

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

FACULTE DE MEDECINE DE BLIDA

DEPARTEMENT DE MEDECINE

THESE

**POUR LE DIPLOME DE DOCTEUR
EN SCIENCES MEDICALES**

**EVALUATION DES EXAMENS
IMMUNOCYTOLOGIQUES ET CYTOGENETIQUES A
VISEE DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE DANS LA
LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE**

Docteur Souad TAOUSSI

Maitre assistante en Hématologie, EHS ELCC Blida

Directeur de thèse : Professeur Mohand Tayeb ABAD

Jury : Présidente : Professeur Fatma Zohra ARDJOUN

Asseseurs : Professeur Hocine AIT ALI

Professeur Redhouane AHMED NACER

Professeur Naima MESLI

Année 2012

Je dédie ce travail

- A ma mère

Sans qui rien n'eut été possible, avec ma reconnaissance éternelle.

- A mon directeur de thèse, le professeur M.T Abad

- Au regretté professeur Y. Oukaci

- Aux professeurs :

- Florence Nguyen-Khac (Hopital Pitié Salpétrière, Paris)

- Véronique Leblond (Hopital Pitié Salpétrière, Paris)

- Aux docteurs : Isabelle Redford-Weiss (Hopital Necker, Paris)

Nicolle Dastugue (Hopital Purpan, Toulouse)

Elise Chapiro (Hopital Pitié Salpétrière, Paris)

- A Madame Fatima EL-Faqihi (Hopital Purpan, Toulouse)

- A Madame Jeanne Ong (Hopital Pitié Salpétrière, Paris)

Toutes ces personnes n'ont ménagé aucun effort pour me former et me guider

Qu'elles soient assurées de ma reconnaissance et de ma gratitude.

- A Nawell Cherfi, première technicienne formée pour la cytogénétique hématologique dans le service d'hématologie du CAC Blida

- Aux patients atteints de LLC.

Que ce travail soit pour eux un bout d'espoir et de réconfort.

- A toute ma famille

- A ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail

Abréviations

Ac : anticorps

ADAM 29 : Disintegrin and metalloprotease protein 29

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

Ag : Antigène

AHAI : Anémie hémolytique Autoimmune.

AID : Activated-induced cytidine deaminase.

AIF : Apoptosis Inducing Factor

Akt : protéine kinase isolée du retrovirus AKT8

AP-1 : Activator Protein-1

Apaf-1: Apoptotic protease-activating factor-1.

APRIL : recepteur de haute affinité du TNF

ARN : Acide ribonucleique

ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

Bad : Bcl2 Associated Death promoter

BAFF : B cell activating factor

BAFF-R : BAFF Receptor

Bak : Bcl2 homologous Antagonist/Killer

Bax : Bcl2 Associated X protein

Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins

BCR : B Cell Receptor

BH : Bcl-2 homology

BLyS: Stimulateur des Lymphocytes B.

BMCA : April receptor

Caspase : CysteinyI-aspartate-cleaving proteases

CCND1 : Cycline D 1

CD : Cluster de differenciation.

CGH : Comparative Génome Hybridization.

CHOP : Cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine, prednisone

CLL/PL : Chronique lymphocytic leukemia/prolymphocytic leukemia.

CMF : Cytométrie en flux.

CMV : CytomégaloVirus.

COP : Cyclophosphamide+ Oncovin + Prednisone.

CRP : C reactive protein.

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CVP : Cyclophosphamide, vincristine, prednisone

CXCR4 : Recepteur SDF-1

DAPI : 4,6 - Diamidino- 2- phenyindole, dilactate.

DD : Death Domain

DED : Death effector domain

del : délétion.

DHAP : dex amethasone, cytarabine, cisplatine

DIABLO : D Direct IAP Binding protein with Low pI

DISC: Death-inducing Signaling Complex.

DLI : Donor Lymphocyte Infusion

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DRS : Death Receptors

DSP-30 : single stranded, CpG unmethylated, phosphorothioate oligodeoxynucleotide

EBMT : European Bone Marrow Trasplantation.

EBV : Epstein Barr Virus

ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group

EDTA : acide éthylènediaminotétraacétique.

EFS : Event-Free-Survival (Survie sans evenement)

ELISA : Enzyme-Linked-ImmunoSorbent-Assay

FAB : French-American-British Coopérative Group.

FADD : Fas Associated Death Domain

Fas L : Fas ligand

FC : Fludarabine + cyclophosphamide

FCR : Fludarabine + Cyclophosphamide + Rituximab

FDX1 : Ferredoxin 1

FISH : Fluorescent In-Situ Hybridization

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine.

FLIP : Flice inhibitory protein.

FSC : Forward Scatter

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GFR- β 2 M : taux de β 2 microglobuline corrigé.

GVHD : Graft Versus Host Disease

GVL : Graft Versus Leukemia

Hb : Hémoglobine

HCL : Heary cell leukemia.

HCV : Hépatite C virus.

HLA : Human Leukocyte Antigen

HSV : Herpes Simplex Virus

HTLV1 : Human T-cell Leukemia Virus .

IAP-binding protein with low pI

IAPs : Inhibitors of Apoptosis

I-FISH : FISH interphasique.

Ig : Immunoglobuline

Ig VH : Immunoglobulin Variable Heavy chain

IL : Interleukine.

ISCN : International System for Human Cytogenetic Nomenclature

Iso : Isochromosomes.

IWCLL : International Working Group on CLL

KCl : Chlorure de potassium.

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : leucémie aigue myeloïde.

LDH : Lactate déshydrogénase

LDT: Lymphocyte Doubling Time.

LF : Lymphome folliculaire

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LNH : Lymphome non-Hodgkinien

LPL : Leucémie prolymphocytaire.

LPS : Lipopolysaccharide

MALT : Mucosa-associated lymphoid tissue

MCL : Mantle cell lymphoma.

MCP : Mitoxantrone, chlorambucil, prednisone

Mdc1 : Mediator of DNA damage checkpoint 1

Mdm2 : Murine double minute 2

MDR1 : Multi Drug Resistance 1

MDS : Myélodysplastic syndrome.

M-FISH : multi- FISH

MGG : May-Grünwald Giemsa.

MLL : Mixed Lineage Leukemia

MM : Myélome Multiple.

MRD : minimal residual disease.

NCI : National Cancer Institute

NCI/WG: National Cancer Institute/Working Group

NK : Natural Killer

NPM1 : Nucleophosmin

NS : Non Significatif

OBL-FC : Oblimersen - Fludarabine, Cyclophosphamide.

OFAR : Oxaliplatine, Fludarabine, Aracytine, Rituximab.

OG : Ombres de Gumprecht.

OMS : Organisation Mondiale de la Sante (WHO : World Health Organization)

ORR : Overall response rate.

OS : Overall Survival (Survie globale)

p : bras chromosomique court.

p53 AIP1 : p53 regulated Apoptosis Inducing protein 1

PAX : Paired Box Gene

pb : paires de bases

PBD Paired Box Domain

PBO : ponction biopsie osseuse.

PBS : Phosphate buffer saline

PC-5/7 : Phycoerythrine Cyanin-5/7

PCR : Polymérase Chain Réaction.

PDGF : Platelet derived growth factor

PDGFR Platelet Derived Growth Factor Receptor

PE : Phycoerythrine

PE Phosphatidylethanolamine

PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule 1

PFS : Progression free survival.

PHA C : Phyto Hém Agglutinine C.

PIAS : Protein inhibitor of activated STAT

PL : Phospholipide

PMA : Phorbol 12-myristate 13-acetate

PR : Polyarthrite rhumatoïde

PTI : Purpura thrombocytopénique idiopathique

PTLD : Post Transplant Lymphoproliferative Disease

PUMA : p53 Upregulated Modulator Of Apoptosis

PWM : pokeweed mitogen.

q : bras chromosomique long.

RC : remission complete

RDHAP : Rituximab, Cysplatine, Aracytine, Cexamethasone.

RDX : Radixin

REACH : Rituximab in the Study of Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia

REAL : Revised European-American Lymphoma

RFC : Rituximab, Fludarabine, Cyclophosphamide.

RG : réponse globale.

RP : rémission partielle.

R-PE : R-phycoerythrine

RPN : Rémission partielle nodulaire.
RQ-PCR : Real Quantitative -PCR
RT-PCR : Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCF : Stem Cell Factor.
SDF-1 : Stromal cell-derived factor-1
SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise
SIMP : Soluble inter membrane mitochondrial proteins
SLPC : Syndromes lymphoprolifératifs chroniques
Smac : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
Smac/DIABLO Second Mitochondria derivated activator of caspases
SMD : Syndrome myélodysplasique
SSC : Side Scatter
SSP : Survie sans progression.
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
SVF : Serum de veau foetal
TAC 1 : gene tachykinin, precursor 1
TCD : test de coombs direct.
TCR : T-Cell Receptor.
TDM : tomodensitométrie : scanner
ter : terminal.
TFT : Time free treatment.
TGF α : Transforming Growth Factor- α
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TK : Tyrosine Kinase
T-LGL : Lymphome à grande cellules T.
TNF : Tumor necrosis factor
TRADD : TNF-R-associated death domain
TRAF : TNF-Receptor Associated Factor
TRAIL : Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
TRM : Treatment related mortality.
TTR : Time To Retreatment.
TTT : Time To Treatment.
VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
WBC : White Blood Count.
WHO : World Health Organisation.
ZAP-70 : Zeta associated protein 70
ZML : Zone marginal lymphoma.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PARTIE THEORIQUE	
I- DEFINITION DE LA LLC	3
II- FREQUENCE	3
III- ETIOPATHOGENIE	3
IV- PHYSIOPATHOLOGIE	4
1- Origine du lymphocyte de LLC	4
2- Resistance à l'apoptose de la cellule LLC	4
2.1 La voie intrinsèque ou voie mitochondriale	4
2.2 La voie extrinsèque	5
2.3 Interaction voie intrinsèque et voie extrinsèque	7
2.4 Régulateurs de l'apoptose	7
2.4.1 La P53	7
2.4.2 Le gène ATM	7
2.4.3 La famille Bcl-2	7
3- Survie ou prolifération cellulaire dans la LLC	8
3.1 Récepteur de la cellule B	8
3.2 Les interleukines	8
3.3 Le CD38	8
3.4 Tumor necrosis factor- α	9
3.5 BMCA, TAC1 et BAFF-R	9
3.6 CD40 et CD 40 ligand	9
3.7 Récepteurs d'adhésion de molécules	9
3.8 Transforming Growth Factor- β	9
3.9 Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire	9
3.10 Récepteurs du Stroma-Derived Growth Factor-1	9
3.11 Récepteur du facteur basique de croissance des fibroblastes	10
3.12 Acide lysophosphatidique et albumine	10

4- Les dérèglements immunitaires	10
4.1 L'hypogammaglobulinémie	10
4.2 Phénomènes auto-immuns	10
V- DIAGNOSTIC POSITIF	11
1- Circonstances de découverte	11
2- Eléments du diagnostic positif	11
2.1 L'hémogramme	11
2.2 L'examen du frottis sanguin	11
2.3 L'immunomarquage lymphocytaire par cytométrie en flux	12
2.3.1 Affirmer la monoclonalité	12
2.3.2 Préciser la variété de l'hémopathie lymphoïde	12
2.3.3 Révéler un impact pronostique	13
2.3.4 Evaluer la maladie résiduelle	14
2.4 Le myélogramme	14
2.5 La biopsie ostéomédullaire	14
2.6 La Cytoponction ganglionnaire	15
2.7 La biopsie ganglionnaire	15
2.8 L'électrophorèse des protéines sériques	15
VI- DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL	15
1- Hyper lymphocytose réactionnelle bénigne	15
1.1 Hyperlymphocytose T	15
1.2 Hyperlymphocytose B polyclonale à lymphocytes binucléés	16
2- La Lymphocytose B monoclonale	16
3- Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques	16
3.1 La Leucémie prolymphocytaire	17
3.2 Les Lymphomes folliculaires en phase leucémique	17
3.3 Le Lymphome du manteau	17
3.4 La Maladie de Waldenström	18
3.5 La Leucémie à tricholeucocytes : forme hyperleucocytaire	18
3.6 Le Lymphome splénique à lymphocytes vilieux	19
3.7 Le Lymphome de la zone marginale	19
3.8 Les Lymphomes T	19

3.8.1 La Leucémie prolymphocytaire T	19
3.8.2 La Leucémie / lymphome à cellules T	19
3.8.3 Le Syndrome de Sézary	20
3.8.4 Les Lymphomes à LGL	20
3.8.4.1 Les lymphomes T-LGL	20
3.8.4.2 Les lymphomes NK-LGL	20
VII LES FACTEURS PRONOSTIQUES	20
1- Facteurs pronostiques classiques	20
1.1 La classification de Rai	21
1.2 La classification de Binet	22
1.3 Le temps de dédoublement des lymphocytes sanguins	23
1.4 L'aspect cytologique des lymphocytes sanguins	23
1.5 Le type d'infiltration médullaire	23
2- Les nouveaux facteurs pronostiques	24
2.1 Les facteurs à valider	24
2.1.1 Les marqueurs sériques : VEGF, thrombopoïétine.	24
2.1.2 La longueur des télomères	24
2.1.3 La mRNA AID	24
2.1.4 L'expression de la lipoprotéine lipase A et d'ADAM29	24
2.1.5 Le profil d'expression des microRNA	24
2.1.6 L'expression de l'antigène leucocytaire humain G	24
2.2 Les facteurs liés au traitement	25
2.3 Les facteurs validés	26
2.3.1 Les marqueurs sériques	26
2.3.1.1 La β 2 microglobuline	26
2.3.1.2 La thymidine kinase sérique	26
2.3.1.3 Le CD23 soluble	27
2.3.1.4 L'Angiopoïétine-2 plasmatique	27
2.3.2 L'état mutationnel des gènes Ig VH	28
2.3.3 L'expression du CD38	29
2.3.3.1 Le seuil de positivité du CD38	29
2.3.3.2 Corrélation du CD38 avec le statut mutationnel des Ig VH	31

2.3.3.3 Le CD38 est un facteur de mauvais pronostic	33
2.3.3.4 L'expression du CD38 peut elle changer au cours de la maladie	34
2.3.4 Le ZAP 70	34
2.3.5 La cytogénétique	37
2.3.5.1 Le caryotype	38
2.3.5.2 L'hybridation in situ fluorescente	40
2.3.5.3 Les anomalies cytogénétiques	41
2.3.5.3.1 La délétion 13q14-34	41
2.3.5.3.2 La trisomie 12	43
2.3.5.3.3 La délétion 11q22.3	43
2.3.5.3.4 La délétion 17p13	45
2.3.5.3.5 La délétion 6q21	47
VIII- EVOLUTION - COMPLICATIONS	47
1- Infections	47
2- Insuffisance médullaire	48
3- Manifestations auto-immunes	49
3.1 Anémie hémolytique auto-immune	49
3.2 Erythroblastopénie auto-immune	50
3.3 Purpura thrombopénique auto-immun	50
3.4 Autres manifestations auto-immunes	50
4- La Transformation de la LLC	50
4.1 Le Syndrome de Richter	50
4.2 La leucémie aigue	52
5- Autres cancers ou hémopathies	52
IX- FORMES CLINIQUES	52
1- Type de description : forme typique	52
2- Les formes selon le stade de Binet	53
3- Les formes cytologiques	53
X- TRAITEMENT	54
1- Evolution du traitement de la LLC	54
2- Les traitements historiques	54
3- Les analogues des purines	55

4- L'immuno-chimiothérapie	57
5- Autres protocoles	61
5.1 OFAR 1	61
5.2 OFAR 2	61
5.3 R-DHAP	61
5.4 OBL-FC	61
6- Les nouvelles molécules	62
6.1 La Bendamustine	62
6.2 Oblimersen	62
6.3 Obatoclax	62
6.4 Flavopiridol	62
6.5 Lenalidomide	62
6.6 Ofatumumab	63
6.7 Lumiliximab	63
7- La greffe de cellules souches hématopoïétiques	63
7.1 L'Autogreffe	63
7.2 L'Allogreffe	64

Partie Pratique

I- MATERIELS ET METHODES	67
I.1 Patients et critères d'inclusions	67
I.1.1 Patients inclus pour l'étude cytologique	67
I.1.2 Patients inclus pour l'étude en caryotype et en FISH	67
I.1.3 Patients inclus sous le protocole FC ou RFC	67
I.2 Matériels et réactifs	67
I.2.1 Pour la cytologie	68
I.2.2 Pour la cytométrie en flux	68
I.2.2.1 Matériels	68
I.2.2.2 Consommables	68
I.2.2.3 Réactifs	68
I.2.2.3.1 Les anticorps monoclonaux	68
I.2.2.3.2 Les billes de calibration	68
I.2.2.3.3 Solutions	68
I.2.3 Pour la cytogénétique conventionnelle : Caryotype	69
I.2.3.1 Equipements	69
I.2.3.2 Réactifs	69
I.2.3.3 Consommables	69
I.2.3.4 Milieux et solutions à préparer	70
I.2.4 Pour la FISH	70
I.2.4.1 Equipements	70
I.2.4.2 Réactifs	71
I.2.4.2.1 Réactifs : Conservation à température ambiante	71
I.2.4.2.2 Réactifs : Conservés à + 4	71
I.2.4.2.3 Sonde pour rechercher la trisomie 12	71
I.2.4.2.4 Sonde pour rechercher la délétion 13q14-34	72
I.2.4.2.5 Sonde pour la détection de la délétion ATM et/ou la délétion P 53	72
I.2.4.2.6 Sonde pour rechercher la délétion 6q21	70
I.2.4.2.7 Réactifs conservation à – 20°C	73
I.2.4.3 Consommables	73
I.2.4.4 Solutions de travail : à préparer	73
I.3 Méthodes	74
I.3.1 Etude Cytologique	74
I.3.2 Cytométrie en flux	74
I.3.3 Cytogénétique conventionnelle : Caryotype	76
I.3.3.1 Mise en culture	76
I.3.3.2.1 Choc hypotonique	76
I.3.3.2.2 Préfixation	77

I.3.3.2.3	Fixation	77
I.3.3.2.4	Etalement cellulaire	77
I.3.3.2.5	Dénaturation en bandes R (Reverse)	78
I.3.3.2.6	Lecture	79
I.3.3.3	Contraintes liées à la réalisation du caryotype	79
I.3.4	L'hybridation in situ fluorescente : FISH	80
I.3.4.1	Aspects techniques	80
I.3.4.2	Avantages et contraintes liées à la réalisation d'une FISH	82
I.3.4.2.1	Avantages	82
I.3.4.2.2	Inconvénients	82
I.3.5	Nomenclature	82
I.3.5.1	Nomenclature : Le caryotype	82
I.3.5.1.1	Notions élémentaires	83
I.3.5.1.2	Désignation d'un caryotype	84
I.3.5.1.3	Anomalies de nombre	85
I.3.5.1.4	Anomalies de structures	85
I.3.5.2	Nomenclature pour L'hybridation in situ fluorescente (FISH)	86
I.3.5.2.1	FISH métaphasique	86
I.3.5.2.2	FISH interphasique	87
I.3.6	Traitement	88
I.3.6.1	Evaluation pré thérapeutique	88
I.3.6.2	Protocoles thérapeutiques	90
I.3.6.2.1	Protocole FC	90
I.3.6.2.2	Protocole RFC	90
I.3.6.3	Surveillance du traitement	91
I.3.6.3.1	Surveillance de la tolérance	91
I.3.6.3.2	Surveillance de l'efficacité	91
I.3.6.3.3	Critères d'arrêt du protocole	92
I.3.7	Etude statistique	92

II- RESULTATS	93
II.1 Etude descriptive des patients	93
II.1.1 Groupe CMF	93
II.1.1.1 Les aspects cytologiques retrouvés	93
II.1.1.2 Aspects immunophénotypiques	93
II.1.1.3 Incidence des autres SPLC dans le type cytologique de LLC évoqué	94
II.1.1.4 Analyse des cas de LLC	94
II.1.2 Groupe cytogénétique	95
II.1.2.1 Caractéristiques des patients	95
II.1.2.2 Répartition des anomalies cytogénétiques au caryotype	96
II.1.2.3 Répartition des anomalies cytogénétiques retrouvées par FISH	97
II.1.2.3.1 Aucune anomalie	97
II.1.2.3.2 Anomalies récurrentes	97
II.1.2.3.2.1 La délétion 13q14q34	98
II.1.2.3.2.2 Trisomie 12	99
II.1.2.3.2.3 Délétion ATM (11q22)	100
II.1.2.3.2.4 Délétion P53	101
II.1.2.3.2.5 Délétion 6q21	102
II.1.2.3.3 Répartition des anomalies cytogénétiques selon le stade de Binet	102
II.1.2.3.4 Comparaison des résultats par caryotype et FISH	105
II.1.2.3.5 Expression du CD38	106
II.1.2.3.5.1 CD 38 négatif	106
II.1.2.3.5.2 CD 38 positif	107
II.1.3 Courbes de survie des pts n'ayant pas reçu le FC ou le RFC	109
II.1.3.1 Courbe de survie globale des pts Non FC ou RFC	109
II.1.3.2 Courbe de survie globale selon le stade de Binet	110
II.1.3.3 Courbe de survie globale selon le CD 38	110
II.1.3.4 Courbe de survie globale selon les anomalies cytogénétiques (FISH)	111
II.1.4 Résultats du protocole Fludarabine + Cyclophosphamide : FC	112
II.1.4.1 Caractéristiques des patients	112
II.1.4.2 Données cytogénétiques pour le groupe FC	114
II.1.4.2.1 Résultats du caryotype	114
II.1.4.2.1 Résultats de la FISH	115
II.1.4.3 Evaluation du protocole FC selon les critères du NCI	115
II.1.4.3 Evaluation de la toxicité du protocole FC	117
II.1.4.4 Devenir des patients sous protocole FC	117
II.1.4.5 Courbes de survie : Protocole FC	118
II.1.4.5.1 Courbe de survie globale : protocole FC	118
II.1.4.5.2 Courbe de survie sans événements du groupe FC	119
II.1.4.5.3 Courbe de survie globale du groupe FC selon le stade de Binet	119

II.1.4.5.4	La courbe de SSE selon le stade de Binet du groupe FC	120
II.1.4.5.5	La courbe de survie globale du groupe FC selon la $\beta 2$ microglobuline	121
II.1.4.5.6	Courbe de SSE du groupe FC selon la $\beta 2$ microglobuline	121
II.1.4.5.7	Courbe de survie globale du groupe FC selon l'infiltration de la PBO	122
II.1.4.5.8	Courbe de survie globale du groupe FC selon le CD 38	122
II.1.4.5.9	La courbe de survie sans événements selon le CD 38 du groupe FC	123
II.1.4.5.10	Courbe de survie globale du groupe FC selon les anomalies par FISH	124
II.1.4.5.11	Courbe de SSE pour les pts de ce groupe FC selon la FISH	125
II.1.5	Résultats du protocole RFC	126
II.1.5.1	Caractéristiques des patients	126
II.1.5.2	Données cytogénétiques par FISH	127
II.1.5.3	Evaluation du protocole RFC selon NCI	127
II.1.5.4	Evaluation de la toxicité du protocole RFC	128
II.1.5.5	Complications infectieuses	129
II.1.5.6	Devenir des patients	129
II.1.5.7	Courbes de survie des pts sous protocole RFC	129
II.1.5.7.1	Courbe de survie globale pour les pts du groupe RFC	129
II.1.5.7.2	Courbe de survie globale du groupe RFC selon le stade de Binet	130
II.1.5.7.3	Courbe de survie globale du groupe RFC selon le CD 38	130
II.1.5.7.4	Courbe de survie globale du groupe RFC selon les anomalies FISH	131
II.1.5.7.5	Courbe de survie : comparaison FC/RFC	131
II.1.5.7.6	Courbe de survie globale : FC/RFC vs Non FC/RFC / CD 38 Négatif	132
II.1.5.7.7	Courbe de survie globale : FC/RFC vs Non FC/RFC / CD 38 Positif	132
III-	DISCUSSION	133
III.1	Sur le diagnostic morphologique	133
III.2	Sur le diagnostic immunophénotypique	133
III.3	Sur la répartition des anomalies cytogénétiques	134
III.3.1	Les échecs du caryotype	134
III.3.2	Anomalies retrouvées par FISH sur un caryotype normal	135
III.3.3	Comparaison des résultats du caryotype aux séries de la littérature	135
III.3.4	Comparaison de nos résultats en FISH aux séries de la littérature	136
III.3.5	Comparaison de nos résultats selon les anomalies cytogénétiques (FISH) et le stade de Binet avec la série de Qiu	138
III.3.6	Commentaires sur le groupe FC	139
III.3.7	Commentaires sur le groupe RFC	142
III.3.8	Commentaires sur le CD 38	142
III.3.9	Commentaires sur la toxicité du FC/RFC	143
IV-	CONCLUSION	144
V -	BIBLIOGRAPHIE	146
VI-	ANNEXES	

VI.1 Représentation en bandes R des 46 chromosomes humains	173
VI.2 Critères de réponse et de progression selon le NCIWG	174
VI.3 LLC : Images FISH et Caryotype : chromosome 13	175
VI.4 LLC : Images FISH et Caryotype : chromosome 12	176
VI.5 LLC : Images FISH et Caryotype : chromosome 11	177
VI.6 LLC : Images FISH et Caryotype : chromosome 17	178
VI.7 LLC : Images FISH et Caryotype : chromosome 6	179
VI.8 Classement OMS des grades de toxicité	180
VI.9 Listes et caractéristiques des données des patients	181
VI.10 Liste des figures	185
VI.11 Liste des tableaux	186
VI.12 Fiche technique leucémie lymphoïde chronique	187

Résumé

L'application du score de Matutes chez 150 patients chez qui le diagnostic de Leucémie Lymphoïde Chronique a été évoqué par l'étude cytologique, nous a permis de confirmer ce diagnostic dans 118 cas parce qu'ils avaient un score supérieur à 4 ; pour 17 autres cas, le diagnostic de LLC n'a été établi qu'après confrontation cyto-immunophénotypique. Parmi ces 150 cas, 15 cas (10%) n'étaient pas des LLC.

Nous avons mis au point, implanté et appliqué de nouvelles techniques de cytogénétique conventionnelle (caryotype) et moléculaire (FISH) à 100 nouveaux cas de LLC issus du groupe des 150 pts.

Le caryotype conventionnel utilisant les facteurs mitogènes classiques (TPA, PHA) est dans notre étude un examen délicat, peu fiable avec un taux d'échec important (60 %) ; par cette technique les anomalies récurrentes n'ont été identifiées que dans 30 % des cas analysables.

La FISH a identifié 80 % d'anomalies récurrentes dans notre étude et a représenté un outil remarquable en fiabilité, spécificité et reproductibilité par rapport au caryotype classique.

Nous avons étudié les fréquences des anomalies cytogénétiques récurrentes sur cette cohorte de 100 patients, en les comparant à celles relevées dans la littérature, et nous avons évalué l'impact pronostique de ces anomalies en analysant la survie globale et la SSE pour les patients traités par FC et RFC.

La répartition des anomalies cytogénétiques au caryotype et par la FISH ne diffère pas de celles relevées dans la littérature pour les délétions 13q14, 11q22, 6q21 et Tri 12 ; les délétions P53 sont significativement plus fréquentes dans notre série par rapport à la littérature.

Les facteurs pronostiques favorables classiques, CD 38 négatif, del 13q14, sont confirmés par notre étude.

Les facteurs pronostiques identifiés comme défavorables, CD 38 positif, del ATM, del P53 et tri 12 sont aussi confirmés par notre travail.

La del P53 est le marqueur pronostique le plus péjoratif ; il est recommandé de la rechercher avant tout traitement comportant de la fludarabine.

L'application de protocoles thérapeutiques à base de fludarabine (FC et RFC) chez respectivement 36 et 17 pts nous a permis de noter des résultats comparables à ceux d'autres équipes de la littérature en termes de taux de rémission complète, de survie globale et de survie sans progression. La toxicité de ces protocoles est identique et gérable.

L'implantation et l'application des techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire (FISH) nous a permis d'identifier des signatures génétiques à profils évolutifs particuliers dans la LLC ; la maîtrise de ces techniques représente par ailleurs un apport précieux pour l'étude des autres hémopathies malignes en Algérie.

Mots clés : LLC, CMF, Matutes, Caryotype, FISH, CD 38, FC, RFC.

Directeur de Thèse : Professeur M.T. ABAD
Chef de service Hématologie
EHS ELCC Blida

Auteur : Docteur Souad TAOUSSI
Maître assistante en Hématologie
Service Hématologie
EHS ELCC Blida

INTRODUCTION

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) rentre dans le cadre très large des syndromes lymphoprolifératifs chroniques. Ceux-ci représentent l'ensemble des proliférations monoclonales affectant les cellules matures des lignées lymphoïdes B et T.

La plupart de ces entités comportent de façon variable une infiltration lymphoïde médullaire et sanguine. Lorsque l'infiltration sanguine périphérique est présente, il peut s'avérer difficile de distinguer une LLC des autres syndromes lymphoprolifératifs. La reconnaissance de ces différentes entités est essentielle pour une prise en charge thérapeutique adaptée.

L'immunophénotypage en cytométrie de flux des syndromes lymphoprolifératifs met en évidence pour chacune de ces entités, un profil phénotypique caractéristique ; la leucémie lymphoïde chronique s'individualise par la coexpression de marqueurs typiques : le CD19, le CD5, le CD23, le CD22 avec une faible intensité, l'absence d'expression du FMC7, l'expression faible d'un seul type de chaînes légères kappa ou lambda, affirmant le caractère monoclonal de la prolifération. L'étude de l'expression de ces différents marqueurs permet d'établir le score de Matutes et dans la majorité des LLC, l'expression de ces différents marqueurs retrouve un score égal à 4 ou 5.

Les classifications de Rai et Binet ont été longtemps les seuls outils qui ont permis de stratifier le pronostic des LLC. Il est apparu à l'usage de ces classifications pronostiques que la LLC était caractérisée par une grande variabilité évolutive y compris au sein des mêmes groupes pronostiques où certains patients présentent une maladie évolutive avec une survie de quelques mois (formes agressives), alors que d'autres ont une maladie plus indolente avec une survie très longue.

Il apparaissait donc très important de disposer de critères pronostiques nouveaux pour adopter des stratégies thérapeutiques adaptées à chaque patient.

Plusieurs paramètres biologiques ont été décrits comme ayant une valeur pronostique : l'importance de la masse tumorale (lymphocytose), l'aspect cytologique des lymphocytes, le temps de dédoublement de la lymphocytose, le type d'infiltration médullaire (nodulaire ou diffus), l'étude du statut mutationnel des gènes de la région variable des immunoglobulines (IgV), l'expression du CD38, les données issues de l'analyse d'expression génique par microarray, l'étude du ZAP 70, une kinase impliquée dans la transduction du signal médié par le TCR et enfin les anomalies cytogénétiques récurrentes.

Parmi les facteurs pronostiques les plus puissants, on relève au premier plan les anomalies cytogénétiques telles les délétions des chromosomes 13, 11 et 17. Plusieurs anomalies cytogénétiques sont identifiées comme des facteurs de pronostic défavorable, en particulier la délétion 17p et la délétion 11q, observées chez des patients porteurs de LLC à des stades avancés et très évolutives.

L'expression importante du CD 38 par les lymphocytes de LLC est corrélée à une évolution péjorative de la maladie. Son étude est possible par cytométrie de flux et est techniquement beaucoup plus facile que l'étude du statut mutationnel des gènes des régions VH et VL des immunoglobulines. Il existe par ailleurs une bonne corrélation entre l'expression du CD 38 et le statut mutationnel des gènes des régions VH et VL des immunoglobulines.

En définitive, les résultats de ces techniques complémentaires, outre leur intérêt diagnostique, ont également un grand intérêt pour évaluer le pronostic des LLC en identifiant des sous groupes de patients à risque, définissant ainsi au mieux la stratégie thérapeutique adaptée pour chaque patient

Quelles étaient les modalités thérapeutiques appliquées jusque là aux LLC ? ; les patients au stade A de Binet faisaient l'objet d'une abstention thérapeutique avec surveillance tous les trimestres, les patients classés B ou C relevaient soit d'une monochimiothérapie (Chlorambucil) soit d'une polychimiothérapie (COP, CHOP).

L'analyse à long terme de ces protocoles démontre les limites de cette stratification pronostique : l'évolution est imprévisible quel que soit le groupe pronostique considéré, les réponses en termes de survie sans progression et de survie globale sont insatisfaisantes.

L'application de nouveaux protocoles thérapeutiques utilisant les analogues des purines a démontré la supériorité de ceux-ci en termes de taux de réponses complètes et de survie sans progression par rapport aux protocoles classiques.

Les objectifs de notre travail sont les suivants :

- Appliquer le score de Matutes pour tout nouveau cas de LLC en vue d'un diagnostic de certitude.
- Etablir la fréquence des anomalies chromosomiques dans la LLC
- Etablir la corrélation entre les résultats des études immunocytologiques et cytogénétiques et le pronostic des LLC.

Pour atteindre ces objectifs nous avons :

- réalisé systématiquement une cytométrie de flux chez tout nouveau cas suspect de LLC par l'étude morphologique.
- mis au point, implanté et appliqué les techniques de caryotypage et de cytogénétique moléculaire (FISH) aux nouveaux cas de LLC confirmés.
- traité les LLC éligibles d'un traitement par le protocole FC dans un premier temps puis le protocole RFC lorsque ce dernier a été reconnu comme gold standard.

I- DEFINITION DE LA LLC

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne touchant le lymphocyte B ; elle représente selon la classification de l'organisation mondiale de la santé la forme leucémique du lymphome lymphocytaire, ne s'en différenciant que par sa présentation leucémique **(1)**. La LLC est caractérisée par une prolifération monoclonale et une accumulation de lymphocytes matures B immunologiquement incompetents, avec infiltration médullaire, sanguine et des organes lymphoïdes.

II- FREQUENCE

C'est la plus fréquente des leucémies en Occident avec une incidence annuelle pour 100000 hts respectivement de 3,35 à 3,69 pour les hommes et de 1,61 à 1,92 pour les femmes en Amérique du nord **(2)**.

En Algérie, l'incidence de la leucémie lymphoïde chronique est estimée à 0,57 cas pour 100000 hts ; Elle touche principalement les sujets âgés (âge moyen au diagnostic = 64,25 ans). Il existe une forte prédominance masculine (Sex ratio M/F = 2) **(3)**.

III- ETIOPATHOGENIE

Dans l'état actuel des connaissances, plusieurs hypothèses sont émises quant aux facteurs étiologiques pouvant être responsables du déclenchement de cette affection : certains travaux suggèrent qu'un antigène commun ou un antigène like ou un auto-antigène pourrait être responsable du déclenchement de cette affection maligne ; d'autres hypothèses impliquent un agent infectieux : le risque d'une LLC augmente avec l'élévation de la fréquence et la sévérité de pneumonies, cellulites, herpès, suggérant le rôle des infections communes dans la pathogénie de la LLC **(4)**.

La LLC ne semble pas être associée à des antécédents d'irradiation ou d'exposition à des toxiques chimiques ou agents viraux.

Il y a une augmentation de 30 fois le risque de développer une leucémie lymphoïde chronique chez les parents au premier degré des patients atteints de LLC ; d'autre part, 13 à 18% des parents au premier degré ont des lymphocytoses B monoclonales CD5+ dans le sang périphérique. Les patients avec LLC familiale sont plus jeunes de 10 ans par rapport aux LLC sporadiques au moment du diagnostic **(5)**. Plusieurs hypothèses du mode de transmission de la LLC familiale sont en cours d'étude, un gène situé sur le 13q21.33-q22.2, l'hétérozygotie pour le gène ATM, l'expression plasmatique élevée du stimulateur des lymphocytes B (BLyS) et une augmentation de la fréquence du polymorphisme au CST-871 dans son promoteur **(6)**.

Il faut noter qu'il n'y a aucune anomalie cytogénétique récurrente qui soit caractéristique de cette maladie ; actuellement, par cytogénétique conventionnelle (avec les nouveaux facteurs mitogènes) ou par hybridation in situ fluorescente, les anomalies génétiques sont décelées dans plus de 80% des cas de LLC, avec une forte implication pronostique.

IV- PHYSIOPATHOLOGIE

1- Origine du lymphocyte de LLC

Les lymphocytes pathologiques monoclonaux de la LLC dérivent d'une sous-population de lymphocytes B CD5+ dont on pense qu'elle correspond à la couronne périfolliculaire du centre germinatif du ganglion et de la rate. La contre partie normale de ces cellules n'exprime pas de mutations des gènes Ig VH (gènes codant pour la partie variable de la chaîne lourde des Ig), tandis que les cellules LLC ont ces mutations dans 55% des cas, suggérant le passage de ces cellules par le centre germinatif **(7)**.

D'autres études suggèrent que les lymphocytes de LLC à profil Ig VH muté ou non muté ont été exposés à un antigène, du fait de l'expression de marqueurs membranaires d'activation (CD23, CD38) et des changements dans le récepteur des cellules B (BCR).

Des études du profil d'expression génique indiquent que les cellules LLC sont des cellules B mémoire avec deux formes : l'une issue d'un lymphocyte pré germinal n'ayant pas de mutation des gènes Ig VH et l'autre issue d'un lymphocyte qui a traversé le centre germinatif avec des mutations des gènes des Ig VH **(8)**.

Les anticorps du clone tumoral LLC sont fréquemment dirigés contre des auto-antigènes : facteur rhumatoïde, anti cytosquelette de l'ADN. Ce répertoire auto réactif responsable de la production des auto-anticorps naturels est fréquemment impliqué dans le processus de transformation maligne du lymphocyte B **(9)**.

2- Resistance à l'apoptose de la cellule LLC

La maladie serait plus accumulative que proliférative. Les lymphocytes B sont bloqués en phase G0 du cycle cellulaire. Le mécanisme principal est un dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose, La résistance accrue à l'apoptose in vivo est à l'origine de l'accumulation progressive des lymphocytes B clonaux bloqués en phase G0/G1 du cycle cellulaire.

L'apoptose est initiée par deux voies principales :

2.1 La voie intrinsèque ou voie mitochondriale : (11) (Figure 1)

Elle est déclenchée généralement par des dommages de l'ADN ou signaux de stress cellulaire (irradiations, drogues cytotoxiques, actions d'onco-protéines ou de protéines suppresseurs de tumeurs comme la P53 ou protéine de virulence virale).

Cette activation induit une phosphorylation et une stabilisation de la P53, une augmentation du ratio bax/bcl 2 et la libération en particulier du cytochrome c parmi les SIMPs (Soluble Inter-Membrane Mitochondrial Proteins) entre les membranes interne et externe des mitochondries vers le cytosol. Le cytochrome c se lie et active le facteur

activateur de l'apoptose-1 (Apaf-1). L'Apaf-1 se lie et provoque l'auto activation de la procaspase 9 au sein d'un complexe appelé apoptosome (cytochrome c + ATP+ Apaf-1) et ensuite des caspases effectrices 3 et 7 (10). L'activation de la cascade des caspases par cette voie est régulée par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP : Inhibitor of Apoptosis). Il n'y a que la survivine parmi les éléments de la famille des inhibiteurs propres des caspases IAP qui est exprimée dans les cellules de la LLC.

