appelé hématopoïèse. Chez l'adulte, cette moelle rouge est essentiellement située dans les os courts et plats comme ceux de la colonne vertébrale, du crâne, des côtes, du sternum et du bassin.

2.2. Définition hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes de différenciation et de maturation cellulaire qui aboutit à la formation des cellules sanguines , elle assure le remplacement continu de différentes cellules sanguines où il y aura un renouvellement de 1 % des hématies , 10 % des plaquettes et la totalité des granulocytes, elle s'effectue donc à partir de cellules souches indifférenciées dont certaines d'entre elles vont se différencier pour générer les diverses lignées . Donc c'est un processus physiologique permet la production des globules rouges, blancs et plaquettes,(Benosman, 2010).

2.2.1.Les compartiments de moelle osseuse hématopoïétique

Le compartiment de différenciation : il est occupé par 106 à 107 cellules Souches dites totipotentes capables d'auto-renouvellement qui sont à l'origine des cellules souches primitives ou CFU (ColonyForming Unit) c'est à dire capables de s'auto renouveler et de se différencier vers toutes les lignées hématopoïétiques Fig. 1 , (Maëlle. 2011).

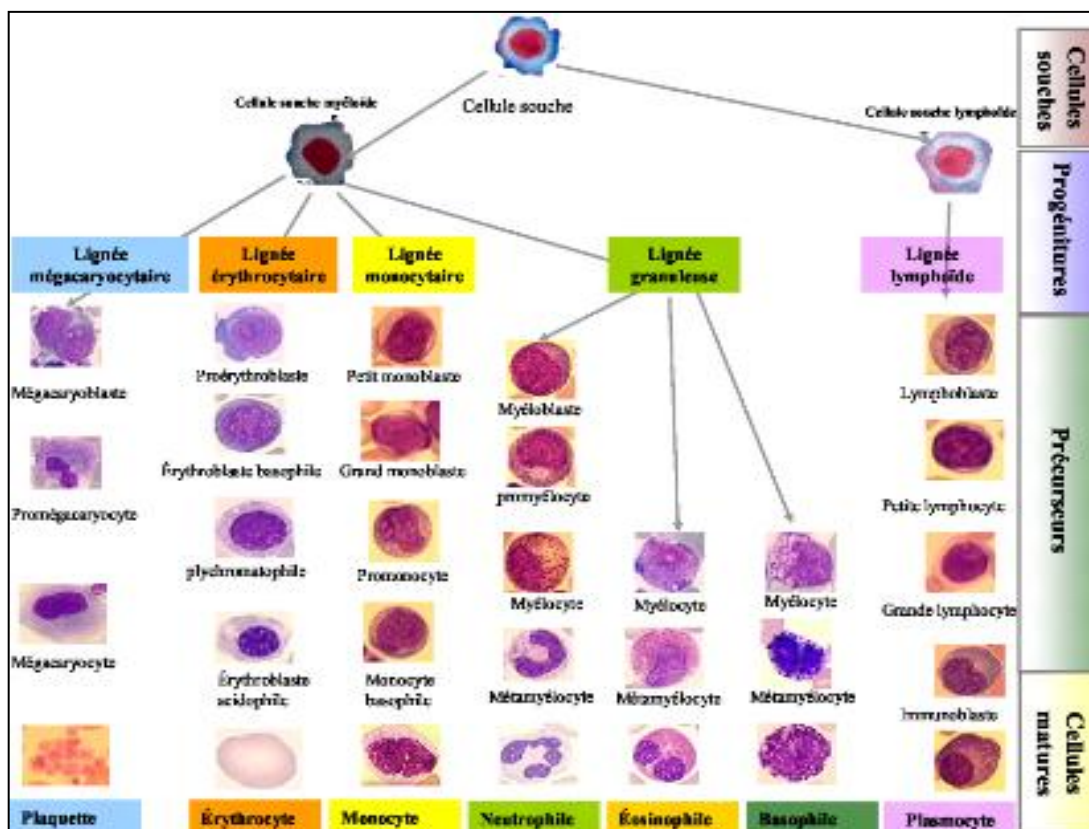


Figure 1 : La moelle osseuse hématopoïétique (Tyler et al , 2000).

Le compartiment des progénitures contenant des cellules progénitrices déterminées pour une lignée, capables de proliférer en se différenciant sous l'effet de facteurs de croissance. Le compartiment de maturation dans lequel se trouvent les précurseurs, premières cellules morphologiquement

reconnaissables au sein de chaque lignée. A la fin de ce processus, les cellules traversent la barrière médullaire et se retrouvent dans la circulation sanguine, (**Maëlle ,2011**).

2.3. Régulation de l'hématopoïèse

2.3.1. Régulation des leucocytes

Les facteurs de stimulation des colonies sont capables d'activer les colonies de leucocytes en culture comme les cytokines produites par les cellules endothéliales, les fibroblastes de la MO et les globules blancs régulent la production et le développement des leucocytes, (**Dee Unglaub, 2007**).

2.3.2. Régulation des globules rouges

La production des globules rouges (érythropoïèse) est contrôlée par l'érythropoïétine (EPO) qui est une glycoprotéine produite par les reins. L'essentiel stimulateur d'EPO est hypoxie tels quelle induit la production d'un facteur de transcription (facteur 1 induit par l'hypoxie) qui active le gène codant pour la fabrication de l'EPO pour contribuer à l'hémostase en stimulant la production de globules rouges, l'augmentation de l'hémoglobine et de la capacité de transporter l'oxygène par le sang. Néanmoins le TNF alpha inhibe la croissance des CFU-E et l'INF gamma bloque les précurseurs érythroblastiques en favorisant tous les deux l'apoptose des globules rouges, (**Dee Unglaub. 2007**).

3. Généralité sur les leucémies

La leucémie ou leucose est un type de cancer du sang qui prend naissance dans la MO. Cela entraîne la fabrication incontrôlée par l'organisme d'un trop grand nombre de globules blancs qui affaiblit le système immunitaire et cause une croissance anarchique des globules blancs qui n'auront pas assez de temps pour se développer. Ces cellules immatures (blastes) ne fonctionneront pas bien avec les interférons produits par d'autres globules blancs, et deviennent cancéreuses et ne peuvent plus se spécialiser, (**Lanz , 2011**).

3.1. Différents types leucémies Lymphoblastique :

3.1.1. Leucémie aigüe Lymphoblastique LAL :

La leucémie aigüe Lymphoblastique (LAL), une affection hématologique maligne due à une prolifération clonale de progénitures lymphoïdes malignes transformées. La sélection du clone malin résulte d'un blocage de différenciation de la progéniture lymphoïde, puis d'un accroissement de ses capacités de survie et de prolifération cellulaire (**SFH-commission pédagogique**).

La classification actuelle de l'OMS, (**Jaffe ES et al, 2001**). Distingue deux entités diagnostiques : la LAL à précurseur B et la LAL à précurseur T, chaque entité comprenant un large spectre de formes cliniques, morphologiques, immun- phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires.

3.1.2. Leucémie lymphoïde chronique LLC:

Les premières recherches sur les leucémies datent du XIX^e siècle. La leucémie lymphoïde a été individualisée grâce aux colorations cytologiques d'Ehrlich au sein des leucémies chroniques vers 1880. La leucémie lymphoïde (aussi appelée leucémie Lymphoblastique) Les cellules souches lymphoïdes se transforment normalement en lymphocytes, un type de globule blanc. Les lymphocytes se trouvent dans le sang et différentes parties du système lymphatique, comme les ganglions lymphatiques et la rate. Les 3 types de lymphocytes sont les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules tueuses naturelles.

Les lymphocytes aident à combattre les infections et à détruire les cellules anormales. Dans 95 % des cas de LLC, ces cellules souches anormales se transforment en lymphocytes B cancéreux. La LLC est l'un des types les plus courants de leucémie chez l'adulte. Elle est très rare chez l'enfant. (Travade P et al, 2000).

4. Epidémiologie

4.1. Fréquence

La fréquence de la LLC est variable selon les régions. Elle est surtout observée en Australie, en Amérique du Nord et en Europe. Elle est rare en Asie et en Amérique du Sud, (Redaelli et al, 2004).

C'est la plus fréquente des leucémies dans les pays occidentaux, où elle représente 22% à 30% de toutes les leucémies de l'adulte, (Redaelli et al, 2004). Une étude épidémiologique en France, sur les hémopathies malignes en Basse-Normandie, montre sur plus de 5000 cas une fréquence de 11.7% pour la LLC, soit $2,84 \pm 0,24$ pour 100 000 habitants. Aux Etats-Unis en 2008, la LLC représentait environ 11% de tous les néoplasies hématologiques et 34% de toutes les leucémies, avec une fréquence de 4.2 pour 100 000 habitants,

4.2. Sexe /ratio

La LLC est plus fréquente chez l'homme (environ 1.4 à 2.0 hommes pour une femme) Les (Troussard. et al, 2009). études épidémiologiques nationales françaises montrent par ailleurs une augmentation annuelle des taux de fréquence de la LLC chez l'homme et chez la femme entre 1980 et 2005, de 0.6% et 1.2% respectivement.

4.3. Age

La LLC est essentiellement une maladie du sujet âgé, qui prédomine après 60 ans (83% des patients), (Troussard. et al, 2009). L'âge moyen des patients au diagnostic est de 70 ans d'après une

étude française et de 72 ans dans une étude américaine qui rapporte environ 10% de patients de moins de 55 ans . Les données américaines montrent une augmentation du nombre de LLC.

5. Diagnostic

Le diagnostic de LLC se fait dans plus de 80% des cas de manière fortuite, devant une lymphocytose anormale sur la numération formule sanguine chez un patient asymptomatique. Dans de plus rares cas, le patient peut présenter dès le diagnostic des signes évocateurs des adénopathies périphériques, une splénomégalie, une anémie et/ou une thrombopénie. En outre, il existe plusieurs méthodes de diagnostic différentes, (**campus hématologie ,2007**).

5.1. Diagnostic positif

Survenant généralement après 50 ans, le début est souvent insidieux :

5.1.1. Les circonstances de découverte

1/ La numération formule sanguine systématique est la circonstance de découverte la plus fréquente: elle objective une hyperlymphocytose.

2/ Le syndrome tumoral (inconstant) : poly adénopathies, splénomégalie (rarement isolée).

3/ Une complication infectieuse révélatrice : zona, pneumopathie récidivante.

4/ Plus rarement les conséquences d'une cytopénie : anémie, thrombopénie, (**campus hématologie ,2007**).

5.1.2. Les éléments du diagnostic

5.1.2.1. La numération formule sanguine met en évidence une hyper lymphocytose :

Elle est suffisante pour évoquer fortement le diagnostic dans la majorité des cas. Elle montre une hyper lymphocytose le plus souvent isolée, d'importance variable (parfois très élevée), toujours supérieure à 4 G/L, persistant sur plusieurs examens au delà de 6-8 semaines.

Les lymphocytes sont le plus souvent de morphologie normale et monomorphes sur le frottis de sang.

Les autres lignées sont normales, en dehors d'une complication (hémoglobine < 120 g/L dans 25% des cas et < 100 g/L dans 10% des cas, thrombopénie < 100 G/L dans 5-10% des cas),

5.1.2.1. En cas de syndrome tumoral

La ponction et la biopsie ganglionnaire ne sont pas utiles au diagnostic. Souvent absent au début de la maladie, le syndrome tumoral est la conséquence d'une infiltration lymphocytaire diffuse pouvant toucher tous les organes. Il se manifeste principalement par des poly adénopathies

superficielles, symétriques, non compressives, fermes et indolores. Touchant toutes les aires ganglionnaires, avec ou sans splénomégalie, et plus rarement une hépatomégalie.

5.2. Diagnostic différentiel

Chez un adulte, toute hyperlymphocytose sanguine doit être contrôlée. Persistante au delà de 6-8 semaines, elle évoque en premier lieu une leucémie lymphoïde chronique. L'examen morphologique des lymphocytes sur le frottis sanguin et l'immunophénotypage permettront d'éliminer les autres syndromes lymphoprolifératifs, correspondant souvent à la dissémination sanguine de lymphomes non hodgkiniens, (**campus hématologie ,2007**).