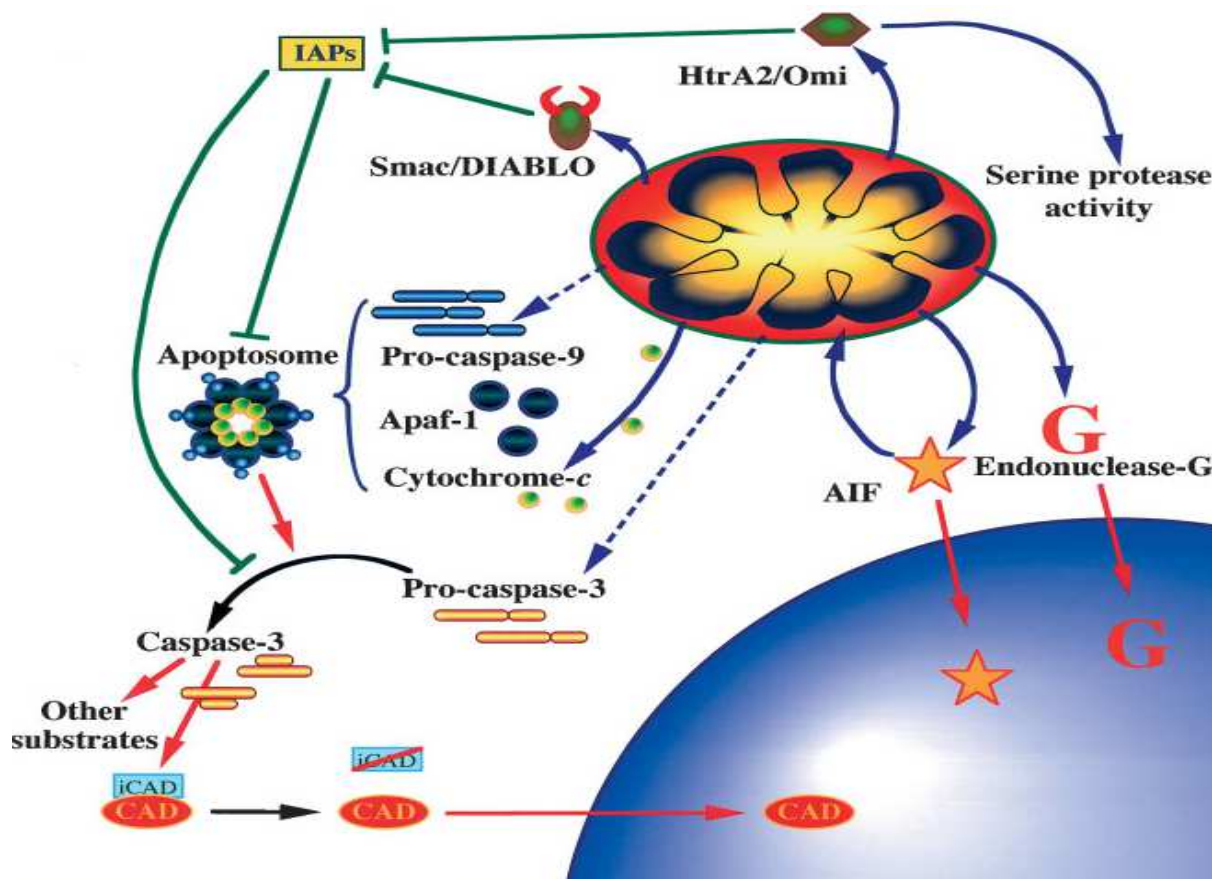


Figure 1 : Voies mitochondriales de l'apoptose : d'après Ravagnan L (11).

Dans cette voie, l'apoptose peut être induite de façon indépendante des caspases par la libération d'autres SMIPs : AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et l'endonucléase G par clivage ou digestion direct de l'ADN.

2.2 La voie extrinsèque

Elle est activée par des récepteurs de mort (DRS : Death Receptors), en particulier le Tumor Necrosis Factor (TNF), le Fas (APO-1 ou CD95), DR4/DR5 (receptors for TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand [TRAIL]).

Ces récepteurs contiennent un domaine cytosolique appelé domaine de mort (DD), qui recrute des protéines adaptatrices telles FADD/Mort-1 (Fas Associated Death Domain) ou

TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain). La protéine adaptatrice recrutée possède une fin du domaine de mort et un domaine effecteur de mort (DED). Une fois lié aux récepteurs du TNF, le DED des protéines adaptatrices se lie à la procaspase 8 ou la procaspase 10 (caspases initiatrices) ; ce complexe entre récepteurs de mort, protéines adaptatrices et procaspases est appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex) ; Ainsi les procaspases s'activent par auto clivage en son sein et activent à leurs tours les caspases dites effectrices comme la caspase 3 responsable de la phase d'exécution de l'apoptose (12). (Figure 2)

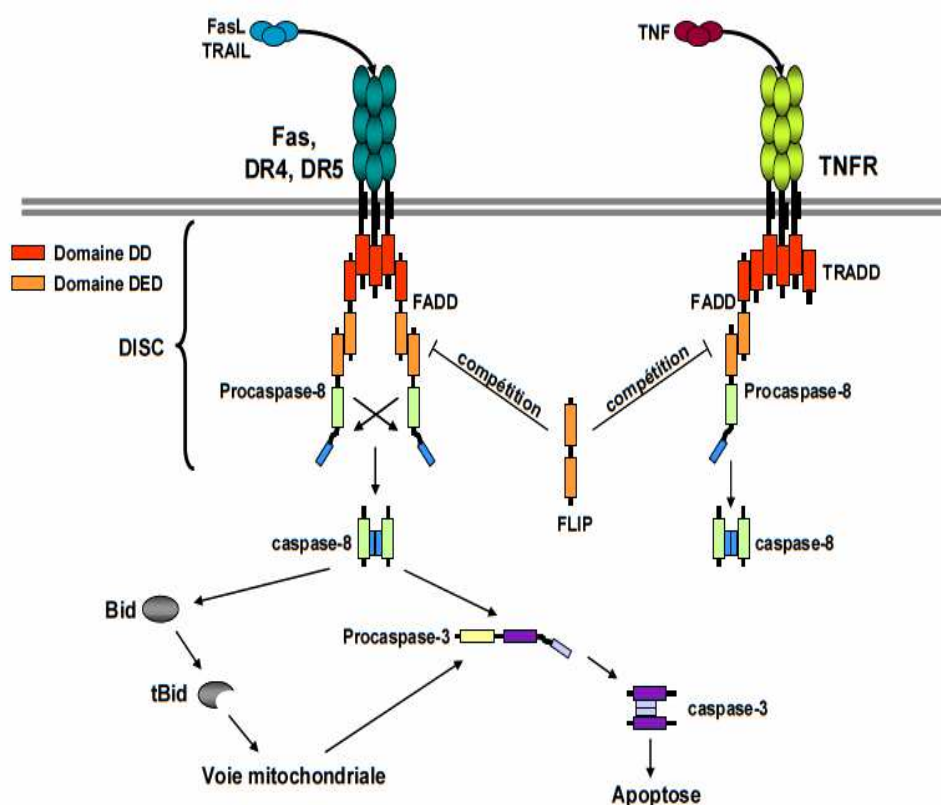


Figure 2 : Voie extrinsèque de l'apoptose : d'après Leger David (12).

L'apoptose par cette voie est contrôlée par la présence d'une variété d'inhibiteurs pouvant se lier au DED au lieu des caspases ; par exemple FLIP (FLICE Inhibitrice Protein) homologue de la caspase 8 sans activité protéolytique (13).

Il a été signalé que les cellules LLC ont des expressions élevées de FLIP rendant ces cellules résistantes à l'apoptose induite par les récepteurs de mort (DR).

Le système Fas-Fas ligand (récepteur à domaine de mort) est défectueux car le Fas est absent ou très faible à la surface des lymphocytes de LLC.

2.3 Interaction voie intrinsèque et voie extrinsèque

La caspase 8 activée peut activer le Bid ; le Bid tronquée se lie au Bax au niveau de la membrane mitochondriale ou à d'autres protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 et provoque la libération du cytochrome c de la mitochondrie **(14)**.

L'activation de la voie intrinsèque par chimio ou radiothérapie peut activer la caspase 8 éventuellement via l'activation de la caspase 3 **(15)**.

2.4 Régulateurs de l'apoptose

2.4.1 La P53 (17p13)

C'est un gène suppresseur de tumeur, activateur de transcription, après phosphorylation et stabilisation suite à des dommages de l'ADN, peut avoir une action antiapoptotique par blocage du cycle cellulaire en G1 ou G2 permettant à la cellule de réparer son ADN avant de s'engager dans la phase S ou M **(16)**.

Une action pro apoptotique de la P53 est aussi possible, préférentiellement dans les cellules tumorales, liée à une régulation positive de l'expression des récepteurs de mort, TRAIL (DR4, DR5) et une augmentation de l'expression des membres pro apoptotiques de la famille des Bcl2 (Bax, Noxa et Puma) **(13)**.

Une surexpression du MDM-2 (Murin Double Minute-2, gène localisé sur le chromosome 12), réduit la capacité de la P53 à bloquer le cycle cellulaire en G1 et pourrait aussi réduire son action pro apoptotique **(16)**.

2.4.2 Le gène ATM

Il est situé sur le chromosome 11q22-q23 ; il est responsable de la phosphorylation et de l'activation de la P53 après lésions de l'ADN par activation de l'ATM kinase et de l'ADN-dépendante kinase **(16,17)**.

2.4.3 La famille Bcl-2 (B-cell Leukemia/Lymphoma-2) :

Trois sous-groupes ont été identifiés :

- 1- antiapoptotique : Bcl-2, Bclxl, Mcl-1.
- 2- pro-apoptotique à trois domaines BH : Bax, Bak, Bok.
- 3- pro-apoptotique à un domaine BH3 : Bim, Bid, Bad.

Dans la LLC l'expression des différents membres de la famille Bcl2 est entièrement orientée vers la survie cellulaire. Les cellules LLC expriment des niveaux élevés de bcl-2, Bax, Bak et des niveaux bas de Bcl-XL et bad **(18)**.

3- Survie ou prolifération cellulaire dans la LLC

Même si un défaut d'apoptose caractérise la LLC, il y a une fraction proliférative des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques et la moelle au sein des centres de prolifération ou pseudo follicules, qui grâce au microenvironnement, est responsable de la progression de la maladie.

Les cellules LLC interagissent avec les cellules dendritiques folliculaires, les cellules du stroma ou les fibroblastes retrouvés dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques, les lymphocytes T et les cellules « Nurselike » présentes dans le sang périphérique **(19)**. Les cellules LLC produisent aussi des cytokines stimulant leurs survies de manière autocrine ou paracrine, tout en inhibant la survie des lymphocytes normaux et les cellules de la moelle. Les facteurs impliqués dans ces mécanismes sont :

3.1 Récepteur de la cellule B (BCR)

Le BCR reconnaît l'antigène, active la prolifération des lymphocytes et leur transformation en plasmocytes. Il a été impliqué dans la survie cellulaire ; le BCR activé protège contre l'apoptose par hyper expression des membres anti apoptotiques de la famille Bcl2 **(19)**. Les cellules LLC sont moins sensibles à l'activation du BCR que les cellules B naïves.

3.2 Les interleukines (IL)

Les cellules LLC possèdent des récepteurs pour les différentes interleukines et peuvent les produire pour certaines (IL-1, IL-6, IL-8). Les interleukines (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8) protègent les cellules LLC de l'apoptose spontanée ou provoquée par le médicament. Les IL-2 et IL-15 stimulent la prolifération des cellules LLC mais pas les cellules B normales **(20)**. L'IL-2 est séquestrée par les cellules LLC par augmentation de son récepteur (TAC), empêchant son interaction avec les lymphocytes normaux, expliquant en partie le dysfonctionnement immunitaire observé dans la LLC

3.3 Le CD38

L'interaction du CD38 sur la cellule B et son ligand le CD31 exprimé par les cellules du microenvironnement, en particulier les cellules endothéliales vasculaires, favorise la survie et la prolifération de la population leucémique **(21)**. L'interaction de ces deux molécules induit l'expression du CD100, molécule qui interagit avec le PlexinB1 (ligand CD100 de haute affinité).

Les cellules Nurselike des cellules LLC expriment CD31 et Plexin-B1 qui délivrent des signaux de croissance et de survie pour les cellules LLC CD38+/CD100+ **(22)**.

Le CD38 a une expression plus élevée dans les compartiments tissulaires contenant des pseudo follicules, qui contiennent des polymphocytes, des para immunoblastes et un nombre élevé de lymphocytes T ; ces derniers probablement promeuvent la prolifération

des cellules tumorales à travers la signalisation CD40/CD40L.

Il existe une association entre le niveau d'expression du CD38 et la vascularité tumorale ; certains auteurs ont montré que les cellules LLC secrètent un facteur de croissance pour l'endothélium vasculaire (Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF) **(23)**.

3.4 Tumor necrosis factor- α (TNF- α)

Le TNF- α protège les cellules LLC contre l'apoptose en induisant l'expression des Bcl-2.

3.5 BMCA, TAC1 et BAFF-R

Les cellules LLC secrètent et expriment BAFF et APRIL ainsi que leurs récepteurs : BMCA, TAC1 et BAFF-R **(24)**. L'ajout de facteurs exogènes BAFF et APRIL aux cellules LLC empêche l'apoptose spontanée et celle induite par le médicament.

3.6 CD40 et CD40 Ligand

Les cellules LLC peuvent sécréter du CD40L. La stimulation du CD40 sur les cellules LLC induit une prolifération et une libération de cytokines (exp : survivine), et une protection contre l'apoptose induite par le médicament **(25)**.

3.7 Récepteurs d'adhésion de molécules

Cette fonction d'adhésion de molécules semble nécessaire pour la survie cellulaire ; ces récepteurs ont un rôle dans la protection contre l'apoptose. Exemple : Les intégrines β 1 et β 2 sur les cellules LLC se lient aux CD54 et CD106 des cellules stromales favorisant ainsi la survie cellulaire **(26)**.

3.8 Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

Le TGF- β induit l'apoptose par inhibition de la synthèse de l'ADN. Les cellules LLC n'expriment pas les récepteurs pour le TGF- β et de ce fait résistent à l'apoptose induite par ce facteur **(27)**.

3.9 Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)

Le VEGF est un facteur angiogénique impliqué dans la survie des cellules cancéreuses ; dans la LLC, il protège ces cellules de l'apoptose spontanée ou provoquée par le médicament **(28)**. Les cellules LLC sécrètent du VEGF et possèdent les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 **(29)**.

3.10 Récepteurs du Stroma-Derived Growth Factor-1 (SDF-1)

Le SDF-1 protège les cellules LLC contre l'apoptose spontanée et provoquée par le médicament et probablement a un rôle dans la survie cellulaire.

3.11 Récepteur du facteur basique de croissance des fibroblastes (bFGF)

Les taux sériques du bFGF de LLC sont élevés ; c'est un facteur protecteur de l'apoptose par diminution de l'expression de la P53 et augmentation de l'expression du Bcl-2 **(30)**.

3.12 Acide lysophosphatidique (LPA) et albumine

Ces deux médiateurs protègent les cellules LLC de l'apoptose spontanée et induite par le médicament, fonction médiée par la kinase Akt **(31)**.

4-Les dérèglements immunitaires

4.1 L'hypogammaglobulinémie

Elle est observée dans près de 30% des cas, conséquence de l'accumulation de défauts individuels au niveau du répertoire B non clonal, CD5 négatif ; sa pathogénie est inconnue; il n'a pas encore été établi que les anomalies du répertoire T étaient en cause **(32)**. Les lymphocytes B de la LLC ont des difficultés à répondre à de nouvelles stimulations antigéniques, avec atteinte en particulier des taux des IgG3 et IgG4. La conséquence du déficit en immunoglobulines est le risque accru d'infections bactériennes, notamment le streptocoque pneumoniae et l'haemophilus influenzae. Le risque d'infections virales est significativement augmenté avec l'introduction des traitements déprimant l'immunité cellulaire.

4.2 Phénomènes auto-immuns

Les manifestations auto-immunes sont dirigées essentiellement contre les cellules hématopoïétiques : **(33)**.

- un test de Coombs peut être positif dans 7% à 35% des cas avec ou sans hémolyse (fréquence: stade A < B < C) souvent de type Ig G polyclonale de forte affinité.
- une AHAI est observée dans 5% à 10% des cas ; la majorité des auto-anticorps sont des auto-anticorps chauds de type Ig G d'origine polyclonale, et réagissent avec des antigènes publics du système rhésus.

- lorsque l'AHAI est à test de Coombs négatif, le diagnostic est plus difficile à poser.

- une érythroblastopénie auto-immune est possible, de diagnostic difficile en raison de l'infiltration lymphocytaire prédominante.
- un purpura thrombopénique auto-immun est observé dans 2 % des cas ; il est difficile à affirmer.
- une neutropénie est rarement rapportée ; le taux et les fonctions des neutrophiles sont généralement conservés ; une neutropénie peut se voir suite à une infiltration lymphocytaire médullaire massive ou suite à un traitement myelosuppresseur.

V- DIAGNOSTIC POSITIF

1- Circonstances de découverte

Les circonstances de découverte sont très variables : chez un sujet de la cinquantaine :

- Au décours d'un hémogramme systématique (médecine du travail ou autre pathologie)
- Lors de signes généraux : asthénie; mais très souvent, l'état général est conservé
- Devant un tableau d'adénopathies généralisées, bilatérales, symétriques, indolores et mobiles par rapport aux plans superficiel et profond (c'est le tableau le plus fréquent)
- Devant une splénomégalie rarement isolée.
- Devant une hypertrophie amygdalienne dans moins de 5% des cas.
- Devant un syndrome d'insuffisance médullaire : anémie et ou thrombopénie.
- Au décours d'une complication : infectieuse, anémie hémolytique auto immune.

2- Eléments du diagnostic positif

2.1 L'hémogramme

Une leucocytose variable souvent supérieure à 50 000 / μ l dont la composante majeure est une hyperlymphocytose toujours supérieure à 5000/ μ l, persistante sur plusieurs examens (plus de 3 mois), ou supérieure à 15000/ μ l sur un seul examen.

2.2 L'examen du frottis sanguin

L'étude cytologique est réalisée sur frottis sanguin après coloration au MGG ; il est important de choisir la zone de lecture, pas trop épaisse ni trop mince ; dans cette dernière éventualité les lymphocytes paraissent plus grands que leur taille réelle, à chromatine trop dispersée leurs conférant un aspect plus jeune.

La lecture du frottis retrouve :

- Les ombres de Gümprécht : débris cellulaires de lymphocytes endommagés lors de la réalisation du frottis sanguin ; elles sont présentes à des degrés variables et il semble que leur fréquence soit un critère pronostique **(34)**.
- Les lymphocytes sont représentés en majorité par des petits lymphocytes d'allure matures, un peu plus grands que le lymphocyte normal (7 à 14 microns de diamètre) avec un rapport nucleocytoplasmique très élevé, un noyau régulier à chromatine dense à structure marbrée, mottée, sans nucléole visible ; le cytoplasme faiblement basophile, agranulaire, est souvent réduit à un fin liseré ; on peut noter la présence de quelques lymphocytes atypiques d'allure pro lymphocytaire ou lymphoplasmocytaire **(35, 36, 37)**.

2.3 L'immunomarquage lymphocytaire par cytométrie en flux

Les hémopathies lymphoïdes chroniques B à dissémination sanguine ou syndromes lymphoprolifératifs chroniques B leucémisés, désignent l'ensemble des proliférations clonales des cellules matures de la lignée B.

Les premiers travaux sur les anticorps monoclonaux de surface pour caractériser les syndromes lymphoprolifératifs chroniques, ont été avancés en 1983 **(38)**.

La caractérisation proposée en 1989 par le FAB était basée sur l'étude cytologique sanguine et médullaire et les marqueurs immunologiques par Immunophénotypage.

L'Immunophénotypage des lymphocytes sanguins a pour buts **(39)** de :

2.3.1 Affirmer la monoclonalité

Les lymphocytes expriment à leur surface des immunoglobulines monotypiques de type kappa (60%) ou lambda (40%). Les immunoglobulines Ig M et Ig D sont présentes simultanément sur la membrane, plus rarement les Ig A, Ig G ou Ig D seules.

2.3.2 Préciser la variété de l'hémopathie lymphoïde

Par une analyse individuelle et multiparamétrique des cellules en suspension : étude de la taille cellulaire et pour chaque marqueur de l'immunofluorescence de surface ou intracytoplasmique.

Quantitativement, un marqueur (CD) est étiqueté positif quand au moins 30% des cellules expriment ce marqueur, exception faite pour le CD38 où le seuil de positivité est variable.

Sur le plan qualitatif (intensité de fluorescence), un CD est étiqueté de faible expression si la différence entre l'index de fluorescence du marqueur et l'index de fluorescence du contrôle est comprise entre 0,2 et 1 log, expression forte si supérieure à un log.

Le lymphocyte LLC exprime les Ag communs de la lignée B : CD19, CD20 faible, le CD23, le CD18, CD27. Exprime de manière caractéristique le CD5 (marqueur T et d'une sous population B activée) ; exprime aussi CD32, CD37, CD40, CD43, CD44, CD45-RA, CDw75. Exprime faiblement le CD79b lié au récepteur B pour l'antigène ; n'exprime pas le FMC7 ni le CD10.

Un système de score du Royal Marsden Hospital appelé score de Matutes attribue un score à chacun des 5 marqueurs suivants (**Tableau I**) :

Antigène	Attribuer 1 point si	Attribuer 0 point si
CD5	+	-
CD23	+	-
CD22 (ou CD79b)	faible expression	Expression non faible
FMC7	-	+
Ig de surface	faible expression	Expression non faible

Tableau I : Système de scoring selon Matutes E.

Ce score est un bon outil qui permet d'asseoir le diagnostic positif de LLC. Le score est de 4 ou 5 dans 92% des cas, dite LLC typique (**40**), ce score peut être de 3 dans 6% des cas, très rarement score 1 ou 2 dans 2% des cas (**41, 44**).

2.3.3 Révéler un impact pronostique

En analyse uni-variée, une forte intensité de fluorescence de l'Ig M, une forte expression du FMC7 et une faible expression du CD23 sont associées à une courte survie.

En analyse multi-variée le CD23 et l'intensité de fluorescence de l'Ig M sont des facteurs pronostiques indépendants (**42**).

Le CD49d à la surface des cellules LLC facilite leur interaction avec le stroma cellulaire via sa liaison à la fibronectine ; ces interactions réduisent l'apoptose spontanée ou celle induite par le médicament.

L'expression du CD49d par cytométrie en flux est reproductible ; cette expression est fortement associée au CD38+, ZAP-70 + et l'état non muté des Ig VH dont il appuie l'impact pronostique sur la survie globale (surtout à un seuil d'expression de 45%) et le temps avant traitement (time to treatment :TTT) ; en revanche il n'interfère pas sur le bon pronostic du ZAP-70 négatif ou du statut Ig VH muté (**43**).

Une entité appelé LLC variante a été décrite par Cro en 2010 en tant que LLC exprimant fortement les Ig de surface, le CD79b, le CD20 et le CD45 avec un Matutes intermédiaire et en absence de t(11 ;14)(q13 ;q32). Cette forme s'associe à des patients plus jeunes, une splénomégalie plus fréquente, une lymphocytose moins importante, un taux de $\beta 2$ microglobuline élevé, un TDL de moins de 12 mois et une trisomie 12 (isolée ou associée) plus fréquente dans ce groupe de malades avec un délai de traitement plus court et une survie plus courte (**45**).

Le CD69 marqueur d'activation précoce dans la LLC, est corrélé de manière significative aux facteurs de mauvais pronostic clinique (RAI) et biologiques ($\beta 2$ microglobuline, CD23 soluble, Zap70, CD38, état mutationnel Ig VH) et s'inscrit comme facteur pronostique indépendant de la survie sans progression et de la survie globale **(46)**.

2.3.4 Evaluer la maladie résiduelle (MDR)

La recherche d'une maladie résiduelle indétectable est importante à l'ère des nouvelles stratégies thérapeutiques ; l'étude de la MDR est incluse dans les critères de réponses du NCI 2008 ; elle doit se faire 2 à 3 mois après la fin du traitement **(47)**.

Une maladie résiduelle négative améliore la survie sans progression et de ce fait le délai de rechute, ainsi que la survie globale **(48)**.

Il existe plusieurs méthodes de mesure de la maladie résiduelle ; historiquement elle était évaluée par une simple approche d'analyse CD19/CD5/ κ ou λ par cytométrie en flux ou par PCR des gènes des chaînes lourdes des Ig (IgH-PCR) ; ces méthodes sont de sensibilité faible et variable **(48)**.

La cytométrie est une méthode fiable et reproductible, en particulier la CMF 4 couleurs avec un seuil de sensibilité à 10^{-4} . Plusieurs combinaisons ont été utilisées. une standardisation en 2007 s'est faite avec un taux plus faible en variabilité inter-laboratoires et en taux de faux positif : CD45/CD14/CD19/CD3 ; avec toujours le CD19/CD5, on teste CD79b/CD43, CD81/CD22 et CD20/CD38 ; elle est utilisable quel que soit le type de prélèvement **(49)**.

La CMF 6 couleurs utilise une seule combinaison d'anticorps sur sang périphérique : CD79b/CD20/CD19/CD5/Kappa/Lambda ; pour la moelle il faut y ajouter les CD45 et CD38 pour éliminer les interférences des précurseurs B. (sensibilité 10^{-4} à 10^{-5})

2.4 Le myélogramme

Il est inutile au diagnostic : il montre une infiltration par des lymphocytes matures à un taux $> 30\%$; il précise le mécanisme de certaines cytopénies (par infiltration lymphocytaire ou auto-immunes).

2.5 La biopsie ostéomédullaire

Elle n'est pas nécessaire au diagnostic ; elle confirme l'infiltration par des petits lymphocytes matures, sans myelofibrose ; histologiquement, l'infiltration peut être nodulaire, diffuse, interstitielle et interstitielle à renforcement nodulaire **(47)**.

Dans les cas d'infiltration nodulaire, la biopsie ostéo médullaire peut avoir un apport diagnostique, le myélogramme pouvant ne pas objectiver une infiltration lymphocytaire nette. Le type d'infiltration médullaire a une valeur pronostique **(50)**. L'infiltration diffuse constitue un facteur de mauvais pronostic. Elle est un des éléments de l'évaluation de la réponse au traitement dans les critères du NCI.

2.6 La Cytoponction ganglionnaire

Elle n'a pas d'intérêt diagnostique ; elle est surtout intéressante pour le suivi, en cas de transformation en un lymphome agressif à grandes cellules (syndrome de Richter).

2.7 La biopsie ganglionnaire

Elle est inutile, elle montrerait l'aspect d'un lymphome lymphocytaire diffus, effaçant l'architecture ganglionnaire normale et contenant parfois des ébauches de pseudo follicules. Elle a sa place en cas de transformation en syndrome de Richter.

2.8 L'électrophorèse des protéines sériques

Elle permet surtout d'éliminer une maladie de Waldenström ; elle montre souvent, l'existence d'une hypogammaglobulinémie dissociée ou portant sur les trois classes d'immunoglobulines.

L'hypogammaglobulinémie est due à une anomalie fonctionnelle des lymphocytes T et des lymphocytes B CD5 négatifs. Elle est d'autant plus fréquente que la maladie est ancienne et que le stade de la maladie est avancé.

L'hypogammaglobulinémie est observée dans 20% à 30% des cas ; c'est la cause essentielle des infections bactériennes ; les infections bactériennes et virales sont responsables de plus de 60% des décès **(51)**.

VI- DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL

1- Hyper lymphocytose réactionnelle bénigne

Le diagnostic différentiel est assuré par l'examen morphologique

1.1 Hyperlymphocytose T

- . Infections chroniques : tuberculose, syphilis.
- . Infections virales : Syndromes mononucléosiques (EBV, VIH, CMV, Hépatites).
- . Infections bactériennes : coqueluche (rare chez l'adulte).

Dans ces pathologies, l'hyperlymphocytose est transitoire, dans un contexte évocateur

1.2 Hyperlymphocytose B polyclonale persistante à lymphocytes binucléés

Entité rare, décrite pour la première fois en 1982 par Gordon et al. (52).

- . Terrain : femme jeune fumeuse.
- . Lymphocytes binucléés à un pourcentage variable jusqu'à 10% de l'équilibre lymphocytaire, accompagnés d'autres cellules lymphoïdes de taille variable. La CMF montre une population B CD19+, CD20+, CD22+, CD27+, chaînes légères kappa+ et lambda+ dans les cellules binucléées et non binucléées avec coexpression des Ig de surface Ig M et Ig D ; cette population est CD5-, CD10-, CD23-
- . Association avec HLA-DR7 et présence récurrente d'un iso chromosome 3q surnuméraire.
- . Evolution bénigne, mais la surveillance semble nécessaire vu que la prévalence des pathologies lymphomateuses est supérieure dans cette population par rapport à la population générale (53).

2- La Lymphocytose B monoclonale (MBL)

C'est une entité relativement récente, définie par la détection par cytométrie en flux d'une lymphocytose monoclonale B durant plus de 3 mois, chez un sujet apparemment sain. Elle peut être CD5+ type CLL ou CD5 – de type non CLL moins fréquemment.

La MBL type LLC a le même phénotype que la LLC, avec les mêmes anomalies cytogénétiques à un niveau de détection plus bas. La progression vers une LLC est de 1% par an sans relation avec le statut mutationnel des Ig VH.

Le groupe MBL type non LLC représente 1% de la population générale. Elle est CD5-, CD10-, CD19+, CD20+ ; expression hétérogène pour le CD23, CD25, CD79b, FMC7 et CD38 ; le phénotype exclue la LLC, le MCL, la HCL, mais fait discuter les lymphomes de la zone marginale et lymphoplasmocytaire (54). Les anomalies cytogénétiques disponibles chez la moitié des patients sont assez hétérogènes à type de délétion 7q, délétion 17q, del 11q, t(2 ;7). La progression est aussi hétérogène d'une stabilité prolongée à une progression vers une lymphadénopathie (55).

3- Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques

La LLC dans sa forme atypique peut poser des problèmes de diagnostic différentiel avec la leucémie polymphocytaire, la leucémie à tricholeucocytes dans sa présentation hyperleucocytaire, et surtout les lymphomes à petites cellules : lymphome du manteau, lymphome folliculaire, lymphome splénique à lymphocytes villeux, le lymphome de la zone marginale non villeux, rarement avec une maladie de Waldenstrom et plus rarement avec les proliférations lymphoïdes malignes T (44,56). Le diagnostic différentiel repose sur l'hémogramme, la cytologie et l'immunophénotypage des cellules lymphoïdes circulantes.

3.1 La leucémie prolymphocytaire (LPL)

Affection rare ; plus grave que la LLC ; Elle est caractérisée par une splénomégalie et l'absence d'adénopathies. La lymphocytose est très importante $> 100.000/\text{mm}^3$; il coexiste une anémie et une thrombopénie dans 50% des cas. Le prolymphocyte (PL) est de taille plus grande, un noyau rond avec un volumineux nucléole à limites très nettes, localisé au centre du noyau, parfois excentré, une chromatine modérément mottée. Le rapport nucléocytoplasmique est plus bas que dans le lymphocyte de la LLC. Le cytoplasme est plus pale. Les PL constituent la majorité des cellules lymphoïdes du sang ($> 55\%$).

Les marqueurs immunologiques sont également différents avec un CD5 souvent négatif, ou positif dans seulement 20% à 30% des cas ; le CD23 est positif dans seulement 10% à 20% des cas. le FMC7, CD22, CD79 a et b sont positifs ; il existe une forte positivité des Ig de membrane ; le CD38 est positif dans 46% des cas. L'expression du CD38, du ZAP-70 et le statut mutationnel des Ig VH n'ont pas d'impact pronostique particulier, toutefois une délétion P53 s'associe à un mauvais pronostic. Cette entité garde une signature génomique spécifique et homogène qui la distingue aisément d'une LLC mixte **(57)**.

La leucémie prolymphocytaire issue d'une transformation d'une LLC a un phénotype semblable à une LLC.

3.2 Les lymphomes folliculaires en phase leucémique : (FL)

Malgré leur fréquence (25-30% des lymphomes non hodgkiniens) la dissémination sanguine se voit seulement dans 5% des cas **(58)**.

Ils se manifestent par des adénopathies diffuses. La population lymphoïde circulante est volontiers polymorphe avec une majorité de cellules de petite taille à cytoplasme très réduit, invisible, à noyau souvent clivé réalisant un aspect en grain de café ; la chromatine est uniformément dense (centrocytes), avec un pourcentage de cellules plus grandes non clivées (centroblastes). La biopsie ganglionnaire montre une architecture tumorale folliculaire. La localisation médullaire est assez difficile à mettre en évidence à cause de la localisation paratrabéculaire, territoire fréquemment non aspiré à la ponction médullaire.

Les cellules lymphoïdes sont : CD19+, CD20+, CD22+ ; CD10 + ; Ig s forte ; typiquement CD 5 -, CD43 -, CD11c -, CD 23 souvent négatif, FMC7+, BCL2+ et BCL6+ ; Ig M souvent exprimée.

3.3 Le lymphome du manteau (MCL)

Il représente 3 à 10 % des lymphomes non hodgkiniens ; âge moyen : 60 ans ; prédominance masculine ; il est au stade de dissémination sanguine dans 1/3 des cas ;

La cytologie est variable : lymphocytes de plus grande taille, de forme variée, noyaux irréguliers, rapport nucléo cytoplasmique très élevé, chromatine dispersée, nucléole peu volumineux ; parfois forme blastoïde faite de cellules jeunes, pouvant simuler une leucémie aigüe ; de pronostic défavorable ; l'immunophénotypage de la prolifération tumorale montre : CD19+, CD5+ , FMC7+, CD43+; les Ig de surface sont plus fortes que dans la LLC, plus souvent lambda que kappa ; Ig M intermédiaire, Ig D faible ou négatif, CD11c faible, CD25 faible, CD22 négatif, CD10 négatif **(58)**. Le CD23 négatif est en faveur d'un MCL, mais une faible expression peut se voir dans le MCL comme dans la LLC, dans ce cas l'analyse d'autres marqueurs est nécessaire pour plaider vers l'un ou l'autre des diagnostics **(59)**. La recherche de la Cycline D-1 par CMF après perméabilisation des cellules est une excellente méthode diagnostique. L'étude cytogénétique par banding G ou par FISH retrouve des anomalies surajoutées dans 85% à 92% des cas **(58)**.

3.4 La maladie de Waldenström

Affection rare, proche de la LLC, qui se discute quand il existe une Ig M monoclonale sérique ; caractérisée par une infiltration médullaire lymphocytaire modérée polymorphe (lymphoplasmocytes, lymphocytes). Les cellules de MW expriment le CD19, CD20, CD22, les chaînes légères k ou λ, souvent le CD79a ; elles sont CD5, CD10 et CD23 négatives ; les cellules à maturation plasmocytaires expriment le CD138 **(60)**.

3.5 La leucémie à tricholeucocytes : forme hyperleucocytaire

Mise en évidence au myélogramme de lymphocytes "chevelus" ou tricholeucocytes et d'une myélofibrose. L'hémogramme montre le plus souvent une pancytopenie avec monocytopenie. Dans de rares cas de formes hyper leucocytaires avec tricholeucocytes circulants, elle peut être confondue avec la LLC. Le tricholeucocyte (ou cellule chevelue = Hairy Cell) est une cellule de taille plus importante que le lymphocyte de la LLC; le noyau parfois clivé est à chromatine modérément mottée, sans nucléole ; le cytoplasme est pâle et plus étendu. La membrane plasmique présente des expansions chevelues sur tout son pourtour. La réaction des phosphatases acides tartrate résistantes est positive.

L'immunophénotypage : CD19+, CD20+ fort, CD22+ fort, CD79a +, le plus souvent Ig M et Ig D, CD25+ modérée, (Dans la forme variante le CD25 est toujours négatif) , FMC7+, et une négativité au CD5, CD10, CD21 et CD23 ; elle exprime assez fortement le CD11c, le CD 103, et le DBA44, le CD 123 et l'annexine A1.

Un système de scoring s'inspirant du score de Matutes a été développé pour la LT ; il est basé sur l'expression des marqueurs CD 103, CD11c, CD25 et CD123 ; Un point est attribué pour une expression positive et 0 point pour une expression négative ; un score 0

ou 1 exclue ce diagnostic **(61)**. Par ailleurs, la cytométrie multi couleur est très sensible et spécifique pour la détection de faibles niveaux de TL dans le sang périphérique ou dans la moelle osseuse **(62)**. L'annexine A1 n'est exprimée par aucune autre lymphopathie B et constitue de ce fait un outil excellent pour distinguer la LT des autres syndromes lymphoprolifératifs B **(63)**. Ces marqueurs sont par ailleurs très importants pour le suivi sous traitement (maladie résiduelle).

3.6 Le lymphome splénique à lymphocytes villeux

Très rare. Il associe une splénomégalie volumineuse à une hyper lymphocytose modérée ; il peut coexister une anémie et ou une thrombopénie modérées ; Les cellules lymphoïdes circulantes sont caractérisées par une petite taille, un cytoplasme portant de petites villosités localisées à un pôle de la cellule. L'étude immunophénotypique montre une positivité du FMC7, le CD25 et CD5 sont négatifs **(64)**.

3.7 Le lymphome de la zone marginale (ZML)

Trois présentations sont connues : splénique, ganglionnaire, extra ganglionnaire (MALT : mucosa-associated lymphoid tissue) particulièrement au niveau de l'estomac et des glandes salivaires. Fréquent (10-15% des lymphomes non hodgkiniens) Cytologie polymorphe : grandes cellules monocytoides, petites cellules clivées, cellules lymphoplasmocytaires. Phénotype : CD 19+, CD20+, CD24+, CD22+ fort, CD 79b +, FMC7 + ; IgS+ modéré à fort, souvent Ig M+ ; la plupart des cellules expriment CD11c ; Ig D est inhabituelle ; CD5-, CD103-, CD23-, CD 10 -, CD25-, CD43-, annexine A1 négative **(64)**. Association fréquente avec les désordres auto-immuns particulièrement le syndrome de Sjogren. 60% des lymphomes MALT ont une trisomie 3 quelque soit le site du lymphome ; toutefois cette anomalie est moins fréquente dans le lymphome de la zone marginale splénique

3.8 Les Lymphomes T CD 3+, CD4+ ou CD8+

3.8.1 Leucémie prolymphocytaire T

La leucocytose supérieure à 100.000/ μ l, splénomégalie et adénopathies habituelles. Morphologie proche des LPL B. CMF : CD2+, CD3+, CD5+, CD7+, souvent CD4+ CD8-, mais peuvent être CD4+CD8+. L'expression CD8+ seule est moins commune **(65)**. Pronostic défavorable, les formes CD4+ CD8- répondent mieux à la chimiothérapie.

3.8.2 La Leucémie / lymphome à cellules T (Adult T- cell Leukemia)

Elle est liée à l'infection par HTLV-I. Les cellules lymphoïdes sont à noyaux polylobés, en " trèfle ". Très mauvais Pronostic **(66)**.

3.8.3 Le Syndrome de Sézary dans sa présentation leucémisée

Les cellules lymphoïdes sont à noyau dit cérébriforme ; expriment CD2, CD3, CD4 et CD5 ; le CD7 est parfois négatif **(67)**.

3.8.4 Les Lymphomes à LGL (grands lymphocytes à grains) :

Cellules à cytoplasme abondant, présence de grains ; une lymphocytose modérée avec neutropénie fréquente

Phénotype : deux formes ont été décrites :

3.8.4.1 Les Lymphomes T-LGL :

Forme la plus courante ; CD3+, CD4+, CD8+ faible, CD2+ exprime un ou plusieurs antigènes NK : CD11b, CD16, ou CD57, réarrangement du TCR $\alpha\beta$ **(68)** ; association fréquente d'une polyarthrite rhumatoïde et d'un syndrome de Felty.

3.8.4.2 Les Lymphomes NK-LGL :

Rencontrés essentiellement au Japon ; leur évolution est aigüe fulminante : fièvre, hépatosplénomégalie, pancytopénie. Une forme chronique est décrite. En cytométrie de flux, CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD56+, CD57- **(68)**.

VII- LES FACTEURS PRONOSTIQUES

La leucémie lymphoïde chronique a des modalités évolutives très variables : Les critères pronostiques permettent de séparer les formes évolutives graves, des formes à évolution lente et indolente.

Dans les années 1980, certains critères clinico-biologiques de valeur pronostique ont été décrits et longtemps adoptés.

1- Facteurs pronostiques classiques

Deux classifications ont été très largement utilisées pour évaluer le syndrome tumoral :

1.1 La classification de Rai

Elle est utilisée essentiellement par les Anglo-Saxons (69). (Tableau II et III)

Stade	Caractéristiques
0	Lymphocytose seule
I	Lymphocytose avec adénopathies
II	Lymphocytose avec splénomégalie et/ou hépatomégalie, avec ou sans lymphadénopathie
III	Lymphocytose avec anémie* (hémoglobine <110 g/l) avec ou sans lymphadénopathie, splénomégalie ou hépatomégalie * Hors anémie hémolytique auto immune
IV	Lymphocytose avec thrombopénie* (plaquettes <100 G/l) avec ou sans anémie et/ou lymphadénopathie, splénomégalie ou hépatomégalie * Hors thrombopénie auto immune

Tableau II : Classification de Rai

Niveau de risque	Stade de Rai	Survie médiane (ans)
Faible	0	> 10
Moyen	I	9
	II	5
Élevé	III	2
	IV	2

Tableau III : Classification révisée de Rai : Catégorie de risque et survie médiane

1.2 La classification de Binet (70) Tableaux IV et V

Cinq aires ganglionnaires sont prises en compte pour la classification :

(1) tête et cou (y compris l'anneau de Waldeyer), (2) aisselles, (3) aine, (4) rate et (5) foie.

L'atteinte ganglionnaire (1 à 3) peut être indifféremment unilatérale ou bilatérale,

Les ganglions dont le diamètre est > 1 cm sont considérés comme hypertrophiés.

Pour l'évaluation du volume de la rate et du foie, seul l'examen clinique est accepté.

Aucune évaluation radiologique n'est prise en compte dans cette classification de Binet.

Stades	Critères de définition
A	Lymphocytose, taux d'hémoglobine > 100 g/l et numération des plaquettes > 100 G/l Atteinte de moins de trois aires ganglionnaires
B	Lymphocytose, taux d'hémoglobine > 100 g/l et numération des plaquettes > 100 G/l Atteinte de trois aires ganglionnaires ou plus
C	Lymphocytose, taux d'hémoglobine < 100 g/l ou numération des plaquettes < 100 G/l Quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes * Hors anémie hémolytique auto-immune ou thrombopénie auto-immune.

Tableau IV : Classification de Binet

Stades	Niveau de risque	Survie médiane (ans)
A	Faible	> 10
B	Intermédiaire	5
C	Elevé	2

Tableau V : Classification de Binet et niveau de risque

Ces deux classifications de réalisation simple (un examen clinique et un hémogramme) gardent toujours leur utilité quand à la stratification pronostique ; néanmoins pour les stades A de Binet ou 0 de RAI, elles ne distinguent pas les formes indolentes des formes à potentiel évolutif plus rapide et plus agressif. De ce fait, de nouveaux facteurs ont été introduits afin de renforcer ces deux classifications :

Le stade A de Binet a été subdivisé en deux sous groupes pronostiques :

A' : Hb > 12 g/dl et lymphocytes < 30000/mm³ de pronostic favorable

A'' : Hb < 12 g/dl ou lymphocytes > 30000/mm³ de pronostic défavorable

La médiane de l'intervalle sans traitement (TFI) :

Stade A' = 180 mois, Stade A'' = 28 mois, stade B = 16 mois, Stade C = 3 mois **(71)**.

1.3 Le temps de dédoublement des lymphocytes sanguins (LDT)

C'est le temps en mois, nécessaire pour que le taux absolu des lymphocytes soit doublé.

C'est un témoin de l'évolutivité de la maladie, proposé d'abord par Galton en 1966 **(72)**.

LDT ≤ 12 mois définit une population de mauvais pronostic avec maladie agressive et une courte survie ; par contre un LDT > 12 mois indique un bon pronostic soutenu par une longue période sans traitement et de survie **(73)**. Molica et Vinolas ont retrouvé une médiane de survie de 36 mois à 58 mois en cas de LDT ≤ 12 mois ; la médiane de survie est non atteinte quand le LDT > 12 mois. De plus, c'est un facteur prédictif de progression rapide dans les formes précoces de la maladie **(73,74)**.

Un seuil moins long a été fixé à 6 mois pour surveiller le temps de dédoublement des lymphocytes. Un TDL en moins de 6 mois indique une maladie active et peut nécessiter la mise en route d'un traitement **(75)**.

1.4 L'aspect cytologique des lymphocytes sanguins

L'existence sur les frottis sanguins de moins de 10% de prolymphocytes est corrélée avec un pronostic favorable ; par contre la présence de plus de 10% de PL est corrélée avec un pronostic défavorable.

Les ombres de Gümprécht (OG) sont les lymphocytes fragiles rompus lors de la préparation du frottis sanguin, inversement corrélé à l'expression de la protéine du cytosquelette : la vimentine. Le pourcentage des OG est élevé (≥ 30%) dans le groupe des Ig VH muté avec un temps médian du diagnostic au premier traitement non atteint comparé à 72,7 mois dans le groupe où les OG < 30% **(34)**.

Un seuil ≤ 20 % est associé à un court délai pour le premier traitement et de survie globale. Le pourcentage des ombres de Gümprécht est bas chez les patients avec CD38 positif, ZAP-70 positif et en cas d'un statut non muté des Ig VH **(76)**.

1.5 Le type d'infiltration médullaire

Le type de l'infiltration histologique médullaire a constitué un facteur pronostique. L'infiltration diffuse est défavorable ; une infiltration non diffuse est plutôt favorable **(77)**.

Une corrélation hautement significative a été retrouvée entre le type d'infiltration médullaire et le stade de la maladie et le taux de lymphocytes. La moitié des malades est décédée dans le cas d'infiltration diffuse avec une médiane de survie de 87 mois, comparé à 11% de décès dans le cas d'infiltration non diffuse. L'auteur a suggéré que le type d'infiltration médullaire aurait une valeur prédictive sur la progression de la maladie dans les stades I et II de RAI **(78)**.

Actuellement l'intérêt pronostique de la PBO semble dépassé par les nouveaux facteurs pronostiques, sauf dans les essais thérapeutiques.

2- Les nouveaux facteurs pronostiques

Certains facteurs et leurs impacts sont bien établis, tandis que d'autres méritent des études plus élargies pour les valider :

2.1 Les facteurs à valider

2.1.1 Les marqueurs sériques : VEGF, thrombopoïétine.

2.1.2 La longueur des télomères : les télomères se raccourcissent à chaque division cellulaire ; dans la LLC les télomères sont encore plus courts indiquant le potentiel prolifératif des cellules leucémiques. Les télomères des cellules non mutées sont encore plus courts suggérant l'activité proliférative encore plus active dans ce sous groupe avec une activité télomérase élevée **(79)**.

2.1.3 La mRNA AID (Activated-induced cytidine deaminase) : AID est un marqueur essentiel pour les hyper mutations somatiques, restreint aux cellules B du centre germinatif. Les cellules LLC exprimant fortement AID font partie du groupe non muté de mauvais pronostic.

2.1.4 L'expression de la lipoprotéine lipase A et d'ADAM29 : elle est surexprimée dans les formes mutées et s'accompagne d'une PFS et d'une survie globale plus prolongées comparées aux formes non muté/LPL dans les LLC traitées par FC **(80)**.

2.1.5 Le profil d'expression des microRNA qui régulent négativement l'expression du BCL2 ; le profil d'expression a une bonne corrélation avec l'état mutationnel des Ig VH et le ZAP-70. Le miR-21 est élevé chez les patients avec mauvais pronostic et prédit la survie globale ; le miR-181b prédit la survie sans traitement (TFS) **(81)**.

2.1.6 L'expression de l'antigène leucocytaire humain G (HLA-G) : une expression HLA-G positive > 12% par cytométrie en flux a un effet sur la survie sans progression comparé au CD38 et au ZAP-70 **(82)**.

2.2 Les facteurs liés au traitement :

L'obtention d'une réponse au traitement et d'une maladie résiduelle négative restent l'idéal à atteindre ; cette réponse dépend aussi de la nature du traitement lui-même (chimiothérapie et allogreffe de moelle). La survie sans progression dépend d'une bonne réponse thérapeutique ; depuis peu de temps des études démontrent que même la survie globale a été modifiée par les thérapeutiques récentes **(83)**.

L'échec à la chimiothérapie a été défini comme :

- L'absence de bénéfice après 3 cures.
- L'apparition d'une nouvelle localisation sous traitement nécessitant une irradiation.
- La survenue d'une rechute, sans réponse à l'augmentation des antimétabolites.
- La toxicité d'une chimiothérapie dépasse son effet bénéfique pour le malade.
- Une progression de la maladie sous traitement.

Le NCIWG en 1996 a défini l'échec thérapeutique comme une réponse inférieure à une RC, une RPN ou une RP et la maladie réfractaire comme l'échec à obtenir au moins une réponse partielle ou une progression sous traitement **(84)**.

Le NCIWG (2008) élargit la définition de maladie réfractaire à un échec thérapeutique en cas : de maladie stable, d'absence de réponse, de progression ou de décès quelque soit la cause, ou de progression dans un délai de 6 mois de la dernière chimiothérapie **(47)**.

Les patients réfractaires à la fludarabine sont définis comme des patients n'ayant pas obtenu une RC/RP ou ceux qui progressent dans un délai de 6 mois après la dernière dose de chimiothérapie, ou ceux qui rechutent ou progressent en moins de 12 mois après une greffe de cellules souches **(85,86)**.

Avec l'avènement des nouveaux facteurs pronostiques et le développement du traitement en première ligne en particulier l'immuno-chimiothérapie (FCR), des groupes à risque ont été définis pour mieux stratifier les indications thérapeutiques :

- catégorie "le plus haut risque" : délétion ou mutation P53, maladie réfractaire aux analogues des purines, une courte réponse de moins de 24 mois et absence de RC sous protocole RFC
- catégorie " haut risque" : patients avec un taux élevé de $\beta 2$ microglobuline ou thymidine kinase, Ig VH non mutée (ZAP-70) ou del 11q22.
- Catégorie " bas risque" : patients sans délétion/mutation de la P53, sans del 11q, des Ig VH mutées, un taux de $\beta 2$ microglobuline bas, sans thérapeutiques antérieures **(87)**.

2.3 Les facteurs validés

2.3.1 Les marqueurs sériques

2.3.1.1 La $\beta 2$ microglobuline :

C'est une protéine extra cellulaire liée de façon non covalente à la chaîne α du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, exprimée à la surface cellulaire de plusieurs tissus, détectable dans le sérum et d'autres fluides du corps humain ; son taux élevé n'est pas spécifique de la LLC.

Dans la LLC, une concentration élevée représente un élément indépendant de mauvais pronostic et de survie raccourcie **(88)**, corrélée à un taux élevé de lymphocytes, un état d'activation de ceux-ci et à un stade avancé de la maladie. Selon Keating et al, elle prédit de la réponse thérapeutique aux FCR **(89)**.

Delgado en 2009, rapporte que le taux de $\beta 2$ microglobuline est lourdement influencé par le taux de filtration glomérulaire dans la LLC, et il a analysé le critère pronostique du taux corrigé de $\beta 2$ microglobuline (GFR- $\beta 2M$). La survie sans traitement est raccourcie chez les patients avec ZAP-70+, un taux de GFR- $\beta 2M$ élevé avec del 11q ou del 17p. La valeur prédictive sur la survie globale n'a pas été retrouvée pour ce facteur **(90)**.

Le taux de la $\beta 2$ microglobuline est particulièrement élevé au cours d'une transformation d'une LLC en une leucémie à prolymphocytes et en cas d'association à des désordres auto-immuns, suggérant que l'expression de la $\beta 2$ microglobuline à la surface cellulaire est corrélée au stade de différenciation des cellules B tumorales **(91)**.

2.3.1.2 La thymidine kinase sérique (s-TK) :

C'est une enzyme intracellulaire qui contrôle la phosphorylation de la déoxythymidine en déoxythymidine mono phosphate ; elle est incorporée sous forme triphosphate dans l'ADN. Présente sous forme TK1 cytoplasmique et TK2 mitochondriale. L'activité sérique normale est assurée essentiellement par la forme TK1 (95%) dont le taux s'élève dans la plupart des néoplasies. Son taux est corrélé à la masse tumorale et à l'activité proliférative de la maladie dans la LLC surtout aux stades A.

Elle s'inscrit comme facteur pronostique indépendant de la survie sans progression ; son taux permet de subdiviser les stades A non indolents en deux sous groupes : un sous groupe avec un taux de s -TK > 7,1 U/L avec une PFS de 8 mois et un sous groupe avec s-TK \leq 7 U/L avec une PFS à 49 mois, semblable au groupe de LLC indolente (42 mois) **(92)**.

2.3.1.3 Le CD23 soluble

C'est un marqueur de surface de la cellule B, récepteur du fragment FC des Ig E. Sa forme sérique résulte du clivage de cette Ag membranaire. Le dosage du CD23 soluble se fait par méthode ELISA.

Son taux sérique élevé est un indicateur de mauvais pronostic et de progression de la maladie **(93)**.

Le temps de doublement du CD23 soluble (SCD23DT) a été étudié dans des stades A non traités ; ce temps < 12 mois est associé à un court temps médian avant traitement et une courte survie : 20 mois et 83 mois respectivement ; comparé à 141 mois et 177 mois si ce SCD23DT est > 1 an. Ce marqueur appuie l'impact pronostique des facteurs pronostiques classiques (statut Ig VH, CD38, ZAP-70, LPL) **(94)**.

Un taux de CD23 soluble élevé est associé à un pourcentage de cellules CD38+ élevé avec une implication pronostique péjorative. Toutefois son critère pronostique indépendant n'a pas été prouvé par des études prospectives.

Certains auteurs ont regroupé ces différents paramètres biologiques afin de réaliser un score de meilleur impact pronostique que chaque facteur pris à part : les patients en stade A sont classés dans le bras haut risque si le TDL < 12 mois et /ou une infiltration médullaire diffuse, un taux de thyrosine kinase > 7 U/L et /ou un taux de β 2 microglobuline > 3,5 mg/L ; au sein de ce groupe, les anomalies cytogénétiques de haut risque (del 11q, del 17p) et le statut non muté des Ig VH sont observés dans 41% des cas avec une progression plus rapide de la maladie **(95)**.

Letestu et al en 2010, ont établi un score de risque de progression des stades A basé sur le taux de lymphocytes > 13 G/L, l'expression du CD38 > 7%, la β 2 microglobuline > 2,5 mg/l et le taux de thymidine kinase > 10 UI/L ; les patients ayant 2, 3 ou 4 facteurs avaient une médiane de survie sans progression de 20 mois comparée à 85% de ceux ayant 0 ou 1 facteur qui n'avaient pas progressé après 7 ans de suivi **(96)**.

2.3.1.4 Angiopoietine-2 plasmatique (Ang-2)

Basé sur un cutt-off de 2459 pg/ml, un taux élevé d'Ang-2 est prédictif d'un court intervalle avant le premier traitement et de survie globale (facteur pronostique Indépendant), s'associe à un stade de Binet avancé , un taux élevé de β 2 microglobuline, un statut non muté des Ig VH, un CD38 positif, un ZAP-70 positif et des anomalies cytogénétiques à risque intermédiaire ou élevé **(97)**.

2.3.2 Etat mutationnel des gènes Ig VH (Immunoglobulin heavy chain variable région gènes)

Les cellules LLC expriment le CD5 et l'Ig M/Ig D et ont le phénotype de la zone manteau like des cellules naïves, qui dans les conditions normales expriment des gènes Ig non mutés. Cependant les cellules LLC montrent dans 50 % à 70 % des mutations somatiques de ces gènes Ig VH. En effet, les gènes Ig VH de 50 % des LLC IgM+, et approximativement de 75% des LLC non IgM+, présentent des mutations somatiques **(98)**. La présence ou l'absence de ces hyper-mutations somatiques est associée à une utilisation particulière de certains gènes VH. Les allèles du gène VH1-69 et VH4-39 sont préférentiellement exprimés dans les formes non mutées ; les gènes VH4-34 ou la majorité de la famille de gènes VH3 sont retrouvés dans les formes mutées **(99)** Exception faite pour l'usage des gènes VH3.21 qui représentent un marqueur de mauvais pronostic indépendant du statut mutationnel des Ig VH **(100)**.

Pour définir le statut mutationnel muté ou non muté, un séquençage nucléotidique de la région variable des Ig est réalisé et comparé avec les séquences germinales les plus proches pour définir les séquences d'homologie. Plusieurs seuils ou cut-off ont été proposés (95%, 97%), mais la valeur de 98% est la plus discriminante selon les différentes études cliniques réalisées **(08,101)**.

Selon Hamblin et al, le séquençage des gènes Ig VH chez 84 patients a montré dans 45,2% des cas une homologie \geq 98% des séquences avec la lignée germinale (non mutée), associé à une maladie progressive et une mauvaise survie ; et une deuxième population qui montre > 2% de mutations somatiques (dite mutée), de meilleur pronostic : médiane de survie des stades A avec des cellules LLC à Ig VH mutée = 293 mois comparée à 96 mois dans la population non mutée. Le statut muté ou pas est un critère stable au cours de l'évolution de la maladie **(102)**.

Vasconcelos en 2003, a retrouvé une médiane de survie globale et une survie sans progression raccourcies dans le groupe de patients avec Ig VH non mutée comparés au groupe avec Ig VH mutée tous au stade A (79-119 mois vs 293 mois et 42 mois vs 156 mois respectivement). Cela permet de reconnaître des formes agressives au sein même d'un stade A **(103)**; il y a pour ce stade, un intervalle sans traitement de 26 mois vs 124 mois selon le statut non muté ou muté des Ig VH respectivement **(104)**.

La réalisation du statut mutationnel des Ig VH est du domaine de la recherche dans des laboratoires spécialisés, vue la difficulté de réalisation ; le CD38 et le ZAP-70 ont été proposés comme marqueurs substitut et leurs corrélations étudiées par de multiples équipes, ainsi que leur valeur pronostique respective qui reste variable **(105,106)**.

Selon Damle en 1999, les patients à Ig VH non mutée expriment des pourcentages élevés de CD38 ($\geq 30\%$) par rapport à ceux à Ig VH mutée. Les patients du premier groupe ont une mauvaise réponse à la chimiothérapie y compris la Fludarabine et ont une courte survie globale **(105)**.

Cette étude est confortée par deux études faites en 2005 par Byrd and al et Del Poeta et al, qui démontrent que le statut non muté garde sa valeur pronostique péjorative avec une courte survie sans progression et une courte survie globale même chez les patients traités par des chimiothérapies à base de fludarabine **(107,108)**. Le statut non muté prédit aussi d'une maladie résiduelle positive après autogreffe de cellules souches hématopoïétiques avec éventuelle rechute ou progression de la maladie ; par contre une allogreffe induit une rémission complète avec maladie résiduelle négative durable même avec un statut non muté des Ig VH **(109)**.

En analyse uni variée, un statut non muté des cellules LLC et une forte expression du CD38 prédisent d'une courte survie.

En analyse multi variée, le statut non muté se dégage comme facteur pronostique indépendant ; dans ce groupe les anomalies génétiques de mauvais pronostic (del17p, del 11q) sont les plus retrouvées, jouant un rôle complémentaire pour prédire du devenir de la maladie. La médiane de survie des patients avec un statut Ig VH non muté et une délétion P53 est à peu près de 3 ans **(110)**

2.3.3 Expression du CD38

C'est une glycoprotéine membranaire de 45kDa initialement décrite comme antigène de surface des thymocytes, retrouvée aussi sur la surface des cellules B, des monocytes et des cellules NK. Ecto-enzyme à activité cyclase et hydrolase. C'est une molécule d'activation et de maturation jouant un rôle dans la signalisation via sa relation avec le T-cell receptor (TCR) sur les cellules T, le B-cell receptor (BCR) sur les cellules B, avec le CD16 sur les cellules NK et avec le FC gamma receptor sur les monocytes.

Le CD38 sur les cellules B est exprimé sur les progéniteurs immatures, les cellules du centre germinal, les lymphocytes activés et les plasmocytes, mais faiblement exprimé sur les cellules B matures.

2.3.3.1 Le seuil de positivité du CD38

C'est un sujet de débat, les valeurs en pourcentage de cellules exprimant le CD38 des différentes études sont illustrées par quelques exemples :

Un cut-off à 7% : Ce taux a été étiqueté par certains auteurs comme meilleur que 30% pour faire la séparation pronostique dans les cohortes. Pour préciser l'impact pronostique individuel de chaque paramètre pronostique (statut mutationnel IgVH, CD38 et aberrations cytogénétiques) le cut-off du CD38 utilisé dans les études suivantes était de 7% **(110,111)**, étiqueté comme le meilleur pour différencier deux groupes selon la probabilité de survie. En analyse uni variée, les gènes Ig VH non mutés et une expression élevée du CD38 prédisent d'une courte survie. En analyse multi variée, le statut non muté des Ig VH, le del 17p, la del 11q, l'âge, le taux de GB, et le taux de LDH sont identifiés comme facteurs pronostiques indépendants

Toujours pour définir le niveau du CD38 qui affecte le pronostic, Thornton a étudié le CD38 en cytométrie en flux triple couleurs ; il a tracé des ratios de risque pour l'intervalle sans traitement pour les groupes supérieurs ou inférieurs pour des cut-off de 0% à 100%. Le ratio de danger maximal a été atteint pour un cut-off de 7%. Les patients au stade A avec un CD38 < 7% ont un long intervalle sans traitement (36 mois), celui-ci était de 8,7 mois pour les patients avec CD38 ≥ 30% **(112,113)**.

L'auteur sur 52 patients, a utilisé 3 niveaux d'expression du CD38 : CD38 < 7%, 7% ≤ CD38 ≤ 30%, CD38 ≥ 30%. Il a conclu à une corrélation significative entre l'expression du CD38 et l'état mutationnel des Ig VH. Une expression élevée de CD38 corrèle avec un état non muté, un taux bas de CD38 corrèle avec un état muté des Ig VH **(114)**.

Un cut-off à 20% :

Chez les patients avec un CD38 ≥ 20%, l'expression du CD38 est associée à une cytologie atypique, une infiltration médullaire diffuse et un taux élevé de lymphocytes périphériques, un syndrome tumoral important, une hépatomégalie, un taux élevé de β2 microglobuline ; leur survie est significativement raccourcie avec une forme agressive de la maladie dans les formes précoces (0-II de Rai) **(115,116)**.

Un CD 38 + et un dysfonctionnement de la P53 sont associés à un mauvais pronostic avec courte survie même au sein d'un groupe d'Ig VH muté **(117)**.

Cut-off à 30%:

Selon Del Poeta en 2001, un taux élevé du CD38 est associé aux stades à risque intermédiaire ou élevé de RAI, à une forte masse tumorale, à un temps de dédoublement des lymphocytes < 12 mois, une survie sans progression raccourcie (37% à 5 ans),

un risque de réponse partielle ou pas de réponse à la Fludarabine et une survie globale courte (50% à 8 ans) **(118)**.

Selon Hamblin en 2002, pour la population CD38 positif, la médiane de survie (du moment de la mesure du CD38) est de 38 mois, elle n'a pas été recherchée pour la population CD38 négatif. Parmi plusieurs paramètres étudiés : stade Binet, cytologie typique ou atypique, TDL, la trisomie 12 et la délétion 13q14 ; seuls le stade Binet, le statut mutationnel Ig VH et la positivité du CD38 avaient une valeur pronostique indépendante. La médiane de survie des patients à Ig VH non mutée et exprimant le CD38 est de 8 ans ; celle des patients à Ig VH mutée et n'exprimant pas le CD38 est de 26 ans **(119)**.

Dans le travail de Ghia et collaborateurs en 2003, les auteurs ont démontré que le discriminant clinique important n'est pas la valeur numérique du CD38 mais plutôt son mode d'expression et sa corrélation avec le statut mutationnel des Ig VH qui permet de prédire du risque de progression de la maladie.

Ils ont divisé leurs cas de LLC en 3 sous groupes :

- Un groupe CD38 positif : expression homogène du CD38 par l'ensemble des cellules.
- Un groupe CD38 Négatif : absence d'expression du CD38 par l'ensemble des cellules.
- Un troisième groupe bimodale caractérisé par la présence concomitante de deux populations, l'une exprimant de manière forte le CD38, la seconde complètement négative. Ils ont par la suite observé que les proportions des deux populations peuvent être très variable de 8% à 76% entre les individus ; le pourcentage à partir duquel une expression est étiquetée bimodale est encore à préciser **(120)**. L'expression du CD38 est un excellent marqueur pronostique. La quantification du CD38 par cytométrie en flux améliore la valeur pronostique du pourcentage du CD38, spécialement dans les stades précoces de la maladie et chez les sujets jeunes **(121)**.

2.3.3.2 Corrélation du CD38 avec le statut mutationnel des Ig VH

L'expression du CD38 a été le premier marqueur corrélé au statut mutationnel des gènes Ig VH : en 1999, Damle et al ont fait l'étude de l'expression du CD38 chez des patients LLC dont le séquençage des gènes Ig VH était disponible et ont étudié la réponse thérapeutique et la survie chez ces malades.

Les cas de LLC ont été divisés en deux groupes :

* Ceux avec profil Ig VH non muté qui corrélé avec un pourcentage de CD38 positif ($\geq 30\%$), ont une mauvaise réponse thérapeutique y compris à la fludarabine et ont une mauvaise survie. Dans ce groupe, il a été remarqué une prédominance masculine.

* Ceux à profil Ig VH mutée, corrélé avec une expression négative du CD38 ($< 30\%$) ne nécessitent pas ou peu de traitement et ont une survie prolongée. Dans ce groupe par contre il n'y a pas de prédominance de sexe **(105)**.

Dans le travail de Ghia et al précité, les auteurs ont étudié la corrélation des différents sous groupes (positif, négatif et bimodal) avec le statut mutationnel des Ig VH :

- Le groupe CD38 négatif est caractérisé par des cellules souvent à gènes Ig VH mutés (88,4%), une médiane de survie non atteinte après 89 mois de suivi et la majeure partie (74,2%) n'a pas nécessité un traitement durant cette période.

- Le groupe CD38 positif est caractérisé par des cellules le plus fréquemment (84,6%) à gènes Ig VH non mutés, une médiane de survie de 183 mois et une grande partie (75%) a nécessité un traitement durant un suivi de 98 mois.

- Le groupe à expression bimodale est à cellules à tendance non mutées dans les gènes Ig VH (68 %), un risque de progression de la maladie semblable au groupe CD38 positif de 63,3%, une nécessité de traitement après un suivi de 87 mois et une médiane de survie de 156 mois **(120)**.

En 2005, Cocco et al confortent cette étude en analysant l'expression antigénique bimodale et son intérêt pronostique : le CD38 et le CD13 étaient les deux antigènes qui exprimaient le plus cet aspect bimodal, dans 14,5% et 12,9% respectivement, sans effet néfaste particulier sur la survie globale, celle-ci rejoint plutôt le groupe CD38 positif **(122)**.

En 2002, Hamblin et al ont démontré une discordance entre le statut mutationnel des Ig VH et la positivité du CD38 dans 28,3% des cas, ainsi qu'une variation dans le taux du CD38 durant l'évolution de la maladie dans 24% des cas. Mais ces deux facteurs restent des facteurs pronostiques indépendants dans la LLC.

La médiane de survie pour le groupe CD38+, Ig VH non mutée est de 8 ans, pour le groupe CD38 négatif, Ig VH mutée de 26 ans, pour le groupe discordant de 15 ans **(119)**.

L'incidence des anomalies cytogénétiques est semblable dans le groupe muté ou non muté des Ig VH. Les anomalies génétiques de haut risque sont presque exclusivement dans le groupe non muté ; par contre l'anomalie favorable, la délétion 13q14 isolée est plutôt présente dans le groupe muté.

En analyse multi-variée, le statut non muté des Ig VH, la délétion 17p, la délétion 11q, l'âge, le taux de GB et le taux des LDH sont identifiés comme des facteurs pronostiques indépendants **(110)**.

2.3.3.3 Le CD38 : facteur de mauvais pronostic, prédictif de progression de la maladie

L'expression du CD38 est associée à l'expression de la B2 microglobuline et du CD23 soluble, à une forte masse tumorale, un TDL de moins de 12 mois, à une réponse partielle ou nulle à la fludarabine et à une survie globale raccourcie **(118,123)**. Parmi les marqueurs de prolifération comme le CD23 soluble et la thymidine kinase (étudiés plus haut), il existe un autre indicateur d'activation du cycle cellulaire, c'est le taux de Ki-67 exprimé par les cellules en phase S. Messmer et al ont démontré que les clones LLC ont un taux de turnover cellulaire de 1-10% par semaine indiquant la partie proliférative du clone LLC.

Le CD38 de surface et le Ki-67 sont détectés simultanément dans les cellules LLC par analyse tri-couleurs ; ce résultat indique la corrélation significative entre ces deux paramètres.

Dans plusieurs observations cliniques, le taux élevé du CD38 est fréquemment associé à une progression de la maladie. Il a été remarqué que ce sont les grands lymphocytes (prolymphocytes, para-immunoblastes) qui expriment des niveaux élevés de CD38 et de Ki-67 dans les pseudo-follicules, en contraste avec les cellules de petite taille, expliquant en partie le mauvais pronostic des formes LLC/LPL et la nature proliférative des prolymphocytes dans la LLC.

Il a été noté qu'il n'y a que les grandes cellules tumorales prolifératives Ki-67 qui expriment le CD38 ; paradoxalement ce ne sont pas toutes les cellules CD38+ qui expriment le Ki-67. En plus, la plupart des cellules Ki-67 sont adjacentes aux cellules T activées (CD4) impliquant ces cellules dans le processus prolifératif **(22,113)**.

Sur une analyse multi variée, seule le stade et le CD38 sont des facteurs indépendants de progression vers un traitement dans les stades précoces de la maladie ($P < 0,0005$). et un intervalle sans traitement de 34 mois (CD38+) vs 120 mois (CD38 -) **(104,112)**.

Une étude de l'impact du CD38 sur le pronostic en regardant la survie sans progression (PFS) et la survie globale sur une médiane de suivi de 53 mois (6-282) a conclu, en analyse multi variée que le CD38 s'est montré le meilleur facteur prédictif de progression (PFS à 84 mois = 20% pour la population CD38 positif et de 70% pour la population CD38 négatif) et que c'est un facteur stable dans le temps chez 98% des patients **(124)**.

2.3.3.4 L'expression du CD38 peut elle changer au cours de l'évolution de la maladie ?

Cette notion est controversée, certains auteurs plaident en faveur de la variation du taux du CD38 durant l'évolution de la maladie, de l'ordre de 19,5% à 25% selon les séries, et toute augmentation est corrélée à une progression de la LLC **(110, 119,125)**. D'autres rapportent un taux stable du CD38 malgré un suivi prolongé de la maladie **(105, 124)**.

Chung a rapporté 3 cas cliniques de LLC avec une augmentation du taux du CD38 et/ou une augmentation des marqueurs myéloïdes (CD13, CD15) ayant connu un pronostic défavorable et une progression de leur maladie **(126)**.

2.3.4 Le ZAP 70

C'est une tyrosine kinase intracellulaire de la famille Syk impliquée dans la signalisation du TCR.

Un des gènes Ig VH code le ZAP70, protéine associée à la chaîne ζ , exprimée par les lymphocytes T, les cellules naturel killer (NK), les cellules B activées amygdaliennes et spléniques et les cellules B LLC à Ig VH non mutée.

Vu la difficulté de l'étude du statut mutationnel des gènes Ig VH à impact pronostique remarquable, une étude du profil d'expression génique a été pilotée pour identifier les gènes exprimés différemment entre les deux sous types d'Ig mutées ou non mutées : le ZAP-70 est le gène qui distinguait le mieux ces sous types et qui prédisait du statut mutationnel dans 93% des cas **(127)**.

Le ZAP-70 recherché par cytométrie en flux sur les cellules T et les cellules leucémiques (positif si $\geq 20\%$ des cellules), a été retrouvé chez 32/56 patients analysés. Les cellules ZAP-70 positif avaient des gènes Ig VH non mutés ; par contre, 21/24 patients à ZAP-70 négatif ($< 20\%$) avaient des gènes Ig VH mutés.

Le niveau du ZAP-70 n'a pas changé au cours de l'évolution (médiane = 37 mois). Les patients en stade A de Binet, à cellules ZAP-70 positif avaient une maladie rapidement progressive et un mauvais pronostic **(106)**. Toute fois, il existe des discordances de 5% à 23% selon les séries qui concernent essentiellement les cas ayant sélectionnés VH 3-21 ou exprimant les anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic en particulier la del 17p13 et la del ATM **(128)**. Le critère instable du ZAP-70 a été évoqué par V. Vrolova en 2010, en retrouvant 34% de changement d'expression du ZAP-70 durant l'évolution de la maladie ; en effet la conversion vers un ZAP-70 positif se retrouvait chez des patients avec statut Ig VH non muté au moment de la progression ou à la rechute de la maladie. En revanche la négativation du ZAP-70 se voyait chez des patients avec maladie stable à Ig VH mutée. **(129)**.

Les auteurs ont étudié l'impact du ZAP70 quantifié par RQ-PCR et sa corrélation avec le statut mutationnel Ig VH sur 42 prélèvements sanguins périphériques, de patients à statut mutationnel et résultats cytogénétiques connus. La RQ-PCR s'est révélée une méthode sensible pour mesurer l'expression du ZAP70 ; une bonne corrélation ZAP70/ statut mutationnel Ig VH a été retrouvée dans 92% des cas **(130)**.

Dans une autre étude en 2008 par Morilla et al, dans le groupe ZAP70 +, la valeur prédictive de la présence d'un état non muté des Ig VH est de 93%. Le groupe ZAP-70 négatif prédit d'un état muté des Ig VH dans 63% des cas **(71)**.

L'étude du ZAP-70 par méthodes immuno-histochimiques **(131,132)** avec 3 niveaux d'expression : négatif, faiblement positif et positif a conclu à des résultats pronostiques significatifs ; un ZAP-70 positif est corrélé à la présence d'anomalies cytogénétiques, un TDL de moins de 6 et 12 mois, un stade II-IV RAI et B-C de Binet, une expression du CD38, une $\beta 2$ microglobuline élevée, un taux de LDH élevé, une concordance avec le statut mutationnel des Ig VH dans 80% des cas et un temps du diagnostic à l'initiation du traitement plus court, 16 mois vs 120 mois pour les patients ZAP-70+ vs ZAP-70 négatif **(104)**. La valeur pronostique péjorative du ZAP-70 a été retrouvée même dans les stades A de la maladie. L'évaluation du ZAP-70 par méthode immuno-histochimique sur biopsie médullaire est simple et reproductible, elle peut même être réalisée en rétrospectif pour les études cliniques avec une valeur pronostique considérable. Sa concordance avec la cytométrie en flux est estimée à 89% **(131,132)**.

Les LLC ZAP-70+ ont une médiane de survie de 8 à 9 ans de leur date de diagnostic comparée à 24 ans de survie pour les LLC ZAP-70 négatif **(133)**.

Une étude en 2006, de l'intérêt du ZAP-70 seul ou associé à d'autres facteurs pronostiques (CD38, CD23 soluble, état mutationnel des Ig VH et les anomalies cytogénétiques par FISH), retrouve que le ZAP-70 prédit d'une courte survie sans progression et de survie globale en association à l'expression de CD38 et le CD23 soluble et le statut non muté des Ig VH. Les cas discordant ont un devenir intermédiaire. Cette valeur pronostique a été confirmée en analyse multi variée, il prédit le mieux la survie sans progression par rapport au CD38 et le statut mutationnel. Il maintient sa valeur pronostique péjorative en présence d'un caryotype normal et il appuie le mauvais pronostic des anomalies cytogénétiques à haut risque **(123)**.

La discordance peut s'observer au sein même du résultat du ZAP-70, comme décrit par Chaar et al en 2008 ; sur 55 cas analysés pour le ZAP70 par cytométrie en flux, 3 cas présentent des discordances suivant le site du prélèvement sur lequel l'analyse du ZAP-70 a été faite:

- 1- Premier cas : La progression s'est accompagnée d'une positivité du ZAP-70 et du CD38 alors que ceux-ci étaient initialement négatifs.

- 2- Deuxième cas : Une reprise évolutive d'une maladie en RC depuis 15 ans après COP, s'est accompagnée d'un résultat discordant entre un sang périphérique CD38+, ZAP-70 = 0%, une biopsie ganglionnaire CD38 positif et un ZAP-70 = 70%, une moelle CD38 positif mais le taux était plus bas, ZAP-70 = 33%
- 3- Troisième cas : Stade 0 RAI, sur sang périphérique CD38 3%, ZAP-70 69%, sur Moelle, ZAP-70 9%, CD38 4 % **(134)**.

Une étude plus importante portant sur une cohorte test + une cohorte de validation, sur un nombre total de patients de 1012, pour préciser l'intérêt pronostique du CD38 + ($\geq 34\%$), l'état mutationnel des Ig VH et l'expression du ZAP-70 (CMF 4 couleurs) conclue que le ZAP70 est le marqueur pronostique le plus fort qui prédit d'un court intervalle sans traitement (TFS) chez les patients nouvellement diagnostiqués : dans le groupe ZAP70 positif, le TFS ne change pas en rajoutant le facteur muté ou non muté des Ig VH : ZAP70+ / Ig VH non mutée, TFS= 2,5 ans (cohorte test) vs. ZAP70+ / Ig VH mutée (cohorte validation) = 3 ans ; ZAP70 N / Ig VH non mutée, TFS = 6,3 ans, ZAP70 N / Ig VH mutée = 10 ans **(135)**.

Etant donné que le ZAP-70, l'état mutationnel des Ig VH et le CD38 (à 7%) étaient des facteurs pronostiques indépendants prouvés, une étude faite sur 142 patients (stades de Binet différents) pour leurs impacts en combiné de 2 ou 3 facteurs, ainsi que la relation des anomalies génétiques étudiés par FISH conclue :

En analyse uni-variée chaque facteur représente un prédicateur indépendant de l'état mutationnel des Ig VH.

En analyse multi-variée :

- le groupe ZAP-70 +/CD38 +/Ig VH non mutée a l'intervalle sans traitement (TFI) le plus court = 11 mois (mauvais risque) avec OS = 5 ans + 5 mois.
- groupe ZAP-70 négatif (N)/ CD38 N / Ig VH mutée a le TFI le plus long = 62 mois (bon risque), OS= + de 13 ans.
- groupe discordant sur 1 facteur ou plus, présente un TFI intermédiaire = 27 mois, OS = 8 ans + 8 mois.

Les anomalies cytogénétiques :

Les aberrations de haut risque (délétions 17p et 11q) sont plus fréquentes dans le groupe ZAP-70 + vs ZAP70 négatif (47% vs 26%), dans le groupe CD38+ vs CD38 négatif (40% vs 15%) et dans le groupe Ig VH non mutée vs mutée (43% vs 15%).

Dans le groupe bon risque, est observée l'incidence la plus élevée de la délétion 13q14 isolée (69%), comparée au groupe mauvais risque (0%).

Les délétions 17p ou 11q sont plutôt dans le groupe mauvais risque (46%) comparé au groupe bon risque (10%). La trisomie 12 est exclusivement retrouvée dans le groupe mauvais risque **(71)**.

Les 3 paramètres Ig VH, CD38, ZAP 70 ainsi que d'autres marqueurs biologiques (le taux de lymphocytes, la thymidine kinase sérique (sTK), la β 2 microglobuline) ont été utilisés pour réaliser un index pronostique. Letestu et al ont étudié 339 LLC, Matutes \geq 4, au stade A de Binet.

Les gènes Ig VH ont été étudiés par séquençage (seuil \geq 98%) : la cytogénétique par I FISH a recherché la délétion 13q14, la trisomie 12, la délétion 11q et la délétion 17p13. Le CD38 a été analysé par cytométrie en flux.

En analyse uni-variée : les marqueurs suivants ont un impact pronostique : le taux de lymphocytes, l'expression du CD38, la β 2 microglobuline élevée, le statut mutationnel des Ig VH, l'expression du ZAP70, la présence d'une délétion 11q ou 17p ou une trisomie 12. L'âge, le sexe et la délétion 13q14 ne sont pas prédictifs de la PFS.

En analyse multi-variée : hormis le statut mutationnel des Ig VH et l'expression du ZAP70, 4 facteurs biologiques sont des facteurs indépendants prédictifs de PFS : sTK > 10U, lymphocytes > 13 G/L, β 2 microglobuline > 2,5mg/l et le CD38 > 7% ; comptés de 0 à 4 facteurs de risques, la PFS à 48 mois est de 95% à 6%. Une discrimination pronostique pour prédire de la progression des stades A a été développée en subdivisant en groupe A = 0 -1 facteur, en groupe B = 2, 3, 4 facteurs ; 85% du groupe A (bas risque) n'ont pas progressé à 7 ans, la PFS au groupe B (haut risque) était à 20 mois **(96)**.

2.3.5 La cytogénétique

La cytogénétique améliore la compréhension de la physiopathologie de la LLC et des lymphomes apparentés.

La cytogénétique conventionnelle par mitogènes classiques a été améliorée récemment par l'introduction des oligonucléotides et de l'interleukine 2 dans les cultures cellulaires permettant de retrouver près de 80% d'anomalies par cette méthode **(136)**.

L'hybridation in situ a eu un rôle primordial dans la stratification des anomalies récurrentes dans cette pathologie et leurs caractérisations pronostiques.

Récemment la CGH arrays (comparative génomic hybridization) a permis d'apporter grâce au screening du génome plus d'informations quand aux anomalies géniques dans la LLC.

Les anomalies cytogénétiques sont des facteurs pronostiques importants et indépendants de la progression et de la survie dans cette pathologie : permettent de prédire du devenir

et ainsi d'assurer un suivi selon le risque individuel de chaque patient en particulier dans les stades précoces de la maladie.

Elle aide à indiquer une stratégie thérapeutique adaptée en particulier dans les groupes à haut risque.

2.3.5.1 Le caryotype

Le caryotype est une analyse de l'ensemble des chromosomes d'une cellule. Il permet de rechercher les anomalies chromosomiques congénitales ou acquises. Le caryotype hématologique est réalisé sur des cellules tumorales, afin d'en rechercher des anomalies. Il s'organise de la façon suivante : prélèvement de cellules sanguines, médullaires ou autres ; mise en culture des cellules prélevées ; traitement des mitoses obtenues et analyse des anomalies de ces mitoses.