5.3. Diagnostic cytologique

La LLC se définit par l'existence d'une lymphocytose supérieure à 5×10^9 G /l qui doit exister depuis plusieurs mois. En moyenne, la lymphocytose est variable autour de 30×10^9 /l mais elle peut atteindre des chiffres beaucoup plus élevés. L'aspect cytologique des lymphocytes pathologiques est très proche de celui des lymphocytes normaux avec parfois quelques atypies. Le plus souvent il s'agit d'un lymphocyte mature avec un cytoplasme peu étendu, un noyau arrondi et une chromatine mottée. Classiquement on décrit, à côté de ces cellules, des noyaux nus appelés « ombres deGumprecht » qui correspondent à des cellules altérées vraisemblablement par l'apoptose liée à la réalisation du frottis et qui sont très évocatrices du diagnostic de LLC. On peut retrouver des cellules de plus grande taille avec un cytoplasme basophile et une chromatine plus fine, parfois nucléolée. Il peut aussi exister des cellules lymphoïdes de taille moyenne, à chromatine relativement mottée contenant un nucléole unique central qui correspondent à des Prolymphocytes). Dans une LLC **Fig. 2** de morphologie typique, l'ensemble de ces cellules anormales ne doit pas représenter plus de 10 % de la population lymphoïde. Lorsque le taux de Prolymphocytes **Fig. 3** représente plus de 55 % des lymphocytes totaux, il s'agit d'une leucémie pro lymphocytaire (LPL) ; une forme mixte LLC/ LPL se définit par un pourcentage intermédiaire de Prolymphocytes, compris entre 10 et 55 %.

Une anémie et / ou une thrombopénie peuvent accompagner l'hyperlymphocytose dès le diagnostic, définissant des formes plus graves de la maladie (stade C), (**Matutes. E et al ,2010**).

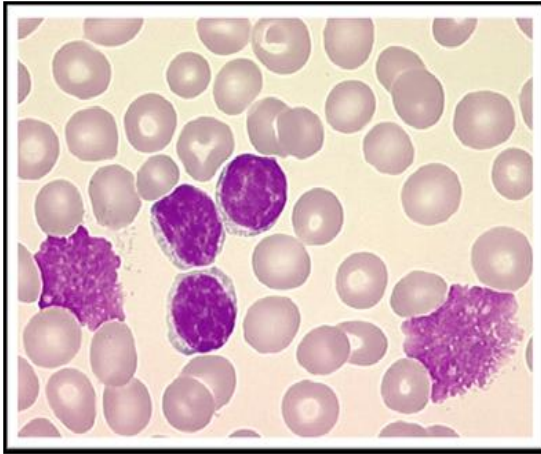


Figure 2: LLC typique : frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa. Petits lymphocytes et ombres de Gumprecht grossissement x100

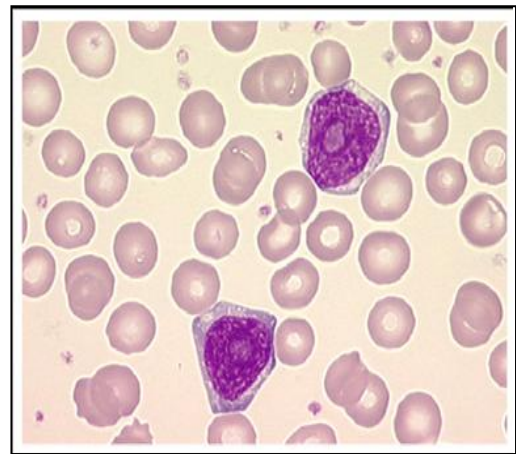


Figure 3 : Prolymphocytes

6 .Symptôme

À un stade précoce de la LLC, la plupart des patients sont asymptomatiques et la maladie n'est diagnostiquée que lorsqu'une élévation de la numération des globules blancs est mise en évidence. Les symptômes plus tardifs peuvent comprendre.

- Ganglions lymphatiques hypertrophiés.
- Fatigue.
- Perte d'appétit.
- Perte de poids.
- Sueurs nocturnes.
- Essoufflement lors d'une activité physique.
- Une sensation de lourdeur abdominale résultant d'une hypertrophie de la rate.

Lors de la progression de la LLC, la personne peut être pâle et présenter une tendance accrue aux ecchymoses. Les infections bactériennes, virales et fongiques ne sont généralement observées qu'en phase tardive de la maladie.

7. Traitement

7.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement qui utilise des médicaments pour tuer ou endommager les cellules cancéreuses. Ces médicaments sont administrés par voie orale ou intraveineuse. Souvent, deux médicaments ou plus sont combinés pour rendre le traitement plus efficace, selon la tolérance de la personne. Les agents chimio thérapeutiques suivants peuvent être employés seuls ou associés :

- bendamustine (Treanda).
- fludarabine (Fludara)
- cladribine (Leustatin)
- chlorambucil (Leukeran),(Dr versha .B *et al* , 2020) .

7.2. Radiothérapie

Ce traitement tue les cellules cancéreuses en utilisant des rayons à haute énergie tels que les rayons X. Si vous avez une hypertrophie des nœuds lymphoïdes ou d'autres organes, la radiothérapie pourrait faire partie de votre plan de traitement. Toutefois, il est rare quela LLC soit traitée par radiothérapie, (Dr versha .B *et al*,2020)

7.3. Chirurgie

On peut vous proposer une chirurgie pour enlever la rate (splénectomie). Elle peut accroître le nombre de globules rouges ou de plaquettes. Elle peut aussi soulager l'inconfort quand une rate enflée exerce une pression sur d'autres organes, (Dr versha .B *et al*, 2020).

7.4. Traitement de la LLC récidivante et réfractaire

7.4.1. Leucémie réfractaire

On appelle leucémie réfractaire une LLC qui n'entre pas en rémission (mais qui peut être stable) ou qui s'aggrave au cours des six mois suivant le dernier traitement. La plupart des patients traités pour une LLC réfractaire bénéficient souvent de longues périodes de rémission après le traitement supplémentaire. Certains types de LLC sont résistants au traitement courant de chimiothérapie, notamment :

- les patients dont la maladie a évolué rapidement malgré le traitement;
- ceux qui présentent une délétion dans le bras court du chromosome 17 (17p-).

Les patients qui font partie d'une de ces deux catégories pourraient se voir recommander de participer à un essai clinique. De nouvelles pharmacothérapies ou la greffe de cellules souches pourraient être des options à considérer, (**Dr spencer.Get al,2017**).

7.4.2. Leucémie récidivante

On appelle « leucémie récidivante » une LLC qui a répondu au traitement mais qui cesse d'y répondre après six mois ou plus. Le traitement pour la LLC récidivante est généralement le même que pour le traitement des patients au diagnostic récent. Après un traitement supplémentaire, la plupart des personnes traitées pour une LLC récidivante bénéficient de longues périodes de rémission,(**Dr spencer.G et al, 2017**).

7.5. Effets secondaires de traitement

Le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) occasionne parfois des effets secondaires courants et long terme (**Dr spencer.Get al, 2017**).

7.5.1. Effets secondaires courants

Les médicaments utilisés pour la chimiothérapie sont les principaux coupables des effets secondaires indésirables. Ces médicaments tuent les cellules cancéreuses, mais peuvent aussi endommager les cellules normales. Les muqueuses qui tapissent la bouche, la gorge, l'estomac et l'intestin sont particulièrement sensibles à ces dommages. De plus, certains traitements peuvent aggraver les symptômes de la LLC.

Les effets secondaires suivants sont courants en ce qui concerne la chimiothérapie et, dans une moindre mesure, le traitement aux anticorps monoclonaux et autres pharmacothérapies. Cliquer ici pour en savoir plus sur ces effets secondaires.

- Fatigue extrême.
- Infections.
- Perte de cheveux.
- Nausées et vomissements.
- Diarrhée.

7.5.2. Effets à long terme et effets tardifs

Chez certains patients, les effets secondaires peuvent durer longtemps après la fin du traitement. Pour en savoir plus sur les effets secondaires persistants, voir le livret gratuit de la Société de leucémie et lymphome du Canada ,(**Dr spencer.Get al,2017**).

7.6.Suivi après le traitement de la leucémie lymphoïde chronique

Le suivi après le traitement de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une composante importante des soins apportés aux personnes atteintes. Les spécialistes du cancer (oncologues ou hématologues) et le médecin de famille se partagent souvent cette responsabilité. Votre équipe de soins.

CHAPITRE II

8. Aspect morphologique de LLC

8.1. Lymphocytes LLC

La morphologie des lymphocytes LLC **Fig. 4** correspond essentiellement à celle des petits lymphocytes observés sur frottis sanguin normal. Différences par rapport aux petits lymphocytes sur le frottis sanguin normal:

- généralement cellules légèrement plus grandes 7-14 μm .
- chromatine du noyau très dense, grossière.
- noyau de structure marbrée **Fig5**, la chromatine grossière et les zones pauvres en chromatine étant disposées côte à côte, (**Annette S et al ,2010**).

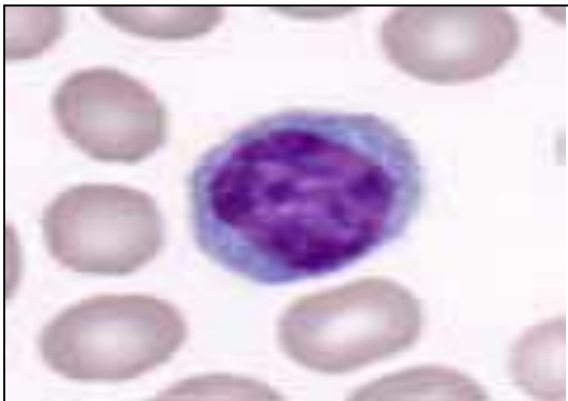


Figure 4 : lymphocyte LLC

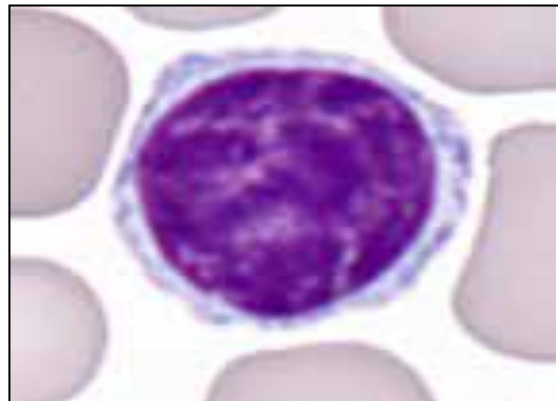


Figure 5 : Noyau de structure marbrée

8.2. Prolymphocytes

Fig6 Par rapport aux lymphocytes LLC:

- cellule plus grande.
- cytoplasme plus large et plus pâle.
- densité de la chromatine moins marquée.
- un grand nucléole clairement visible, (**Annette S et al ,2010**).

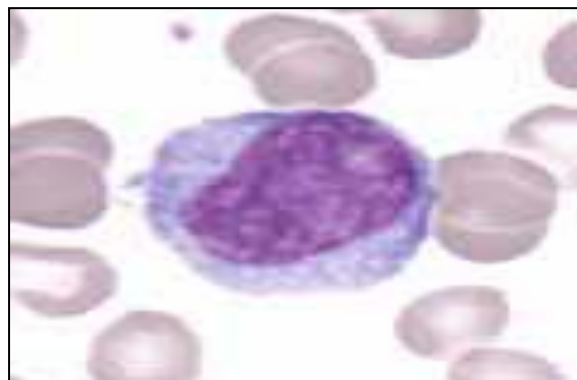


Figure 6 : prolymphocyte

8.3. Lymphocytes présentant des noyaux encochés

Fig.7 Différences par rapport aux lymphocytes LLC:

- cellule plus grande.
- chromatine dispersée, mais non de type blastique.
- noyau irrégulier avec plis, encoche, entaille **Fig.8**



Figure 7 :Noyau avec encoches

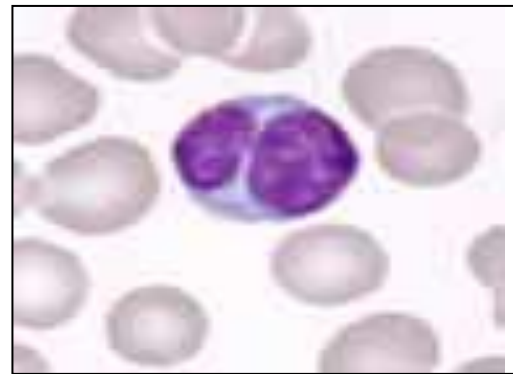


Figure 8 : Noyau avec entailles

Il est important d'évaluer la morphologie des lymphocytes sur une zone appropriée **Fig 9** du frottis sanguin. Une zone trop mince **Fig10** du frottis montre des lymphocytes trop distendus, la cellule apparaît dans l'ensemble trop grande et la chromatine trop dispersée. On évalue de préférence les lymphocytes dans la zone intermédiaire entre normale à épaisse. Cela signifie qu'il n'y a plus «d'espaces» entre les érythrocytes, dont certains sont disposés en courtes «chaînettes» de deux à trois cellules, (*Annette S et al ,2010*).