Dans les années 80, les anomalies cytogénétiques n'étaient retrouvées que dans 40% à 50% des cas, taux limité par l'index mitotique bas des cellules LLC in vitro et la mauvaise réponse aux stimulations par les mitogènes classiques (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate : TPA, lipopolysaccharide (LPS), pokeweed mitogen (PWM)) **(137)** ; Juliusson en 1990 a retrouvé 55% d'anomalies cytogénétiques clonales par caryotype : la trisomie 12 et la délétion 13q14 étaient les plus fréquentes dans sa série suivies par le réarrangement du bras long du chromosome 14 (14q32). Cette analyse cytogénétique avait une corrélation avec la survie globale des patients (caractère pronostique) attribuant une survie de plus de 15 ans pour les patients avec un caryotype normal contrastant avec une survie de 7,7 ans des patients avec une anomalie clonale en dehors d'une del 13q14 isolée **(138)**.

Des efforts ont été faits pour améliorer les résultats cytogénétiques par caryotype conventionnel compte tenu de son importance dans la visualisation de tout le génome.

En 2002, Raymund Buhmann améliore les résultats du caryotype conventionnel en utilisant le CD40 ligand (CD40L) comme facteur stimulant du cycle cellulaire. Par ce travail, il a confirmé les résultats obtenus par FISH et il a retrouvé 41% de caryotypes complexes **(139)**.

En 2006, Frank Dicker a obtenu 80% d'anomalies cytogénétiques par caryotype suite à une immuno-stimulation des cultures cellulaires par CpG-oligonucléotide DSP 30 plus interleukine 2. Ce taux est comparable à celui obtenu par FISH (81% vs 79%) ; le caryotype en plus a mis en évidence des sous groupes pronostiques en rapport avec des anomalies additionnelles : des translocations équilibrées ou non équilibrées (qui restent pour la plupart du temps non récurrentes) et des caryotypes complexes étiquetés de mauvais pronostic avec un haut risque de progression de la maladie.

Il existe une corrélation significative entre translocations déséquilibrées et état Ig VH non mutée et entre translocations équilibrées et caryotype complexe et expression positive du CD38 **(136)**. Haferlach en utilisant les mêmes stimulants obtient 98% de pousses cellulaires sur 500 patients étudiés avec 78,4% d'anomalies (1,7 anomalie par patient), résultat supérieur à la FISH faite pour les anomalies récurrentes ; 19,8% de translocations réciproques, impliquant en particulier les gènes des Ig et 21% de caryotype complexe ont été répertoriés dans cette étude.

Les formes avec statut Ig VH non mutée sont retrouvées associées de manière très significative à la délétion du11q ; la délétion 13q14 est surexprimée dans le groupe Ig VH mutée **(140)**.

Sur une cohorte de 65 patients atteints de LLC avant traitement par cladribine, Neste a retrouvé 42% de translocations, et par une analyse multi variée les translocations non équilibrées sont corrélées à un échec thérapeutique, une courte survie sans traitement et une courte survie globale **(141)**.

Une étude faite par Christine Mayr en 2006, en stimulant les cultures cellulaires par du CD40 ligand ou par les CpG-oligonucleotides et IL 2 retrouve 34% de translocations non récurrentes mais les points de cassures sont aussi retrouvés dans d'autres types de lymphomes : 1(p32p36) ,1(q21q25), 2(p11p13), 6(p11p12), 6(p21p25), 13q14, 14q23, 18q21. Ces translocations représentent un sous groupe de mauvais pronostic indépendant avec médiane de survie sans traitement et survie globale plus courtes (24 vs 106 mois ; 94 vs 346 mois respectivement) en comparaison avec le groupe sans translocations **(142)**.

Une anomalie récurrente rare (1,3%) et récemment étiquetée : dic (17;18) (p11.2 ;p11.2) représente une translocation non équilibrée entre les bras court des chromosomes 17 et 18 avec perte du 17p et du 18p ; s'inscrit souvent dans le cadre d'un caryotype complexe, avec un statut mutationnel non muté dans 88% des cas, et un délai médian du diagnostic au premier traitement de 15 mois (maladie progressive) **(143)**.

En 2010, par CGH-array, E. Chapiro a mis en évidence une anomalie cytogénétique la plus fréquente après la del 13q14 ; le gain sur 2p, toujours associé à d'autres anomalies type délétion 6q ou gain sur 1p. Le gain sur le 2p inclus deux oncogènes : REL (associé à un état non muté des Ig VH) et le MYCN (associé à une surexpression de mRNA). Le gain sur le 2p semble être un marqueur de progression **(144)**.

La translocation t(14 ;19)(q32.2 ;q13.2)(IgH/BCL3), a été décrite comme anomalie récurrente au cours des hémopathies lymphoïdes B dont la LLC, les lymphomes agressifs, et la maladie de Hodgkin ; dans la LLC, elle survient dans les cas à morphologie et

phénotype atypiques (Matutes :1 à 3), avec une trisomie 12 isolée, des Ig VH non mutées, s'associant à une maladie agressive et un risque accru de transformation en Richter.

Cette translocation a été recherchée par FISH sur 225 cas de LLC typique (Matutes>3), elle a été rarement retrouvée (1,8%), seulement dans les cas à trisomie 12 isolée, sans caractère pronostique particulier relativement à l'évolution de la maladie ou le risque de transformation en Richter.

Il est intéressant de rechercher cette anomalie en cas de LLC atypique avec Matutes bas et trisomie 12 isolée, vu le caractère pronostique qu'elle confère à cette sous entité **(145)**.

2.3.5.2 L'hybridation in situ fluorescente (FISH)

Les techniques d'hybridation in situ sont basées sur la propriété de réassociation spécifique des acides nucléiques. Une sonde dénaturée (ADN simple brin marqué par un fluorochrome) en solution peut s'hybrider spécifiquement avec sa séquence cible (préparation chromosomique dénaturée) grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques. Les molécules de sonde non hybridées sont éliminées par lavages ; les hybrides spécifiques sont révélés par immunofluorescence après observation à l'aide d'un microscope à épi fluorescence.

La FISH a été appliquée dans la LLC d'abord comme complément intéressant au caryotype conventionnel, même si cette technique ne recherche que les anomalies cytogénétiques ciblées sur métaphases et sur noyaux (interphases) ; elle a amélioré considérablement les résultats obtenus par caryotype en mettant en évidence les anomalies cryptiques et en analysant un plus grand nombre de cellules **(146)**.

Les anomalies clonales ont été retrouvées dans 72% (le caryotype a révélé 32%) **(147)** à 82% **(148)**. Les anomalies les plus répertoriées sont la délétion 13q14-34, la délétion 11q22, la trisomie 12, la délétion 17p13, la délétion 6q21 **(148)** moins fréquemment le réarrangement du bras long du chromosome 14 **(149)**.

Ces anomalies impliquées dans la pathogénèse et la progression de la maladie ont souvent été établies selon un modèle hiérarchique ; ainsi Dohner a stratifié ses patients selon ce modèle suivant l'anomalie cytogénétique en 5 groupes pronostiques, corrélés à la survie globale des patients : del 17p13, del 11q22, trisomie 12, caryotype normal, del 13q14 isolée ; la médiane de survie était de 32, 79, 114, 111 et 133 mois respectivement. Le groupe avec del 17p13 et del 11q22 avait une maladie plus agressive que le reste des autres groupes. La del 17p13 a la médiane d'intervalle sans traitement la plus courte de 9 mois comparée à 92 mois en cas de del 13q14 isolée **(148)**.

Une étude prospective confirme l'impact pronostique des anomalies cytogénétiques détectées par FISH et suggère l'évolution clonale et l'acquisition de nouvelles anomalies

chez les patients atteints de LLC à un stade précoce, durant l'évolution de la maladie. Cette évolution clonale est de moins de 2% durant les deux premières années d'évolution puis atteint 27% des cas au delà de 5 ans d'évolution, surtout parmi les patients avec une forte expression du ZAP-70 (42% des cas) et du CD49d et les formes non mutées. Dans cette dernière catégorie de malades, la tendance est vers l'acquisition d'anomalies de mauvais pronostic (del P53 et del ATM) avec une résistance thérapeutique aux alkylants et aux régimes à base de fludarabine. De ce fait la répétition de l'analyse FISH est justifiée avant une deuxième ou nième ligne thérapeutique pour mettre en évidence de nouvelles anomalies cytogénétiques acquises à caractère pronostique pour une meilleure stratification thérapeutique **(150)**.

2.3.5.3 Les anomalies cytogénétiques

2.3.5.3.1 La délétion 13q14-34

C'est la première anomalie cytogénétique et la plus commune, décrite dans les années 80. La région délétée est approximativement de 600kb située entre le locus D13S273 et D13S25

Différents gènes candidats ont été décrits : TRIM13 (CAR/LEU5/DLEU5/RFP2), DLEU1 et 2, CLLD 6, 7, 8; mais leur rôle dans la leucémogenese n'est pas clair **(151)**.

La région délétée située en 13q14.3 inclue un gène suppresseur de tumeur, Retinoblastoma (RB1) et inclue le D13S25, un gène marqueur localisé dans la région télomérique du RB1 **(152)**.

Le RB1 code une phosphoprotéine nucléaire impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et la régulation de la transcription. La délétion monoallélique du RB1 est fréquemment retrouvée dans la LLC

Récemment des gènes micro-RNA, le miR-15 et le miR-16 situés dans la région délétée sont impliqués dans la leucémogenese de la LLC ; ces gènes régulent l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-2 **(153,154)**.

Une région pré télomérique du bras long du chromosome 13, la région 13q34 peut être délétée comprenant le gène GAS6 (growth-arrest specific gene). Les gènes gas sont fréquemment exprimés durant les étapes de croissance cellulaire. La détection d'une délétion du 13q34 associée à une délétion 13q14 indique le caractère terminal de la délétion, son absence indique son caractère interstitiel.

La délétion 13q14 isolée est retrouvée dans 10 à 20% des cas par caryotype standard, car souvent cryptique **(155)**; elle est mieux détectée par FISH dans 55 % à 64 % des cas (l'anomalie la plus fréquente) **(148)**; elle est associée à une forme typique et indolente de

la maladie **(156)** et un pronostic favorable quand elle est isolée avec une médiane de survie de 133 mois **(148)**.

La délétion 13q14 peut être hétérozygote ou monoallélique (13q14-x1), le cas le plus commun (70% des cas) ou homozygote ou bi allélique (13q14-x2) ou formant une mosaïque des deux types de délétions à une fréquence à peu près égale. Dans une cohorte de Reddy en 2006, sur les cas mosaïque le clone monoallélique était plus important que le clone bi allélique et les patients de ce dernier groupe étaient plus âgés suggérant que quelques cas de délétion 13q14 monoalléliques évoluent vers une forme bi allélique en quelques années **(149)**.

Le temps avant le premier traitement (TFT) et la médiane de survie globale sont semblables dans les trois groupes de délétion 13q14. Selon la même étude, le groupe de patients avec del 13q14 homozygote est plus âgé de 4 ans que le groupe de patients avec del 13q14 hétérozygote **(157)**.

Ces travaux n'appuient pas l'hypothèse de Chena en 2008 suggérant qu'une del 13q14 bi allélique est de mauvais pronostic avec une survie sans traitement plus courte par rapport à une délétion monoallélique (28,5 vs 49 mois) sur un échantillon réduit de délétions bi alléliques **(158)**.

Toutefois, les patients avec délétion 13q14 ne constituent pas un groupe homogène. Selon Dyke un pourcentage de cellules délétées en 13q14 dépassant 65,5% est corrélé à un TFT plus court qu'un pourcentage de cellules délétées inférieur à 65,5 % avec un temps sans traitement à 5 ans de 38% vs 79% et cela s'inscrit comme facteur pronostique indépendant (CD38, ZAP70, Ig VH). Ce pronostic moins favorable est maintenu en comparant ce groupe avec des patients avec une FISH normale (TFT à 5 ans : 38% vs 67%) **(157)**. Un seuil plus important à 80% de cellules délétées en 13q14 comme seule anomalie, retrouve deux groupes pronostiques ; le groupe ayant $\geq 80\%$ de del 13q14 a une survie globale plus courte (56 vs non atteinte) et un court intervalle avant le premier traitement (TFT) 38 vs 87 mois. Ces paramètres sont maintenus en comparaison avec un caryotype normal ou une trisomie 12 **(159)**.

Ce critère défavorable associé au pourcentage de cellules délétées est peut être expliqué en partie par la délétion du miR-15a et miR-16-1 avec le segment 13q14 ; gènes connus dans la régulation négative du facteur antiapoptotique Bcl-2 conférant aux cellules un caractère plus résistant à l'apoptose **(154)**.

Son association à une délétion 11q ou à une trisomie 12 ne modifie pas leurs devenir, hormis une survie globale plus prolongée d'une délétion 17p si elle est associée à une délétion 13q14.

Les patients ayant une association del 13q14 et une délétion P53 sont plus âgés que ceux ayant une del 13q14 isolée ou une del P53 isolée suggérant que la délétion P53 est un phénomène secondaire acquis après la del 13q14 au cours de la progression de la maladie **(149)**.

2.3.5.3.2 La trisomie 12

Elle est observée dans 13 % à 25% des cas des séries avec une survie raccourcie **(148)**.

La zone minimale critique de trisomie semble correspondre aux bandes 12q13-15 qui contiennent l'oncogène murin double minute 2 (MDM 2) ; une onco protéine impliquée dans une boucle d'autorégulation avec la P53 qui en se liant à elle l'inactive **(160)**. Le profil de l'expression génique chez les patients avec trisomie 12 a mis en évidence le gène HIP1R qui a une sensibilité de 79,3% et une spécificité de 90,6% de prédire d'une trisomie 12 en particulier si le pourcentage de cellules trisomiques dépasse 15,5% **(161)**.

La FISH est plus performante dans la détection de trisomie 12, le caryotype n'a pas retrouvé la trisomie 12 dans 33% des cas retrouvés par FISH **(162)**.

Les cellules LLC avec trisomie 12 expriment de manière plus forte le CD20 selon des études multi variées et ont une bonne réponse aux traitements à base de Rituximab (anti CD20) **(163)** et ont une expression plus élevée des Ig de surface, une plus faible expression du CD23 et expriment le FMC7 **(164)**.

La trisomie 12 s'associe à une morphologie atypique **(164)**, en particulier LLC/PL (LLC avec plus de 10% de polymphocytes) ou LLC mixte (47% des cas trisomiques en particulier dans les trisomies 12 complexes). Par contre, pas de corrélation entre la trisomie 12 et les taux de globules blancs, l'hémoglobine ou les plaquettes, ni avec le stade de la maladie, le sexe ou le syndrome tumoral **(162)**.

Elle n'a pas de valeur pronostique par elle même puisque la survie est semblable aux malades avec caryotype normal **(148)** ni sur la survie sans traitement ; selon Geisler (étude danoise) elle n'est associée à une maladie progressive que quand elle complique des anomalies cytogénétiques déjà existantes **(142,165)**.

2.3.5.3.3 La délétion 11q22. 3 (del ATM)

Retrouvée dans 10% à 20% des cas selon les séries **(107)**. En combinant délétions et mutations, l'altération ATM atteint 25% des cas de LLC, mais les mutations de l'ATM en

absence de délétions restent difficiles à mettre en évidence vu la taille du gène et la contrainte du séquençage qui en découle **(166) (167)**.

La région minimale délétée du 11q22.3-23.1 de 2-3 Mb contient les gènes ATM (ataxia telangiectasia mutated), RDX (radixin), FDX1 (ferredoxin 1), tous des potentiels gènes suppresseurs de tumeurs **(168)**.

ATM est un gène codant pour une phosphoprotéine nucléaire de 370 kD qui contrôle l'intégrité, la recombinaison et la réparation de l'ADN et intervient dans la régulation de la progression du cycle cellulaire.

Les cas d'ATM mutés ont un profil d'expression génique caractérisé par une dérégulation des gènes impliqués dans l'apoptose et la réparation de l'ADN **(166)**.

Différents groupes de travail ont analysé le gène ATM et ont décrit des mutations du gène avec perte de l'expression de protéine chez 20% à 40% des patients atteints de LLC avec une survie raccourcie (35,6 vs 97,3 mois) et une maladie agressive. Par ailleurs, pas de particularités cytologiques ou immunophénotypiques dans le groupe de patients avec dél ATM **(169)** ; en effet, Austen a retrouvé 36% de mutations sur l'allèle résiduel des LLC avec délétion ATM étudiées dans sa cohorte de patients, constituant un sous groupe associé à une progression rapide de la maladie et une courte survie des patients **(170)**. Les patients avec une délétion ou une mutation ATM ont de manière significative un intervalle de survie sans traitement plus court, comparés aux patients sans altération de l'ATM **(166)**. Les mutations ATM peuvent entraîner un dysfonctionnement de la voie P53 **(171)**; de ce fait, elle fait partie du groupe pronostique à haut risque avec la dél 17 p13 **(110)**. La majorité des patients avec dél ATM est réfractaire aux dommages causés par la chimiothérapie sur l'ADN cellulaire (forme chimio-réfractaire). Quoiqu'une étude faite pour analyser la sensibilité des cellules LLC délétées en ATM à la fludarabine, n'a pas retrouvé de résistance particulière de ces cellules à la fludarabine avec ou sans Rituximab, comparé à la résistance avérée des cellules délétées en P53 **(172)**.

Les cellules LLC avec dél ATM expriment le CD20 plus faiblement que ceux sans anomalies FISH et il n'y a que 50% des patients qui répondent aux traitements à base de Rituximab (anti CD20) **(163)**.

Elle est associée à un âge plus jeune des patients (âge moyen = 66 +/- 14 ans dont 24% de moins de 50 ans) **(149)**, syndrome tumoral périphérique, médiastinal et abdominal important (forme Bulky) et une forme avancée de la maladie (stade Rai avancé). Elle est associée à une forme non mutée des Ig VH **(110)** et à une expression du ZAP 70, à une progression plus rapide de la maladie, un intervalle sans traitement plus court (9 vs 43 mois ; $P < 0,001$) et une survie globale raccourcie chez les patients de moins de 55 ans

(survie médiane 64 mois vs 209 mois) **(173,174,175)**, Le CD38, le statut non muté des Ig VH et le ZAP-70 sont généralement plus exprimés en cas de del 11q22.3 **(175)**.

2.3.5.3.4 La délétion 17p13 (del P53)

Retrouvée dans 7% à 10% des cas **(148)**, une mutation de l'autre allèle existe dans 72% à 83% des cas (une altération de la P53 est souvent le résultat d'une inactivation des deux allèles).

Les délétions 17p13 sont associées à une perte et/ou une mutation de la P53 (gène suppresseur de tumeur) dans 94% des cas **(160)**. La P53 joue un rôle essentiel pour l'induction de l'apoptose ou de l'arrêt du cycle cellulaire après endommagement de l'ADN. Des anomalies cytogénétiques complexes sont associées à la del P53 dans 50% des cas **(176)** Il a été constaté que le génome des cellules LLC 17p- est hautement instable avec une atteinte fréquente des locus suivants : 8q24.13,-q24.1- gain MYC, 8p- perte, perte sur le 18p et ou le 20p, del 6q.

L'amplification ou gain 2p16.1-p14 avec la perte du 8p ont un impact sur le temps du diagnostic au traitement qui est plus court et sur la survie globale suggérant qu'il y a des gènes autres que le locus P53 impliqués dans la tumorigenèse **(177,178)**.

Les patients avec del P53 ont un taux élevé de prolymphocytes et un taux plus bas en lymphocytes T CD3 + résiduels ; elle est retrouvée surtout dans les stades évolutifs de la maladie (stades B, C de Binet) et au cours de sa progression où elle peut prédire d'une transformation et d'une résistance thérapeutique aux agents alkylants et à la fludarabine du fait de leur dépendance de la voie P53 pour l'apoptose (Une atteinte monoallélique de la P53 entrave la réponse à la Fludarabine in vitro) **(179)**. En analyse multi variée, la del P53 et le stade C sont des facteurs indépendants de courte survie globale, la plus mauvaise selon une étude multi variée d'Oscier et al. Son acquisition en rechute peut être le résultat d'une sélection thérapeutique, survenant à un âge plus avancé, lui affectant un pronostic sombre **(8, 125, 180)**. Une analyse de l'état mutationnel de la P53 est indiquée avant toute thérapeutique en deuxième ligne car de nouvelles anomalies peuvent être sélectionnées en post traitement **(179)**.

Une mutation de la P53 peut exister sans délétion et elle s'associe à une survie globale réduite dans la LLC ; en effet pour Wattel en 1994, la médiane de survie était de 7 mois pour les cas avec mutation de la P53 avec une réponse de 12,5% aux régimes de chimiothérapies (chlorambucil, CHOP, Fludarabine) comparé à 80% pour les cas non mutés **(107, 181, 182)**.

Une délétion sans mutation de l'allèle résiduel reste extrêmement rare ; par contre une mutation isolée sans délétion peut être retrouvée dans 5% à 18% des cas **(183)** et elle est le résultat d'une sélection au sein de cellules LLC particulièrement en post traitement ; l'auteur retrouve une association fréquente d'une del ATM en cas d'atteinte monoallélique de la P53 (22% des cas) ; un statut non muté des Ig VH a été retrouvé dans tous les cas de P53 mutée.

Les patients avec anomalies de la P53 ont un temps raccourci avant traitement : la médiane de temps avant traitement est de 2 mois en cas de mutation isolée de la P53, de 21,3 mois en cas de del 17p, comparés à 64,9 mois chez les patients sans anomalies de la P53. En analyse multi variée le statut mutationnel des Ig VH et les mutations P53 prédisent de manière indépendante une progression rapide de la maladie **(176)**. Médiane de survie globale de 32 mois, médiane de survie sans traitement de 9 mois **(148)**.

Une certaine hétérogénéité clinique au sein d'une population délétée en P53 a été décrite avec une évolution indolente chez certains patients ; il rajoute à la del P53 deux éléments pronostiques qui appuient le caractère péjoratif de la del P53 ; ceux sont le stade 1 ou plus de RAI et le statut non muté des Ig VH. Une survie à 3 ans des patients avec 1 ou moins, 2 et 3 de ces facteurs était respectivement de 95%, 74% et 22% **(184)**. La fréquence des anomalies de la P53 dans les stades précoces de la maladie reste limitée (4% dans cette série) et souvent associée à une maladie progressive, hormis une sous population associée à un état muté des Ig VH qui est stable et ne nécessitera jamais de traitement. De ce fait l'indication d'introduire de manière systématique un traitement à base d'Alemtuzumab dans les stades A/0 avec délétion P53 est à discuter **(185)**.

LLC réfractaire aux régimes à base de Fludarabine et P53

Les délétions et les mutations P53 sont retrouvées dans une grande proportion de LLC réfractaires à la Fludarabine, mais plus de la moitié de ces cas ne peut pas être expliqué seulement par l'altération de la P53, d'autres mécanismes doivent être mis en évidence.

Il a été démontré que la del P53 est associée à une mauvaise réponse aux régimes de première ligne à base de fludarabine, une courte survie sans progression et de survie globale **(107)**.

Récemment, il a été montré que la P53 a comme cible miR-34a sur le 1p36 et miR-34b/c sur le 11q23 et entre autre le CCND1 et le Bcl-2. La famille miR-34 particulièrement miR-34a intervient dans la cascade d'activation de la P53 comme l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence cellulaire. Dans la LLC avec 17p- il existe une rétro-régulation (DOWN-REGULATION) du miR-34a avec une faible expression de celui-ci.

Le miR-34a est aussi faiblement exprimé dans les LLC réfractaires avec ou sans altération de la P53 (délétion et/ou mutation) comparé aux LLC non réfractaires, suggérant que le caractère réfractaire de la LLC ne passe pas obligatoirement par un dysfonctionnement de la voie P53 et ses cibles et que d'autres mécanismes à l'origine de cette résistance thérapeutique doivent être élucidés. Les patients avec del17p répondent à l'alemtuzumab seul ou en association avec d'autres chimio ou immuno-chimiothérapies **(186)**.

2.3.5.3.5 La délétion 6q21

La fréquence par cytogénétique est de 6% des cas **(137)** ; elle est de 10% des cas par FISH ; c'est la moins fréquente des anomalies de la LLC. **(148)**. La région minimale de délétion est de 3 centimorgans (cM) sur la bande 6q21 **(187)** Les gènes spécifiques à cette délétion n'ont pas encore été mis en évidence. Cette délétion s'associe à une forte leucocytose et un syndrome tumoral important, à un stade plus avancé et à une transformation en une leucémie à prolymphocytes ; elle ne semble pas avoir d'impact sur la survie globale et la survie sans événements **(149)**.

VIII- EVOLUTION COMPLICATIONS

- La LLC est une maladie incurable (hormis les rares cas de patients jeunes traités par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques).
- Sous traitement, la rémission complète est obtenue par les nouvelles molécules selon des stratégies thérapeutiques entraînant une prolongation de la survie sans progression et même récemment la survie globale, en particulier chez le sujet jeune sans comorbidités.
- Les principales causes de décès dans les stades évolutifs sont dues aux complications infectieuses et hématologiques.

1- Infections

Elles sont multifactorielles : **(188)**

- du fait de la Maladie : sur un terrain de déficit immunitaire cellulaire et humoral, secondaires à l'hypogammaglobulinémie, à un déficit de l'immunité à médiation cellulaire et l'activité du complément, et aux anomalies de la fonction des neutrophiles.
- après traitement par les analogues des purines (fludarabine, pentostatine): entraînant des neutropénies sévères ou une immunosuppression profonde.

Elles sont récurrentes, et d'autant plus sévères que le malade est multi traité ; elles peuvent être graves et représentent la première cause de mortalité.

Leur fréquence n'est pas complètement corrélée à l'état mutationnel des Ig VH, ni au défaut de l'immunité à médiation cellulaire ou l'activité du complément. Un déficit en une classe d'Ig donné ne prédit pas d'un risque infectieux spécifique ou particulier.

Les infections les plus fréquemment rencontrées sont :

- Les infections bactériennes :
 - Pneumopathies communautaires à pneumocoques.
 - Infections ORL (sinusites, otites)
 - Les septicémies.
 - Un réveil de tuberculose pulmonaire n'est pas rare chez des malades âgés.
- Les infections virales (herpes, zona).
- Les infections opportunistes : candida, aspergillose, pneumocystose, pneumopathies à CMV.

L'incidence et la sévérité des infections ont été étudiées dans les deux protocoles de chimiothérapie, fludarabine seule (F) ou fludarabine plus cyclophosphamide (FC), en première ligne, en dehors de toute antibiothérapie préventive : il n'a pas été noté de différence entre les deux bras (32,9% vs 39,9%) ; un taux élevé de thymidine kinase représente un facteur de risque indépendant pour les infections dans cette étude **(189)**.

2- Insuffisance médullaire

Elle survient d'emblée ou le plus souvent en cours d'évolution : les trois lignées sanguines sont affectées à des degrés différents :

- anémie : normocytaire normochrome arégénérative
- neutropénie : aggravant le risque infectieux préexistant à cause de l'immunodépression.
- la thrombopénie : risque hémorragique lorsqu'elle est profonde.

L'anémie est parmi les complications fréquentes de la LLC, de causes multiples : infiltration médullaire massive, AHAI, hypersplénisme.

L'aplasie érythroïde pure : au cours de la LLC les cellules CD34 médullaires sont capables de générer des précurseurs érythroïdes qui répondent normalement à l'érythropoïétine (stimulation) et le TNF- α (inhibition).

Au cours des LLC compliquées d'anémie, il n'y'a pas d'atteinte intrinsèque des précurseurs érythroïdes, le taux sérique du TNF- α est élevé suggérant son implication directe dans l'inhibition de l'érythropoïèse **(190)**.

3- Manifestations auto-immunes

La cellule de la LLC peut agir en cellule présentatrice d'antigène induisant probablement la formation de cellules T helper auto-réactives et des cellules T régulatrices non fonctionnelles. Les cellules LLC tendent à produire des auto-anticorps monoclonaux poly-réactifs.

Les manifestations auto-immunes peuvent compliquer la LLC à n'importe quel stade de la maladie particulièrement suite à un traitement à base de Fludarabine ou peuvent même la précéder.

Une auto immunité simple, réfractaire ou complexe est considérée à présent comme une indication à traiter la LLC **(191)**.

La fréquence des complications auto-immunes compliquant une LLC est de 5 à 10% ; les cytopénies auto-immunes ne constituent pas un facteur de mauvais pronostic, leur survie est meilleure que le groupe avec cytopénie secondaire à une atteinte médullaire connue de mauvais pronostic. Ces cytopénies auto-immunes ne sont pas considérées dans le système de classification en stades **(192)**.

3.1 Anémie hémolytique auto-immune

L'AHAI est définie par une baisse d'au moins 2g/dl d'Hb associée à un test de Coombs direct positif et / ou une augmentation du taux de réticulocytes et du taux de la bilirubine indirecte en dehors d'autres causes avérées de cette anémie

Dans une série de 1203 patients, l'âge de plus de 65 ans, le sexe masculin, le taux de lymphocytes > 60% représentent des facteurs associés à une augmentation de la fréquence d'une AHAI au diagnostic d'une LLC. Une AHAI est observée dans 4,3% de cas de LLC dont 90% étaient une forme active, et dans 25% des cas étaient une forme traitée. Le test de Coombs direct est positif de type Ig G dans 87% des cas ou Ig G + complément, avec présence d'anticorps " chauds " dirigés contre les antigènes du système Rhésus. Parfois il s'agit d'une agglutinine froide de type Ig M dans 13% des cas (anti I ou anti i) avec Coombs direct de type complément seul **(193)**.

L'AHAI reste plus fréquente dans les stades avancés de la maladie, à Ig VH non mutée dans 66% des cas de cette série. Les patients avec AHAI précoce au cours de l'évolution de la maladie ont une survie raccourcie comparée à ceux qui développent tardivement cette complication **(194)**.

Sur une cohorte de patients traités par FCR, 6,5% ont développé pendant ou après le traitement une AHAI (fréquence comparable aux taux historiques), dans 82,4% à test de Coombs direct négatif, répondant bien aux corticoïdes, ciclosporine, Ig IV.

L'association du Rituximab et cyclophosphamide à la fludarabine réduit la fréquence de l'anémie hémolytique suite à la fludarabine ; de ce fait, l'existence d'une AHAI ne contre indique pas le FCR en première ligne **(195)**.

3.2 Erythroblastopénie auto-immune

De diagnostic difficile dans cette pathologie

- . Anémie avec effondrement du taux de réticulocytes.
- . Le myélogramme met en évidence une absence de précurseurs érythroïdes

3.3 Purpura thrombopénique auto-immun (PTAI)

Relativement rare, observée dans 2% des cas

Myélogramme : présence normale ou augmentée des mégacaryocytes.

Ces manifestations peuvent aggraver une cytopénie préexistante (insuffisance médullaire, hypersplénisme, toxicité des chimiothérapies)

3.4 Autres manifestations auto-immunes

Elles ont été plus rarement décrites :

- . Maladie de Willebrand acquise, anticorps anti-facteur VIII.
- . Néphropathies glomérulaires (syndrome néphrotique).
- . Angio-œdème acquis (anti-C1 estérase), pemphigus paranéoplasique

4- La Transformation de la LLC

4.1 Le Syndrome de Richter

Il s'agit d'une transformation de la LLC (hémopathie de bas grade) en lymphome non hodgkinien à grandes cellules de haut grade de malignité.

L'incidence actuarielle à 10 ans est de 16,2%. La fréquence est différente selon les séries et selon le préalable thérapeutique et son type. Selon plusieurs études, cette fréquence est de 1,7 à 2,8% ; elle peut atteindre 18% des cas traités par Fludarabine ; cette

ascension post fludarabine peut être expliquée par l'immunosuppression profonde et prolongée en particulier en CD4 permettant l'expansion d'autres clones lymphoïdes **(196)**.

Les signes évocateurs sont : l'altération de l'état général, la fièvre, les sueurs nocturnes, la perte du poids, l'augmentation de la taille des adénopathies (asymétriques, inflammatoires, douloureuses) qui doublent de diamètre en moins de 3 mois. Fréquence des adénopathies rétropéritonéales bulky, de la splénomégalie et ou hépatomégalie avec signes de compression.

Le Richter peut avoir rarement des localisations extra nodales : gastro-intestinale, SNC, peau, yeux, testicules, poumon et rein.

Biologiquement : une augmentation jusqu'à 3 fois le taux des LDH, témoin de la masse tumorale, une para-proteine peut être observée ainsi qu'une hypercalcémie en rapport avec des lésions osseuses lytiques assez rares dans cette affection.

Le diagnostic de certitude repose sur la biopsie ganglionnaire ou tissulaire avec étude histologique qui met en évidence un LNH à grandes cellules immunoblastiques. Il existe une variante Hodgkin du Richter de pronostic meilleur que le Richter proprement dit.

Les facteurs de risques d'une transformation en LNH haut grade ou Richter sont différents des facteurs de risque d'une progression de la maladie.

En analyse uni variée les facteurs prédisposant à une transformation en Richter sont : le statut non muté des Ig VH, l'absence de la délétion 13q14, l'expression du CD38 et du ZAP-70, le diamètre et le nombre des adénopathies, un stade de Binet avancé, un taux de LDH élevé. En analyse multi variée, utilisant des facteurs cliniques et biologiques, les facteurs de risque d'une transformation, identifiés comme facteurs indépendants sont : des adénopathies ≥ 3 cm de diamètre et l'absence de la délétion 13q14. **(197)**.

La trisomie 12, la délétion ATM et la del P53 sont plus fréquentes dans le groupe transformé en Richter que dans le groupe LLC non transformé.

La chimiothérapie intensive ou l'immuno-chimiothérapie et la greffe de cellules souches n'améliorent pas le pronostic péjoratif de cette entité ; les taux de réponse varient de 5% à 43% avec une médiane de survie de 5 à 8 mois ; la survie globale diffère selon les séries de 08 à 16,5 mois **(198)**. En analyse multi variée, les facteurs qui prédisent d'une prolongation de la survie sont une bonne performance Statut, des LDH $\leq 1,5$ fois la limite supérieure de la normale, un taux de plaquettes $\geq 100.000/\text{mm}^3$, des adénopathies ≤ 5 cm de diamètre et moins de deux lignes thérapeutiques antérieures **(199)**.

4.2 La leucémie aigue

L'évolution vers une leucémie aigue est rarissime, moins de 1% des cas, de type lymphoblastique le plus souvent **(198)**.

5- Autres cancers ou hémopathies

Les patients atteints de LLC ont un risque multiplié par 3 à 5 pour développer un second syndrome lymphoprolifératif : particulièrement LNH à grandes cellules B, une maladie de Hodgkin décrite comme un variant du syndrome de Richter, une leucémie à prolymphocytes ; des cas isolés de myélome multiple et de leucémie à tricholeucocytes ont été rapportés.

La survenue de leucémies aigues est exceptionnelle. Elles sont secondaires au traitement (chloraminophéne).

Ce risque estimé à 2,7% sur une série de 962 LLC (suivi médian = 53 mois) est accru pour les malades traités par les analogues des purines et les anthracyclines. Il n'y a pas de liaisons significatives entre ce risque et les autres facteurs pronostiques connus dans la LLC (ZAP-70, CD38, statut Ig VH, anomalies cytogénétiques. **(196)**.

Il existe une augmentation de l'incidence des cancers solides (10% des cas) : mélanomes, sarcomes, cancers de colon, poumon ou cancers cutanés

IX- FORMES CLINIQUES

1- Type de description : forme typique

Chez un homme de 65 ans.

L'état général est le plus souvent conservé : il n'existe pas d'amaigrissement, pas de fièvre, permettant au patient de mener une vie quasi normale ; dans certains cas des sueurs nocturnes peuvent exister. Les adénopathies superficielles sont généralisées, cervicales, axillaires, inguinales, symétriques, non compressives, indolentes, rénitentes, mobiles, non fixées, de diamètre variable de 1 à 2 cm, parfois plus volumineuses. Les adénopathies profondes (médiastinales ou mésentériques) sont rares. Une splénomégalie de volume modéré est parfois associée ; Envahissement tissulaire : les organes atteints sont : le tube digestif, la sphère ORL : les amygdales palatines sont parfois hypertrophiées de façon bilatérale ; d'autres organes peuvent être atteints : les poumons, la peau, la plèvre.

Dans cette forme typique, à l'hémogramme :

- une hyper lymphocytose majeure dépassant $100\ 000 /\text{mm}^3$ est fréquente.
- le taux d'hémoglobine, les plaquettes et les polynucléaires sont le plus souvent normaux.

La radiographie pulmonaire est normale. S'il est réalisé, l'examen tomodensitométrique thoraco-abdomino-pelvien révèle la présence de petits ganglions médiastinaux, rétro-péritonéaux et mésentériques de 1 à 2 cm de diamètre, non compressifs.

2- Les formes selon le stade de Binet

Stades A : La forme est souvent indolente : il n'existe pas de signes généraux ; l'examen clinique est normal. Il n'existe ni anémie ni thrombopénie.

L'évolution est habituellement très lente ; la progression peut survenir chez certains patients et nécessiter un traitement. La médiane de survie est en moyenne de 10 ans dans ces formes.

Stades B : Certains stades B sont ont un profil évolutif lent et ne nécessitent pas de traitement au début.

D'autres ont une progression plus rapide et sont éligibles à un traitement cyto réducteur. La médiane de survie de ces stades est de 7 ans

Stades C : La majorité des patients à ces stades seront symptomatiques : altération de l'état général, cytopénies profondes ; nécessiteront rapidement un traitement cyto réducteur. Médiane de survie : 4 ans.

3- Les formes cytologiques (200)

Trois présentations cytologiques sont connues :

- Forme typique : C'est la forme la plus commune, représente 80% des cas. Plus de 90% des cellules du sang périphérique sont des petits lymphocytes matures ; une petite proportion ne dépassant pas 10% des cellules peut être faite par de cellules d'allure prolymphocytaires ou ayant un noyau indenté et irrégulier. La présence des ombres de Gümprrecht dans les formes typiques conforte le diagnostic, étant donné que ce phénomène est rare dans les autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques.
- Les formes atypiques, ou récemment appelé variantes, représentent 15% des cas de LLC, subdivisées en deux sous types :

- Forme CLL/PL : de 11 à 54% des cellules sont des prolymphocytes, mais avec un pléomorphisme quand à la taille et le noyau de ces cellules. Cette forme s'accompagne souvent d'un pronostic plus agressif qu'une forme typique avec un taux élevé de lymphocytes, une splénomégalie plus marquée et une maladie plus proliférative.

- Forme atypique : plus de 15% des cellules sont des cellules de type lymphoplasmocytaires et de cellules clivées ; ces formes sont appelées LLC à cellules mixtes dans la classification FAB.

Dans ces formes l'immunophénotypage a un intérêt primordial pour les différencier des autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B leucémisés.

Les formes variantes aux stades précoces de la maladie ont une survie sans progression plus courte et nécessitent un traitement plus rapidement que les formes typiques,

Les trisomies 12 sont plus fréquentes dans cette entité ; par contre les del 13q14 isolées sont rares. Il a été constaté que ces formes atypiques sont associées aux états non mutés des Ig VH elles mêmes associées à une survie courte (**36, 37**).

X- TRAITEMENT

1- Evolution du traitement de la LLC

L'approche traditionnelle du traitement seulement symptomatique de la LLC, reposait sur l'extrême hétérogénéité de cette maladie et l'absence de preuve qu'un traitement précoce améliore la survie globale. Cette vision est remise en cause avec l'avènement de nouvelles molécules et de nouvelles stratégies thérapeutiques intégrant des facteurs pronostiques pertinents. La revue de la littérature suivante expose l'évolution des approches thérapeutiques de cette pathologie

2- Les traitements historiques

Le chlorambucil

C'est l'alkylant qui a été le plus largement utilisé en monothérapie, en première ligne. Le taux de réponse varie de 60 à 70 % mais les rémissions complètes sont rares.

Les corticoïdes

Ils ont été fréquemment utilisés en association à la chimiothérapie mais leur activité anti-tumorale n'a jamais été démontrée dans la LLC et un traitement combinant chlorambucil et prednisone n'a pas amélioré la survie par rapport au chlorambucil seul **(201)**.

Le cyclophosphamide

Il a également été utilisé mais essentiellement en association avec les analogues des purines tels que la fludarabine. Utilisé en consolidation (1,5 à 3g/m² X 3) après 6 cures de fludarabine seule en première ligne : améliore la qualité d'une réponse nodulaire ou complète de 16% à 48% **(202)**.

Les protocoles CVP et CHOP

Ils ont été très largement utilisés depuis le début des années 80, mais aucune de ces polychimiothérapies n'a montré sa supériorité par rapport au chlorambucil **(203)**.

3- Les analogues des purines

Fludarabine

L'utilisation de la fludarabine seule ou avec de la prednisone est efficace et bien tolérée. Le taux de réponse globale est de 78%, avec une médiane de survie de 63 mois sans différence notable selon l'utilisation ou pas du prednisone. Pour les malades répondeurs le temps médian avant progression est de 31 mois et la médiane de survie dans ce groupe est de 74 mois. L'âge de plus de 70 ans et le stade avancé (stade III, IV) de la maladie s'accompagnent d'une survie raccourcie par rapport aux stades précoces. Les malades en rechute, surtout ceux ayant eu une RC en première ligne, répondent bien à un protocole de rattrapage à base de fludarabine. Les infections sont peu fréquentes surtout chez les patients en rémission **(204)**. Dans une étude comparative de RAI en 2000 entre fludarabine injectable et chlorambucil en première ligne, la fludarabine est supérieure avec 63% de réponse globale dont 20% de RC et une PFS médiane de 20 mois ; le chlorambucil a un taux beaucoup plus bas avec 37% de réponse globale dont 4% de RC, une PFS de 14 mois. Pas de différence significative en survie globale (66 mois vs 56 mois). L'association de ces deux molécules est très toxique sans résultat meilleur que la fludarabine seule **(205)**.

Etude comparative Fludarabine/CHOP/CAP en première ligne dans la LLC B et C :

réponse globale respectivement : 71,1% / 71,5% / 58,2% ; RC= 8% / 9% / 2% ; la médiane de survie = 69 mois / 67 mois / 70 mois. Pas de différence de fréquence d'infection ou d'anémie hémolytique auto-immune **(206)**.

Une étude randomisée comparant trois protocoles (fludarabine, fludarabine + endoxan, chloraminophéne) ne montre aucune différence significative en survie globale **(207)**.

La forme orale de la Fludarabine a été introduite à 40mg/m²/J pendant 5 jours, une cure/mois pour un total de 6 à 8 cures ; elle donne une réponse globale dans 64% des cas dont 18% RC et 47% de RP, une médiane de PFS = 15,2 mois après une médiane de suivi de 31,6 mois, une médiane de survie sans traitement = 18,6 mois. Seule la del 17p a un effet négatif avec une PFS et une survie globale raccourcies. Une neutropénie grade 3 et 4 dans 50% des cas et une thrombopénie grade 3 et 4 dans 11% des cas ont été notées. La survie globale avec la forme orale est comparable à celle de la forme injectable **(208)**. La Cladribine, la Pentostatine, la Fludarabine ont entraîné des réponses supérieures, en termes de RC et de durée de rémission par rapport au Chlorambucil sans aucune différence en terme de survie globale **(209)**.

Cladribine + Cyclophosphamide

L'association Cladribine + Cyclophosphamide dans la LLC avec délétion P53 : Cladribine 0,12 mg/kg/J IV 3 jours + cyclophosphamide 250 mg/m²/J IV 3 jours, une cure par 28 jours pour 6 cures. La réponse globale est de 80% dont 50% RC et 30% RP. PFS médiane de 23 mois. La toxicité selon les auteurs de cet article, serait acceptable **(210)**.

Par contre, il a été clairement rapporté un avantage de l'association fludarabine et cyclophosphamide par rapport à la fludarabine seule en termes de réponse complète et globale.

Protocole Fludarabine + Cyclophosphamide : FC

Utilisé d'abord comme traitement de seconde ligne ou en cas de résistance aux alkylants **(211)**, le protocole fludarabine + cyclophosphamide a été longtemps le traitement de référence en première ligne de la LLC

Eichhorst en 2006 a comparé le protocole FC injectable chez les patients de moins de 66 ans vs Fludarabine seule en première ligne : la réponse globale est de 94% vs 83%, une RC de 24% vs 7%, une PFS médiane de 48 mois vs 20 mois, une survie sans traitement de 37 mois vs 25 mois, sans différence significative dans la survie globale. Le protocole

FC cause plus de leucopénies et de thrombopénies sans augmentation du nombre des infections sévères **(182)**.

Laurenti en 2008, a utilisé l'association FC orale en première ligne : F= 30 mg/m² J1-J3 et C= 250 mg/m² J1-J3 une cure chaque 28 jours pour un total de 6 cures. Sur 35 patients évaluables, 40 % ont eu une réponse complète et 37 % une réponse partielle, soit 77% de réponse globale, une PFS médiane de 23 mois et un temps médian avant une seconde ligne thérapeutique(TTR) de 38 mois. Les patients avec délétions 11q22 .3 et 17p13.1 ont une réponse globale plus basse (43% vs 85%), une PFS plus courte (22 vs 27 mois), un TTR plus court (22 vs 40 mois). Le TTR est aussi plus court dans le groupe non muté (26 vs 41 mois). Protocole bien toléré vue une toxicité hématologique gérable **(212)**.

En 2011, une comparaison de l'efficacité et la toxicité des deux voies d'administration a été faite par Laurenti et collaborateurs : pas de différences significatives en survie globale, PFS, temps avant deuxième ligne thérapeutique (TTR) et réponse globale. Les neutropénies grade 3-4 et les infections sévères sont plus fréquentes dans le groupe IV, les nausées et les vomissements sont plus fréquents dans le bras oral **(213)**.

4- L'immuno-chimiothérapie

Anti CD 20

Du fait de l'expression de l'anticorps CD20 par les lymphocytes de LLC, une thérapie ciblée par l'anticorps monoclonal anti-CD20 humanisé (Rituximab) a été développée dès le début des années 2000, en monothérapie en première ligne à 375mg/m²/ semaine pendant 4 semaines à 6 mois d'intervalle pour un total de 4 cures, les résultats étaient modestes avec une réponse globale de 58%, avec 9% de RC, une PFS à 2 ans estimée à 49% à 20 mois de suivi médian **(214)**.

Anti CD 20 + Méthyle prednisolone

En première ligne le méthyle-prednisolone haute dose 1g/m², J1 à J3 chaque mois pour 3 cycles associé au Rituximab, est bien toléré avec 96% de réponse globale dont 32% de RC, une médiane de survie sans progression de 30,3 mois à 3 ans de suivi avec une survie globale à 96%. Protocole intéressant pour les patients à réserve myéloïde limitée ne pouvant tolérer les associations thérapeutiques standard **(215)**.

Anti CD 20 + Fludarabine + Cyclophosphamide : FCR

L'association Fludarabine + Cyclophosphamide + Rituximab (FCR) a déjà été rapportée en 2005, par l'équipe du MD Anderson chez 224 patients dont l'âge médian était de 58 ans, comme la plus efficace en phase II avec une réponse globale à 95% et une RC 72%. **(89)**. Dans l'étude CLL8, le schéma R-FC a prolongé la SSP de 10 mois (42,8 vs 32,3 mois) et a doublé le taux de rémission complète par rapport au protocole FC (52% vs 27%, $p=0.000007$), avec un taux de réponse globale de 95% vs 88% et une tendance positive en faveur du schéma R-FC s'est dégagée au niveau de la survie globale **(216)**. Durant la même année, une autre équipe rapporte des résultats équivalents en confirmant que le RFC est avérée le déterminant le plus fort de la survie. Le taux de réponse globale 95% dont 72% de rémission complète, la survie globale à 6 ans est de 77%, une survie sans rechute de 51%. Le temps médian avant progression 80 mois. Les facteurs qui agissent négativement sur la réponse à ce protocole sont l'âge de plus de 70 ans, la $\beta 2$ microglobuline ≥ 2 fois la normale, le taux de GB $\geq 150.000/\mu\text{l}$, les anomalies du chromosome 17, les LDH ≥ 2 fois la normale. Il n'y a pas de facteurs pré thérapeutiques qui diminuent la durée de la rémission complète **(217)**. La fréquence des infections sévères et opportunistes est comparable au bras fludarabine seule (33% vs 40%) **(218)** Le risque d'infections retardées est de 10% la première année de RC et de 4% la deuxième année et de 1,5% les années suivantes **(217)**.

L'équipe de Hallek (CLL8) en 2010, confirme le bénéfice sur la survie globale du protocole **(83)**. Ainsi il est devenu le standard du traitement de la LLC en particulier chez le sujet jeune avec Ig VH non mutée et haut risque FISH. Par contre pas de bénéfice en matière de réponse globale dans le groupe Ig VH mutée et risque FISH standard **(213)**.

Le régime R-FC a également donné des résultats similaires dans l'étude REACH chez des patients avec LLC réfractaire/récidivante avec une prolongation de 10 mois de la PFS et un taux de RC doublé (24% vs 13%) **(219)**. Une étude similaire chez des patients réfractaires analysés en 2011, par Badoux et col, rapporte 74% de réponse globale dont 30% de réponse complète, une médiane de survie globale estimée à 47 mois et une médiane de PFS de 21 mois. Neutropénie grade 3-4 à 57%, thrombopénie 3-4 à 19,5%.

Les patients ayant reçu moins de 3 lignes thérapeutiques, sans résistance à la fludarabine et sans anomalies cytogénétiques de haut risque (del 17p ou caryotype complexe) ont une meilleure durée de réponse et une meilleure survie après traitement. Les patients réfractaires à la fludarabine ou ayant reçu plus de trois lignes thérapeutiques ont une mauvaise réponse et une PFS raccourcie, de ce fait sont éligibles d'essais thérapeutiques et de greffe de cellules souches dans la mesure du possible **(220)**.

Les patients qui nécessitent une seconde ligne thérapeutique en moins de 36 mois ont une courte survie globale (moins de 24 mois de la date du retraitement **(217)**).

FCR Lite

Suite à la toxicité rapportée dans le RFC avec une neutropénie grade 3 et 4 dans 52% des cycles, une réduction de doses de Fludarabine à 20 mg/m² et de cyclophosphamide à 150mg/m²/J a été proposée en première ligne (RFC Lite) avec du Rituximab 375mg/m²/J pour la toute première perfusion puis 500mg/m²/J pour les perfusions suivantes, J1 et J14 de chaque cycle, puis maintenu en consolidation une fois tous les trois mois jusqu'à rechute. Une prémédication et un traitement préventif antibactérien et antiviral doivent être assurés.

Réponse globale à 100%, RC à 77%. Durée médiane de réponse complète 22,3 mois. Les patients avec del 17p n'ont pas eu de réponse complète. Neutropénie grade 3 et 4 à 13% des cycles. Comparant le RFC Lite/RFC classique: RC: 77% vs 70%, neutropénie grade 3 et 4: 13% vs 52% **(221)**.

FCR + Mitoxantrone

Une autre combinaison en première ligne a été proposée aux patients de moins de 70 ans, à base de FCR + Mitoxantrone 6 cures, suivie chez les patients répondeurs par une maintenance par Rituximab 375mg/m²/J chaque 3 mois pendant 2 ans. ORR= 93%, CR (MRD-) = 46%, CR (MRD+)= 36%, un total de RC = 82%, RP= 11%. Une neutropénie sévère =13%. Infections majeures = 8%, infections mineures = 5% des cycles. Toujours avec une réponse moins importante dans le groupe de mauvais pronostic (stades avancés, del 17p et taux β2 microglobuline élevé) **(222)**.

Ces récentes améliorations prometteuses des traitements de la LLC ont permis d'atteindre des taux de rémission complète (RC) et une survie sans progression prolongée ainsi qu'une amélioration de la survie globale sans néanmoins guérir la maladie puisque une rechute inéluctable survient chez la plupart des patients.

Anti CD 52

L'alemtuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène CD52, exprimé sur les cellules T et B normales et leucémiques, les macrophages et les monocytes ; il a été d'abord utilisé chez les patients réfractaires à la fludarabine et ayant reçu des alkylants entraînant des taux de rémission moléculaire complète de l'ordre de 38% **(223)**.

Utilisé en monothérapie en perfusion en première ligne comparé au chlorambucil 40 mg/m²/28 jours par voie orale pendant 12 mois, a montré un résultat nettement meilleur de réponse globale 83% vs 55% ; de RC 24% vs 2% et de PFS= 14,6 mois vs 11,7 mois, toujours sans effet sur la survie globale **(224)**.

La voie sous cutanée est ensuite adoptée pour sa meilleure tolérance et une efficacité équivalente. Une réponse objective est observée dans 1/3 des patients réfractaires, avec des courbe de survie globale et de survie sans rechute semblables entre les groupes del 17p et del 11q et les autres groupes pronostiques cytogénétiques ; il y a aussi une amélioration des médianes de PFS et de survie globale comparé avec la voie intraveineuse : 7,7 mois vs 4,7 mois et 19,1 mois vs 16 mois respectivement **(225)**.

Anti CD 52 + Anti CD 20

L'association Rituximab 375 mg/m² IV/ semaine et Alemtuzumab 30 mg IV/ semaine pendant 4 semaines: réponse globale dans 90% avec 37% de réponse complète dans les LLC haut risque. Une réactivation du CMV est survenue dans 10% des cas, une neutropénie grade 3-4 dans près de 15% des cas **(226)**.

Avec Rituximab + Alemtuzumab S/C en première ligne, chez les patients à haut risque (del 17p, del 11q, Ig VH non muté, ZAP-70 +, CD 38+) : RC = 37%, ORR = 90%, durée de la réponse 14 mois.

Anti CD 52 en consolidation

L'Alemtuzumab a été utilisé en consolidation dans les LLC haut risque, 5 semaines après le protocole FR, à la dose de 30 mg IV trois fois par semaine pendant 4 semaines ; du fait d'une toxicité importante il n'a plus été recommandé **(227)**.

Utilisé dans la suite des protocoles Fludarabine ou FC à la dose de 30 mg 2 fois par semaines pendant au maximum 12 semaines, il a été arrêté précocement du fait des infections sévères à type de réactivation du cytomégalo virus, aspergillose pulmonaire. Toutefois après un suivi médian de 48 mois, la PFS est significativement plus prolongée dans le bras consolidation (médiane non atteinte vs 20,6 mois) ; la PFS à 3 ans est de 81,8% dans le bras consolidation vs 30% dans le bras observation. La fréquence des infections est probablement due au court intervalle libre entre chimiothérapie d'induction et la consolidation, surtout si celle ci contient du Rituximab **(228)**.

RFC + Anti CD 52

En 2011, Parikh rapporte l'association CFAR : Fludarabine, Cyclophosphamide, Rituximab, Alemtuzumab, une cure chaque 4 semaines pour un total de 6 cures, en première ligne dans les LLC haut risque ($\beta 2$ microglobuline ≥ 4 mg/L, chez les patients de moins de 70 ans).

Une prémédication avant le Rituximab et l'Alemtuzumab, ainsi qu'une prophylaxie

antibactérienne et antivirale sont systématiques. L'allopurinol 300mg/j est donné la première semaine du traitement.

Ce protocole donne 70% de RC, 3% de RPN, 18% de RP, pour une réponse globale de 92% ; médiane PFS à 38 mois, avec 48 mois pour les patients MDR négative et 15 mois pour les patients MDR positive. La médiane de survie globale est non atteinte. Protocole particulièrement intéressant dans le groupe del 17p avec 57% de RC obtenue. Neutropénie grade 3-4 dans 33%, thrombopénie grade 3-4 dans 13%, les infections dans 18% des cures **(229)**.

5- Autres protocoles

Dans les formes réfractaires, d'autres protocoles ont été utilisés:

5.1 OFAR 1: Oxaliplatine + Fludarabine + Aracytine + Rituximab

Utilisé dans le syndrome de Richter donne une réponse globale de 50% ; dans les formes réfractaires donne une réponse globale de 33% ; en cas del 17p une réponse globale de 35% ; elle est de 29% en cas de del 11q **(230)**.

5.2 OFAR 2

C'est le résultat d'une modification de dose de l'OFAR1 avec réduction de la dose d'aracytine et augmentation de la dose d'oxaliplatine. L'OFAR2 induit une réponse dans 41% dans le Richter et 55% des LLC réfractaires. OFAR1 est adopté pour le Richter avec une médiane de survie 18 mois et OFAR2 pour les LLC réfractaires avec médiane de survie de 21,4 mois pour leurs meilleurs résultats respectifs dans chaque entité **(231)**.

5.3 R-DHAP : Rituximab, Cisplatine, Cytosine Arabinoside, Dexaméthasone

Il a été utilisé chez certains patients réfractaires et en rechute ; il a donné des résultats encourageant surtout dans les formes bulky **(232)**.

5.4 OBL-FC : Oblimersen , Fludarabine , Cyclophosphamide

Chez les patients en rechute et réfractaires, comparé au FC : RC+RPN= 17% vs 7% avec un gain dans la survie globale (25% vs 15% à 5 ans) **(233)**.

6- Les nouvelles molécules

6.1 La Bendamustine

Traitement conduit en première ligne chez 319 patients ; les résultats sous Bendamustine vs Chlorambucil sont comme suit : la réponse globale 68% vs 31% ; la RC 31% vs 2% ; PFS médiane 21,6 mois vs 8,3 mois respectivement ; sans différence significative en survie globale.

Une toxicité hématologique grade 3 et 4 dans le bras Bendamustine : 40% vs 19%.

En association : Bendamustine + Rituximab en première ligne chez des pts en progression : réponse globale 91% dont 33% de RC, complications infectieuses = 5%.

Chez les LLC en rechute : réponse globale 77%.

Son association avec la fludarabine s'accompagne de cytopénies importantes **(225)**.

6.2 Oblimersen :

Chez 241 patients en rechute ou réfractaire à la fludarabine, l'association Oblimersen + FC comparé au FC améliore les résultats : RC/RPN : 17% vs 7% respectivement. Les mêmes réponses globales et survie globale **(234)**.

6.3 Obatoclox

Essai thérapeutique avec la Fludarabine et le Rituximab chez les patients en rechute, semble tolérée, sans signes de myélosuppression ni de toxicité neurologique **(235)**.

6.4 Flavopiridol

Chez les patients intolérants ou réfractaires, un bolus 30 à 40 mg/m² pendant 30 minutes, suivi d'une perfusion de 30 à 50 mg/m² pendant 4 heures, une fois par semaine pendant 4 à 6 semaines. Une réponse partielle est obtenue dans 45% des cas dont 42% chez les patients avec del (17p) et del (11q) ou caryotype complexe **(236)**.

6.5 Lenalidomide :

Le Lénalidomide est à utiliser avec prudence en escalade de dose, chez des patients sélectionnés, avec bonne hydratation et une cytoréduction dans les formes bulky et

éducation du patient et sa famille au risque de flambée tumorale, avec utilisation précoce des corticostéroïdes pour le premier cycle **(237, 238)**.

En monothérapie en continu jusqu'à progression ou toxicité intolérable, en première ligne en escalade de dose de 10 mg à 25 mg/j : ORR= 56%. Chez les sujets de plus de 65 ans, en escalade de dose de 5 mg/j à 25 mg/j 9 cycles: ORR = 52% **(239)**.

6.6 Ofatumumab :

Utilisé en monothérapie : dans les LLC Fludarabine et Alemtuzumab résistantes : ORR 58%, PFS= 5,7 mois. Les formes bulky réfractaires à la Fludarabine ORR 47%, PFS= 5,9 mois **(240)**.

En association avec FC, à 500 mg : RC= 32%, ORR = 77%. A 1g : RC= 50%, ORR= 73%. D'autres associations sont en cours d'évaluation : Ofatumumab + chlorambucil en première ligne, Ofatumumab + Bendamustine chez les patients réfractaires.

6.7 Lumiliximab :

Il a montré une activité anti tumorale dans 52% des cas, avec diminution du taux des lymphocytes dans 91% des cas ; utilisé avec FCR n'augmente pas la toxicité avec un taux de RC = 52%, avec la même réponse globale chez les LLC réfractaires et en rechute **(241)**.

7- La greffe de cellules souches hématopoïétiques

Ces procédures thérapeutiques offrent un bénéfice en termes de qualité de réponse, de survie sans maladie, au prix d'une toxicité marquée et un cout considérable.

7.1 L'Autogreffe

Il a été relevé la difficulté de mobilisation de cellules souches en particulier chez les patients traités par les analogues des purines **(242)**. Néanmoins, l'autogreffe faite après une première ou une seconde rémission améliore la survie sans progression, sans effet sur la survie globale, avec des rechutes constantes ne conférant pas à cette procédure un espoir de guérir cette maladie **(251)**.

Les résultats de l'autogreffe sont meilleurs quand elle est réalisée précocement dans l'évolution de la maladie

Le bénéfice marqué sur la survie sans progression est en particulier noté chez les patients bons répondeurs à la chimiothérapie (l'effet de l'autogreffe est aussi limité chez les malades réfractaires) et sans facteurs pronostiques défavorables (del P53, del ATM, statut Ig VH non muté) **(243)**. La mortalité liée à la procédure (TRM) est de 1,5%, la procédure améliore le taux de RC, la survie sans maladie à 5 ans = 51,5% et la survie globale à 77,5% **(244)**.

Par cette procédure, il y a une augmentation du risque de développer une myélodysplasie et / ou une LAM secondaire surtout chez les patients multi-traités et ayant reçu du cyclophosphamide et une irradiation totale avant l'autogreffe : 8% des patients développent une LAM et une MDS en post-transplantation **(244)**.

En 2011, une randomisation autogreffe / observation après RC suite à une induction 3 mini-CHOP + Fludarabine x 3 ou DHAP x 3.

Les patients en RC auto-greffés : EFS à 3 ans = 79,8% vs 35,5%. Les patients sans RC : randomisation autogreffe / FC : EFS à 3 ans = 48,9% vs 44,4% (non significative). Pas de différence de survie globale.

Pas de différence entre autogreffe et FC dans le groupe recevant DHAP. L'autogreffe en consolidation d'une RC améliore la PFS sans effet sur la survie globale **(245)**.

7.2 L'Allogreffe

L'allogreffe est indiquée selon le consensus 2007 de l'EBMT chez les sujets jeunes :

- En cas d'absence de réponse ou en cas de rechute en moins de 12 mois suite à un régime à base d'analogues de purines.
- En cas de rechute en moins de 24 mois suite à une réponse à un régime à base d'analogues de purines ou une autogreffe.
- En cas de présence d'une anomalie de la P53 si patient éligible d'un traitement **(246)**.

Les éléments qui prédisent d'un bon devenir suite à une allogreffe sont : un sujet jeune en absence de comorbidités (< 50 ans pour la plupart des centres greffeurs), une bonne performance statut, une faible masse tumorale, un intervalle diagnostic-greffe court, des patients non lourdement traités avec une chimio-sensibilité aux régimes antérieurs, accomplissant plus de 95% de chimérisme donneur-receveur.

Par cette procédure :

- Le taux de mortalité non lié à la rechute est élevé, entre 24 % et 47 %
- La survie sans maladie et la survie globale sont en plateau de 40 à 60 % 4-5 ans après la greffe.
- Le taux de rechute est de 2 % à 25 % à 3-5 ans après la greffe ; la rechute est moins fréquente après 4 ans sauf dans les greffes déplétées en cellules T.
- L'incidence de la GVH aigüe est de 49 % à 56 % et de la GVH chronique est de plus de 50 % **(243 ; 252)**.
- Une rémission soutenue est obtenue même chez les patients réfractaires aux régimes à base de fludarabine.
- L'impact négatif des facteurs de mauvais pronostic comme la del 17p et l'état non muté des Ig VH est gommé.
- L'allogreffe rajoute à l'effet cytotoxique, l'effet graft-versus-leukemia (GVL) qui prolonge le contrôle de la maladie ; les infusions des lymphocytes du donneur (DLI) sont efficaces en cas de rechute.
- Son action est limitée par la mortalité liée à la GVH, les infections et l'âge avancé dans cette pathologie **(243)**.

Par cette procédure, la survie sans progression est de 30% à 71% à 5 ans. Cependant vu la toxicité liée au conditionnement myeloablatif (mortalité de 17% à 44%), des procédures de conditionnement dit atténué ont été développées et montrent une réduction nette de la mortalité liée à la transplantation (de 7% à 20%). La survie sans progression est de 44 à 75% à 5 ans **(247)**.

L'incidence de la GVH aigüe est de 34 % à 45 % et la GVH chronique est de 51 % à 64 %, elle garde son effet bénéfique chez les patients avec facteurs de mauvais pronostic (del 17p, état des Ig VH non muté, réfractaires aux régimes à base d'analogues des purines). Le statut de la maladie (RC ou pas RC), constitue un facteur pronostique important en études multi-variées, d'où les efforts considérables faits pour améliorer la qualité de la réponse avant la greffe en particulier pour les malades réfractaires **(243)**.

Ces observations sont confirmées par une étude récente relative à l'allogreffe avec un conditionnement atténué faite chez 82 patients réfractaires à la fludarabine qui donne 55% de rémission complète et 15% de rémission partielle. Après une médiane de suivi de 5 ans, le taux de progression est de 38%, le taux de rechute de 50%, la survie globale de 39% ; cette survie est supérieure à celle des patients recevant un conditionnement total et cela est dû au taux de TRM deux fois plus bas dans le bras conditionnement atténué **(246,248)**

Une autre étude sur la greffe à conditionnement atténué dans une population de LLC à

haut risque retrouve une EFS à 4 ans de 42% même chez les patients avec del 17p ; elle est de 89% si la maladie résiduelle est négative. La survie globale à 4 ans est de 65%. Une comparaison entre traitement standard et allogreffe dans cette catégorie de malade à haut risque est en faveur de la greffe avec une amélioration de la survie **(249,250)**

L'allogreffe à partir de donneurs non apparentés est en hausse ces dernières années, les résultats selon le conditionnement myeloablatif vs non myeloablatif sont comme suit :

- La mortalité non liée à la rechute est de 38 % vs 24 % à 28 %, 2 à 5 ans après la greffe.
- La survie sans progression est de 10 % à 30 % vs 51 % à 5 ans.
- La survie globale est 20 % à 59 % vs 48 % à 51 % à 5 ans.
- Le risque de rechute est aux alentours de 30 % pour les deux modalités
- L'incidence de la GVH aigue est de 45 %- 52 % vs 28 %- 87 %, celui de la GVH chronique est de 66 % - 85 % vs 31 %- 65 % **(243)**.

I- MATERIELS ET METHODES

I.1 Patients et critères d'inclusions

Il s'agit d'une étude prospective sur des patients atteints de LLC, recrutés de Juin 2006 à Décembre 2011 au service hématologie EHS ELCC Blida.

Une fiche technique détaillée est renseignée pour chaque patient (Annexe 12)

I.1.1 Patients inclus pour l'étude cytologique :

Groupe 1 : 150 patients.

A été inclus dans cette étude tout patient, quelque soit son âge, jamais traité, présentant un syndrome lymphoprolifératif chronique avec une hyperleucocytose et une hyperlymphocytose $> 5000 /\mu\text{l}$, chez qui l'étude cytologique du frottis sanguin retrouve des signes cytologiques en faveur d'une LLC sur la base de la classification FAB.

Critères d'exclusion : patients présentant un syndrome lymphoprolifératif chronique avec hyperlymphocytose $> 5000 /\mu\text{l}$, et cytologie non évocatrice de LLC sur la base de la classification FAB.

I.1.2 Patients inclus pour l'étude en caryotype et en FISH :

Groupe 2: 100 patients.

Ont été inclus les patients issus du groupe 1, dont le diagnostic de LLC a été prouvé par cytométrie en flux, quelque soit leur âge et avant tout traitement

I.1. 3 Patients inclus sous le protocole FC

Ont été inclus les patients âgés de moins de 70 ans, issus du groupe 2, jamais traités, ECOG 0 à 2, sans autres cancers associés. Nombre de patients = 36. Durée de suivi : 17-70 mois.

I.1.4 Patients inclus sous le protocole RFC

Ont été inclus les patients âgés de moins de 70 ans, issus du groupe 2, jamais traités, ECOG 0 à 2, sans autres cancers associés. Le nombre de patients =17. Durée de suivi : 7-26 mois.

I.1.5 Patients non traités par FC ou RFC

Il s'agit de 82 patients atteints de LLC, déclarés non éligibles au FC ou au RFC en raison de leur âge, de comorbidités, de stade A, de non adhésion aux protocoles.

I.2 Matériels et réactifs

I.2.1 Pour la cytologie : banc de coloration MGG ; microscope optique.

I.2.2 Pour la cytométrie en flux

I.2.2.1 Matériels

- Cytomètre en flux 4 couleurs FACS Calibur Becton-Dickinson (BD).
- Automate pour hémogramme.
- Centrifugeuse réfrigérée.
- Réfrigérateur
- Agitateur rotatoire type Vortex

I.2.2.2 Consommables

- tube Falcon 5 ml
- pipettes
- embouts jaunes (100µl) et bleus (1000 µl)
- chronomètres
- portoirs

I.2.2.3 Réactifs

I.2.2.3.1 Les anticorps monoclonaux

Ils sont couplés à différents fluorochromes : FITC, PE, PerCP-Cy5.5, APC.

Les marqueurs utilisés dans notre étude sont les suivants : panel SLPC : CD19, CD20, CD22, CD79b, CD10, CD23, CD5, CD25, FMC7, chaines légères kappa/lambda, chaines lourdes Ig M, Ig D, CD43, CD103, CD138, CD11c, CD38, CD3, CD4, CD8.

I.2.2.3.2 Les billes de calibration

Les billes en polyméthylmétacrylate, simulant des cellules sanguines normales blanches sont marquées par différents fluorochromes précités.

Ces billes servent à régler la tension des tubes photomultiplicateurs (PMT), et à faire la compensation de fluorescence.

I.2.2.3.3 Solutions

- Solution de lyse des GR 10 X, conservation : t° ambiante après dilution à 1X
- Solution PBS ou « cell-wash ».
- Liquide de gaine « Facs-flow »
- Solution « Facs-rinse » et « Facs-clean » pour entretenir les tubulures de l'appareil.
- Eau physiologique à 9 ‰.

I.2.3 Pour la cytogénétique conventionnelle : Caryotype

I.2.3.1 Equipements

Hotte à flux laminaire.
Incubateur à CO₂.
Centrifugeuse.
Etuve sèche à 37°C.
Agitateur magnétique.
PH mètre.
Bain-marie à 90° thermostaté.
Frigidaire à + 4°C
Congélateur à - 20°C
Microscope à contraste de phase
Système d'analyse et d'archivage des données type Cyto-Vision.

I.2.3.2 Réactifs

Conservés à température ambiante :

Méthanol pur.
Acide acétique glacial.
NaH₂PO₄, 12H₂O poudre pour la dénaturation bandes R
KH₂PO₄, Na₂HPO₄, 12H₂O poudre pour le tampon coloration bandes R
Giemsa R
Eukitt
DMSO

Conservés à + 4°C :

RPMI avec ou sans glutamine 1640 Sigma
Colcémid 10µg/ml Eurobio, Sigma.
KCL à 5,6 g/l (0,0075M)
Héparine lithium.

Conservés à - 20°C :

Sérum de veau foetal. Sigma
Lectin from vulgaris phaseolus vulgaris C (Phyto C) Sigma
PMA (phorbol-myristate-acétate) 1mg/ml Sigma
L glutamine + pénicilline- streptomycine Sigma

I.2.3.3 Consommables

Tubes Falcon 20 ml
Flasques de culture à bouchon ventilé ou non.
Pipettes pasteur.

Pipettes en plastic de transfert de 15 ml.
Portoirs tubes Falcon
Lames superfrost, lamelles
Bacs pour dénaturation en porcelaine pour 8 lames avec couvercle.
Bacs en verre pour 8 lames
Plateaux inox.
Chronomètres.
Portoirs de lames en verre.
Boîtes en plastique pour conservation des lames dénaturées, colorées et luttées.
Eprouvettes 100, 500 et 1000 ml.
Becher 1000 ml.
Pince.
Distributeur-doseurs.

I.2.3.4 Milieux et solutions à préparer

- Milieu de culture (RPMI complet) : 400 ml de RPMI 1640 + 100 ml SVF + 1 ml héparine lithium + 5 ml pénicilline-streptomycine-L glutamine. A conserver à + 4°C.
- PMA : centrifuger l'ampoule à 1000 tours/min, ajouter 1 ml DMSO. Aliquoter par 10 µl et conserver à - 20°C.
- PHA c (poudre lyophilisée) : reprendre le flacon avec 5 ml d'eau distillée. Aliquoter à 100 µl et conserver à - 20°C.
- KCL : dissoudre 5,6 g dans un litre d'eau distillée. Conserver à + 4°C ; préchauffer à 37°C avant emploi.
- Fixateur : mélanger 3 volumes de Méthanol + 1 volume d'acide acétique.
Conservation TA.
- Tampon coloration bandes R : mettre 7,39 g de KH₂PO₄ + 3 g de Na₂HPO₄, 12H₂O dans 1 litre d'eau distillée, sur un agitateur magnétique, ajuster le PH à 6,7 avec du Na₂HPO₄, 12H₂O.
- Solution Giemsa tamponnée : mettre 4 ml Giemsa + 4 ml tampon coloration, compléter à 100 ml par de l'eau distillée.
- Tampon de dénaturation (sodium phosphate monobasic) : 120 g de NaH₂PO₄ dans un litre d'eau distillée. Conservation à TA.

I.2.4 Pour la FISH

I.2.4.1 Equipements

- En plus du matériel nécessaire à la mise et sortie de culture, on aura besoin de :
- Etuve à 37°C sèche.
- Bain marie à 37°C et 72°C.
- Balance de précision.
- Agitateur magnétique
- Thermobrite (chambre humide avec plaque chauffante réglable pour dénaturation et hybridation)
- Microscope à fluorescence muni de filtres appropriés à chaque fluorochrome et un filtre triple bandes (DAPI/FITC/Rhodamine) pour lire en multicolore :
- Logiciel pour le traitement d'images et l'archivage : Applied Imaging (Cytovision).

I.2.4.2 Réactifs

I.2.4.2.1 Réactifs : Conservation à température ambiante

- 20 SSC (VWR)
- HCL 1 N
- PBS 10 x (Eurobio)
- Formaldehyde.
- MgCl₂ poudre.
- Ethanol à 70%, 85% et 100%.
- Igepal.
- Eau distillée.
- Huile pour microscope.

I.2.4.2.2 Réactifs : Conservés à + 4

Le DAPI.

Les sondes (Kreatech) : Les sondes utilisées sont les suivantes :

I.2.4.2.3 Sonde pour rechercher la trisomie 12

C'est une sonde centromérique avec un seul marquage, nous avons utilisé selon la disponibilité, trois fluorochromes différents : spectrum vert (Platinum Bright 495), le rouge (Platinum Bright 550), et le bleu (Platinum Bright 415).

Une trisomie est exprimée par trois spots au lieu de deux sur les noyaux ou sur les mitoses.

Une deuxième sonde à double marquage, le centromère en vert, locus 12q13 en rouge. **(Figure 3)**

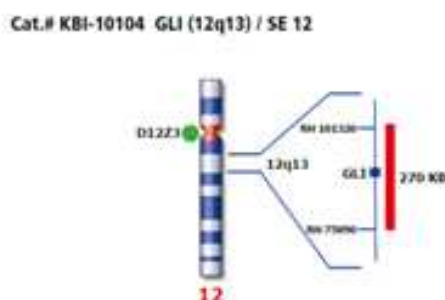


Figure 3 : Sonde GLI (12q13) / SE12

Une trisomie = trois spots rouges et trois spots verts sur chaque noyau ou mitose.

I.2.4.2.4 Sonde pour rechercher la délétion 13q14-34

Sonde marquée sur le locus 13q14 en rouge et sur le locus 13q34 en vert. **(Figure 4)**

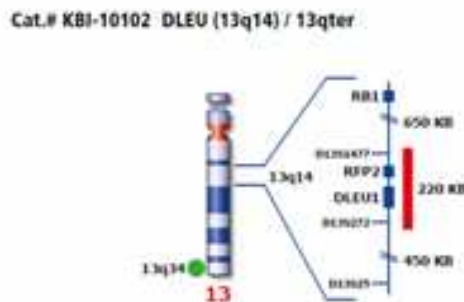


Figure 4 : Sonde DLEU (13q14) / 13qter

Une délétion 13q14 s'exprime par un seul spot rouge et deux spots verts

Une délétion 13q14-q34 s'exprime par un seul spot vert et un seul spot rouge

I.2.4.2.5 Sonde pour la détection de la délétion ATM et/ou la délétion P 53.

Une sonde à double marquage a été utilisée, le locus 11q22 (ATM) est marqué en rouge, le locus 17p13 (P53) est marqué en vert **(Figure 5)**

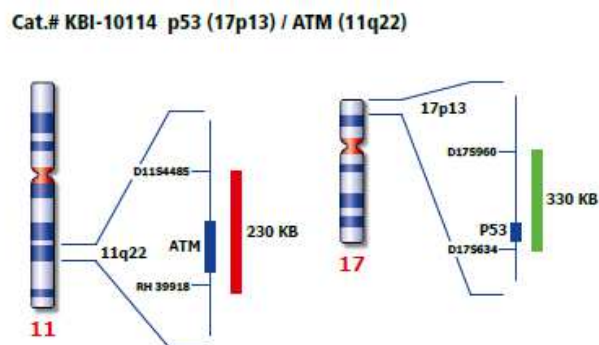


Figure 5 : Sonde p53 (17p13) / ATM (11q22)

Une délétion ATM s'exprime par la présence d'un seul spot rouge au lieu de deux et de deux spots verts du locus P53 normal.

Une délétion P53 est exprimée par la présence d'un seul spot vert au lieu de deux et de deux spots rouges du locus ATM normal.

Dans le cas où le sujet présente une délétion ATM et une délétion P53, il existe un seul spot vert et un seul spot rouge

I.2.4.2.6 Sonde pour rechercher la délétion 6q21.

Une sonde à double marquage a été utilisée, le locus d'intérêt le 6q21 est marqué en rouge, le centromère du chromosome 6 comme sonde témoin est marqué en vert.

(Figure 6)

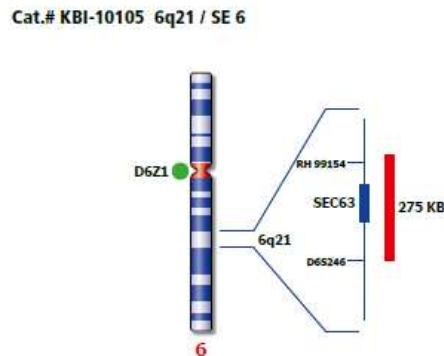


Figure 6 : Sonde 6q21 / SE 6

Une délétion 6q21 est exprimée par deux spots verts correspondant aux deux centromères des deux chromosomes 6 et un seul spot rouge.

I.2.4.2.7 Réactifs conservation à – 20°C

Pepsine 1g ou 10g (SIGMA).

I.2.4.3 Consommables

- Bacs à lames en porcelaine avec couvercle.
- Bacs à colorations
- Lames superfrost et lamelles 24 x 60 mm et 22 x 22 mm.
- Graveur diamant
- PH mètre.
- Portoirs pour lames en verre.
- Eprouvettes.
- Pipettes de transfert : 1ml, 2ml, 5ml, 25 ml.
- Pipettes de précision : 10, 100, 200, 500, et 1000 µl et pipette réglable de 2 à 10 µl.
- Carton range lame avec rabat.
- Para film

I.2.4.4 Solutions de travail : à préparer

- 2 SSC : reconstituer 100 ml de 20 SSC + 900 ml d'eau distillée.
- HCL 0,01 N : reconstituer 1 ml de l'HCL 1 N + 99 ml d'eau distillée.
- Pepsine à 10% : mettre 1g de pepsine dans 10 ml d'eau distillée à aliquoter par 120 µl, conservée à – 20°C.
- MgCl₂/ Formaldéhyde 37% : à préparer extemporanément.
Peser 0,36 g de MgCl₂ RP normapur, les déposer dans une éprouvette.

Verser dessus 2 ml de formaldéhyde. QSP 80 ml de PBS 1x

Mélanger en bouchant l'éprouvette avec un para film.

Transvaser dans un bac opaque identifié.

- 0,4 SSC/ 0,3 Igepal : mettre 10 ml de 20 SSC + 1,5 ml Igepal + 475 ml eau distillée, dans un bécher ; mélanger à l'aide d'un aimant sur l'agitateur magnétique ; ajuster le PH entre 7 et 7,5. Cette solution se conserve 6 mois à température ambiante.

- 2 SSC/ 0,1 Igepal : 100 ml 20 SSC + 1 ml Igepal + 850 ml eau distillée ; mélanger avec un aimant sur un agitateur magnétique ; ajuster le PH entre 7 et 7,5. Cette solution se conserve 6 mois à température ambiante.

I.3 Méthodes

I.3.1 Etude cytologique

L'analyse cytologique au microscope optique est réalisée sur frottis sanguin coloré au May Grunwald Giemsa (MGG) en double aveugle par deux cytologistes.