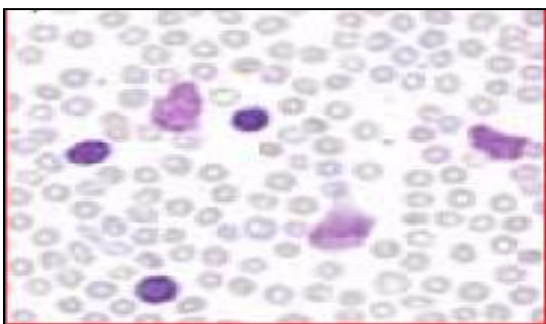


Figure 9 : zone appropriée

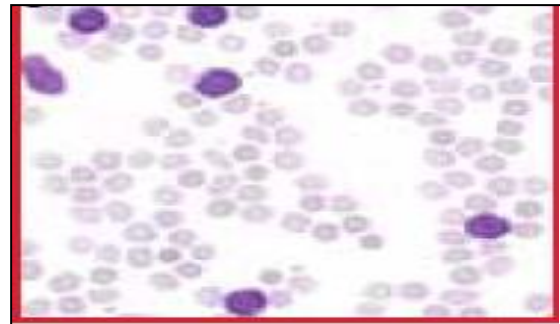


Figure 10 : zone trop mince

8.4.Cellules lésées / ombres de Gumprecht

Il s'agit de débris cellulaires de lymphocytes endommagés survenant lors de la réalisation du frottis sanguin. Ils sont souvent nombreux dans la LLC. De rares cellules lésées se présentent cependant aussi sur le frottis sanguin ou en présence d'infections virales et ne

sont donc pas pathognomoniques pour la LLC. Dans ces cas, on parle de «cellules lésées» et non «d'ombres de Gumprecht» **Fig. 11**, (Annette S et al. 2010).

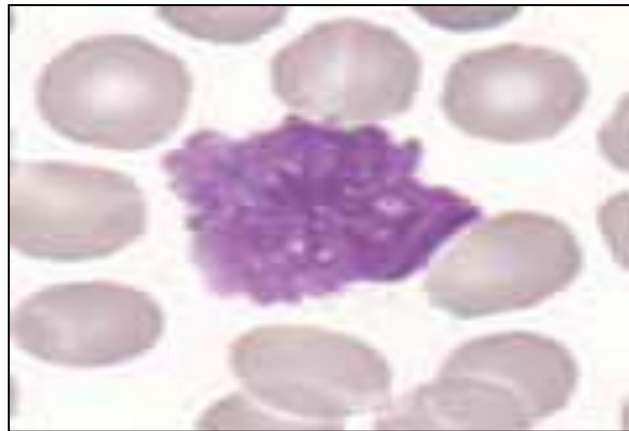


Figure 11 : Cellules lésées / ombres de Gum-prech

Lors de la différenciation leucocytaire, les cellules lésées / ombres de Gumprecht sont à compter séparément et doivent donner 100% avec les autres types de leucocytes La désignation «ombre de Gumprecht» ne doit être utilisée qu'en cas de diagnostic confirmé d'une LLC .Le calcul du nombre absolu de lymphocytes en cas de LLC ou de de LLC est basé sur la présomption somme des cellules lésées et des lymphocytes.

8.5. Formule érythrocytaire et réticulocytes

Une chute de l'hémoglobine associée à la présence de sphérocytes, une polychromasie (réticulocytose) **Fig. 12** et éventuellement des érythroblastes évoquent une anémie hémolytique auto-immune (AHAI). Les lymphocytes LLC produisent, chez env. 11% des patients, des anticorps dirigés contre les propres érythrocytes au cours de la maladie, (Annette S et al , 2010).

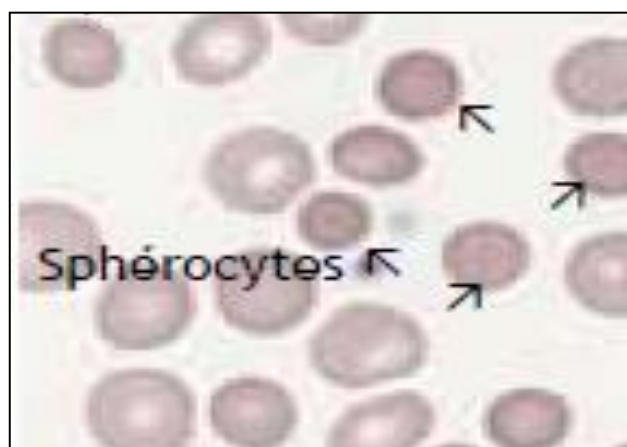


Figure 12 : Sphérocytes

9. Aspect physiopathologique

9.1. Origine cellulaire de la LLC

En se fondant sur les caractéristiques cytologiques et phénotypiques des lymphocytes de LLC, cette hémopathie a longtemps été considérée comme dérivant d'un lymphocyte B naïf au repos. L'immun-phénotype des lymphocytes de LLC est néanmoins différent de celui de toute cellule B normale.

Une avancée majeure dans la compréhension de la LLC est survenue en 1999, quand différentes équipes ont indépendamment démontré que le taux de mutations somatiques dans les gènes des domaines variables des chaînes lourdes des immunoglobulines **IgVH** (Région variable du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines) permettait de subdiviser la maladie en deux groupes distincts ayant des évolutions cliniques différentes, (**Hamblinet *al*, 1999**).

La LLC n'apparaît alors plus comme une entité unique mais comme l'association dans une même entité nosologique de deux sous types de maladies dérivant d'une cellule à des stades de maturation différents. Les LLC mutées (~50%) pour les IgVH dériveraient d'une cellule dont l'origine est Centro-germinative ou post-centre germinatif tandis que les LLC non mutées (~50%) proviendraient d'une cellule naïve d'origine pré-centre germinatif ou indépendante du centre germinatif. Cette dichotomie constitue une particularité au sein des hémopathies lymphoïdes B, car la plupart des lymphomes présentent des IgVH mutés, indiquant que la cellule transformée appartient au centre germinatif ou a transité par cet environnement (à l'exception des lymphomes du manteau qui comportent seulement 20% de patients mutés), **Fig13, (Küppers *et al.* 1999)**.

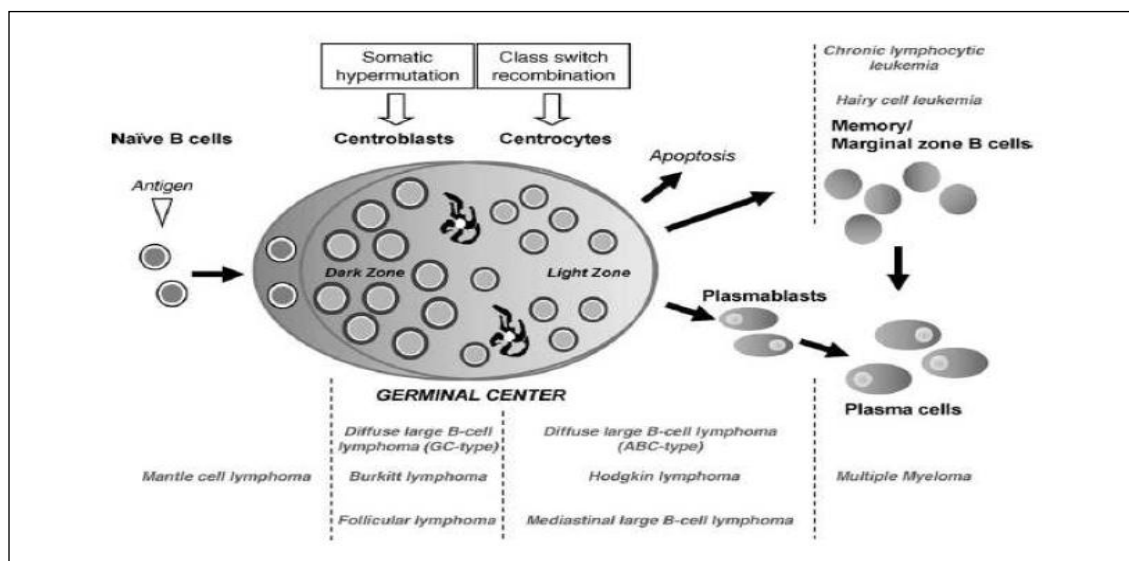


Figure 13 : Origine cellulaire des lymphomes à cellules B

Les études de profil d'expression globale démontrent que les LLC présentent pourtant un profil homogène, quel que soit leur statut mutationnel, suggérant malgré tout l'existence d'un précurseur cellulaire commun, (Klein *et al.*, 2001). Ces analyses révèlent également que ce profil d'expression est proche de celui de cellules B ayant expérimenté l'antigène, ce qui inclut les cellules B mémoires classiques et les cellules B de la zone marginale, qui peuvent être somatiquement mutées ou non. Au total, un des modèles proposés pour l'origine cellulaire de la LLC est schématisé **Fig14**. Les cellules B naïves peuvent être entraînées dans une réponse immunitaire T dépendante (avec hyper mutation des IgVH dans le centre germinatif) ou T-indépendante (sans hyper mutation des IgVH). Selon l'achèvement des réponses, la cellule se différencie en cellule B de la zone marginale ou en cellule B mémoire. Sous l'effet d'une stimulation antigénique chronique, la cellule reste activée et acquiert avec le temps des altérations génétiques menant à la survenue d'un clone phénotype-ment anormal **MBL** (MBL Monoclonal B-Celllymphocytosis). Puis à la transformation oncogénique.

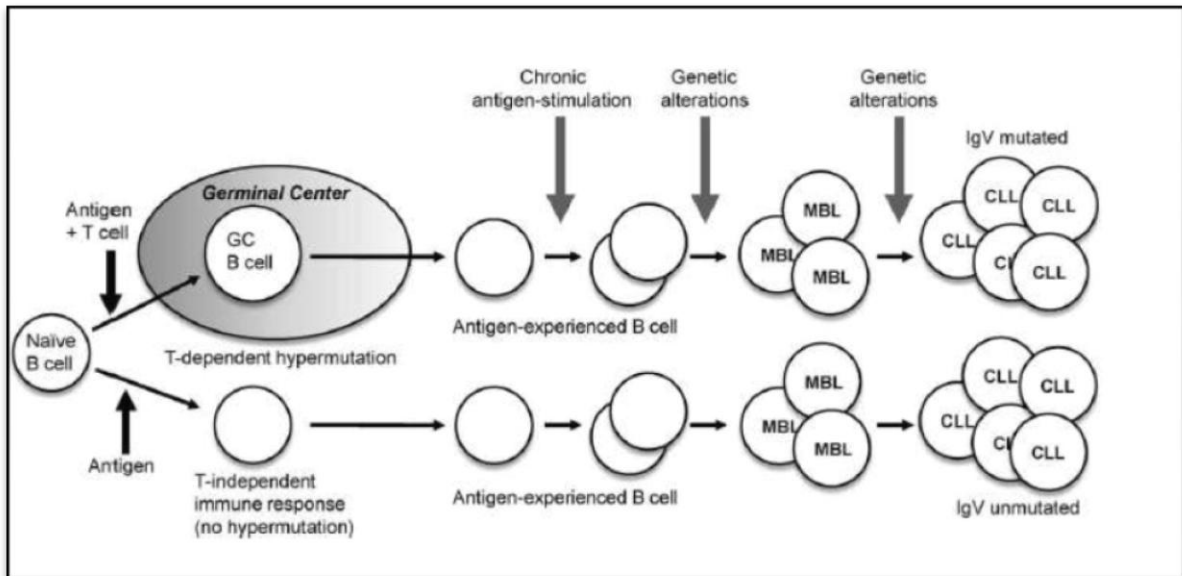


Figure 14 : Un modèle pour l'origine cellulaire de la LLC (d'après Klein *et al.* 2010).

9.2. Résistance à l'apoptose

9.2.1 Voies de l'apoptose

Il est communément admis que la LLC se caractérise par une dysrégulation de l'apoptose conduisant à une accumulation de cellules. De façon générale, il existe deux voies principales d'apoptose **Fig15** convergeant sur les caspases qui représentent les effecteurs clés de l'exécution de la cascade apoptotique.

La voie intrinsèque est activée par un large spectre de signaux tels les drogues cytotoxiques, l'irradiation, la privation de facteurs de croissance et les stress cellulaires. Elle implique la libération

de protéines mitochondriales, en particulier le cytochrome c qui va s'unir à la protéine cytosolique APAF-1, l'ensemble provoquant une cascade d'activation de caspases, de la caspase 9 jusqu'à la caspase effectrice, la caspase 3, aboutissant ainsi aux changements morphologiques et biochimiques qui définissent l'apoptose. La voie extrinsèque est activée par des récepteurs de mort, membres de la famille TNF (Tumornecrosis factor), présents à la surface cellulaire et possédant un domaine de mort commun intra-cytoplasmique (DD). Ces récepteurs, dont le plus connu est la molécule FAS (CD95), déclenchent directement la cascade des caspases à partir de la caspase 8 qui va se lier à la protéine FA (DD) et entraîner l'apoptose. Dans la LLC, c'est essentiellement l'activation de la caspase 9 qui est en cause, c'est-à-dire la voie intrinsèque de l'apoptose, (*Chiorazziet al, 2005*).

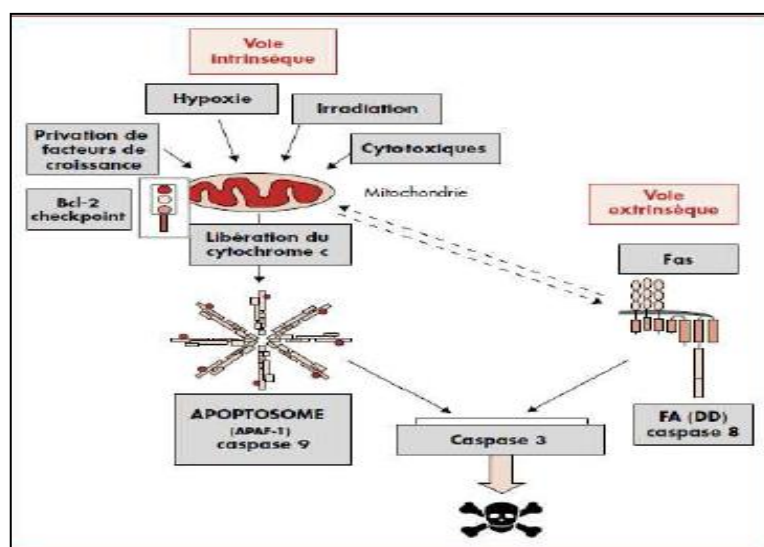


Figure 15 : Représentation schématique des 2 voies de l'apoptose, d'après *Chiorazziet al, 2005*)

9.2.2. Apoptose chimio -induite

En dépit d'options thérapeutiques efficaces, la rechute après chimiothérapie conventionnelle est caractéristique de la LLC, ce qui en fait un modèle de résistance à l'apoptose chimio-induite.

Ces mécanismes de chimiorésistance ne sont que partiellement compris. L'un des phénomènes documentés est l'inactivation de la voie p53 qui entraîne une résistance à la chimiothérapie conventionnelle, en particulier la fludarabine et les alkylants. Les altérations d'autres membres de la voie p53, incluant ATM et mir-34a, peuvent également induire une chimiorésistance, (*Zenzet al, 2009*). Le rôle de la surexpression de protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2, comme BAX et BFL-1, a également été suggéré, (*Bosanquet et al, 2002*). Enfin, il a été démontré que la présence de cellules stromales confère une résistance au nouvel inhibiteur de BCLXL et BCL2A1 (nommé ABT-737), soulignant le rôle du microenvironnement.

10. Facteur

10.1. Facteurs environnementaux

Un lien statistique a été mis en évidence entre le développement d'une LLC et le fait de vivre et/ou de travailler dans une exploitation agricole, et plusieurs données suggèrent que les insecticides et herbicides (agent orange) augmenteraient le risque de LLC (**Baumann Kreuziger LM *et al.* 2014**). Les autres facteurs de risque identifiés dans la population occidentale sont les antécédents familiaux d'hémopathie maligne (tous types confondus), certains facteurs environnementaux (métier de coiffeur), la taille élevée et le fait d'avoir une sérologie positive pour l'hépatite C. Certains facteurs ont par ailleurs été retrouvés comme associés à un risque amoindri de développer une LLC ; il s'agit du terrain atopique, du fait d'avoir un antécédent transfusionnel, l'exposition solaire importante et le fait de fumer, (**Morton JM *et al.* 2014**).

10.2. Facteurs héréditaires

L'existence d'une susceptibilité génétique à développer une LLC est corroborée par plusieurs données : les apparentés au premier degré de patients ayant une LLC ont un risque relatif de développer eux-mêmes une LLC évalué à 8,5, (**Goldin L.R *et al.* 2009**). De plus, les jumeaux monozygotes de patients porteurs d'une LLC se voient plus souvent diagnostiquer eux-mêmes des LLC que leurs jumeaux dizygotes. Il est intéressant de noter que cette susceptibilité génétique aux syndromes lymphoprolifératifs ne semble pas restreinte à la LLC dans la mesure où les apparentés au premier degré de patients porteurs d'une LLC ont également un sur-risque de développer un autre lymphome indolent. Des polymorphismes nucléotidiques (SNP) sont potentiellement impliqués dans ces formes familiales, et concerneraient notamment les gènes IRF4 et BCL2, ou seraient responsables de la régulation négative des miRNA mir-15a et mir-16-1. Une revue récente recense la plupart des SNP ayant un rôle dans la pathogenèse de la LLC, (**Kipps TJ *et al.* 2017**).

11. Aspect moléculaire et anomalie chromosomique

11.1. Anomalies chromosomiques et Mutations

Par comparaison avec les autres lymphomes B, les translocations réciproques équilibrées sont remarquablement rares au cours de la LLC, (**Döhner *et al.* 2000**). La LLC est à l'inverse caractérisée par des anomalies chromosomiques déséquilibrées, en particulier des délétions et des

amplifications, dont les plus fréquentes sont les délétions **13q, 11q, 17p** et la trisomie **12**. Leurs caractéristiques cytogénétiques et conséquences physiopathologiques.

Le faible nombre de translocations réciproques équilibrées impliquant les locus des gènes des chaînes lourdes ou légères des gènes des immunoglobulines (Ig) suggère que la cellule originelle n'est pas Centro-germinative, mais plutôt post-centre germinatif ou indépendante du centre germinatif, si bien qu'elle est préservée des phénomènes de remodelage des locus des gènes des immunoglobulines nécessaires aux hyper mutations somatique et la commutation de classe, phénomènes qui favorisent les cassures doubles brins et les translocations chromosomiques impliquant les Ig ,(Klein *et al.* 2010).

A l'inverse, les aberrations génomiques conduisant à la transformation oncogénique semblent survenir après ces phénomènes, probablement durant la prolifération des cellules B induite par l'antigène De la même façon, la leucémie à tricholeucocytes, dérivant elle-aussi des cellules B post-centre germinatif ayant expérimenté l'antigène, se distingue des autres lymphoproliférations B par l'absence de translocations réciproques équilibrée.

11.1. 2. Délétion 13q14

La délétion de la région 13q14, trouvée dans plus de 50 % des cas de LLC, est l'anomalie cytogénétique la plus fréquente et historiquement associée à un meilleur pronostic quand elle est isolée (Dohner H, *et al.*). Cette délétion est le plus souvent hétérozygote. Elle peut être homozygote, et il peut aussi exister un mélange de cellules homo- et hétérozygotes. Il existe une région commune délétée d'environ 550 kb suggérant un rôle prépondérant dans la pathogénie de la LLC.

Grâce à des hybrides somatiques obtenus à partir de cellules de LLC avec anomalies du chromosome. Une région minimale de délétion de 29 kb contenant le supposé gène suppresseur de tumeur *DLEU2* (**deleted in lymphocyticLeukemia**) a été identifiée. Le gène *DLEU2* a été largement étudié et n'est pas considéré à ce jour comme gène suppresseur de tumeur dans la LLC. Un groupe de 2 miRNAs (MIR15A et MIR16-1) sont localisés à l'intérieur de la région minimale délétée et sont dérégulés dans 70 % des cas de LLC. Les gènes codant pour ces 2 miRNAs sont Ubiquitaires et non-codants, ils ont une fonction régulatrice de l'expression des gènes dont ils se fixent sur la partie UTR(UntranslatedTranscribed Région). Dans le cas de la LLC, l'haplo-insuffisance des miRNAs semble jouer un rôle de suppresseur de tumeur et de faibles variations d'expression du gène ont une répercussion Majeure sur le phénotype. Ces micro-RNAs favorisent l'apoptose, en régulant de façon négative le gène *BCL2* .

Le bon pronostic associé à la « délétion 13q isolée » doit cependant être nuancé pour les grandes délétions incluant le gène *RBI* qui seraient associées à des LLC cliniquement plus agressives.

11.1. 3 Trisomie 12

La trisomie 12 est observée dans 11 à 25 % des cas. La trisomie 12 est considérée comme un marqueur de risque intermédiaire dans le modèle pronostique hiérarchique initialement proposée par .La trisomie 12 est associée à d'autres anomalies chromosomiques dans plus de la moitié des cas, comme les trisomies 18 et 19, la délétion 14q, les translocations (14;18), t(14;19), t(8;14). La trisomie 12 est considérée par certaines équipes comme une anomalie clonale précoce, la LLC pouvant évoluer secondairement avec l'apparition d'aberrations chromosomiques secondaires ou de mutations touchant en particulier les gènes *NOTCH1*, *TP53*, et *FBXW7* (Landau .DA *et al*, 2013).

11.1.4. Délétion 11q22-23

La délétion du bras long du chromosome 11, de taille assez hétérogène, est retrouvée chez 6 à 20 % des patients, selon les études, (Letestu.Ret *al*, 2010) .

Elle est associée cliniquement à une lymphadénopathie importante, ainsi qu'à des facteurs de mauvais pronostic comme le statut non muté des gènes *IGHV*. Depuis la mise en place de la trithérapie par rituximab-fludarabine-endoxan, les patients avec délétion 11q ont une survie sans progression plus courte, mais n'auraient plus une survie globale diminuée.

La délétion 11q peut être primitive ou secondaire dans l'évolution de la maladie, mais semble être plus souvent sous-clonale,(Landau. DA *et al*, 2013). La région critique en **11q22.3-q23**. Contient le gène *ATM*, codant pour une protéine qui agit en amont de **p53** dans l'identification et la réparation de dommages de l'ADN. Des mutations de l'autre copie du gène *ATM* sont retrouvées chez environ 30 % des patients et semblent avoir un impact sur la survie et la survie sans progression des patients traités par une chimiothérapie type fludarabine/endoxan .

La délétion 11q peut aussi impliquer le gène *BIRC3*, localisé en **11q22.2**, à environ 6 000 kb. Le gène *BIRC3* est également muté dans de rares cas de LLC au diagnostic (environ 5 %). L'inactivation de *BIRC3* serait associée à une résistance accrue aux chimiothérapies et est mutuellement exclusive de la délétion *TP53* (Rossi. D *et al* , 2013).

11.1.5. Délétion 17p13

La délétion du bras court du chromosome 17 [del17p/17p-] est identifiée chez moins de 10% des patients au diagnostic Tam CS, (Shanafelt. TDet *al*, 2006). En revanche, elle est retrouvée chez 30 à 50% des patients réfractaires aux traitements (notamment ceux comportant des analogues des purines), ce qui en fait l'anomalie la plus fréquemment acquise après traitement. Cette notion de résistance aux traitements s'explique par le fait qu'en réponse au stress cellulaire dû à la

chimiothérapie, la cellule active sa voie p53. Si cette voie est fonctionnelle, le programme de mort cellulaire par apoptose conduira à l'élimination de la cellule. On comprend dès lors que toute cellule dépourvue d'une voie p53 normale va s'affranchir de ce processus apoptotique. Elle pourra même, du fait du traitement, accumuler des anomalies supplémentaires.

In fin, le traitement aura donc l'effet inverse de celui escompté et conduira à la sélection clonale d'une population cellulaire dépourvue des mécanismes apoptotiques, Plusieurs études ont démontré l'influence de la date d'apparition de la **del17p** sur la survie globale.