Les critères cytologiques suivants ont été retenus pour le diagnostic de LLC :

- Présence en majorité de petits lymphocytes d'allure matures, un peu plus grands que le lymphocyte normal (7 à 14 microns de diamètre) avec un rapport nucleocytoplasmique très élevé, un noyau régulier à chromatine dense à structure marbrée, mottée, sans nucléole visible ; le cytoplasme faiblement basophile, agranulaire, est souvent réduit à un fin liseré
- Présence de moins de 55% de prolymphocytes: cellules de taille moyenne à grande avec un noyau contenant une chromatine mature relativement bien condensée laissant apparaître un nucléole proéminent et un cytoplasme modérément basophile.
- Présence de moins de 15 % de grandes cellules ou de cellules lymphoplasmocytaires ou de cellules à noyaux clivés.
- Présence d'ombres de Gümprécht dont le taux est évalué par rapport à 200 cellules lymphoïdes comptées

Trois formes cytologiques de LLC sont retenues :

- forme typique : plus de 90% des cellules du sang périphérique sont des petits lymphocytes matures.
- forme CLL/PL : de 11 à 54% des cellules sont des prolymphocytes
- forme atypique : plus de 15% des cellules sont des cellules de type lymphoplasmocytaire et / ou de cellules clivées ; ces formes sont appelées LLC à

cellules mixtes dans la classification FAB.

I.3.2 Cytométrie en flux

Pour chaque patient une fiche de renseignement est remplie à la consultation ; elle comporte : Nom, Prénom, Age, N° de fiche de consultation, origine, antécédents, un résumé de l'examen clinique, hémogramme complet, la lecture du frottis sanguin, le diagnostic évoqué parmi les SLPC.

Un prélèvement de 5 cc de sang total est réalisé sur tube EDTA, aussitôt acheminé au laboratoire pour étude en cytométrie.

1- Préparation des échantillons

- Si le taux de GB est supérieur à 50000/ μ l, une dilution est nécessaire avant de procéder aux différents marquages.
- Préparer une série de tubes à essai (12x75 mm) suffisante pour la manipulation
- Le marquage se fait par 4 anticorps couplés aux fluorochromes (FITC, PE, PerCPCy5.5, APC) suivant un panel prédéfini.
- Dans chaque tube :
 - mettre 100 μ l de sang lavé + 10 μ l d'Ac de spécificité connue.
 - incuber les tubes pendant 15 min à température ambiante, dans l'obscurité.
 - ajouter 2 ml de solution de lyse diluée au 1/10ème dans de l'eau distillée ; mélanger au vortex.
 - faire une deuxième incubation de 15 min à température ambiante, dans l'obscurité.
 - centrifugation 5 min à 300 tours/min
 - éliminer le surnageant puis réaliser 2 lavages avec 3 ml de cell-wash.
 - éliminer le surnageant puis ajouter 500 μ l de cell-wash ; ainsi l'échantillon est prêt pour une analyse au cytomètre ; il peut être conservé à + 4°C pendant 24 heures.
 - le marquage des chaînes légères nécessite un prélavage qui élimine les IgS circulantes pour éviter les faux négatifs ; le temps d'incubation est différent : le premier est de 30 minutes, le deuxième est de 10 minutes.

2- Mise en marche et calibrage du FACS Calibur.

3- Acquisition des données.

4- Analyse des résultats

Cette technique permet l'analyse individuelle et multi paramétrique de cellules en suspension en associant une caractérisation morphologique (morphométrie) et une réaction d'immunofluorescence. Les résultats fournis se présentent sous forme d'histogrammes : cytogramme représentant l'étude morphométrique taille/structure, et histogramme bi paramétrique fournissant le pourcentage de cellules simplement et doublement marquées.

La fluorescence totale mesurée est composée de la fluorescence spécifique due aux liaisons antigène-anticorps formées et d'une fluorescence non spécifique. Ce signal non spécifique est mesuré et soustrait à l'aide d'un " contrôle isotypique ".

Quantitativement, le résultat est positif quand 30 % ou plus des cellules lymphoïdes B expriment le cluster de différenciation (CD) testé, le CD23 a été utilisé à un seuil de 20% et le CD10 à un seuil de 10%.

Qualitativement, le CD22, le CD79b et les SIg sont jugés de faible expression quand la différence entre l'index de fluorescence du marqueur et l'index de fluorescence du

contrôle est comprise entre 0,2 et 1 log (lorsque cette différence est supérieure à 1 log, on parle de forte expression).

Nous procédons à :

- Une analyse taille/structure (FSC/SSC)
- Un repérage de la population lymphoïde en traçant une région d'intérêt ou « gate »
- Un choix de gate1= R1 qui représente la population lymphocytaire sujet d'exploitation.
- Le CD19 positif, marqueur pan B représente notre population d'étude « R2 »
- L'étude est faite sur gate = R1 x R2
- Sur la fenêtre d'intérêt, Cytogramme biparamétrique, des repères en quadrants délimitent les seuils de positivité et de négativité des éléments analysés ; ainsi les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules positives et en intensité de fluorescence.
- Les résultats sont sauvegardés dans le dossier LLC.

I.3.3 Cytogénétique conventionnelle : Caryotype

I.3.3.1 Mise en culture

Prélèvement de façon stérile sur tube vacutainer hépariné (jamais EDTA) 5 à 10 ml de sang total.

Toute préparation pour mise en culture doit se faire stérilement sous une hotte à flux laminaire.

Un comptage de GB est réalisé ; mettre 2 millions de cellules/ml de milieu de culture pour un volume total de 10 ml dans un flask de 50 ml, avec facteurs mitogènes : un flask avec 50 µl de PMA et un flask avec 50 µl de PMA + 100µl de PHAc, culture pendant 72 heures, rarement 96 heures,

Les cultures sont réalisées dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂, bouchons de flask dévissés à un quart de tour et incubées à plat sur un plateau en inox.

I.3.3.2 Sortie de culture

Le port de gants est obligatoire, toute centrifugation se fait bouchons fermés.

A J3 ou J4 de culture, procéder à la sortie de culture : mettre dans chacun des flask utilisés, 60 µl de colcémid, homogénéiser et mettre à l'étuve à CO₂ pendant 30 min.

I.3.3.2.1 Choc hypotonique

- Prendre des tubes coniques de 15 ml, identifier chaque tube par le Nom, prénom, numéro d'enregistrement, type, durée et date de culture.
- Transvaser chaque flask déjà homogénéisé dans le tube conique correspondant.

- Centrifuger les tubes 5 min à 1300 tours/min.
- Eliminer le surnageant par un système de pompe à vide.
- Sur le culot ajouter 8 à 10 ml de KCL préchauffé à 37°C ; homogénéiser par aspiration refoulement sur la paroi du tube, plusieurs fois.
- Laisser agir 25 min dans l'étuve sèche à 37°C.

I.3.3.2 Préfixation

Ajouter 0,5 ml de fixateur dans chaque tube et homogénéiser délicatement, puis centrifuger 5 min à 1300 tours/min.

I.3.3.2.3 Fixation

Eliminer le surnageant de chaque tube.

Ajouter 1 ml de fixateur sur le culot, homogénéiser doucement le culot cellulaire avec une pipette pasteur.

Ajouter 8 ml supplémentaire de fixateur et homogénéiser.

Centrifuger 5 min à 1300 tours/min.

Effectuer 2 à 3 fixations jusqu'à l'obtention d'un culot cellulaire blanc.

En cas d'urgence, attendre au moins 45 min avant étalement, si non conserver les tubes à + 4°C pour le lendemain.

I.3.3.2.4 Etalement cellulaire

C'est une étape cruciale pour la qualité des mitoses et la dénaturation. Elle dépend de la température qui doit être de 23°C à 25°C et de l'humidité qui doit être de 30 à 40%, conditions assez difficiles à réaliser dans la pièce de travail !!

- Remettre en suspension les culots cellulaires puis centrifuger à 1300 tours pendant 5 min.
- Retirer le surnageant en laissant 1/3 pour le culot pour 2/3 fixateur, dilution à ajuster après vérification des lames au microscope.
- Homogénéiser à la pipette pasteur.
- Etiqueter les lames superfrost par le nom, prénom, type et temps de culture ainsi que la date de culture.
- Laisser tomber sur une lame une ou 2 gouttes de suspension cellulaire à 3 ou 4 cm de hauteur de la lame.
- Laisser sécher à température ambiante au moins ¾ d'heure avant la dénaturation.
- Si l'humidité est $\geq 55\%$, placer les lames dans l'étuve sèche à 37°C pour un séchage plus rapide.
- Si l'humidité est plutôt basse $\leq 30\%$, étaler les culots sur un film de vapeur et laisser sécher à température ambiante.
- Observer la qualité des mitoses et la densité de l'étalement au microscope interférentiel. En cas de besoin concentrer ou diluer le culot cellulaire et procéder à l'étalement du nombre de lames nécessaires à la manipulation.

I.3.3.2.5 Dénaturation en bandes R (Reverse)

C'est une technique de marquage de l'euchromatine mettant en évidence des structures appelées bandes sur les chromosomes au sein d'une mitose. Elle consiste à faire un traitement thermique à 87°C en milieu saline (tampon phosphate) suivi d'une coloration au Giemsa.

Dénaturation - coloration :

- Verser la solution de phosphate dans les bacs de porcelaine avec couvercle.
- Préchauffer ces bacs pendant 30 minutes à 87°C (le bain marie affiche 90°C).
- Choisir une lame par patient pour tester le temps de dénaturation, en moyenne 6 lames par bac
- Réhydrater les lames déjà séchées dans un bac d'eau distillée pendant 5 minutes.
- Egoutter les lames et les plonger dans le bac de solution phosphate à 87°C.
- Le temps de dénaturation est variable selon les conditions atmosphériques déjà citées et la qualité des mitoses, de 12 à 20 minutes en moyenne.
- Une fois le temps de dénaturation trouvé (étape délicate et contraignante, pouvant être très longue), procéder à la dénaturation de 6 lames en moyenne par patient ; cela peut être plus ou moins, en fonction de la richesse de la lame en mitoses.
- Une fois le temps de la dénaturation écoulé, sortir les lames du bac et les plonger rapidement dans de l'eau distillée entre 18°C et 20 °C pour refroidir les lames et stopper le processus de dénaturation.
- Rincer à l'eau du robinet et égoutter.
- Plonger les lames dans la solution Giemsa tamponnée à 4%, préparée en extemporané, pendant 4 minutes.
- Rincer sous l'eau du robinet, égoutter et laisser sécher à température ambiante.

Observation des lames dénaturées au microscope à contraste de phase pour estimer si les chromosomes sont bien, peu ou trop dénaturés.



Figure 7: Mitose à chromosomes trapus



Figure 8 : Mitose de bonne qualité

Si la dénaturation est insuffisante, les chromosomes paraissent sombres sans bandes apparentes ; dans le cas contraire où la dénaturation est trop importante, les chromosomes paraissent ressemblants à des arêtes de poisson. En fonction de cela, il faut soit allonger soit raccourcir le temps de dénaturation.

Suite à la dénaturation et la coloration, monter les lames avec de l'Eukitt est facultatif, cela sert à mieux conserver les lames :

Sous une hotte chimique (à solvant), après avoir séché les lames, les tremper une à une dans du toluène, laisser sécher les lames à température ambiante ; déposer du baume d'Eukitt sur une lamelle 24 x 60 mm et déposer cette lamelle face 'mouillée' sur la lame ; essuyer avec l'essuie tout pour enlever l'excès d'Eukitt et laisser sécher sous la hotte.

Conserver dans des boîtes à lames (50 ou 100 lames) avant et après lecture.

I.3.3.2.6 Lecture

- Se fait au microscope optique relié à un logiciel d'exploitation type Cytovision et à une camera ultrasensible noir et blanc.
- En mode capture :
 - repérer les mitoses de bonne qualité (chromosomes bien étalés, bien séparés)
 - photographier au minimum 20 mitoses, bien dénaturées par patient (sur une ou plusieurs lames).
- En mode analyse :
 - procéder au découpage des chromosomes qui peut se faire de manière automatique mais l'œil du lecteur est toujours nécessaire pour ajuster les fausses manipulations faites par le logiciel.
 - Classer les chromosomes et annoter les anomalies éventuelles ; chercher toujours une clonalité en cas de mise en évidence d'une anomalie ; cela peut se faire en analysant plus de 20 mitoses.
 - Une clonalité est affirmée sur :
 - au moins deux mitoses pathologiques en cas d'un chromosome surnuméraire (trisomie) ou d'une anomalie de structure (translocations, délétions, inversions, duplications ou isochromosome)
 - au moins trois mitoses pathologiques en cas de perte d'un même chromosome (monosomie)
 - La nomenclature ISCN 2009 est utilisée.

I.3.3.3 Contraintes liées à la réalisation du caryotype

Le caryotype conventionnel dans la LLC est un examen délicat.

Les difficultés et les limites de cet examen sont liées :

- à l'index de prolifération faible dans la LLC

- aux mitogènes utilisés (TPA et PHA sont peu recommandés ; IL2 et DSP 30 de préférence)
- à l'obtention de mitoses de bonne qualité
- à la qualité de la dénaturation (banding)
- au seuil de détection des anomalies par l'œil humain
- au niveau de résolution du caryotype (10 Mb)
- au temps de réalisation : depuis le prélèvement jusqu'au rendu de résultat, le temps peut varier de 90 heures à 140 heures

I.3.4 L'hybridation in situ fluorescente : FISH

I.3.4.1 Aspects techniques

Toute la manipulation doit être protégée de la lumière.

- Après étalement et séchage des lames déjà identifiées par le nom, prénom, type et date de culture, on marque les zones d'intérêt à l'aide d'une pointe diamant.
- Les lames vieillissent 3 à 7 jours dans l'étuve sèche à 37°C.
- Préchauffer le bain marie à 37°C pendant au moins 30 minutes : y mettre à chauffer aussi un bac de 2 SSC et un bac de HCL 0,01 N.
- Après vérification ultime de la température, plonger les lames dans du SSC à 37°C, pendant 2 minutes.
- Faire dissoudre la pepsine et la mettre dans l'HCL juste avant de mettre les lames suite à leur bain dans le SSC ; incubation dans HCL- pepsine pendant 5 à 15 minutes.
- Lavage 1 : dans du PBS pendant 3 min.
- Post-fixation dans du MgCl₂/ formaldéhyde pendant 10 minutes.
- Lavage 2 : dans du PBS pendant 3 minutes.
- Déshydratation des lames dans les bains d'éthanol à 70%, 85% puis 100%.
- Laisser sécher à l'air libre.
- Mettre les papiers humidifiés dans les deux niches du thermobrite réservées à cet effet. Allumer le thermobrite, attendre la montée de la température à 37°C,
- Une fois les lames sèches, procéder aux dépôts de sondes : appliquer 10 µl de sonde prête à l'emploi sur la zone déjà délimitée, couvrir par une lamelle et la sceller par du ruber ciment (facultatif).

Certaines sondes nécessitent une dilution avant le dépôt (exp : CEP 12) : 2 µl de sonde + 8 µl de buffer.

Une fois déposée, l'identification de la sonde doit être portée sur la lame.

- Mettre les lames ainsi prêtes dans le thermobrite, procéder à une dénaturation dont la température diffère selon les sondes. Dans notre cas, la dénaturation est faite à 75°C pendant 5 minutes, puis l'hybridation est faite à 37°C pendant une nuit.

- Le lendemain, faire le lavage : mettre un bac en porcelaine avec du 0,4 SCC/0,3 % Igepal dans un bain marie à préchauffer à 72°C.

- Mettre les lames dans un bac de 2 SCC/0,1 Igepal à température ambiante pendant 2 minutes, pour détacher les lamelles.

- Mettre les lames dans l'Igepal 0,3% à 72°C pendant 2 minutes.

- Remettre les lames dans un deuxième bain Igepal 0,1% pendant 1 minute à température ambiante.

- Déshydrater les lames pendant une minute dans chaque bain d'éthanol à 70%, 85% puis 100%.

- Laisser sécher à température ambiante.

- Appliquer 15 µl de DAPI sur la lame (pour la contre coloration) et couvrir d'une lamelle.

- Lecture au microscope à fluorescence dans une chambre noire, avec comptage des signaux sur au moins 200 noyaux et 20 mitoses.

Dans le cas où les mitoses sont insuffisantes (moins de 10), le comptage de 500 noyaux a été réalisé.

- Une prise de 3 à 5 photos par sonde pour l'archivage a été effectuée.

Lecture et interprétation :

Chaque sonde est marquée par un fluorochrome sur le locus d'intérêt (exp : rouge) et souvent sur un autre locus témoin par un autre fluorochrome (exp : vert).

Le seuil de positivité est de 5 % pour les sondes 13q14, CEP 12, ATM, 6q21 et de 7% pour la P53.

La lecture a été faite en double aveugle en particulier pour contrôler les taux limites.

Sur les noyaux :

- Ne pas compter les noyaux qui se chevauchent, ni les noyaux détériorés.

- Ne pas compter les zones où les noyaux ne sont pas hybridés.
- Compter les signaux diffus s'ils sont séparés des autres signaux.
- Compter les signaux divisés en deux petits signaux juxtaposés comme un seul signal.
- Compter deux petits signaux reliés par un fil fluorescent comme un seul signal.
- Ne pas compter les signaux non spécifiques, reconnus par leurs intensités de fluorescence différentes.

Sur les mitoses : Ne pas compter les mitoses incomplètes, ou à chromosomes trop dispersés.

Les résultats sont rendus selon la nomenclature internationale ICSN 2009

I.3.4.2 Avantages et contraintes liées à la réalisation d'une FISH

I.3.4.2.1 Avantages

L'hybridation in situ (FISH) est un examen certes ciblé, mais qui présente surtout lorsque plusieurs sondes sont utilisées, de nombreux avantages :

- Il ne nécessite pas de grandes quantités de cellules.
- même en absence de pousse cellulaire, l'examen des noyaux peut suffire
- c'est une technique simple et rapide, applicable en routine
- il peut être réalisé en urgence avec rendu de résultats en 24H
- il est Indépendant de la qualité des mitoses et ne nécessite pas de dénaturation
- le seuil de détection est de 50kb à 5 Mb

I.3.4.2.2 Inconvénients

C'est un examen ciblé ne mettant en évidence que la ou les anomalies recherchées ; nécessite une rigueur pour la lecture et l'interprétation des résultats.

L'utilisation de réactifs parfois très toxiques impose des mesures strictes de protection.

I.3.5 Nomenclature

I.3.5.1 Nomenclature : Le caryotype

La nomenclature des chromosomes humains est le résultat de plusieurs conférences internationales s'étalant des années soixante aux années 2000, qui établissent des recommandations sous formes d'un système international de nomenclature de cytogénétique humaine (ISCN), le dernier en vigueur date de 2009.

I.3.5.1.1 Notions élémentaires

Le chromosome est formé de deux chromatides liés par un étranglement nommé centromère.

Le centromère divise le chromosome en deux bras : un bras court appelé « p » qui représente la partie supérieure du chromosome et un bras long appelé « q » qui représente lui la partie inférieure.

Le centromère situé à peu près au milieu du chromosome avec un « p » et un « q » à peu près égaux définit un chromosome métacentrique. Un centromère situé à l'extrémité supérieure du chromosome de telle sorte que le bras « p » est beaucoup plus court que le bras « q » définit un chromosome acrocentrique. Une position intermédiaire du centromère avec un bras « p » qui fait à peu près la moitié de la taille du bras « q » définit un chromosome submétacentrique.

Le caryotype humain contient 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes ou chromosomes sexuels X et Y.

La classification historique des chromosomes avant l'avènement du système de banding, était basée seulement sur la taille décroissante des chromosomes et la position du centromère. Ainsi 7 groupes sont distingués :

- Groupe A (1 - 3) : chromosomes grands et métacentriques.
- Groupe B (4 - 5) : chromosomes grands et submétacentriques.
- Groupe C (6 – 12, X) : chromosomes de taille moyenne métacentriques ou submétacentriques, le chromosome X semble le plus long de ce groupe.
- Groupe D (13 – 15) : chromosomes de taille moyenne acrocentriques avec des satellites.
- Groupe E (16 – 18) : chromosomes relativement courts métacentriques ou submétacentriques.
- Groupe F (19 – 20) : chromosomes courts métacentriques.
- Groupe G (21 – 22, Y) : chromosomes courts acrocentriques avec satellites, le chromosome Y n'a pas de satellites.

Le marquage des chromosomes en bandes ou banding sert à identifier les chromosomes au sein du même groupe. Chaque chromosome est une série continue de bandes sans interbandes(. La bande peut être subdivisée en sous bandes ou en des sous-sous bandes dans le banding haute résolution.

La bande est une partie du chromosome reconnaissable de la partie adjacente par sa clarté ou sa coloration dense, les bandes constituent les régions de chaque bras chromosomique et chaque région est délimitée par des repères ou Landmark, ces repères désignent les caractères morphologiques identifiant les chromosomes. Ces repères sont représentés par le centromère, les télomères (extrémités des chromosomes) et les bandes.

Les bandes comme les régions sont comptées sur chaque bras du centromère vers le télomère. Les symboles « p » et « q » désignent les bras courts et longs de chaque chromosome respectivement.

Le centromère (cen) est désigné 10 (un ; zéro) ; la partie en face du bras court est nommée p10, la partie en face du bras long est nommée q10. Les deux régions adjacentes au centromère sont nommées 1 sur chaque bras, la région plus distale par 2 et ainsi de suite.

Pour désigner une bande, 4 items sont nécessaires : le numéro du chromosome, le symbole du bras, le numéro de la région et le numéro de la bande de cette région, dans l'ordre et sans espaces ni ponctuation. Par exemple 13q14 indique le chromosome 13, le bras long, région 1, bande 4. si une sous bande doit être identifiée, un point décimal est placé après la bande désignée suivi par le numéro de la sous bande toujours en allant du centromère vers la partie distale du chromosome, par exemple 11q22.3 désigne le chromosome 11, le bras long, la région 2, la bande 2, la sous bande 3.

I.3.5.1.2 Désignation d'un caryotype

La description commence par le nombre total des chromosomes y compris les chromosomes sexuels, suivi par une virgule, elle même suivie par la désignation des chromosomes sexuels.

Exemple : 46,XY pour un caryotype normal masculin, 46,XX pour un caryotype normal féminin.

Les anomalies des chromosomes sexuels sont présentées en premier, suivies par les anomalies des autosomes listés suivant l'ordre numérique des chromosomes quelque soit le type de l'anomalie de nombre ou de structure.

L'anomalie du nombre précède celle de structure d'un même chromosome. Chaque anomalie est séparée par une virgule.

Certaines lettres ou symboles sont utilisés comme abréviation pour désigner les réarrangements chromosomiques :

- Si un seul chromosome est réarrangé, il est étiqueté entre parenthèse () suivant immédiatement le type du réarrangement, ex inv(16).
- Si plusieurs chromosomes sont concernés, dans la parenthèse, ils sont séparés par un point virgule (;) commençant toujours par le chromosome sexuel s'il est atteint puis par les autosomes en nombre croissant, exception faite pour les insertions où le chromosome receveur est cité en premier.
- Le signe + ou – est placé avant le chromosome normal ou anormal (dérivé d'une translocation par exemple) en plus ou en moins respectivement. Les signes + ou - placé après les bras chromosomiques indiquent un manque ou un gain de matériel chromosomique (ex : 5q-, 3p+), mais ne doit pas être utilisé dans la formule du caryotype.
- Le signe de multiplication (x) est utilisé pour décrire les multiples copies d'un chromosome réarrangé, mais pas les copies d'un chromosome normal.
- Le signe (:) indique une cassure chromosomique, le symbole (::) indique une cassure et une réunion.

- La fin d'un bras d'un chromosome peut être désignée par la bande en question ou par le mot ter (terminal). Ex : 13q34 ou 13qter
- Sur un caryotype, quand plusieurs clones existent, ils sont séparés par / et le nombre de mitoses analysées pour chaque clone est placé entre parenthèse carré []
- Le mot mosaïque (mos) désigne des mitoses avec anomalies différentes, originaires d'un même zygote ou cellule mère, au contraire du terme chimère (chi) qui désigne des mitoses originaires de zygotes différents.

I.3.5.1.3 Anomalies de nombre

Un caryotype normal à 46 chromosomes est dit diploïde, un caryotype à 46 chromosomes mais contenant des anomalies de nombre sur certains chromosomes ou anomalies de structures est dit pseudodiploïde. Un caryotype avec un nombre anormal de chromosome désigne l'aneuploïdie.

L'hyperdiploïdie désigne un caryotype avec plus de 46 chromosomes. Un caryotype avec moins de 46 chromosomes désigne l'hypodiploïdie.

Quand le gain survient sur chromosome normal, cela indique une trisomie, une tetrasomie indique un gain de deux copies chromosomiques supplémentaires. La perte d'un chromosome normal indique une monosomie, exemple : +12 indique une trisomie 12, -7 indique une monosomie 7.

I.3.5.1.4 Anomalies de structures

De multiples anomalies de structures peuvent survenir dans les hémopathies lymphoïdes chroniques. Dans la LLC, les délétions et les translocations simples ou complexes sont le plus rencontrés.

Délétions (del)

C'est une perte du matériel chromosomique concernant une ou plusieurs bandes. elles résultent d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal : délétion terminale ou de deux cassures sur un même bras chromosomiques avec perte du segment intercalaire : délétion interstitielle, cette dernière peut être de très petite taille difficile à mettre en évidence en caryotype conventionnelle, dans ces cas de figures la Fish avec une sonde spécifique trouve tous son intérêt

Exemple d'une délétion interstitielle : del(11)(q22.3q23.1) : indique une délétion interstitielle sur le chromosome 11, avec cassure et réunion entre les 11q22.3 et 11q23.1, nous pouvons l'exprimer autrement : del(11)(pter→q22.3::q32.1→qter).
Exemple d'une délétion terminal : del(17)(p13), le point de cassure survient sur la bande 3 terminale du bras court du chromosome 17, exprimé autrement : del(17)(qter→p13 :)

Le point de cassure au cours de la délétion peut être difficile à déterminer ou inconnu, cela est illustré par un exemple : del(13)(q ?) : délétion sur le bras long du chromosome 13, mais le point de cassure est inconnu.

Les translocations

C'est un échange de matériel chromosomique entre deux ou plusieurs chromosomes. Les translocations peuvent être équilibrées ou non équilibrées.

Les translocations réciproques affectant deux chromosomes avec deux cassures et recollement après échange des segments distaux, sa formule suit les règles précitées, en cas de translocation impliquant 3 chromosomes, dans la nomenclature celui qui est cité en seconde position est celui qui reçoit le segment chromosomique de celui qui est cité en premier ; et celui qui est cité en dernier est celui qui donne son segment chromosomique au premier cité.

Exemple : t(2 ;5)(q21 ;q31), points de cassures sur q21 du chromosome 2 et sur q31 du chromosome 5 avec échange des segments distaux des deux bras.

t(2 ;7 ;5)(p21 ;q22 ;q23) : indique une translocation complexe entre les chromosomes 2, 5 et 7.

Le segment distal du 2p21 est transloqué sur le 7 au niveau de la bande q22. Le segment à partir du 7q22 est transloqué sur le chromosome 5 au niveau de la bande 5q23. Le segment à partir du 5q23 est transloqué sur le chromosome 2 sur la bande 2p21.

I.3.5.2 Nomenclature pour L'hybridation in situ fluorescente (FISH)

I.3.5.2.1 FISH métaphasique

Si le résultat du caryotype est donné, le résultat de la FISH métaphasique et interphasique suit séparé d'un point (.), l'abréviation ish, espace, et le résultat de la FISH.

Dans le cas où seulement le résultat de la FISH est donné, commencer la formule par ish, suivi par un espace et le symbole de l'anomalie de structure, suivi par des parenthèses séparées du chromosome, le point de cassure, le locus ou les loci pour lesquels les sondes ont été utilisées.

Quand cela est possible, le nom du clone est préférable, si non le locus est désigné suivant la base de données du génome. Si le locus n'est pas disponible sur cette base de données, le nom du gène est utilisé selon la nomenclature HUGO.

La désignation du locus est séparé par une virgule et le statut du locus est donné immédiatement après la désignation du locus : présent (+), absent (-), dupliqué (++)

Exemple de formules :

Une délétion :

ish del(13)(q14.3)(D13S319 -) : del 13q14.3 monoallélique.

ish del(13)(q14.3)(D13S319 – x 2) : del 13q14.3 biallélique.

46,XY,del(13)(q14.3)[8]/46,XY[12].ish del(13)(q14.3)(D13S319 -)[17] : présence d'une délétion 13q14.3 chez un sujet de sexe masculin dans 8 mitoses sur 20 en caryotype et dans 17 mitoses sur 20 par FISH.

Une translocation :

46,XX,t(11 ;14)(q13 ;q32)[20].ish t(11 ;14)(BCL1- ;IgH+,BCL1+)[20] : présence d'une translocation t(11 ;14) chez un sujet de sexe féminin. La FISH indique la perte du BCL1 sur le dérivé 11 et son passage sur le dérivé 14 en distal du locus IgH. Ce résultat est exprimé dans 20 mitoses en caryotype et en FISH.

I.3.5.2.2 FISH interphasique

Les informations données suite à l'analyse des noyaux est dite FISH interphasique : désignée par le symbole nuc ish, elle inclut le nombre de signaux et leurs positions relatives les uns par rapport aux autres.

Pour le nombre de signaux : l'abréviation nuc ish est suivie immédiatement dans une parenthèse par l'identification du locus, un signe de multiplication (x), et le nombre de signaux vus. Si le système détaillé de nomenclature est utilisé, ish est suivi par un espace puis l'identification de la bande d'intérêt.

Si deux ou plusieurs sondes sont utilisées pour deux ou plusieurs loci, ces derniers sont cités de suite dans une seule parenthèse séparés par une virgule, le signe de multiplication (x) est en dehors de la parenthèse suivi par le nombre de signaux vus.

Si plusieurs sondes sont utilisées sur un même chromosome, les loci sont cités par ordre de pter jusqu'à qter, séparés par une virgule.

Si un locus est testé sur deux ou plusieurs chromosomes, le résultat est rapporté dans un « a string », séparé par des virgules pour les chromosomes sexuels et les autosomes de 1 à 22. Le nombre de cellules étudiées est placé dans [].

Exemples :

nuc ish(ATMx1)[200/400] : perte du signal ATM dans 200 noyaux sur 400 étudiés.

nuc ish(D12Z1x3)[100/400] : gain d'un signal supplémentaire du centromère du 12 dans 100 noyaux sur 400 analysés.

nuc ish(D13S319x0)[100/400]/(D13S319x1)[150/400] : présence d'une délétion homozygote du D13S319 sur 100 noyaux étudiés sur 400, 150 noyaux montre une délétion hétérozygote.

La position relative des signaux :

Si les locus de deux chromosomes séparés sont testés, les signaux normalement restent séparés, exp : nuc ish(ABL1,BCR)x2[400]

Si deux signaux sont juxtaposés sur un chromosome comme dans la t(9 ;22) simple fusion, le résultat est exprimé ainsi : nuc ish(ABL1x2),(BCRx2),(ABL con BCRx1)[400]

Si les signaux sont juxtaposés sur deux chromosomes différents comme dans une sonde double fusion, le résultat est exprimé ainsi : nuc ish(ABL1x3),(BCRx3),(ABL1 con BCRx2)[400]

Si le signal est normalement juxtaposé, la sonde qui montre l'anomalie qui consiste en la séparation d'un double signal est appelée Break-apart :

Exp : nuc ish(MLLx2)[400] à l'état normal, nuc ish(5'MLL,3'MLL,5'MLL con 3'MLL)x2[400], cela indique que le MLL est réarrangé avec un signal séparé et un double signal normal.

I.3.6 Traitement

I.3.6.1 Evaluation pré thérapeutique

Nous avons pratiqué chez tous les patients :

Un interrogatoire minutieux pour préciser :

- La date du début et les circonstances de découvertes.
- Les antécédents du patient en particulier un suivi pour un autre cancer concomitant ou précédant sa maladie actuelle, l'existence d'un cancer familial en particulier un syndrome lymphoprolifératif.
- La profession pour une éventuelle exposition à un toxique.
- La présence de signes généraux : fièvre prolongée de plus d'une semaine $\geq 38^{\circ}\text{C}$, une perte de poids de plus de 10 kg en moins de 6 mois et des sueurs nocturnes.

Un examen clinique : qui comporte :

- Une appréciation de l'état général selon l'ECOG, prise du poids et de la taille du patient

- Un examen clinique complet avec mesure du diamètre des adénopathies en particulier la plus volumineuse, le débord splénique et la flèche hépatique en centimètre, établir un schéma en résumant dessus l'examen clinique.

- Examens radiographiques : pour apprécier la masse tumorale au niveau médiastinal et intra et retro péritonéale, nous demandons au diagnostic :

- Téléthorax et/ou scanner thoracique.
- Echographie abdominopelvienne ou un scanner abdominopelvien.

Un bilan Biologique :

Un bilan diagnostique : un hémogramme complet avec équilibre leucocytaire, un frottis sanguin et un medullogramme colorés au MGG, un prélèvement sur tube EDTA pour l'étude en cytométrie en flux.

Un bilan d'évolutivité : VS, LDH, CRP

Un bilan de complication : une électrophorèse des protéines avec dosage pondéral des Immunoglobulines, un test de Coombs direct.

Un bilan pronostique :

- Un prélèvement stérile sur tube hépariné vacutainer pour cytogénétique
- Un prélèvement sur tube sec pour dosage de la $\beta 2$ microglobuline
- Une PBO avec apposition et le prélèvement est adressé au service d'analyse anatomopathologique pour étude histologique.

Un bilan pré-thérapeutique :

- Un prélèvement sur tube hépariné pour bilan rénal, uricémie, hépatique, glycémie, bilan phosphocalcique, ionogramme sanguin, bilan lipidique, groupage sanguin, des sérologies virales HBS, HCV, HIV
- Une échocardiographie.

Le diagnostic de LLC est retenu selon les critères du NCI 1996, les malades sont classés selon la classification de Binet. Les stades B et C évolutifs sont traités.

Les patients (53) ont bénéficié :

- Entre janvier 2007 et Mai 2010, du protocole FC : 36 patients.
- Entre Juin 2010 à Décembre 2011, du protocole RFC : 17 patients.

Les patients protocolaires ont reçu de 3 à 6 cures, au rythme d'une cure par mois pendant six mois.

I.3.6.2 Protocoles thérapeutiques

I.3.6.2.1 Protocole FC

Il comporte : Fludarabine + Cyclophosphamide

Injectable : F = 25mg/m²/j perfusion de 30 minutes, 3 jours consécutifs

C = 250 mg/m²/j perfusions de deux heures, 3 jours consécutifs

Une cure par mois pendant 6 mois.

Per os : F = 40 mg/m²/j ,3 jours consécutifs

C = 250 mg/m²/j ,3 jours consécutifs

Une cure par mois pendant 6 mois.

I.3.6.2.2 Protocole RFC

Il comporte: FC+ Rituximab (anticorps anti CD20)

Cure n°1: Rituximab = 375 mg/ m² J1

F = 25 mg/m²/J J2, J3, J4

C = 250 mg/m²/J J2, J3, J4

Cure n°2 à n°6: Rituximab 500 mg/ m² J1, FC (meme dose) J1, J2, J3.

Une réhydratation est assurée pour chaque patient avant de procéder à l'administration de la chimiothérapie.

Une prémédication est faite pour les patients sous Rituximab, par antihistaminique, 1g de prodafalgan et hydrocortisone 100 mg, une ampoule de ranitidine, avant la perfusion du Rituximab.

Le Rituximab est injecté en deux phases ; une dose test de 50 mg sur une heure de temps puis le reste de la dose est injecté en augmentant le débit progressivement, sur une durée de 4 heures ; pour éviter les réactions d'hypersensibilité liées au produit.

Un antiémétique : Zophren est donné avant l'administration des antimétopiques.

Une prophylaxie anti-infectieuse est assurée pendant toute la durée du traitement et 6 mois après la fin de la chimiothérapie, elle consiste en : Bactrim forte 1 comprimé / jour 3 x par semaine, Aciclovir (200 mg) 2 comprimés par jour tous les jours.

Un Hémogramme, un bilan rénal, hépatique et un TCD sont réalisés avant chaque cure ; un taux de PN \geq 1500/mm³ et l'absence de signes d'hémolyse sont requis, le cas échéant la cure est retardée et un bilan d'exploration est lancé.

I.3.6.3 Surveillance du traitement

I.3.6.3.1 Surveillance de la tolérance

Un contrôle clinique pour guetter tous signes d'infection ou effets secondaires du traitement est réalisé deux fois par mois.

Un hémogramme est réalisé à J7 et J14 post cure pour la première cure, puis entre ces deux échéances, selon la sensibilité de chaque patient.

En cas de neutropénie grade 4 ($\leq 500/\text{mm}^3$), mise du patient sous G-CSF pendant en moyenne 5 jours à raison d'une injection sous cutanée par jour. En cas de neutropénie grade 3, un lien est établi avec le médecin de la localité du patient, pour une surveillance conjointe.

Chez les patients avec neutropénie grade 4, nous avons procédé à une réduction des doses par pallier pour éviter une agranulocytose prolongée :

Pallier 1 = réduction de 25 % des doses de Fludarabine et de cyclophosphamide.

Si le patient présente toujours une neutropénie grade 4 en post cure à cette dose, nous appliquons le pallier 2 qui consiste à réduire de 50 % les doses de la chimiothérapie.

Si la cytopénie grade 4 persiste malgré la réduction de dose, le traitement est arrêté.

I.3.6.3.2 Surveillance de l'efficacité

Une première évaluation clinique, biologique et radiologique est réalisée après 3 cures, avec un examen clinique des aires ganglionnaires avec mesure du diamètre.

Le protocole est poursuivi si la réponse est objective avec une bonne tolérance clinique (absence d'infection grave) et biologique (neutropénie résolutive soit spontanément ou sous facteur de croissance).

Une évaluation selon les critères NCI (Annexe 1) est réalisée 2 à 3 mois après la fin de la chimiothérapie.

Les patients sont évaluable s'ils ont reçu ≥ 3 cures.

Cette évaluation comporte un examen clinique complet, un bilan biologique et radiologique de contrôle, une PBO avec apposition et une étude histologique.

Surveillance de la toxicité retardée et de l'évolution de la maladie :

Après la fin du traitement, la surveillance a pour buts de guetter les effets toxiques à long terme, en particulier les infections retardées, la durée de la réponse (survie sans progression) et la survenue d'une éventuelle rechute ou une progression suite à une réponse partielle.

Elle est :

- Clinique : un examen clinique complet en particulier aires ganglionnaires ; recherche d'effets secondaires liés au traitement et des complications. Tous les 3 mois les deux premières années, puis tous les 6 mois jusqu'à la cinquième année, puis tous les ans.
- Biologique : hémogramme avec équilibre leucocytaire, LDH, β 2 microglobuline, bilan rénal, ionogramme sanguin, électrophorèse des protéines. Tous les 3 mois les deux premières années, puis tous les 6 mois jusqu'à la cinquième année, puis tous les ans.
- Radiologique : radiographie du thorax et échographie abdominopelvienne et cardiaque deux fois par an.

Les patients en RP ou maladie stable, sont surveillés tous les deux mois jusqu'à signes de progression.

Les patients en échec, sous réserve d'un statut hématologique correcte, sont mis sous protocole thérapeutique de rattrapage.

I.3.6.3.3 Critères d'arrêt du protocole

Une cytopénie profonde grade 4 et prolongée plus de 2 mois.

Une infection grave en particulier pulmonaire.

Une maladie stable ou en progression après 3 cures.

La survenue d'une complication auto-immune sous traitement.

I.3.7 Etude statistique

Utilisation du logiciel XLSTAT 2012 pour :

- La comparaison des moyennes et pourcentages ; test du Chi² avec correction de Yates pour les petits effectifs
- Les courbes de survie selon Kaplan-Meier
- La comparaison des courbes de survie par le test du log Rank

II- RESULTATS

II.1 Etude descriptive des patients

II.1.1 Groupe CMF

L'étude a porté sur 150 pts chez qui le diagnostic de LLC a été évoqué par la cytologie.

Les patients se répartissent en 52 femmes et 98 hommes, sexe ratio = 1,9.

Age moyen = 64 ans (37-91).

II. 1.1.1 Aspects cytologiques des 150 cas

- LLC typique : 121 cas (81 %)
- LLC /PL : 6 cas (4%)
- LLC atypique 23 cas (15 %)
- Ombres de Gümprrecht : elles ont été observées dans 140 cas (93 %)

II.1.1.2 Aspects immunophénotypiques des 150 cas

Classification selon le score de Matutes

- Score 5 : 55 cas (36,5%)
- Score 4 : 63 cas (42%)
- Score 3 : 19 cas (12,5%)
- Score 2 : 9 cas (6%)
- Score 1 : 4 cas (3%)

Pour ces 150 pts, le diagnostic de LLC a été confirmé par CMF dans 118 cas (scores 4 et 5), et dans 17 cas (score 3) après confrontation avec la cytologie ; ainsi 135 cas (90 %) sont des LLC.

Les autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques (SLPC) diagnostiqués sont représentés par 15 cas (10 %) avec un score de Matutes ≤ 3 .