En effet, détectée *de novo* au moment du diagnostic, la survie globale est de 4 à 5 ans. En revanche, elle passe à 12 voire 18 mois si l'anomalie est identifiée lors du suivi, comme anomalie additionnelle. Par ailleurs, certaines études ont montré que la survie sans progression et la survie globale des patients **17p-** sont inversement proportionnelles à la taille du clone **17p-**, déterminée par les techniques classiques de FISH ciblée, Les mutations du gène *TP53* sont identifiées sur l'autre copie du gène chez environ 90 % des patients avec del17p, Au diagnostic, 5 % des patients présentent une mutation détectée par technique classique de séquençage (Sanger) sans délétion. En rechute, l'étude de populations réfractaires ou résistantes au traitement par fludarabine montre un taux de mutations de *TP53* de 13 à 39 % et 25-30 % des patients avec mutation *TP53* ne présentent pas de délétion de l'autre allèle. En 2015,. ont décrit différents types de mutations de *TP53* ayant des conséquences fonctionnelles et un impact pronostique différents. Ils ont également montré une augmentation du taux de mutations avec le temps. Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit et en grande profondeur (**ultra deep NGS**) ont montré l'existence de petits clones porteurs de mutations de *TP53*, qui sont retrouvés chez moins de 10 % des patients non traités. Mêmes petits, ces clones présentent la même valeur pronostique péjorative que ceux identifiés par des techniques plus classiques de séquençage. En effet, ces sous clones représentent la population cellulaire majoritaire lors de l'échappement thérapeutique ou de la rechute chez la majorité des patients. Cependant, pour une faible proportion des patients analysés rétrospectivement, le clone muté pour *TP53* ne s'est pas développé, ce qui suggère la coopération de plusieurs gènes dans la survenue de la résistance au traitement.

11.2. Mutations

11.2.1. Mutation P53

Le gène *TP53*, long d'environ 23 kb, est localisé en 17p13.1, (Xu-Monette et al, 2012).

Il comporte 11 exons et 10 introns, le premier exon étant non codant. Le gène est sous le contrôle de 2 promoteurs dont le premier est situé en amont du premier exon et le second au début du premier intron. La protéine p53 canonique est constituée de 393 acides aminés et sa masse moléculaire est de 53kDa. Elle est composée de 5 domaines fonctionnels : un domaine de transactivation NH2-terminal, un

domaine riche en proline, un domaine central de liaison spécifique à l'ADN, un domaine d'oligomérisation et un domaine de régulation **Fig16**.

Ces cinq domaines permettent de définir la protéine p53 comme facteur de transcription. Le domaine central suffit à déterminer la reconnaissance des sites consensus de liaison de p53 au niveau de ses cibles transcriptionnelles, alors que les domaines N- et C terminaux peuvent être remplacés par des domaines fonctionnellement homologues à d'autres facteurs de transcription.

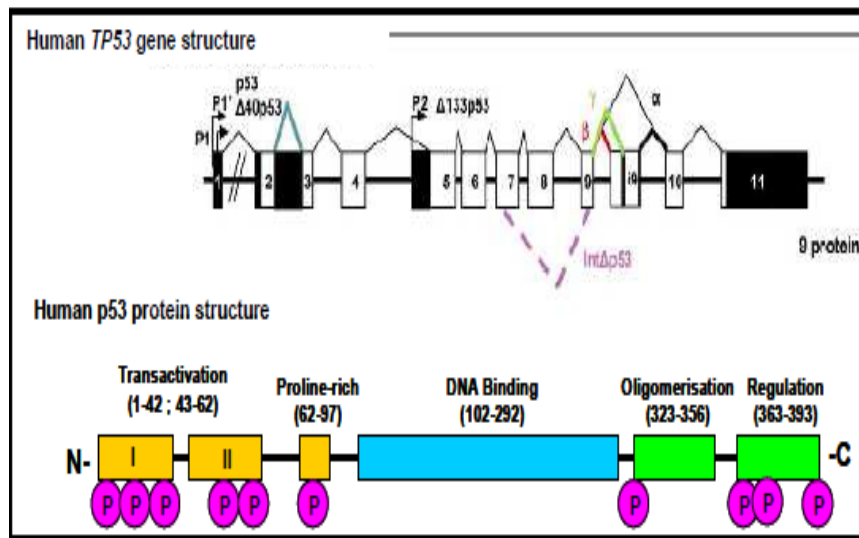


Figure 16 : Structure du gène *TP53* et de la protéine p53

11.2.1.1. Rôle de p53

11.2.1.1.1. Contrôle du cycle cellulaire

Une des fonctions la mieux connue de p53 est sa capacité à induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Ce contrôle de l'entrée en phase S semble être essentiellement relié à son activité transcriptionnelle sur P21, La régulation positive de *P21* par p53, en réponse à des altérations génomiques, inhibe l'activité de la cycline E/cdk2, ce qui permet alors l'accumulation de RB sous sa forme hypophosphorylée, (Demers *et al*, 1994). et l'arrêt du cycle cellulaire.

L'intervention de p53 au point de restriction G1/S est essentielle mais p53 intervient également dans l'arrêt entre les phases G2 et M du cycle cellulaire, (Taylor *et al.*, 2001). Le facteur clé pour cette transition G2/M est le complexe cycline B1/CDC2 qui est cytoplasmique et ne rentre dans le noyau qu'au moment de la mitose. Le gène *14-3-3s*, transactivé par p53, est capable de séquestrer ce complexe cycline B1/CDC2 dans le cytoplasme pour provoquer un arrêt de la division en G2. Un second gène transactivé par p53, *GADD45*, est également important pour le contrôle de la transition

G2/M. L'inactivation de ce gène chez les souris conduit à un phénotype très proche de celui des souris nullizygotés pour le gène *TP53* : une forte aneuploïdie et de nombreuses anomalies chromosomiques. La surexpression de *GADD45* est capable d'induire un blocage de la division cellulaire en phase G2.

11.2.2.2. Inactivation de p53 au cours de la LLC

Il existe plusieurs modes d'inactivation des fonctions suppressives de p53, qui surviennent au niveau de l'ADN, de l'ARN ou de la protéine.

11.2.2.2.1. Au niveau génomique

il s'agit le plus souvent d'une inactivation bi-allélique par délétion d'un allèle et mutation somatique de l'autre : 80% à 90% des patients porteurs d'une délétion 17p présentent une mutation sur l'allèle restant, Cependant, des mutations sans délétion allélique sont également observées dans 4 à 5% des cas de LLC. Des mutations bi-alléliques ont également été décrites.

La majorité des mutations sont des mutations ponctuelles situées au niveau du domaine de liaison à l'ADN ; ce sont fréquemment des mutations faux-sens, moins souvent des insertions-délétions, des mutations non-sens ou des mutations des sites d'épissage (**Fig18 A et B**), (**Petitjean et al, 2007**) Bien que les codons 175, 179, 209, 248, 273 soient plus fréquemment touchés, la localisation des mutations est hautement variable ; la base de données IARC récence 188 mutations différentes à l'heure actuelle dans la LLC. Ces mutations entraînent la plupart du temps une perte de fonction totale ou partielle ; certains mutants conservent cependant leur fonction de transactivation, Les mutations *TP53* résultent souvent en une diminution de la dégradation par le protéasome via MDM2, conduisant à l'accumulation de protéine p53 mutante. Celle-ci exerce fréquemment un effet dominant-négatif sur la liaison à l'ADN et l'action transactivatrice de la protéine sauvage, ce qui peut expliquer les anomalies fonctionnelles de TP53 même en cas de mutation mono-allélique sans délétion associée, (**Petitjean et al, 2007**). D'autres travaux, menés sur des souris hétérozygotes *TP53*^{+/-}, porteuses d'un allèle nul et d'un allèle fonctionnel, démontrent que la diminution du dosage génique est suffisante pour favoriser le développement de cancers, sans nécessairement que l'inactivation de *TP53* soit bi-allélique. Des silencings de *TP53* par méthylation de son promoteur ou de son UTR ont également été rapportés dans la LLC, (**Xu-Monette et al, 2012**).

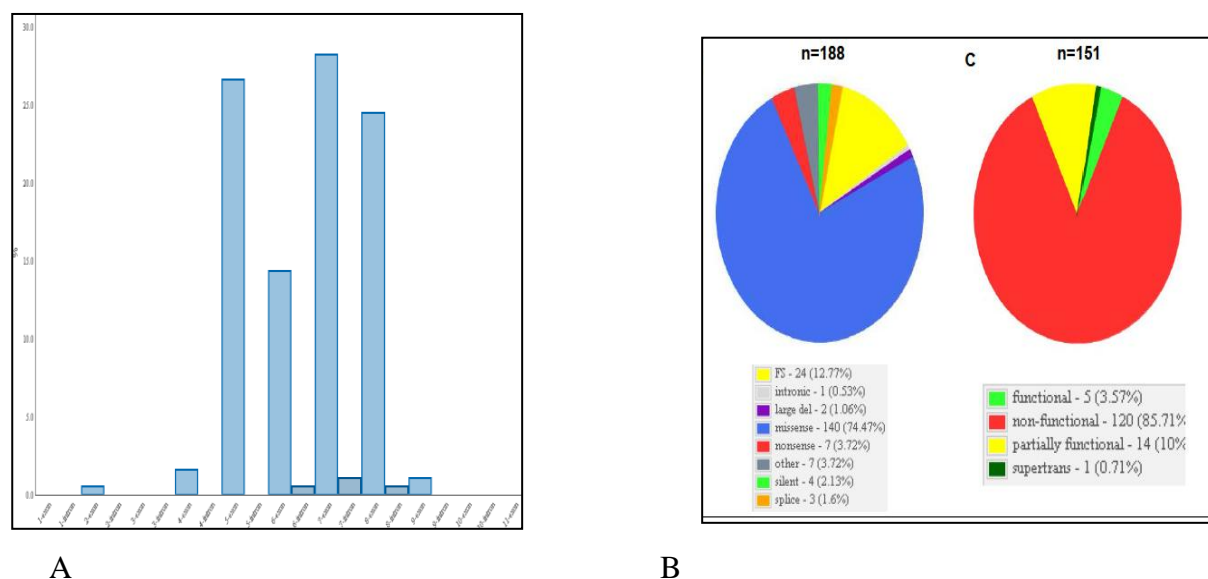


Figure 17 : Profil mutationnel de TP53 au cours de la LLC (données issues de la base de données IARC mise à jour en novembre 2012, version R16 ,(Petitjean *et al*, 2007)

A/ Répartition des mutations entre exons et introns. B/ Types de mutations

11.2.2.2.2.Au niveau de l’ARN

l’épissage alternatif, éventuellement favorisé par une mutation de site d’épissage, peut induire une activité transcriptionnelle sélective de p53, ou au contraire une perte d’activité transcriptionnelle. Certains microARN (miRs-25, -30d, -92a, -125b, 504, -1285, -141, -15 et -16) peuvent également interférer au niveau post-transcriptionnel et diminuer la traduction de p53 .

11.2.2. Mutations du gène ATM

A l’image des mutations TP53 associées aux délétions 17p, des mutations de l’allèle ATM restant ont été mises en évidence chez les patients porteurs de délétion 11q ; ces inactivations bi-alléliques par mutation+délétion sont cependant moins fréquentes que pour TP53 et concernent 36% des LLC 11q- (Austen *et al*, 2007). Des mutations sporadiques mono ou bi-alléliques d’ATM ont également été rapportées en l’absence de toute délétion chez 7% à 20% des patients. Il s’agit majoritairement de mutation troncantes et de mutations faux-sens. Dans certains cas, la présence d’une mutation mono-allélique d’ATM est un événement germinale, suggérant que les patients hétérozygotes pour l’Ataxie-Télangiectasie seraient prédisposés à la survenue de LLC, L’étude de la fréquence de ces mutations constitutionnelles chez des patients atteints de LLC porteurs ou non de délétion 11q a permis de démontrer que l’hétérozygotie germinale d’ATM n’intervient pas dans l’initiation de la LLC mais influence la progression rapide de la maladie via la perte de l’allèle ATM sain

Sur un plan clinique, les mutations du gène *ATM* ont été rapportées comme marqueurs défavorables s'accompagnant d'une survie globale et d'une survie sans traitement raccourcies. Plus récemment, dans l'essai anglo-saxon CLL4, ce sont les anomalies bi-alléliques d'*ATM* qui ont été spécifiquement associées à une survie sans progression et à une survie globale plus courte qu'en cas d'anomalie mono-allélique. (Skowronska *et al*, 2012). Dans cette série, la survie sans progression des patients présentant une altération bi-allélique d'*ATM* est d'ailleurs semblable à celles des patients porteurs d'une altération de *TP53*. A l'inverse, la survie sans progression des patients non mutés pour *ATM* et des patients porteurs d'une mutation mono-allélique isolée est similaire (28,6 mois vs 30, 7 mois).

D'autre part, l'observation dans cette série d'une survie sans progression plus courte en cas de délétion mono-allélique d'*ATM* (17,1 mois) qu'en cas de mutation mono-allélique d'*ATM* sans délétion 11q associée (30,7 mois) constitue un argument supplémentaire pour penser que d'autres gènes, situés sur le bras long du chromosome 11, sont impliqués dans la pathogénie des LLC. En ce sens, il a récemment été démontré que le gène *BIRC3*, situé en 11q22, joue un rôle dans la physiopathologie des formes chimiorésistantes de LLC, (Rossi *et al*, 2012).

11.2.3. Mutations de SF3B1 (SF3B1 Splicing factor 3b, subunit 1) :

Les mutations du gène *SF3B1*, codant un constituant critique du spliceosome, sont mises en évidence dans 5% des LLC au diagnostic et dans 17% des LLC réfractaires à la fludarabine. (Rossi *et al*, 2011). Ces mutations, majoritairement faux-sens, sont situées essentiellement dans les exons 12 à 18 ; elles ciblent de façon récurrentes 3 hotspots dans l'exon 14 (codons 662, 666, et 700, la mutation K700E étant la plus récurrente) et sont associées à la présence de délétion 11q. Les mutations de *SF3B1* et de *NOTCH1* semblent généralement mutuellement exclusives. La présence de mutations de *SF3B1* s'accompagne d'un raccourcissement de la survie sans traitement et de la survie globale, ce qui leur confère une valeur prédictive péjorative. (Rossi *et al*, 2011). Cependant, parmi les LLC réfractaires à la fludarabine de l'essai CLL2H, il semble que cette valeur pronostique soit inexistante. Parallèlement aux mutations *NOTCH1*, le travail a évalué de façon prospective l'impact des mutations de *SF3B1* dans la cohorte de 494 patients du protocole UK LRF CLL4. Ces mutations sont associées à une diminution de la survie globale (54.3 vs 79.0 mois, $p < 0,001$). En analyse multivariée, les mutations de *SF3B1* présentent par ailleurs une valeur pronostique indépendante, bien que les anomalies de *TP53* restent le marqueur le plus informatif de la survie. Un travail récent a rapporté que l'absence de mutation des IgVH et la présence de mutations de *SF3B1* et de *XPO1* (Exportine 1) sont plus fréquentes chez les patients qui acquièrent une mutation *TP53* au cours de la maladie ; ceci suggère que ces marqueurs seraient des facteurs de risque potentiels pour l'acquisition de mutation *TP53*.

11.3. Classification

Les deux principales classifications pronostiques utilisées en clinique sont celle de Rai (Rai .K. R. *et al* ,1975) et Binet. Ces deux systèmes de classification sont simples, s'appuyant uniquement sur des examens physiques et des tests de laboratoire standards. Ils ont été décrits dans les années 80 et restent aujourd'hui encore valables malgré l'apparition de nouveaux marqueurs pronostiques.

11.3.1. Classification de Rai

La classification de Rai est très utilisée aux Etats-Unis depuis 1975 et distingue 5 stades différents en fonction de la présence ou non d'adénopathie, d'une hépatomégalie et/ou une splénomégalie et la présence de cytopénie. Tableau 1

Tableau 1: Classification de Rai selon Rai (Rai. k et al ,1975)

Stade	Caractéristiques	Survie médiane en 1975(en mois)
0	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée	> 150
I	Lymphocytose + adénopathies	101
II	Lymphocytose + splénomégalie et/ou hépatomégalie	71
III	Lymphocytose + anémie < 11 g/dL	19
IV	Lymphocytose + thrombopénie < 100 G/L	19

Par la suite, cette classification a été modifiée pour réduire le nombre de groupes Pronostiques de 5 à 3 tableau 2

Tableau 2 : Classification de Rai modifiée selon Scarfo (Scarfo L *et al* ,2016)

Risqué	Caractéristiques
Faible	Lymphocytose sanguine et médullaire isolée
Intermediaries	Lymphocytose et adénopathies et/ou hépato-splénomégalie
Elevé	Lymphocytose et anémie et/ou thrombopénie

11.3.2. Classification de Binet

La classification de Binet est largement utilisée en Europe depuis 1981. Elle définit 3 stades (A, B e C) et est basée sur le nombre d'aires ganglionnaires atteintes à l'examen clinique (définies par la

présence de ganglions lymphatiques hypertrouffés ≥ 1 cm de diamètre ou d'organomégalie) ainsi que sur la présence de cytopénie (anémie et/ou thrombocytopénie). Les aires ganglionnaires impliquées sont les aires cervicales, axillaires et inguinales, l'hépatomégalie et la splénomégalie. Tableau 3

Tableau 3 : Classification de Binet selon Binet,(Binet. Jet 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 atteintes
B	Absence d'anémie (Hb> 100 g/L) ou de thrombocytopénie (Plt> 100G/L) et plus de 2 aires ganglionnaires atteintes
C	Anémie (Hb< 100 g/L) ou thrombocytopénie (Plt< 100 G/L) quel que soit le nombre d'aires ganglionnaires atteintes

Cependant ces deux classifications ne permettent pas de distinguer parmi les patients de stade précoce, ceux qui auront une évolution rapide de ceux qui resteront stables. C'est pourquoi des marqueurs pronostiques plus récents de nature cytogénétique, moléculaire, phénotypique et sérique, ont été développés et doivent être pris en compte pour estimer la vitesse de progression de la maladie.

11.3.3.Classification de Rossi

En 2013, Rossi a proposé une approche différente en intégrant le statut mutationnel de quatre gènes fréquemment mutés dans la LLC ainsi que les principales anomalies cytogénétiques. (Rossi. D et al . 2013) .Cette classification distingue quatre groupes pronostiques différents rassemblés dans le tableau 4

Tableau 4: Classification de Rossi selon Rossi (Rossi. D et al . 2013)

Stades	Caractéristiques	Survie 10 ans
Haut risqué	Anomalie de <i>TP53</i> et/ou mutation de <i>BIRC3</i>	29%
Risque intermédiaire	Mutation <i>SF3B1</i> et/ou <i>NOTCH1</i> et/ou del(11q)	37%
Faible risqué	Absence d'anomalie au caryotype ou trisomie 12	57%
Très faible risque	del(13q)	69%

11.4. Marquer

11.4.1. IGVH

Les immunoglobulines sont des glycoprotéines constituées de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, chacune étant composée d'une région variable et d'une région constante. L'analyse des réarrangements d'IGVH et de l'état mutationnel se fait par PCR sur ADN complémentaire synthétisé à partir de l'ARN extrait des cellules tumorales puis séquençage direct. Il s'agit d'une technique d'analyse complexe et onéreuse. Le statut IGVH est un marqueur pronostique des plus pertinents dans la LLC, la forme mutée étant de meilleur pronostic que la forme non mutée. Des études ont montré que la médiane de survie est de 24 ans pour les patients avec un statut IGVH muté alors qu'elle n'est que de 8 ans pour les patients avec un statut IGVH non muté.^{57,58} De plus, le locus IGVH non muté est souvent associé à une résistance à la chimiothérapie ainsi qu'à la présence d'aberrations chromosomiques défavorables comme la délétion 11q et se traduit par une maladie plus agressive. (Tobin, G. *et al*, 2002).

11.4.2. ZAP 70

La protéine ZAP 70 (Zeta-Associated-Protein-70) est une tyrosine kinase intracellulaire de la famille Syk normalement présente dans les lymphocytes T et NK et favorise le signal d'activation délivré par les récepteurs de surface. Cette protéine n'est physiologiquement pas exprimée par les lymphocytes B circulants, l'expression de ZAP 70 par les cellules LLC étant une aberration phénotypique. L'expression de ZAP 70 déterminée par cytométrie en flux, est également corrélée avec l'absence de mutation des IGVH, une progression rapide de la maladie et une survie raccourcie des patients.⁶⁵ Plusieurs méthodes permettent de mesurer l'expression de ZAP-70 telles que la RT-PCR, l'immunoblot, l'immunohistochimie et la cytométrie en flux. La CMF est la technique la plus utilisée et sa réalisation technique nécessite une perméabilisation de la membrane cellulaire, en raison de la localisation intracellulaire de ZAP70. Actuellement, en France, ZAP70 n'est plus recherchée en routine du fait d'une analyse trop contraignante et d'une meilleure accessibilité du statut mutationnel des IGVH, (Crespo, M *et al*, 2003).

11.4.3. CD49d

Il s'agit de la sous unité $\alpha 4$ de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ qui est une molécule de surface dont l'expression induit la prolifération médiée par le microenvironnement des cellules leucémiques. D'après une équipe, le CD49d serait un marqueur pronostique puissant prédictif de la SG et de la survie sans traitement. Son expression est associée aux formes progressives de LLC et à une SG et sans traitement plus courte, (Bulian, P, *et al* 2014).

11.4.4. La Thymidine Kinase (TK)

Il s'agit d'une enzyme cellulaire catalysant la phosphorylation de la thymidine en thymidine monophosphate, un précurseur essentiel à la synthèse de l'ADN, (Ellims.Pet *al*, 1981) La forme prédominante de la TK est présente dans les cellules en division uniquement, ce qui fait de cette enzyme un marqueur potentiel de l'activité proliférative des cellules tumorales. Un taux élevé de TK est corrélé à un stade clinique avancé et à une maladie progressive. Une étude décrit une relation entre la TK et le statut mutationnel IGVH et montre qu'un taux ≥ 15 U/L est significativement associé au statut mutationnel IGVH non muté. Outre le statut mutationnel, le taux de TK est associé à de nombreux autres marqueurs de mauvais pronostic tels que CD38, ZAP 70 ou un taux de $\beta 2$ microglobuline élevé. Cependant, l'utilisation de ce facteur pronostique reste limitée du fait de son manque de spécificité. De plus, l'activité sérique TK diminue avec l'âge, et l'interprétation de son taux doit donc se faire en fonction de l'âge du patient, d'autant plus que la LLC est une hémopathie du sujet âgé..

11.4.5. CD23 soluble

Le CD23, récepteur de faible affinité des IgE, est un marqueur de surface des cellules de LLC. Cette glycoprotéine transmembranaire peut être clivée en fragments solubles de taille variée, les CD23 solubles (CD23s). Selon quelques publications, CD23s serait un marqueur sensible et spécifique de la LLC et son taux est corrélé au temps de doublement des lymphocytes, au degré d'infiltration diffuse de la moelle osseuse et au stade clinique reflétant la progression de la maladie. De plus une étude prospective évaluant la valeur prédictive du taux de CD23s sur la SG et sur le temps d'évolution des patients de stade A vers les autres stades de la LLC a montré que les patients de stade A de Binet avec une concentration de CD23s supérieure à la valeur de 574 U/mL, ont un pronostic significativement plus défavorable avec un temps de progression plus court que les patients présentant un taux inférieur à ce seuil. Ce marqueur est classiquement mesuré par technique ELISA et n'est pas utilisé en routine. Cependant, une équipe a mis au point une méthode de dosage par CMF du CD23s, (Sarfati.M, 1996) .

11.5. Les indicateur de l'analyse cytogénétique dans LLC

11.5.1. Caryotype

Le regain d'intérêt du caryotype dans la LLC date de l'introduction dans les cultures de mitogènes type CD40 ligand ou CpG-oligodéoxynucléotides, plus ou moins associés à des interleukines (IL-2 et IL-4), permettant de stimuler les cellules tumorales de la LLC et de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques, qui sont retrouvées dans 80 à 90 % des cas. Lorsque le diagnostic de LLC est établi, le caryotype seul (sans FISH) ne s'envisage plus car il peut être pris malgré tout en défaut du fait de l'existence d'anomalies cryptiques et de clones minoritaires que la

sensibilité du caryotype ne permet pas de retrouver. L'intérêt du caryotype est donc d'apporter des informations supplémentaires à la FISH, plus particulièrement sur l'existence d'un caryotype complexe et la présence de translocations qui ont une valeur pronostique, ou sur l'existence d'autres anomalies cytogénétiques non recherchées par les sondes FISH classiques. Ont rapporté que les LLC avec un caryotype anormal, sans anomalie détectée par les 4 sondes FISH, aurait un plus mauvais pronostic, (**Rigolin .G et al ,2012**). Il est par ailleurs un outil complémentaire à la FISH dans le suivi des LLC afin d'étudier leur évolution clonale. Cependant ces données ne modifient pas l'attitude thérapeutique à l'heure actuelle.

Le caryotype est donc recommandé dans la LLC s'il y a une intention de traitement ou lors du suivi de la maladie. En revanche, lors d'un diagnostic incertain, le caryotype est alors indispensable.

Fig18.

11.5.1.1. Avantage de caryotype

- Etudie tout le génome+++.
- Détecte les anomalies de nombre: polydiploïdie, hypodiploïdie.... et de structures: translocations; délétions; inversions; insertions; additions; ring; chromosome minute, (**CHERIF.N et al ,2017**).

11.5.1.2. Inconvénient de caryotype

- Sa résolution (au maximum 5 millions de paires de bases, 5Mb).
- La difficulté de caractériser certaines anomalies dites cryptiques.(**CHERIF.N et al ,2017**).