Il s'agit respectivement de :

- Lymphomes folliculaires : 3 cas
- Lymphomes du manteau : 6 cas
- Lymphomes de la zone marginale : 3 cas
- Leucémie à prolymphocytes : 1 cas
- Lymphomes B inclassables : 2 cas

II.1.1.3 Incidence après CMF des SPLC selon le type cytologique de LLC évoqué

Sur 121 cas, classés LLC typique par l'étude morphologique, 10 cas (8,3 %) ne sont pas des LLC en CMF, alors que 111 cas sont confirmés LLC (91,7 %).

Sur les 23 cas, classés LLC atypique par l'étude morphologique, 4 ne sont pas des LLC en CMF ; alors que 19 cas sont confirmés LLC.

Sur les 6 cas, classés LLC/PL par l'étude morphologique, 1 cas n'est pas une LLC en CMF ; alors que 5 cas sont confirmés LLC. (**Tableau VI**)

Cytologie	Phénotype CMF	
	LLC	SLPC non LLC
LLC typique (121)	111	10
LLC atypique (23)	19	4
LLC / LP (6)	5	1
Total (150)	135	15

Tableau VI : Incidence des autres SPLC dans le type cytologique de LLC évoqué

II.1.1.4 Analyse des cas de LLC : 135 cas

- Répartition selon le stade de Binet : -Stade A = 21, Stade B = 51, Stade C = 63.

- Correspondance entre type cytologique et score de Matutes :(**Tableau VII** ; **Figure 9**)

- LLC typique : 111 cas 5 (82 %) : score 3 = 8 ; Score 4 = 56 ; Score 5 = 47

- LLC /PL : 5 cas (4%) : score 3 = 2 ; Score 4 = 1 ; Score 5 = 2

- LLC atypique : 19 cas (14 %) : score 3 = 7 ; Score 4 = 6 ; Score 5 = 6

Type cytologique	Matutes score 3	Matutes score 4	Matutes score 5	Total
LLC Typique	8	56	47	111 (82%)
LLC/PL	2	1	2	5 (4%)
LLC atypique	7	6	6	19 (14%)
Total	17	63	55	135

Tableau VII : LLC : 135 cas : Correspondance entre cytologie et score de Matutes.

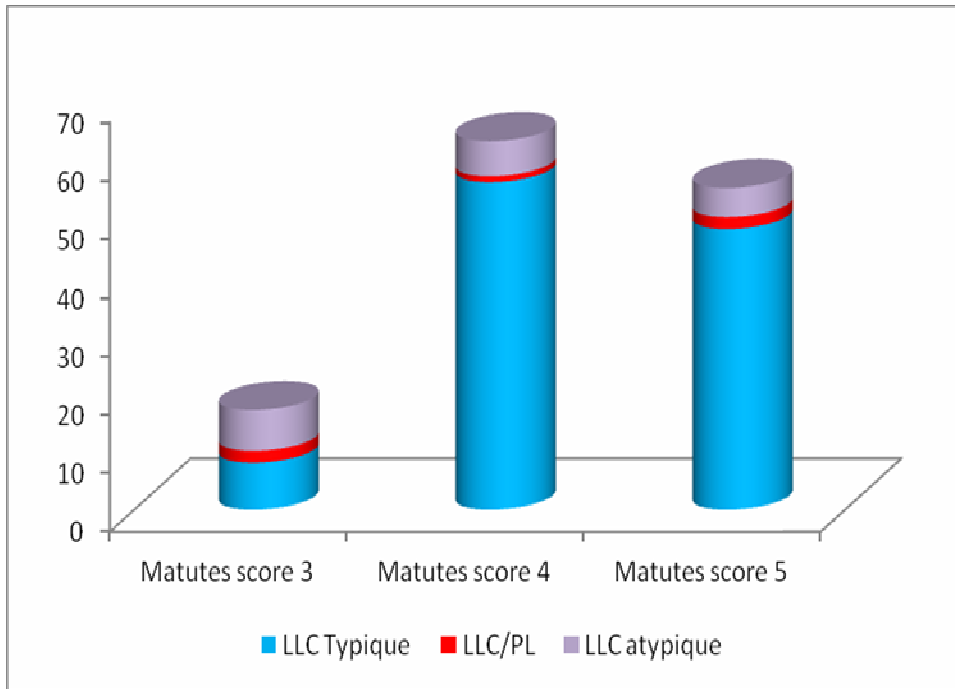


Figure 9 : Correspondance entre cytologie et score de Matutes

- Répartition selon le CD38

Le CD38 a été fait chez 121 pts ; il n'a pas été réalisé dans 14 cas.

Le seuil de positivité utilisé dans notre laboratoire est $\geq 30\%$.

Le CD38 est positif chez 61 pts sur 121 (50,4 %), il est négatif dans 60 cas (49,6 %)

II.1.2 Groupe cytogénétique

L'étude a portée sur 100 patients

II.1.2.1 Caractéristiques des patients

Répartition selon le sexe : 27 femmes et 73 hommes, sexe ratio= 2,7.

Age moyen 61,3 ans (37 – 80)

Répartition selon les stades de Binet : stade A : 17 ; stade B : 38 ; stade C : 45.

Répartition selon le score de Matutes : 3 chez 14 pts, 4 chez 49 pts, 5 chez 37 pts.

CD38 $\geq 30\%$: positif chez 46 pts, Négatif chez 47 pts, non fait chez 7 pts

II.1.2.2 Répartition des anomalies cytogénétiques au caryotype (Figure 10)

Dans notre travail, une rareté voir une absence de mitoses a été observée dans 27 cas (27 %); dans ces cas le caryotype n'a pas été réalisé.

Des mitoses ont été obtenues dans 73 cas ; le caryotype était ininterprétable dans 33 cas (33 %) pour problème de dénaturation ou difficulté d'interprétation (chromosomes trapus ou trop longs et chevauchés)

Le caryotype a été interprétable dans 40 cas. Il a objectivé une absence d'anomalie dans 28 cas (70%).

Un caryotype pathologique a été retrouvé dans 12 cas (30 %): les anomalies sont les suivantes : **(Images en Annexes 3, 4, 5, 6, 7)**

- une trisomie 12 isolée dans 3 cas.
- une del 13q14 isolée dans 3 cas.
- une del (17)(p13) isolée dans un cas.
- une del (11)(q22) isolée dans un cas.
- une del (13)(q14) + del (17)(p13) dans un cas.
- une trisomie 12 + del (17)(p13) dans un cas.
- une trisomie 12 + del (14)(q13;q31) dans un cas.
- une trisomie 12 + del (13)(q14) dans un cas.

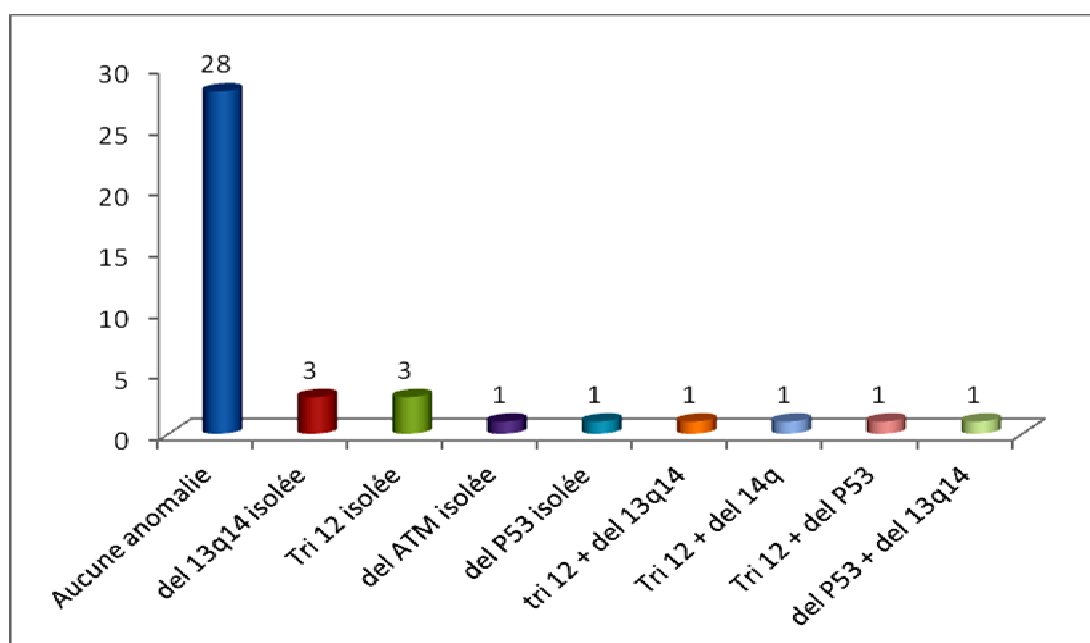


Figure 10 : Répartition des anomalies cytogénétiques retrouvées au caryotype

II.1.2.3 Répartition des anomalies cytogénétiques retrouvées par FISH : 100 cas

L'hybridation in situ (FISH) a été réalisée chez 100 pts ; il n'y a eu aucun échec de réalisation ou d'interprétation.

Les résultats sont comme suit (**Figure 11**) (**Images en Annexes 3, 4, 5, 6, 7**)

II.1.2.3.1 Aucune anomalie

Aucune anomalie n'est retrouvée chez 20 pts (20 %)

Age moyen = 62 ans (48-80)

Médiane de survie : non atteinte

Le temps moyen de survie est de 51,8 mois (46,3-57,3).

Nous relevons deux décès dans ce groupe.

II.1.2.3.2 Anomalies récurrentes

L'étude retrouve des anomalies récurrentes chez 80 pts (80 %).

Elles se répartissent en :

- anomalies simples ou isolées : 48 cas (60 %).
- 2 anomalies associées : 27 cas (33,75 %).
- 3 anomalies associées : 5 cas (6,25 %).

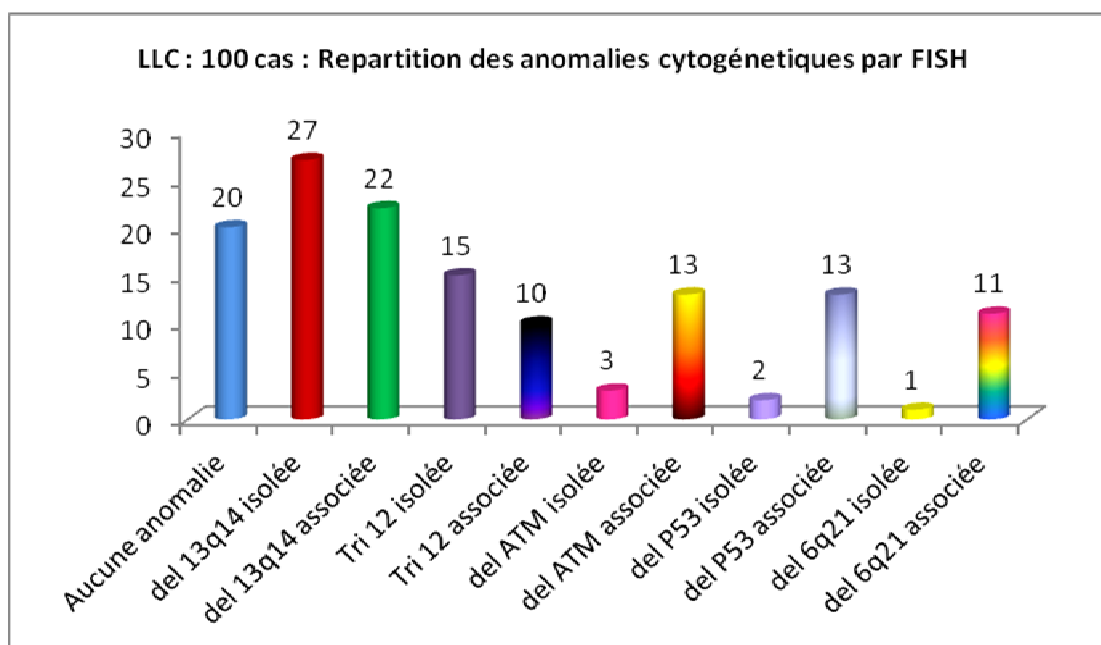


Figure 11 : Répartition des anomalies cytogénétiques par FISH

II.1.2.3.2.1 La délétion 13q14q34

Elle est retrouvée chez 49 pts (49 %), est répartie comme suit :

Délétion 13q14 isolée : 27 cas dont :

- 21 monoalléliques
- 2 bialléliques
- 4 biclonales ou en mosaïque

Délétion 13q14 associée : 22 cas (**Figure 12**)

- del 13q14 + trisomie 12 = 2 cas.
- del 13q14 + del ATM = 5 cas.
- del 13q14 + del P53 = 6 cas dont une délétion biclonale et une del terminale 13q14q34.
- del 13q14 + del 6q21 = 5 cas dont une del 13q14 biallélique.
- del 13q14 + del ATM + del 6q21 = 2 cas dont une del 13q14 biallélique.
- del 13q14 + trisomie 12 + del ATM = 2 cas.

L'âge moyen de la population del 13q14 isolée est de 59 ans (46-69)

L'âge moyen de la population del 13q14 biclonale est de 60 ans.

Cette anomalie est survenue dans 10 cas stade A, 4 cas stade B, et 13 cas stade C.

L'analyse des clones en % de délétion (monoallélique/ biallélique) de la del 13q14 biclonale (5 cas) : 75/25, 47/48, 14/80, 17/24, 22/15.

L'analyse des clones en % de délétion de l'association 13q14/ P53 respectivement (6 cas) : 70/77, 37/88, 96/64, 30/95, 80/80, 87/42.

Médiane de survie de la population 13q14 isolée : non atteinte

Temps moyen de survie est de 69 mois

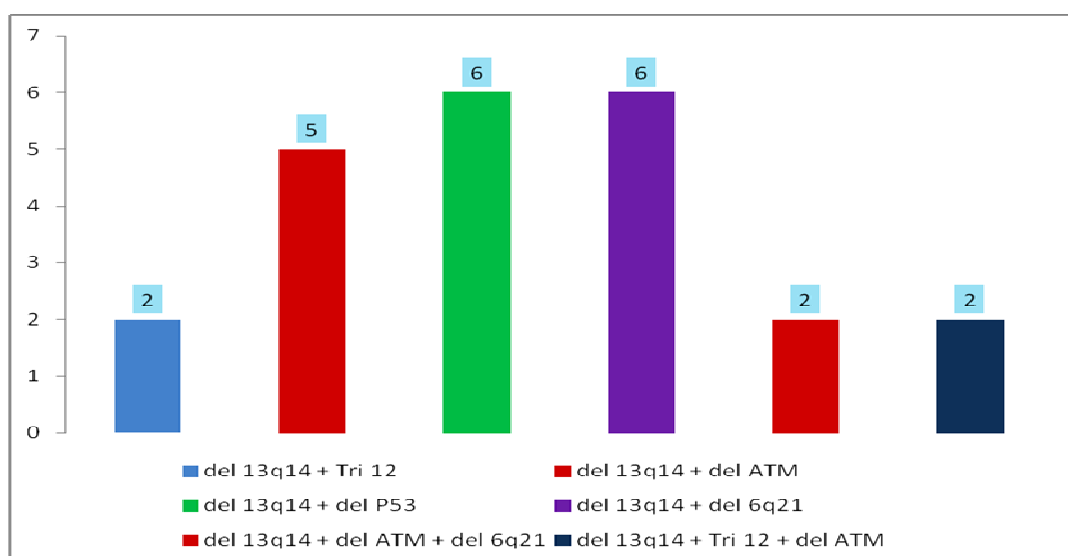


Figure 12 : Représentation de la del 13q14 associée

II.1.2.3.2.2 Trisomie 12

Elle est retrouvée chez 25 patients (25 %)

Elle est isolée chez 15 patients.

Elle est associée chez 10 pts (**Figure 13**)

- Tri 12 + del 13q14 = 2 pts.
- Tri12 + del ATM = 2 pts.
- Tri 12 + del P53 = 4 pts.
- Tri 12 + del 13q14 + del ATM = 2 pts.

Age moyen de la population trisomie 12 isolée : 64,4 ans (50-76)

La trisomie 12 isolée survient chez 2 pts au stade A, 7 pts au stade B, 6 pts au stade C.

Sept trisomie12 sur 25 surviennent dans le groupe cytologie variante, dont 2 sont associées à la del P53.

Un score de Matutes égal à 3 est retrouvé dans 5 cas sur 7.

Médiane de survie : 58 mois

Temps moyen de survie est de 45 mois (32,8-57,2).

Nous relevons 5 décès dans ce groupe.

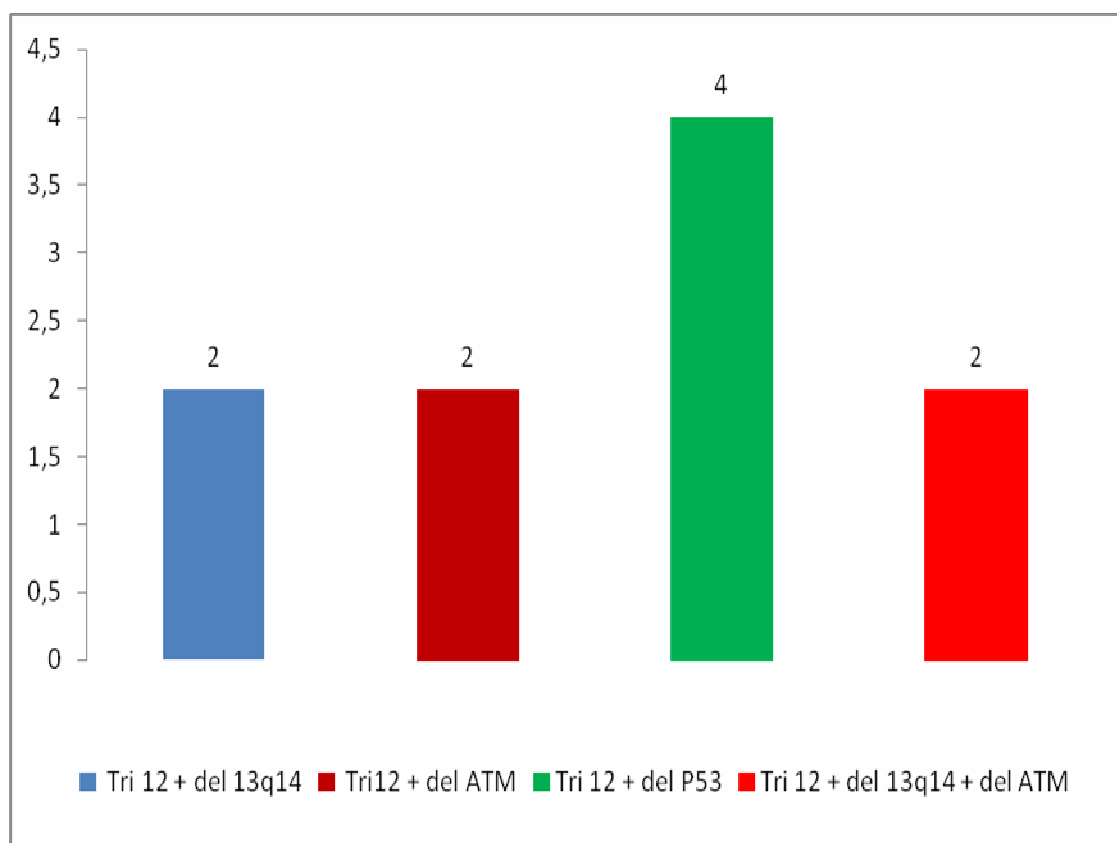


Figure 13 : Représentation de la trisomie 12 associée

II.1.2.3.2.3 Délétion ATM (11q22)

Elle est retrouvée chez 16 pts (16 %)

Elle est Isolée chez 3 pts.

Elle est associée chez 13 pts (**Figure 14**)

- del ATM + del 13q14 = 5 pts.
- del ATM + trisomie 12 = 2 pts.
- del ATM + del 6q21 = 1 pt.
- del ATM + del P53 + del 6q21 = 1 pt.
- del ATM + del 13q14 + tri 12 = 2 pts.
- del ATM + del 13q14 + del 6q21 = 2 pts

L'âge moyen est de = 62,6 ans (48-78).

Les del ATM sont réparties selon le stade de Binet en 9 stades B et 7 stades C.

Médiane de survie de ce groupe : non atteinte

Temps moyen de survie est de 50,2 mois (37,8 – 62,6).

Nous relevons 04 décès dans ce groupe.

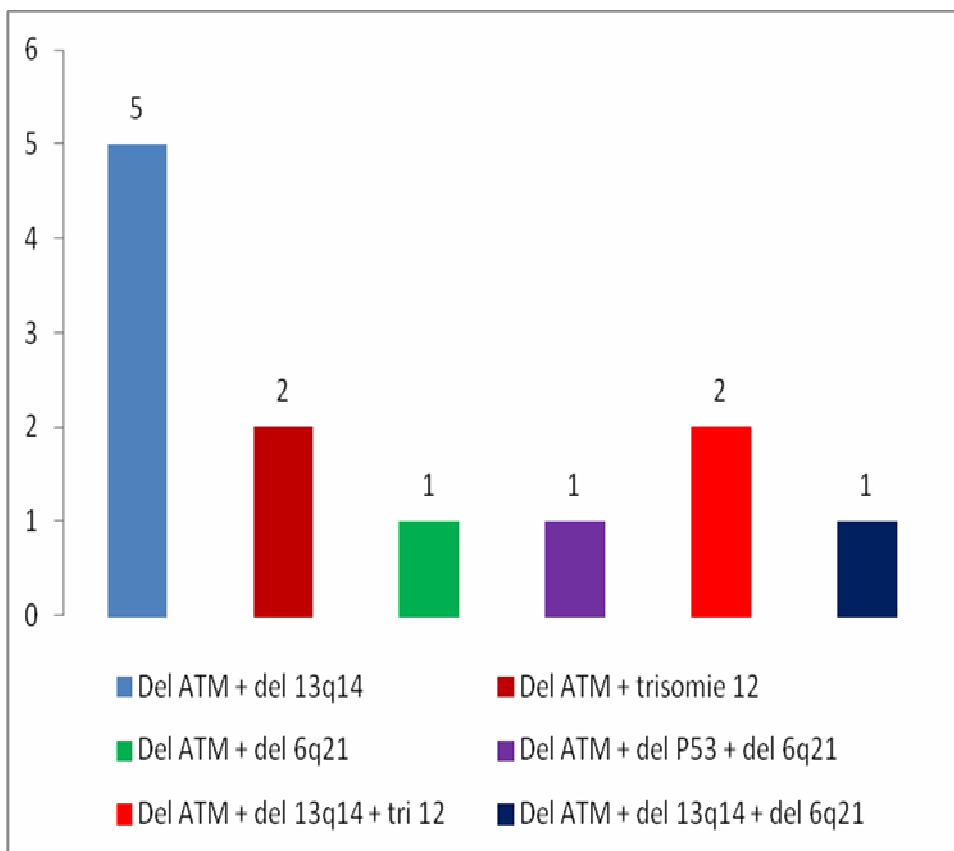


Figure 14 : Représentation de la del ATM associée

II.1.2.3.2.4 Délétion P53

Elle est retrouvée chez 15 pts (15 %)

Elle est isolée dans 2 cas.

Elle est associée chez 13 pts (**Figure 15**)

- del P53 + tri 12 = 4 cas.
- del P53 + del 13q14 = 6 cas dont une del 13q14 bichromosomique.
- del P53 + del 6q21 = 2 cas.
- del P53 + del ATM + del 6q21 = 1 cas.

Age moyen = 64 ans (49-76), un patient est âgé de moins de 50 ans dans ce groupe

Les del P53 sont réparties selon le stade de Binet en :

- stade A : 2 cas
- stade B : 2 cas
- stade C : 11 cas

Médiane de survie : 28 mois.

Temps moyen de survie est de 29 mois (18,4 - 39,5)

Nous relevons 07 décès dans ce groupe.

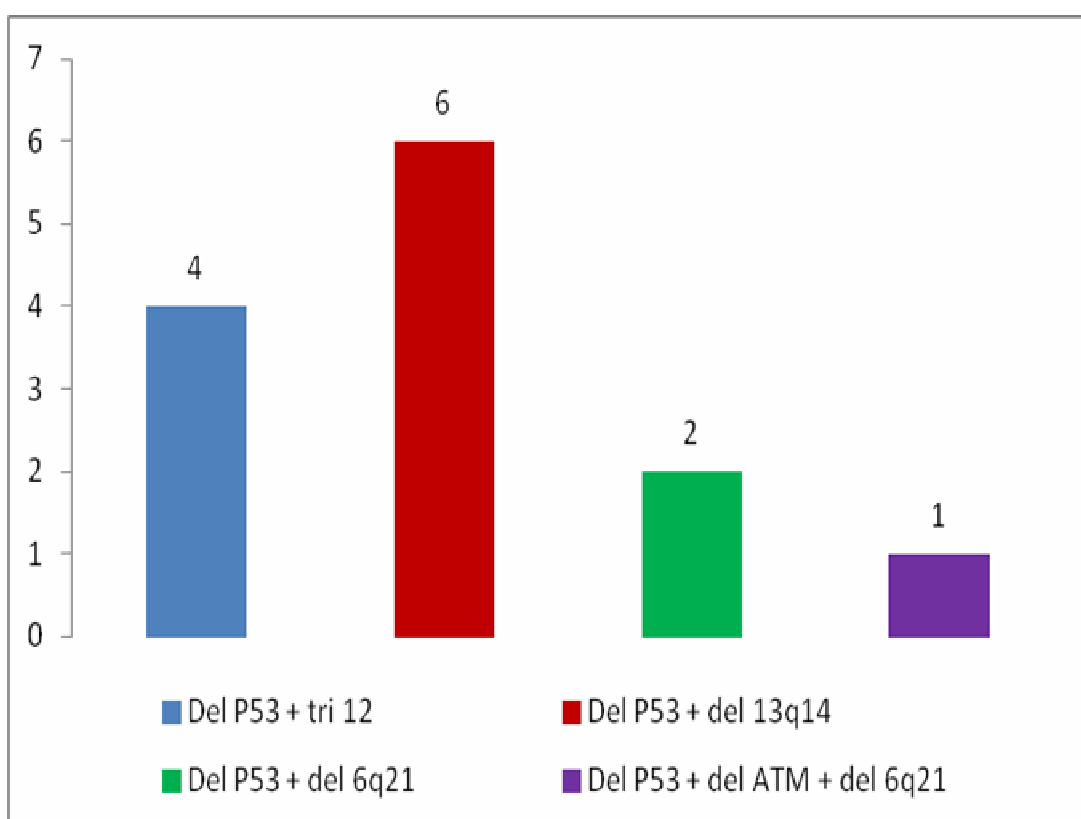


Figure 15 : Représentation de la del P53 associée

II.1.2.3.2.5 Délétion 6q21

Elle est retrouvée dans 12 cas (12 %).

Elle est isolée dans un cas.

Elle est associée à une del P53 deux fois, à une del ATM une fois, à une del 13q14 cinq fois, à une del 13q14+del ATM deux fois, del ATM+ del P53 une fois (**Figure 16**).

Médiane de survie non atteinte. Temps moyen de survie est de 65 mois.

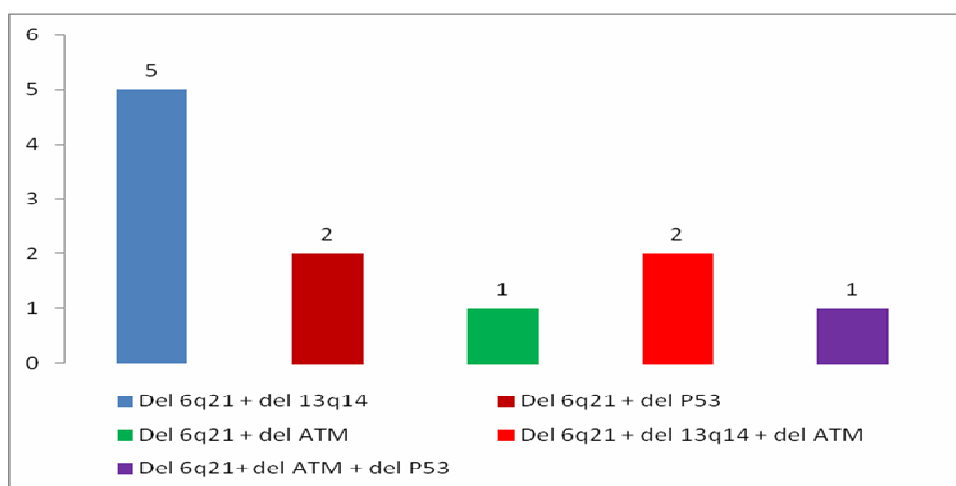


Figure 16 : Représentation de la del 6q21 associée

II.1.2.3.3 Répartition des anomalies cytogénétiques selon le stade de Binet

Stade A : 17 pts (**Figure 17**)

- **Aucune anomalie** = 2 cas (11,7%)

- Les anomalies récurrentes ont été retrouvées dans 88,3%.

- **del 13q14** : - 10 cas de del 13q14 isolées dont une biallélique et une biclonale (58,8%)

- un cas, associée à une del 6q21.

- **trisomie 12** : 3 cas (17,6 %), isolée dans 2 cas, associée à la P53 dans un cas.

- **del P53** : 2 cas, isolée dans un cas (11,7%).

- **del 6q21** un cas, associée à la del 13q14 (5,8%)

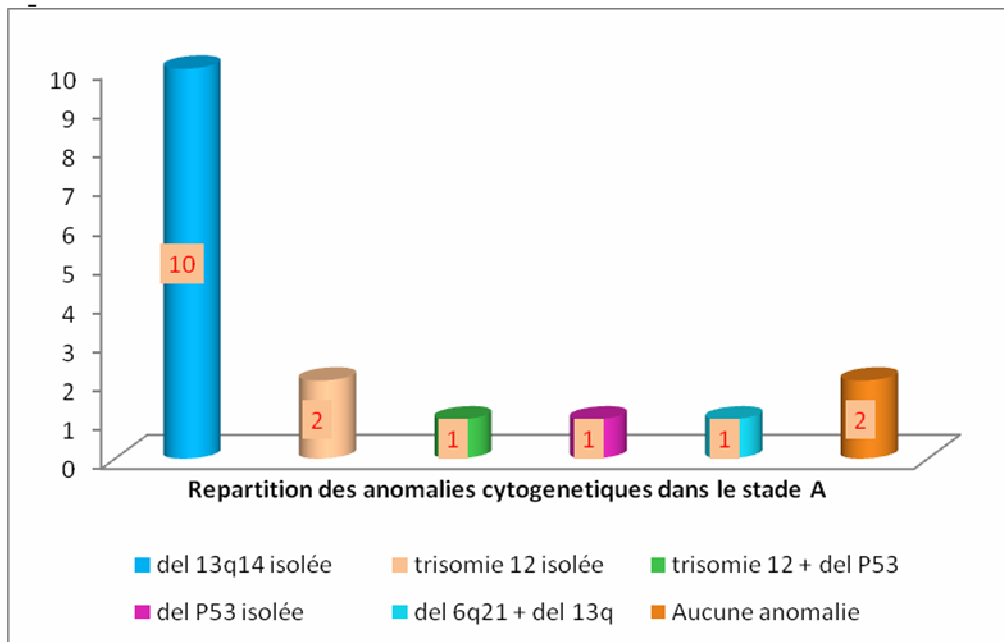


Figure 17 : Anomalies cytogénétiques au stade A

Stade B : 38 cas (**Figure 18**)

- **Aucune anomalie** : dans 12 cas

- **Les anomalies récurrentes** : sont retrouvées dans 68,4%.

- **del 13q14** : La del 13q14 est isolée dans 4 cas (10,5%).

- **Trisomie 12** : 9 cas (23,7%)

- isolée dans 7 cas (18,4%)

- associée à la del 13q14 dans 1 cas, à la del ATM dans un cas.

- **délétion ATM** : 9 cas (23,7%)

- isolée dans 2 cas.

- associée à la trisomie 12 dans un cas, à la del 13q14 dans 6 cas

- **délétion P53** : 2 cas (5,2%), toutes associées, une fois à une del 13q14 et une fois à une del 6q21.

- **del 6q21** : 5 cas (13 %) toutes associées, à la del 13q14 dans 3 cas, à la del P53 dans un cas, et à la del 13q14 et la del ATM dans un cas.

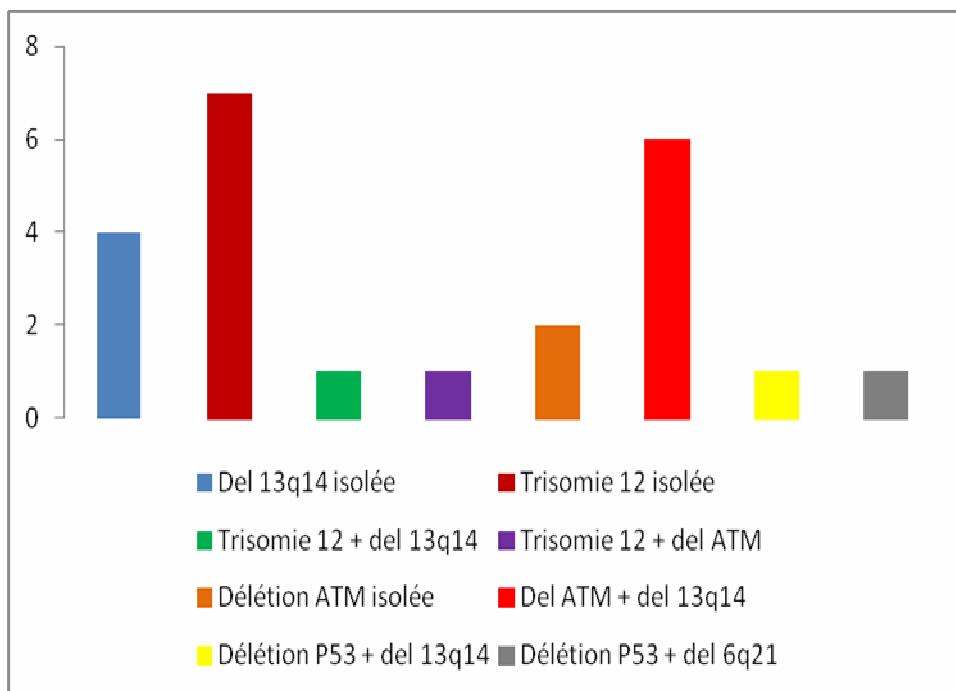


Figure 18 : Anomalies cytogénétiques au stade B

Stade C : 45 pts (Figure 19)

- **Aucune anomalie** : 6 cas

- **Les anomalies récurrentes** : sont retrouvées dans 86,6%.

- **Délétions 13q14 isolées** : 13 cas = 28,8 %, dont une biallélique et 3 biclonales.

- **Trisomies 12** : retrouvée dans 13 cas, isolées dans 6 cas (13,3%), associée à la del 13q14 dans un cas

- **Délétion ATM** : retrouvée dans 7 cas (15,5 %), isolée dans un cas, associée à une del P53 dans un cas.

- **Délétion P53** : retrouvée dans 11 cas (24,4 %), isolée dans un seul cas.

- **Délétion 6q21** : retrouvée dans 5 cas, dont une isolée.

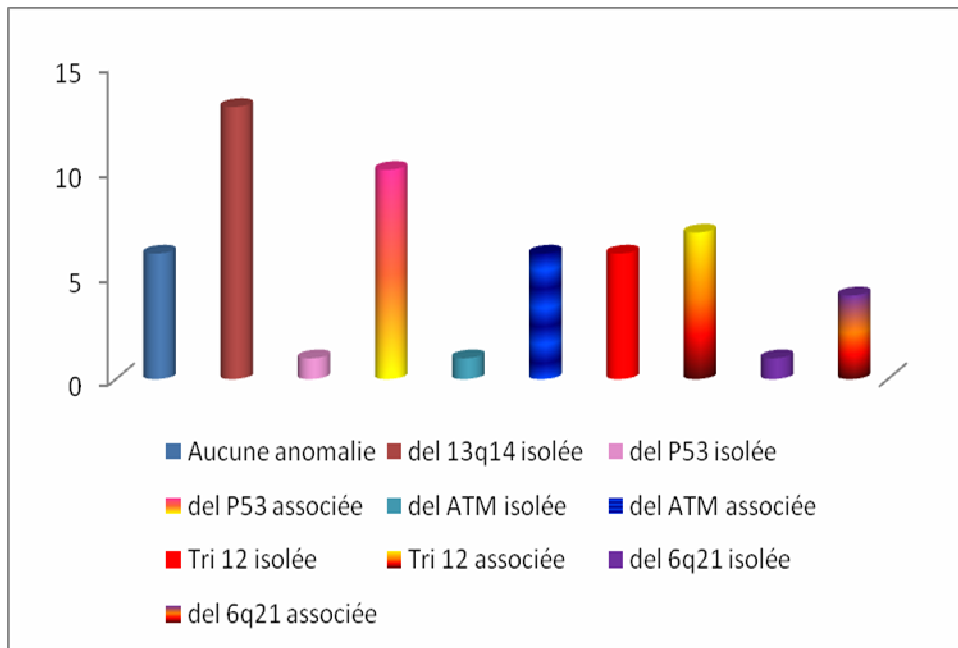


Figure 19 : Anomalies cytogénétiques par FISH au stade C

II.1.2.3.4 Comparaison des résultats par caryotype et FISH : (Tableau VIII)

■ Dans 13 cas l'absence d'anomalie en caryotype a été confirmée par la FISH

■ Dans 15 cas (53,6%) chez qui le caryotype n'a pas retrouvé d'anomalies, la FISH a retrouvé des anomalies observées dans un clone minoritaire dans la plupart des cas :

il s'agit d'une :

- trisomie 12 dans 5 cas dont 2 isolées
- del 13q14 dans 9 cas dont 7 isolées ; parmi les 9 cas il y a une biclonale et une biallélique
- del ATM dans un cas, associée à une tri 12
- del P53 dans 3 cas dont une isolée
- del 6q21 dans 2 cas, toutes associées.

■ Dans 2 cas : la FISH a été contributive en montrant un petit clone de del 6q21 non révélé au caryotype dans le premier cas ; dans le deuxième cas, le caryotype a retrouvé une del 14q13q31 non ciblée par l'examen en FISH (**Tableau VIII**)

N°	sexe	âge	caryotype	FISH (clone en %)
1	M	68	Normal	del 13q14 isolée (17 %)
2	M	48	Normal	del 13q14 isolée bichromosomale (41 %)
3	M	65	Normal	del 13q14 isolée (12 %)
4	M	63	Normal	del 13q14 isolée (16 %)
5	M	66	Normal	del 13q14 isolée (10 %)
6	F	51	Normal	del 13q14 isolée (50 %)
7	M	47	Normal	del 13q14 isolée (11 %)
8	M	50	Normal	Trisomie 12 isolée (39 %)
9	F	64	Normal	Trisomie 12 isolée (67 %)
10	M	52	Normal	del P53 isolée (12 %)
11	M	57	Normal	Trisomie 12 (65 %) + del P53 (18 %)
12	M	59	Normal	Trisomie 12 (53 %) + del ATM (63 %)
13	M	70	Normal	del P53 (18 %) + del 6q21 (17 %)
14	M	54	Normal	del 13q14 biallélique (78 %) + del 6q21 (20 %)
15	M	67	Normal	Trisomie 12 (15%) + del 13q14 (16%)
16	M	49	del(17)(p13)	del P53 + del 6q21 (12 %)
17	M	66	Trisomie 12 + del 14q13q31	Trisomie 12 isolée (68 %)

Tableau VIII: Comparaison des résultats par caryotype et FISH

II.1.2.3.5 Expression du CD38 (Tableau IX et Figure 20)

Le seuil utilisé dans notre étude pour la positivité du CD 38 est $\geq 30\%$.

Le CD38 a été fait dans 121 cas.

II.1.2.3.5.1 CD 38 négatif : 60 pts (49,6 %) :

- Age moyen de cette population est de 64 ans (38-80)
- Stade A = 13 cas, stade B = 16, stade C = 31 cas.
- Sexe : Homme = 42, Femme = 18
- Cytologie :
 - typique dans 48 cas
 - atypique dans 11 cas
 - LLC/PL dans un cas.
- Cytogénétique non faite : 13 cas.
- Aucune anomalie cytogénétique dans 7 cas.