11.5.2.FISH

La technique FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) est une technique qui permet de révéler par fluorescence grâce à des sondes d'ADN des séquences complémentaire sur les chromosomes étudiés.

Chaque analyse ne permet d'identifier que l'anomalie ciblée, les sondes utilisées font suite à de précédentes analyses (pathologie ou anomalie suspectée sur caryotype), (**CHERIF.N et al ,2017**).

Selon les recommandations européennes, l'anomalie obligatoire à rechercher avant tout traitement est la délétion 17p (sonde TP53) **Fig18**, ainsi que la mutation du gène *TP53* . Les patients avec délétion 11q rechutant plus précocement, il est également recommandé de rechercher la délétion 11q (sonde ATM).

11.5.2.1. Avantage

- Respectant la rigueur de la technique, elle est facile.
- Détection d'anomalies cryptiques: parfois l'observation des bandes chromosomiques au caryotype ne permet pas d'interpréter certains remaniements complexes ou non, la FISH permet d'affirmer ces anomalies suspectées. Exemple: $t(12.21)(p13;q21)$ Les sondes peintures marquant la totalité d'un chromosome sont également très utiles pour caractériser des remaniements complexes, (CHERIF.N *et al*, 2017).

11.5.2.2. Inconvénient

- Au Contraire du caryotype qui peut détecter plusieurs anomalies au même temps, la FISH est ciblée, ne détectant que l'anomalie recherchée.
- Technique couteuse (sondes commerciales), (CHERIF.Net *al*, 2017).

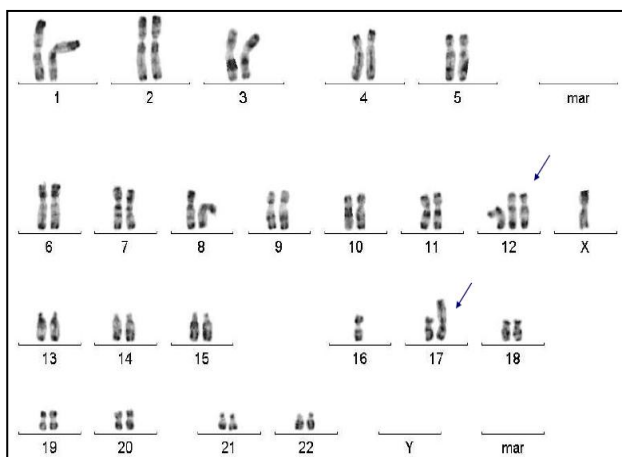


Figure18 : Diagnostic par caryotype
Dél 17p P53

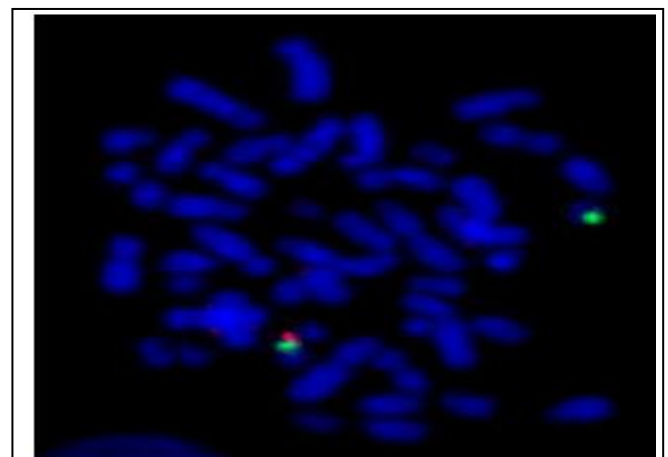


Figure19: Diagnostic par FISH Dél 17p P53

12. complications et Transformation

Les complications auto-immunes sont fréquentes dans la LLC et surviennent chez 25% des patients. L'AHAI est cependant la complication auto-immune la plus fréquente, (Zent and Kay *et al*, 2010).

12.1. Transformations

Dans une faible proportion des cas, la LLC se transforme en formes plus agressives : Une de ces formes est le **syndrome de Richter** qui correspond au développement d'un lymphome agressif dans la plupart des cas sous la forme d'un lymphome B Diffus à Grandes Cellules (LBDGC) ou plus rarement d'un lymphome de Hodgkin (LH). Le diagnostic et la distinction de ces deux entités se feront par une analyse histopathologique. La suspicion clinique de cette transformation chez les

patients atteints de la LLC est basée sur une altération de l'état général avec l'apparition ou l'aggravation des symptômes tels que la fièvre, les sueurs nocturnes, une croissance rapide des ganglions lymphatiques ou d'une masse lymphoïde extranodale ou encore une augmentation excessive du taux de lactate déshydrogénase (LDH).

L'imagerie par tomographie par émission de positrons (TEP) peut guider le choix d'effectuer ou non une biopsie. Environ 2 à 7% des patients atteints de la LLC développent un syndrome de Richter.

Les anomalies génétiques retrouvées dans les cas de Richter type LBDGC sont les mutations *NOTCH1*, *TP53*, *CDKN2A* et *MYC*. L'expression *MYC* retrouvée dans 30 à 40% est fréquemment associée à l'expression *BCL2* et le variant LBDGC exprime dans la plupart des cas PD-1 (ProgrammedcellDeath 1) contrairement à la LLC et au LBDGC *denovo*³⁸. D'un point de vue immunophénotypique, les cellules du syndrome de Richter de type LBDGC sont CD20+, n'expriment le CD5 que dans environ 30% des cas et le CD23 dans environ 15% des cas³⁹. La plupart des syndromes de Richter de type LBDGC ont un phénotype de cellules post-centre germinatif (positivité IRF4) alors que seulement 5 à 10% présentent un phénotype type centre germinatif avec une expression du CD, (**Kristinsson . S et al ,2009**).

Dans le cas du variant type LH, le diagnostic repose sur la présence de cellules de Reed-Sternberg de phénotype CD30+, CD15+, CD20-, (**Xiao .W et al ,2016**).

Le pronostic du syndrome de Richter est généralement sombre en particulier chez les patients fortement prétraités pour la LLC. Le facteur pronostique le plus important est la relation clonale entre la LLC et les clones de lymphome agressif, une transformation impliquant des lymphocytes non clonalement liés à la LLC étant de meilleur pronostic.

La transformation pro- lymphocytaire des cellules B est un évènement rare mais qui demeure une évolution possible de la LLC. Cette maladie se manifeste par une splénomégalie symptomatique et une majoration de la lymphocytose avec plus de 55% des lymphocytes qui sont des prolymphocytes. La clinique de la leucémie à Prolymphocytes est généralement plus agressive que celle de la LLC.

13. Techniques d'analyses en biologie moléculaire

13.1. Matériels

La détection des leucémies lymphoïdes chronique nécessite des analyses sanguines à savoir l'accumulation des lymphocytes matures. Le matériel et les produits utilisés sont récapitulés dans le tableau 5

Tableau 5 : Matériels et produits chimiques utilisés pour les analyses des leucémies Lymphoïdes

PRODUITS	MATÉRIEL
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Solution May-Grünwald. ▪ Giemsa liquide. ▪ Huile à immersion. ▪ Solution SSPP. ▪ Eau distillée. ▪ Solutions conservées à température ambiante : ▪ Facs Flow, Cell Wash, Facs Clean, Facs Rinse, CellFix, FacsPerméabilizing . ▪ Réactifs conservés à + 4°c : ✓ Les billes de calibration. ✓ Les anticorps monoclonaux. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Automate pour analyse hématologique (SysmexXN-350) ▪ Incubateur. ▪ Centrifugeuse à grande vitesse. ▪ Réfrigérateurs à 4° C, un congélateur à 20°C ▪ Microscope optique ▪ Pipettes de 1000 µl ▪ Pointes standard en boites. ▪ Pointes stériles en plastique. ▪ Lames et lamelles de microscope. ▪ Tubes de centrifugation en plastique jetable. ▪ Gangs, Seringue, garrot, sparadrap, compresse.Cytométrie en flux (BD FACSCalibur): Comprend: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Capacité de tri de 3 tubes. ▪ 2 lasers (488 Saphir, 635 diodes rouges). ▪ Système à 4 couleurs (vert, jaune, rouge,infrarouge). ▪ MAC Computer avec le logiciel CellQuestPro. ▪ Agitateur rotatoire type vortex. <p>Tube à essai Corning™ Falcon™.</p>

13.2. Méthodes

Les prélèvements reçus au laboratoire et issus des malades ont été effectués selon les techniques habituelles tout en respectant les conditions d’asepsie Tableau 7

Tableau 7 : Les différents types de prélèvement.

Prélèvement	Méthode	Condition de prélèvement
Sang	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Mettre des gants Faire une antiseptie de la peau. ▪ Poser le garrot (maximum 1 minute) et rechercher la veine, à prélever rapidement, Ponctionner. ▪ Desserrer le garrot dès le premier tube Tube EDTA (mauve). ▪ Veiller au bon remplissage de tubes Retirer le tube tout en maintenant le corps de prélèvement Homogénéiser le tube dès le retrait du corps de prélèvements par 5 à 10 retournements lents. ▪ Retirer l'aiguille tout en comprimant la veine avec un coton. Le patient assure la compression pendant 2 à 3 minutes. ▪ Identifier les tubes en laissant le niveau de sang apparent. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Le patient ne doit pas être à jeun. ▪ Le prélèvement doit se faire avant tout traitement, car la chimiothérapie ou une Corticothérapie peut entraîner soit une altération de l'expression de certains antigènes membranaires ou une destruction cellulaire. ▪ Ces prélèvements doivent être effectués le matin et acheminé rapidement au Laboratoire d'hématologie pour être manipulés le jour même ou au plus tard le lendemain
Moelle osseuse	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Insère une aiguille dans l'os de bassin ou de sternum. ; Ces os-là présentent le double avantage d'être faciles d'accès et suffisamment fins pour être transpercés facilement. La ponction de moelle osseuse dure moins de 15 minutes et se fait le plus souvent sous anesthésie locale. 	

13.2.1. Formule numérique sanguine

Cette étape se fait grâce à un automate (Sysmex XN-350). La numération des éléments figurés peut se faire par variation d'impédance qui est la méthode de référence où une suspension de sang est mise dans un diluant conducteur est aspirée et qui passe entre deux électrodes, chaque cellule sanguine

n'étant pas conductrice, entraîne une baisse de la conductivité électrique, la chute de tension est proportionnelle à la taille de la cellule et ces impulsions sont comptées.

Les cellules sont considérées comme :

- Globules rouges toute particule supérieure à 36 μ^3 .
- Plaquettes toute particule comprise entre 2 et 20 μ^3 .
- Globules blancs, les globules rouges étant préalablement lysés, toute particule supérieure à 35 μ^3 .

La mesure de l'hémoglobine est réalisée sur la dilution des leucocytes, l'agent de lyse forme un complexe coloré avec l'hémoglobine puis lecture par faisceau optique à 525 nm.

13.2.2.Réalisation du frottis sanguin

L'examen du frottis de sang **Fig 22** au microscope constitue un complément essentiel du comptage par automates. L'étude qualitatif (forme ; taille et volume) des éléments figurés du sang sont réalisée comme suivant :

- ✓ Déposer une goutte du sang de taille moyenne à 1.5 cm sur le bord droit d'une lame.
- ✓ Etaler par capillarité la goutte au contact de l'arête d'une lamelle tenue à 45 degrés.
- ✓ Pousser rapidement la lamelle vers la gauche de la lame de façon à étaler le sang en une couche mono cellulaire (ne pas répéter l'opération plusieurs fois sur la même lame).

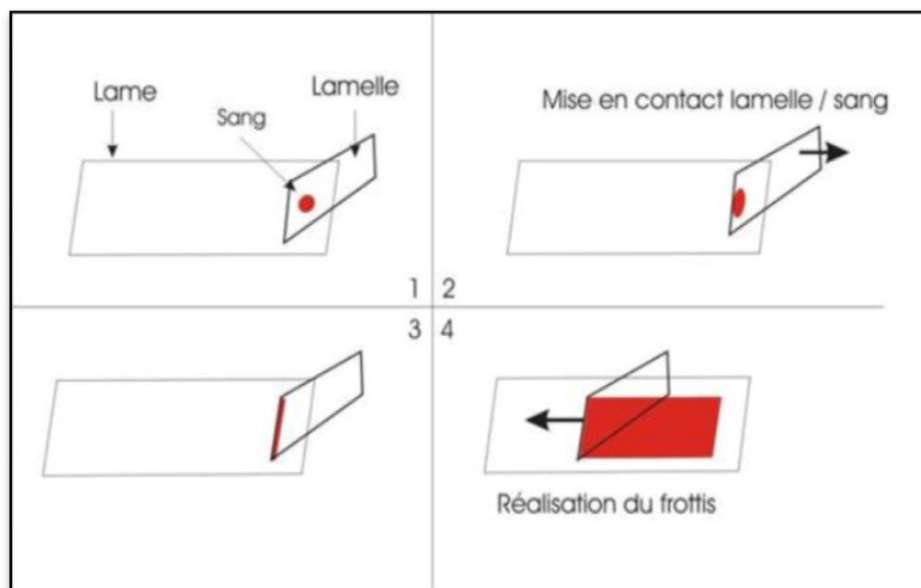


Figure 22: La réalisation du frottis sanguin (Lacombe C, D1 – Hématologie 2005 – 2006).

- ✓ **Fixation** : La lame du frottis est placée sur un support horizontal au-dessus d'un bac de coloration. On verse sur la lame 15 gouttes de colorant May-Grünwald pur de façon à recouvrir complètement le frottis. On laisse agir 3 minutes.

- ✓ **Coloration au May-Grünwald:** On ajoute autant des gouttes d'eau neutre que de gouttes du colorant, le mélange est rapide, on laisse agir pendant 2 minutes. Pendant ce temps, on doit préparer la dilution du Giemsa, préparation extemporanée de 3 minutes auparavant. Pour cela, il faut introduire 20 cm³ d'eau neutre dans une éprouvette graduée, et ajouter 30 gouttes de colorant de telle manière que celui-ci reste à la surface de l'eau neutre. On rejette ensuite le colorant par un jet d'eau neutre.
- ✓ **Coloration au Giemsa :** On verse le contenu de l'éprouvette dans une boîte de Laveran. Dès que la lame est prête, on mélange en agitant doucement (le pouvoir colorant est maximum au moment du mélange). On dépose ensuite la lame (frottis en dessous) dans la boîte, on laisse agir pendant 20 minutes (Giemsa lent) et on rince après sous un jet d'eau neutre.
- ✓ **Séchage :** On laisse sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure de la lame avec du papier filtre. On attend au moins 5 minutes avant l'examen microscopique du frottis qui révélera une couleur violette foncée du noyau et un cytoplasme à teinte variable mais toujours pâle

13.2.3. Technique de la cytométrie en flux

Elle se base sur un principe par mesure optique, en résumé, associe la cytométrie de flux et la diffraction lumineuse, la source de lumière étant généralement un laser. La cellule dévie la lumière en fonction de sa taille, de sa granularité et de la forme de son noyau. Pour une analyse optimisée :

- ✓ L'immunophénotypage doit être effectué sur des cellules fraîches non fixées au formol car la viabilité est plus grande.
- ✓ Pour avoir des résultats concluants, il faut connaître les bases optiques de la CMF et les propriétés des fluorochromes (Avant le commencement de la manipulation il faut d'abord effectuer un comptage des globules blancs si le résultat de ce comptage dépasse 25000 mille/mm³, la réalisation d'une dilution avec cellwash est obligatoire).
- ✓ Le premier tube est obligatoirement un tube de témoin qui ne contient pas de marqueurs, juste 100 µl du culot lavé.
- ✓ Les différents fluorochromes se trouvent dans le reste des tubes.

13.2.4. Les étapes de préparation de l'échantillon

- ✓ Numération des tubes de l'échantillon.
- ✓ Mettre 100 µl du culot lavé de l'échantillon dans tous les tubes.
- ✓ Ajouter 20 µl des anticorps monoclonaux selon le panel dans tous les tubes sauf le témoin.
- ✓ Avec un vortex mélanger le contenu des tubes.
- ✓ Incubation pendant 20 – 30 minutes à l'obscurité.

- ✓ Verser dans chaque tube 2 ml du vert-lyse, puis incuber pendant 10 minutes à l'obscurité.
- ✓ Centrifuger les tubes à une vitesse de 1500 tours /5 minute.
- ✓ Réaliser deux lavages avec 3 ml de cellwash.
- ✓ Centrifuger une autre fois tous les tubes à une vitesse de 1500 tours /5 minutes.
- ✓ Ajouter 250 µl de facs flow dans les tubes.
- ✓ En fin acquisition des données dans l'appareil, et analyse de l'échantillon.

13.2.5.Principe de caryotype et FISH

13.2.5.1.Principe de caryotype

Technique de marquage permettant de mettre en évidence des structures appelées bandes, sur les chromosomes. La technique des bandes R: correspond à un marquage de l' euchromatine (segments non variable), ainsi les chromosomes présentent une alternance de bandes sombres et claires.

13.2..5.2.Principe de FISH

La FISH se fait dans une chambre noire (technique et lecture) .

Les sondes FISH: Il peut s'agir de sondes locus, de peintures chromosomiques ou de sondes centromériques ou télomériques.

- ✓ Les étapes de la FISH après étalement des lames :
- ✓ Prétraitement des lames.
- ✓ Application des sondes.

CONCLUSION

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une prolifération lymphoïde monoclonale, responsable d'une infiltration médullaire, sanguine, parfois ganglionnaire, constituée de lymphocytes matures de morphologie normale et de phénotype B. C'est la plus fréquente des leucémies de l'adulte. D'évolution chronique, la LLC reste une maladie incurable, mais de progression lente pour une large majorité des patients.

Il y a plusieurs diagnostics pour détecter cette maladie comme diagnostic positif, cytologique, histologique.

Au début, cela explique pourquoi la maladie ne montre aucun signe jusqu'à ce qu'elle progresse là où les ganglions lymphatiques sont plus gros que d'habitude. Vous pouvez ressentir des signes physiques tels que fatigue, fièvre, l'essoufflement.

LLC est une maladie cytogénétique, elle est produite par des anomalies chromosomiques par exemple la **délétion 17p** associée à la perte du gène suppresseur de tumeur p53, et par la **mutation du gène TP53**.

L'analyse moléculaire de LLC pour déterminer les anomalies chromosomiques et les mutations par plusieurs techniques en particulier, L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) et Le cary typage.

Pour stabiliser cette maladie, les médecins utilisent plusieurs traitements comme la chimiothérapie, les corticoïdes et les antibiotiques. L'administration de ces traitements provoque un certain nombre d'effets indésirables donc les médecins surveillent les malades régulièrement et de près pour garantir une meilleure survie sans rechute.

Références

Bibliographiques

REFERENCE :

1. **Annette steiger** .Point de vue hématologie .Aspect morphologique de LLC .**2010** .
2. **Austen B, Skowronska A, Baker C et al.** Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol*; 25: 5448–5457. **2007**.
3. **Baumann Kreuziger LM, Tarchand G, Morrison VA.** The impact of Agent Orange exposure on presentation and prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. Jan;55(1):63–6. **2014**
4. **Benosman C.** Contrôle de la dynamique de la leucémie myéloïde chronique par Imatinib. Mathématiques appliquées et calcul scientifique. Université Bordeaux 1 école doctorale de mathématiques et informatique. 11-12 p. **2010**.
5. **Binet, J. L., Auquier, A. & Dighiero, G.** A New Prognostic Classification of Chronic Lymphocytic Leukemia Derived from a Multivariate Survival Analysis. **1981**.
6. **Bosanquet, A.G., Sturm I, Wieder T et al.** Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*; 16: 1035-1044. **2002**.
7. **Bulian, P. et al.** CD49d Is the Strongest Flow Cytometry–Based Predictor of Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *JCO* **32**, 897–904 .**2014**.
8. **Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M.** Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*; 352:804-15. **2005**.
9. **Compushematologie.**leucémie lymphoid chronique llc .TICEM-UMVF.**2007**
10. **Crespo, M. et al.** ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* **348**, 1764–1775 **2003**.
11. **Dee Unglaub S.** Physiologie humaine un approche intégrée. Pearson éducation. France. 110-511-508 p. **2007**.
12. **Demers G.W., Foster S.A., Halbert C.L., and Galloway D.A.** Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc. Natl.Acad. Sci.; U.S:* 91, 4382-6. **1994**.
13. **Demers G.W., Foster S.A., Halbert C.L., and Galloway D.A.** Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc. Natl.Acad. Sci.; U.S:* 91, 4382-6. **1994**.
14. **Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A et al.** Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910–**1916**

15. **Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger *et al.*** Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* ; 343 : 1910-6. **2000** .
16. **Dr .Spencer gebson** .Societe e leuciemelymphoïde du canada .**2017**
17. **DR.vershaBaerhisociete** de leuceime lymphoïde du Canada .**2020**
18. **Ellims, P. H., Gan, T. E. & Van der Weyden, M. B.** Thymidine kinase isoenzymes in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol***49**, 479–481.**1981**.
19. **Ferrant A.** Hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d’Hématologie . **2004**.
20. **Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A et al.** Unmutated Ig V (H) genes are associated with a moreagressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood* ; 94: 1848-1854.**1999**.
21. **Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW.** World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; **2001**.
22. **Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al.** Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primer.* 19;3:16096. **2017**.
23. **Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA et al.** Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*; 194:1625–38. **2001**.
24. **Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K.** Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*; 341: 1520–9. **1999**.
25. **Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, LawrMS, et al.** Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*; 152 : 714-26. **2013**.
26. **Lanz S.** Les leucémies de l’adulte. Ligue suisse contre le cancer. 52 p. **2011**.
27. **Laurent B.** Mécanismes d’adhérence des leucocytes aux fibres synthétiques ; application à la filtration du sang. Thèse de doctorat en biomécanique, université paris 7– denisdiderot. Ufr de physique. **2001**.
28. **Letestu R, Levy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib, et al.** Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients : the strength of routine parameters. *Blood* ; 116 : 4588-90. **2010**.
29. **Maëlle Mauzon.** les cellules souches hématopoïétiques: définition, origines et principales utilisations thérapeutiques. Thèse de Doctorat pharmacie. Université Nancy Henri Poincaré. 39 pages . **2011**.
30. **Matutes E, Attygalle A, Wotherspoon A, Catovsky D.** Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Pract Res Clin Haematol.* Mar;23(1):3-20. **2010**

- 31. Morton LM, Slager SL, Cerhan JR, Wang SS, Vajdic CM, Skibola CF, et al.** Etiologic heterogeneity among non-Hodgkin lymphoma subtypes: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2014 Aug; (48):130–44. **2014.**
- 32. Petitjean A, Mathe E, Kato S et al.** Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*; 28: 622-9. **2007.**
- 33. Petitjean A, Mathe E, Kato S et al.** Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*; 28: 622-9. **2007.**
- 34. Petitjean A, Mathe E, Kato S et al.** Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*; 28: 622-9. **2007.**
- 35. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP et al.** Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 46: 219–234. **1975.**
- 36. Redaelli, A., B. L. Laskin, et al.** "The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia." *Eur J Cancer Care (Engl)* **13**(3): 279. **2004.**
- 37. Rossi D, Brusca A, Spina V et al.** Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*; 118: 6904-8. **2011.**
- 38. Rossi D, Fangazio M, Rasi S et al.** Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 119:2854-62. **2012.**
- 39. Rossi D, Rasi S, Spina V et al.** Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 121: 1403-12. **2013.**
- 40. Sarfati, M., Chevret, S. & Chastang, C.** Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. **1996.**
- 41. Scarfò, L., Ferreri, A. J. M. & Ghia, P.** Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **104**, 169–182 **2016.**
- 42. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, et al.** Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* ; 24 : 4634-41. **2006.**
- 43. Skowronska A, Parker A, Ahmed G et al.** Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol* (a); 30: 4524-32. **2012.**

44. **Tobin, G. et al.** Somatically mutated Ig VH3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **99**, 2262–2264 **2002**.
45. **Travade P, Tournilhac O et Dighiero G.** Leucémie lymphoïde chronique. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris, tous droits réservés), Hématologie, 13-013-B-20, 2000,12 p. **2000**,
46. **Troussard, X., V. Duchenet, et al.** "[Haematological malignancies: incidence in Basse- 184 **Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O.** Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2009 May;94(5):647–53. . **2009**.
47. **Tyler et al.** Les différents compartiments de la moelle osseuse hématopoïétique. . **2000** .
48. **Xiao, W. et al.** Hodgkin lymphoma variant of Richter transformation: morphology, Epstein-Barr virus status, clonality, and survival analysis—with comparison to Hodgkin-like lesion. *Human Pathology* **55**, 108–116 **.2016**.
49. **Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y et al.** Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood*; 119: 3668-83. **2012**.
50. **Zent, C. S. and N. E. Kay.** "Autoimmune complications in chronic lymphocytic. **2010**.
51. **Zenz T, Häbe S, Denzel T et al.** Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*; 114: 2589-97. **2009**.