- Anomalies récurrentes retrouvées dans 40 cas sur 47 = 85,1 %
- La délétion 13q14 isolée dans 20 cas (42,5 %), dont 4 biclonales et 2 bialléliques.
- Une trisomie 12 isolée dans 7 cas, associée dans 4 cas : à la del 13q14 dans 1 cas, à la del P53 dans 2 cas, à la del 13q14 + del ATM dans un cas. Les trisomies 12 en totalité représentent 23,4%
- Une del ATM associée dans cinq cas : à la del 13 q14+ trisomie 12 dans un cas, à la del 13q14 dans deux cas, à la del P53+del 6q dans un cas, à la del 13q14 + del 6q21 dans un cas. La del ATM représente 10,6 %. Une association de très haut risque est représentée par un cas ayant une del ATM + del P53 + del 6q21.
- Une del P53 isolée dans un cas, elle est associée dans 6 cas (à la del 13q14 deux fois, à la del 6q21 une fois, à la trisomie 12 deux fois, à la del ATM + del 6q21 une fois. La del P53 représente 14,9 % du groupe.
- Une délétion 6q21 est retrouvée dans 3 cas, toutes associées : à la del P53, à la del P53 + del ATM, à la del 13q14 + del ATM.

II.1.2.3.5.2 CD 38 positif : 61 cas (50,4 %)

- Age moyen : 64,7 % (47- 91)
- sexe : Homme = 45 cas, Femme = 16 cas
- Stade A = 5 cas, stade B = 31 cas, stade C = 25 cas.
- cytologie : typique = 51 cas, atypique = 8 cas, LLC/PL = 2 cas.
- La cytogénétique non faite chez 15 patients.
- Aucune anomalie dans 10 cas
- Les anomalies récurrentes sont retrouvées dans 36/46 = 78,2 %
 - La del 13q14 isolée = 5 cas (10,8 %)
 - La trisomie 12 isolée 8 cas ou associée dans 6 cas : à la del 13q14 dans 1 cas, associée à une del P53 dans 2 cas et à une del ATM dans 2 cas, à la del 13q14 + del ATM une fois. Toutes les trisomies 12 représentent 30,4%
 - La del ATM isolée dans 3 cas ou associée dans 7 cas : à une del 13q14 dans 2 cas, à une trisomie 12 dans 2 cas, à une del 6q21 dans un cas, à une del 13q14 + tri 12 dans un cas, à une del 13q14 + del 6q21 dans un cas.

Toutes les del ATM représentent 21,7 %.

- La del P53 isolée dans un cas, associée dans 7 cas : à une del 13q14 dans 4 cas, à une trisomie 12 dans 2 cas, à une del 6q21 dans un cas. Toutes les del P53 représentent 17,4 %
- La del 6q21 isolée dans un cas, associée dans 6 cas : del ATM une fois, del 13q14 + del ATM une fois, la del 13q14 dans 3 fois, la del P53 une fois. La del 6q21 représente 15,2 %.

	CD38 Négatif	CD38 Positif	p
Nombre	60 cas (49,6 %)	61 cas (50,4 %)	0,940
Age moyen (ans)	64 (38 – 80)	64,7 (47 - 91)	0,959
Sexe (cas)	H = 42 F = 18	H = 45 F = 16	0,792 0,779
Stades	A = 13 B = 16 C = 31	A = 5 B = 31 C = 25	0,037 0,006 0,238
Cytologie (cas)	Typique : 48 Atypique : 11 LLC/PL = 1	Typique = 51 Atypique = 8 LLC/PL = 2	0,607 0,430 0,568
Cytogénétique faite	47 cas (78,3 %)	46 cas (75,4 %)	0,703
Anomalies récurrentes	40 cas (85,1%)	36 cas (78,2 %)	0,393
del 13q14 isolée	20 cas (42,5%)	5 cas (10,8 %)	0,0005
Trisomie 12	11 cas (23,4 %)	14 cas (30,4 %)	0,444
- Isolée	7 cas	8 cas	
- Associée	4 cas	6 cas	
del ATM	5 cas (10,6 %)	10 cas (21,7 %)	0,145
- Isolée	0 cas	3 cas	
- Associée	5 cas	7 cas	
del P53	7 cas (14,9 %)	8 cas (17,4 %)	0,743
- Isolée	1 cas	1 cas	
- Associée	6 cas	7 cas	
del 6q21	3 cas (6,4 %)	7 cas (15,2 %)	0,293
- Isolée	0 cas	1 cas	
- Associée	3 cas	6 cas	

Tableau IX : Expression du CD 38 selon l'âge, le sexe, le stade, la cytologie et les anomalies cytogénétiques

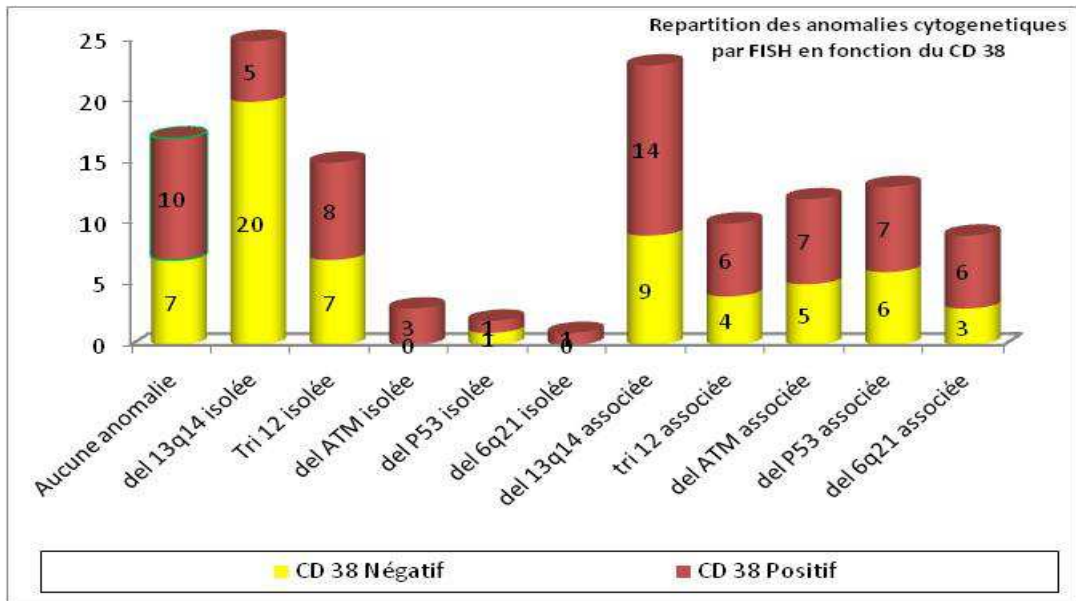


Figure 20: Anomalies cytogénétiques dans les groupes CD38+ et CD38-

II.1.3 Courbes de survie des pts n'ayant pas reçu le FC ou le RFC

II.1.3.1 Courbe de survie globale

Elle montre (Figure 21)

- une médiane de survie non atteinte
- une survie à 2 ans de 66,9 %, à 4 ans de 55,3 %
- un plateau à 50,7 % après 54 mois

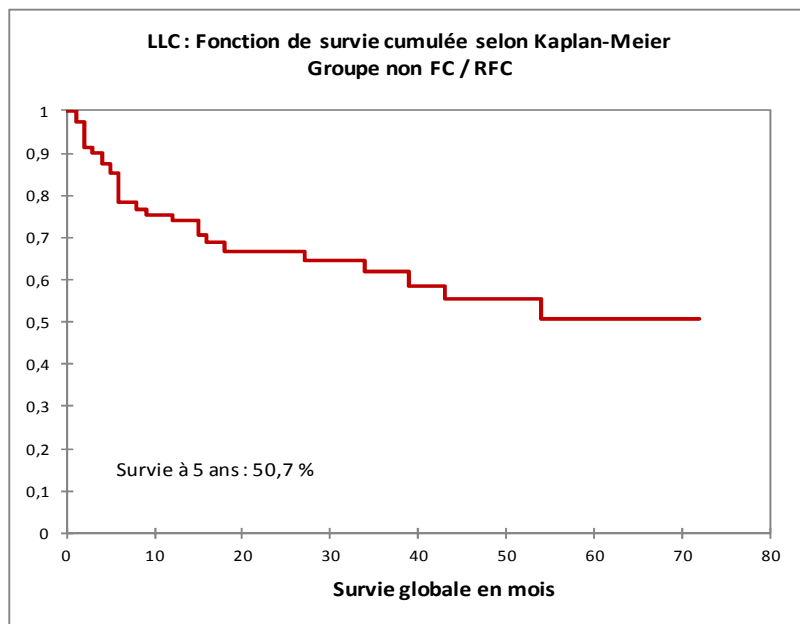


Figure 21 : Courbe de survie globale du groupe Non FC/RFC

II.1.3.2 Courbe de survie globale selon le stade de Binet

La courbe de survie globale de ce groupe Non FC ou RFC selon le stade de Binet montre (**Figure 22**)

- une médiane de survie non atteinte pour le stade A
- un plateau à 84,7 % après 16 mois pour le stade A
- une médiane de survie non atteinte pour le stade B
- un plateau 51,1 % après 54 mois pour le stade B
- une médiane de survie à 27 mois pour le stade C
- un plateau à 35,9 % après 39 mois pour le stade C

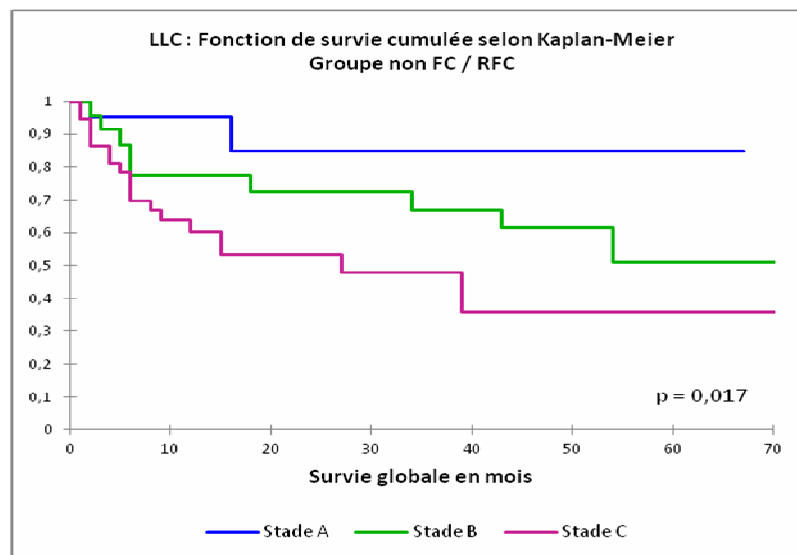


Figure 22 : courbe de survie globale du groupe Non FC ou RFC selon le stade de Binet

II.1.3.3 Courbe de survie globale selon le CD 38

La courbe de survie selon le CD 38 de ce groupe Non FC/ RFC montre (**figure 23**) :

- Pour le CD 38 négatif :
- une médiane de survie non atteinte
 - une survie à 2 ans de 76,1 %, une survie à 4 ans de 69,2 %
 - un plateau à 69,2 % après 44 mois
- Pour le CD 38 positif :
- une médiane de survie à 34 mois
 - une survie à 2 ans de 57,6 %, une survie à 4 ans de 39,5 %
 - un plateau à 26,3 % après 54 mois

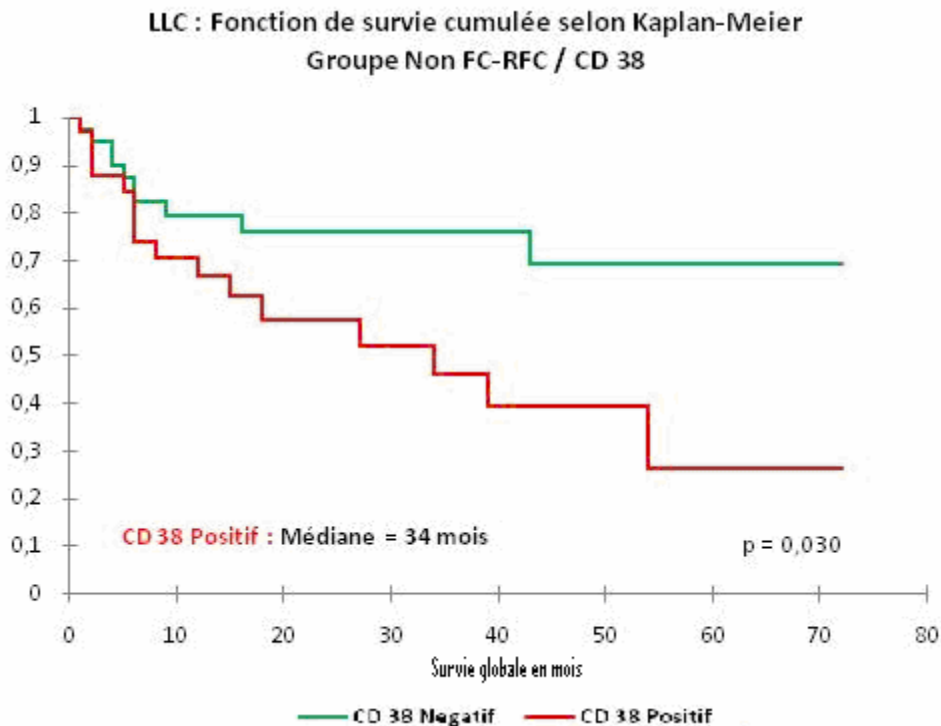


Figure 23 : Courbe de survie selon le CD 38 du groupe Non FC/ RFC

II.1.3.4 Courbe de survie globale selon les anomalies cytogénétiques (FISH)

La courbe de survie globale du groupe Non FC/RFC selon les anomalies cytogénétiques par FISH montre (**Figure 24**) :

- une médiane de survie non atteinte pour les pts :
 - présentant une del 13q14 isolée
 - présentant une del 6q21
 - ayant une délétion P53
 - ayant une délétion ATM
- une médiane de survie à
 - 43 mois pour les pts ayant une trisomie 12
 - 54 mois pour les pts ne présentant aucune anomalie

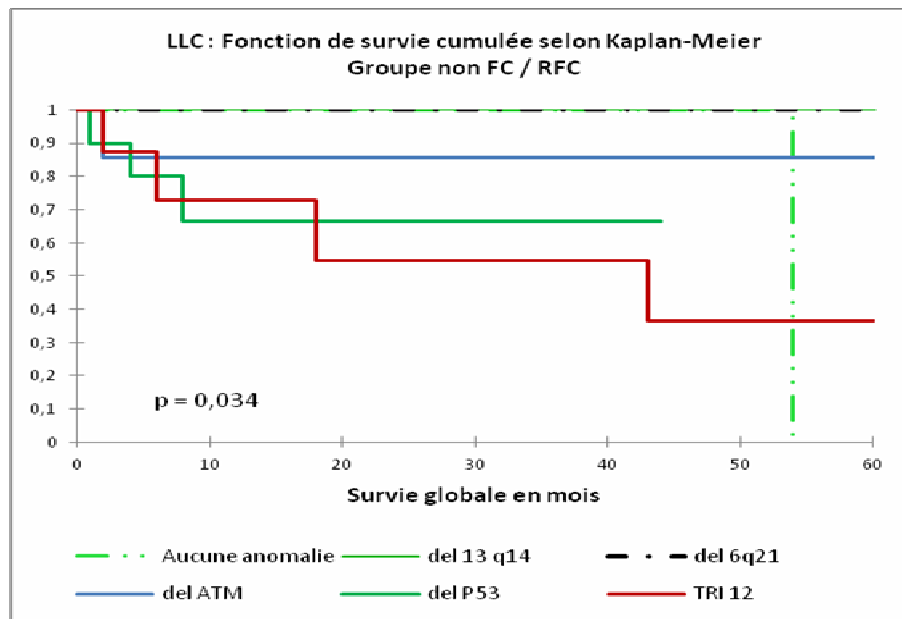


Figure 24 : Survie globale selon les anomalies cytogénétiques (FISH) du groupe Non FC/RFC

La courbe de survie sans événements n'a pas été établie pour ce groupe en raison de son hétérogénéité et des critères d'évaluation différents de ceux du NCI.

II.1.4 Résultats du protocole Fludarabine + Cyclophosphamide : FC

II.1.4.1 Caractéristiques des patients

Ce protocole a été appliqué chez 36 patients, 7 femmes, 29 hommes, sexe ratio = 4,1.

L'âge moyen est de 59 ans (37- 73) ; un patient dont l'âge dépasse 70 ans, sans comorbidité, avec un âge physiologique plus jeune, est mis sous ce protocole, il avait un stade C, particulièrement évolutif.

Pas d'antécédents personnels de cancer.

Les cancers familiaux sont retrouvés dans 4 cas; et se répartissent selon le type et le lien de parenté comme suit :

- mère : un adénocarcinome de la vésicule biliaire.
- nièce : néoplasie du sein, histologie non précisée.
- père : adénocarcinome de la prostate
- Sœur : néoplasie de caractères non précisés.

La profession : deux professions prédominantes sont les fonctionnaires (agents administratifs et enseignants) et les agriculteurs.

Le délai diagnostique moyen est de 5,4 mois (1 - 24).

L'examen clinique

L'ECOG = 0 : 16 patients ; = 1 : 8 patients ; = 2 : 12 patients.

Nous avons retrouvé une forme bulky avec adénopathies de 12 cm de grand diamètre, et 12 cas avec un débord splénique dépassant 6 cm.

L'atteinte ORL est présente dans 4 cas, avec une hypertrophie amygdalienne unilatérale dans deux cas et bilatérale dans deux cas.

L'atteinte hépatique est retrouvée dans 3 cas.

Une atteinte cutanée a été notée dans un cas, sous forme de bourgeonnement au niveau de la joue dont la biopsie avec étude histologique a retrouvé une infiltration lymphocytaire.

Une infection au diagnostic est retrouvée dans 3 cas : un phlegmon amygdalien, une infection urinaire et une otite.

L'atteinte tumorale profonde appréciée par le bilan radiologique est présente au niveau médiastinale dans 11 cas, et sous diaphragmatique de manière constante.

Hémogramme

Une hyperleucocytose constante moyenne de $137,9 \times 10^9/L$ (48,5 – 519,6) ; faite d'une hyperlymphocytose avec une moyenne de $128 \times 10^9/L$ (32,6 – 514,4).

Taux moyen de PN = 5670/ μl ; un taux moyen Hb = 9,7 g/l (4,7 – 13,6) ; un taux moyen des plaquettes = $119 \times 10^9/L$ (26 – 307)

Frottis sanguin

Il retrouve 34 cas de LLC typique à petits lymphocytes matures, avec moins de 10% de grands lymphocytes et moins de 15 % de prolymphocytes.

Une LLC atypique est notée dans 2 cas avec au frottis sanguin, un contingent de grandes cellules égal respectivement à 10 % et 26 % ; dans 3 cas de LLC on note la présence de prolymphocytes entre 15 % et 55 %.

Les LLC variantes sont associées à un score de Matutes égal à 3 dans un cas ; il n'a pas de trisomie 12 dans ce groupe immunophénotypique.

Le medullogramme a été pratiqué de manière systématique ; il retrouve une infiltration lymphocytaire égale en moyenne à 83 % (49 - 100)

La cytométrie en flux a été pratiquée de manière systématique et retrouve un score de Matutes à 5 chez 13 patients, un score à 4 chez 22 patients, un score à 3 chez un patient.

Le CD38 est positif chez 23 pts (63,8 %), dont 14 (61,9%) font partie du stade C.

Dans le cadre des complications :

Le test de Coombs est négatif dans tous les cas.

L'électrophorèse des protéines faite dans tous les cas montre une hypogammaglobulinémie < 7g/l dans 7 cas.

Pour le bilan pronostique :

La classification selon Binet stratifie nos pts en 16 pts au stade B et 20 pts au stade C.

LDH faite chez tous les pts, élevée chez 10 pts.

La β 2 micro globuline pratiquée chez 29 pts; élevée chez 14 pts (48,2%).

CRP positive chez 5 pts sur 33 cas faits (15,1%).

La PBO a été faite de manière systématique : elle retrouve une infiltration diffuse dans 26 cas, une infiltration interstitielle dans 4 cas, et une infiltration nodulaire dans 5 cas.

Une PBO n'a pas pu être interprétée du fait de la mauvaise qualité du prélèvement.

II.1.4.2 Données cytogénétiques pour le groupe FC

II.1.4.2.1 Résultats du caryotype

Réalisé dans 18 cas / 36 (50 %), il n'a pas révélé d'anomalies dans 11 cas (61 %)

Les anomalies retrouvées dans 7 cas (39%) sont représentées par :

- une del 13q14 isolée dans 2 cas.
- Une trisomie 12 isolée dans un cas.
- Une del ATM isolée dans un cas.
- Une trisomie 12 associée dans deux cas, une fois à une del 13q14 et une fois à une del(14)(q13q31).
- Une del 17p isolée dans un cas.

II.1.4.2.1 Résultats de la FISH

L'hybridation in situ fluorescente a été pratiquée chez 29 pts ; 7 pts n'ont pas bénéficié de l'étude cytogénétique par FISH par manque de réactifs au début de notre recrutement.

Sur les 29 pts, on retrouve 23 cas ayant des anomalies (79,3%) : anomalie simple dans 13 cas, 2 anomalies dans 8 cas, 3 anomalies dans 2 cas.

La délétion 13q14 isolée est retrouvée dans 6 cas ($6/29 = 20,6\%$) dont 4 monoalléliques et 2 biclonales.

La délétion 13q14 est associée dans 7 cas : à une del P53 une fois, à une del 6q21 trois fois, à une trisomie 12 deux fois, et à une del ATM et del 6q21 une fois.

La trisomie 12 : 7 cas (30,4 %), est isolée dans 4 cas, associée dans deux cas à la del 13q14 et une fois à la del ATM.

La délétion ATM : 5 cas (21,7%), dont deux isolée et trois associées (del 6q21, tri 12, del 13q14 + del 6q21)

La délétion P53 : a été retrouvée dans 3 cas (13%), isolée dans un cas, associée une fois à la del13q14 et une fois à la del 6q21.

La délétion 6q21 est toujours en association, trois fois à une del 13q14 dont une biallélique, une fois à la del ATM, une fois à la del P53, et une fois à la del 13q14 + del ATM.

II.1.4.3 Evaluation du protocole FC selon les critères du NCI

Le protocole FC a été administré en injectable chez 31 patients, et pour raison d'éloignement des patients et difficultés d'hébergement nous avons préféré la voie orale pour 5 patients.

Le nombre de cures préconisé est de 6, reçu par 31 patients.

05 patients ont arrêté leurs traitements précocement : leurs caractéristiques sont comme suit :

- Une patiente a reçu 5 cures, âgée de 69 ans, Matutes 5, CD38 positif, en stade C, ayant une infiltration interstitielle à la PBO, une trisomie 12 isolée.

Protocole arrêté pour une neutropénie grade 4 de plus de 2 mois + une asthénie profonde. La patiente est vivante en RC maintenue avec une survie de 39 mois.

- Deux patients ont reçu 4 cures

- Une patiente âgée de 57 ans, Matutes = 4, CD38 positif, stade C, ayant une infiltration diffuse à la PBO. FISH non faite. Le protocole est arrêté suite à une infection pulmonaire sévère et trainante.

La patiente progresse rapidement en un intervalle de 3 mois et décède en échec avec une survie globale de 13 mois.

- Un patient âgé de 69 ans, Matutes 4, CD38 positif, en stade C, ayant une infiltration nodulaire à la PBO et une délétion ATM isolée.

Le protocole est arrêté pour progression et infection pleuro-pulmonaire sévère et létale, avec une survie globale de 17 mois

- Deux patients ont reçu 3 cures :

- Patient âgé de 48 ans, Matutes = 4, CD38 négatif, stade C, une infiltration diffuse à la PBO et une délétion 13q14 isolée. Le protocole est arrêté pour traitement antituberculeux sans preuves radiologique ni bactériologique. Patient vivant en RPN avec une survie de 49 mois.

- La deuxième patiente âgée de 65 ans, Matutes = 4, CD38 négatif, stade C, une infiltration nodulaire à la PBO et une del 13q14 biclonale.

Protocole arrêté pour neutropénie grade 4 prolongée. La patiente est vivante en rechute avec une survie de 39 mois.

L'évaluation de tous les patients selon les critères du NCI retrouve :

Une rémission complète obtenue chez 15 patients soit 41,6 %.

Une RPN chez 14 patients (38,8 %).

Trois rémissions partielles (8,3 %).

Un échec chez 4 patients (11,1%).

La réponse globale qui regroupe les RC + RPN + RP est de 89 %

Répartition de nos résultats selon le stade Binet :

Stade B (16 pts) : RC = 8 pts (50 %), réponse globale = 100 %

Stade C (20 pts) : RC = 7 pts (35%), réponse globale = 80 %

II.1.4.3 Evaluation de la toxicité du protocole FC

Sur 205 cycles reçus

Une neutropénie grade 3 dans 10 cycles/ 205 (4,8 %) et grade 4 dans 20 cycles/205 (9,8 %) soit 14,6% des cycles. Elle a été observée chez 30 pts sur 36 (83,2%). Une lymphopénie à moins de 400/ μ l est notée dans 7,3% des cycles. Une anémie grade 3-4 a été notée chez 10 pts (27,6%), une thrombopénie grade 3 chez 2 pts (5,5%) soit 1,4% des cycles. Durée moyenne d'aplasie de 10,8 jours sans GCSF.

Complications infectieuses : 65 épisodes infectieux ont été relevés (31,7%) qui sont pour la majorité des infections gérables traitées par antibiothérapie en ambulatoire.

Nous déplorons un décès (2,8%) suite à une infection pleuro pulmonaire grave traitée en hospitalier avec évolution défavorable, chez un patient en progression.

Une infection pulmonaire interstitielle est notée chez une patiente chez qui le traitement en hospitalier a fait régresser les signes mais avec récurrence itérative dès l'arrêt de l'antibiothérapie ; la patiente ayant arrêté le protocole FC après 4 cures pour neutropénie grade 4 prolongée, a rapidement progressé et est décédée en échec thérapeutique.

Deux patients ont présenté des lésions vésiculeuses en particulier du dos et des avant bras, traitées par aciclovir 200 mg, 3 cp/J pendant 5 jours. Evolution favorable et la reprise du protocole a été sans incidents notables, les patients étant maintenus sous 2cp/j d'aciclovir tous les jours.

Un patient a présenté une tuberculose pulmonaire documentée, 24 mois après la fin de la chimiothérapie, avec suite favorable sous traitement antituberculeux pendant 6 mois.

II.1.4.4 Devenir des patients sous protocole FC

Sur 15 RC, 10 patients (66,6 %) sont toujours vivants en RC ; 5 patients ont rechuté (33,3 %) après un délai moyen de rechute de 24 mois (9 – 40) dont 3 sont décédés.

Sur les 14 patients en RPN :

- 5 patients sont vivants toujours en RPN.
- Un patient est perdu de vue en RPN après suivi de 12 mois ; il est considéré décédé.
- Huit patients ont rechuté (57 %) après un délai moyen de 19,8 mois (9 – 46) dont trois sont décédés.

Sur les 3 patients en RP :

- Un patient (aucune anomalie) a rapidement progressé (5 mois de la fin de la chimiothérapie) ; il est considéré comme réfractaire à la fludarabine.
- Deux patients ont rechuté après 9 mois (del P53) et 12 mois (del 13q14 biallélique + del 6q21) de la fin de la chimiothérapie ; après deuxième ligne thérapeutique type RFC, un patient est décédé en échec après 4 cures (SG = 46 mois), le deuxième patient est toujours vivant à sa troisième ligne thérapeutique ; il est en RP.

Les 4 patients en échec sont décédés ; ils sont tous du stade C, avec CD38 positif, une infiltration diffuse à la PBO dans 3 cas sur 4 ; deux patients ont eu une étude cytogénétique qui a retrouvé une del ATM isolée dans un cas et une del P53 + del 6q21 dans un autre cas.

II.1.4.5 Courbes de survie : Protocole FC

II.1.4.5.1 Courbe de survie globale : protocole FC

La survie globale est (**Figure 25**) :

- de 88,9 % à 2 ans, de 67,5 % à 4 ans
- en plateau de 54 % après 5 ans ; La médiane de survie n'est pas atteinte

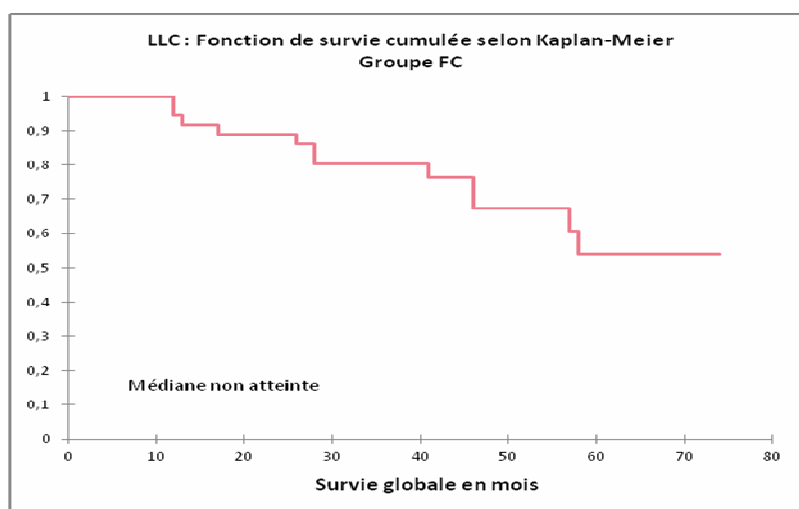


Figure 25 : Courbe de survie globale : protocole FC

II.1.4.5.2 Courbe de survie sans événements du groupe FC

Elle montre (**Figure 26**) :

- une médiane de survie à 39 mois
- une survie de 62,1 % à 2 ans, une survie de 42 % à 4 ans
- un plateau de 31,5 % après 51 mois

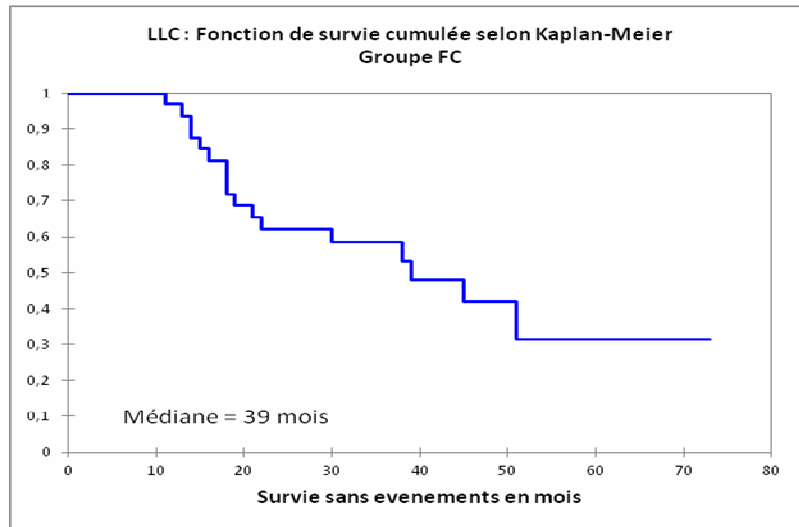


Figure 26 : Courbe de survie sans événements du groupe FC

II.1.4.5.3 Courbe de survie globale du groupe FC selon le stade de Binet

Elle montre (**Figure 27**):

- stade B : une médiane de survie non atteinte, un plateau à 72,5 % après 58 mois
- stade C : une médiane de survie 57 mois, un plateau de 35,6 % après 57 mois

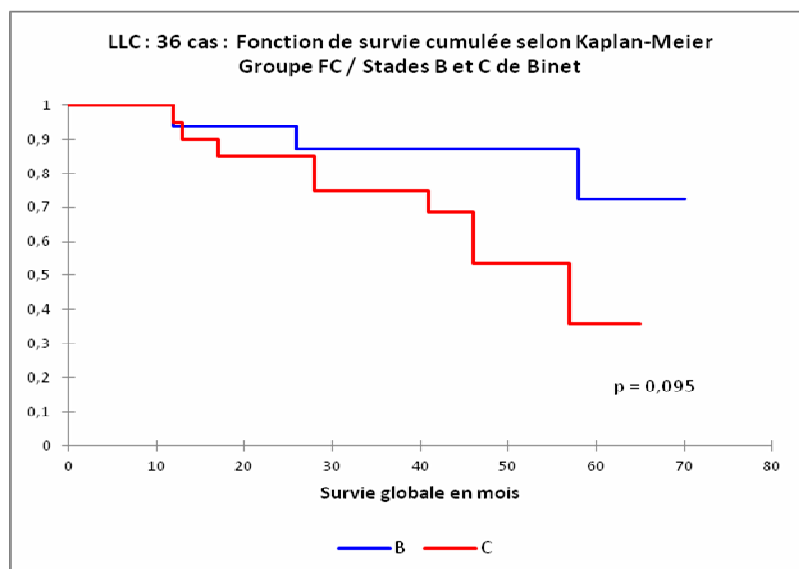


Figure 27 : Courbe de survie globale du groupe FC selon le stade de Binet

II.1.4.5.4 Courbe de survie sans événements selon le stade de Binet du groupe FC

Elle montre (**Figure 28**):

- Pour le stade B :
 - une médiane de survie à 38 mois
 - une survie à 2 ans de 68,2 %
 - une survie à 4 ans de 45,5 %
 - un plateau de 45,5 % après 38 mois

- Pour le stade C :
 - une médiane de survie à 39 mois
 - une survie à 2 ans de 56,3 %
 - une survie à 4 ans de 34,3 %
 - un plateau de 17,1 % après 51 mois

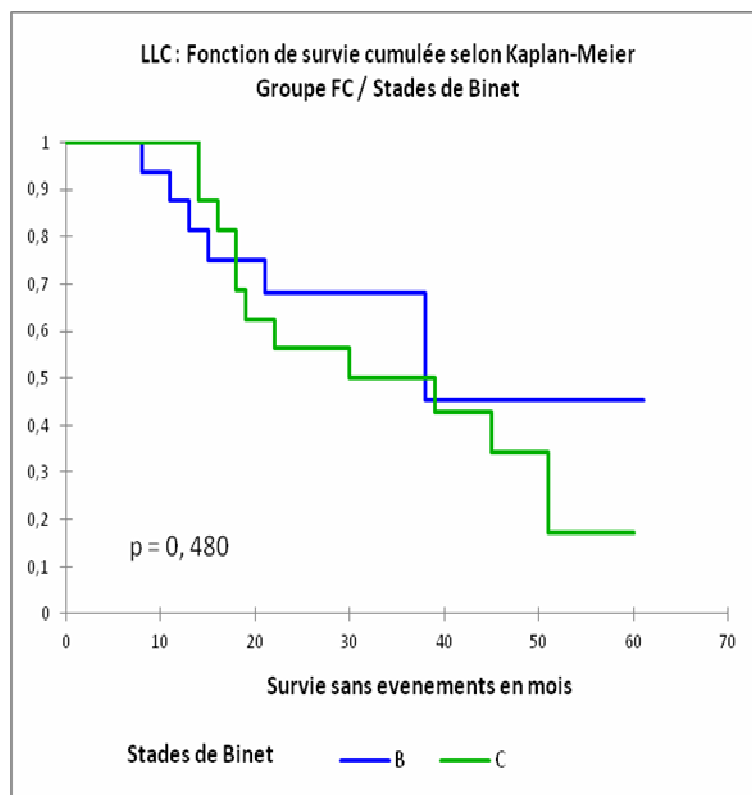


Figure 28 : Courbe de survie sans événements selon le stade de Binet du groupe FC

II.1.4.5.5 Courbe de survie globale du groupe FC selon la $\beta 2$ microglobuline

Elle montre (**Figure 29**) : une médiane de survie non atteinte pour le groupe positif, de 58 mois pour le groupe négatif

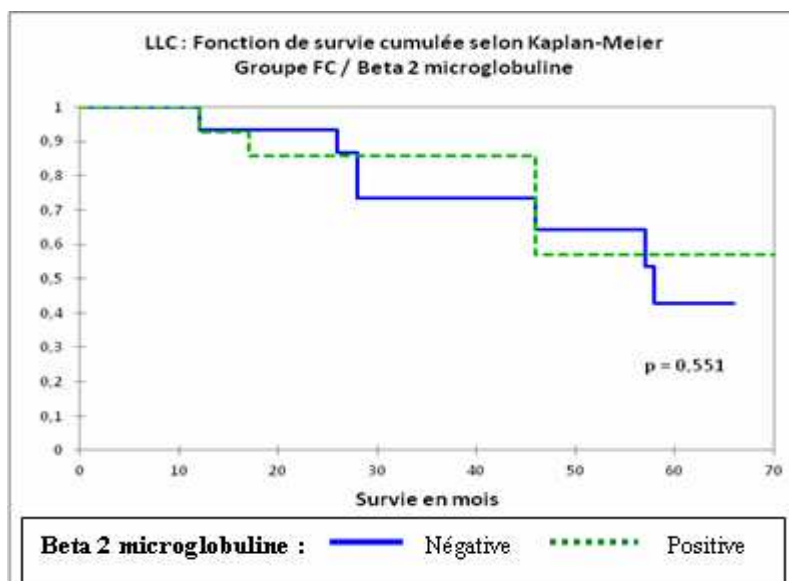


Figure 29 : Courbe de survie globale du groupe FC selon la $\beta 2$ microglobuline

II.1.4.5.6 Courbe de survie sans événements du groupe FC selon la $\beta 2$ microglobuline

Elle montre (**figure 30**): une médiane de survie de 39 mois pour le groupe positif, de 38 mois pour le groupe négatif.

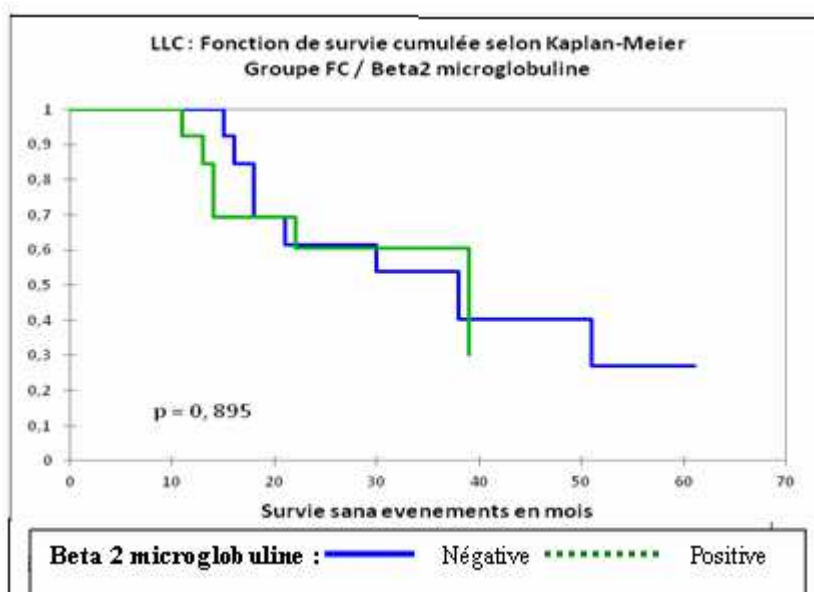


Figure 30: Courbe de survie sans événements du groupe FC selon la $\beta 2$ microglobuline

II.1.4.5.7 Courbe de survie globale du groupe FC selon le type d'infiltration de la PBO

Elle montre (**Figure 31**) une médiane de survie non atteinte quelque soit le type d'infiltration.

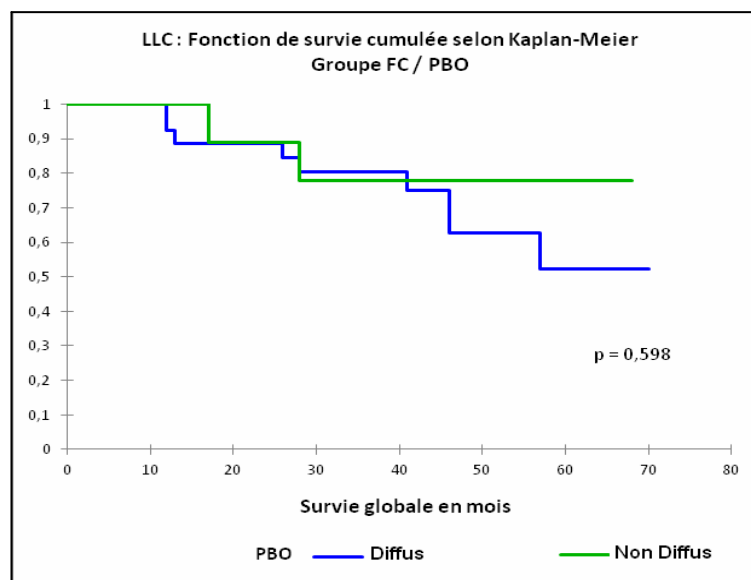


Figure 31: Courbe de survie globale du groupe FC selon le type d'infiltration à la PBO

II.1.4.5.8 Courbe de survie globale du groupe FC selon le CD 38

Elle montre (**figure 32**) :

- une médiane de survie non atteinte pour les pts ayant un CD 38 négatif
- une médiane de survie à 57 mois pour les pts ayant un CD 38 positif

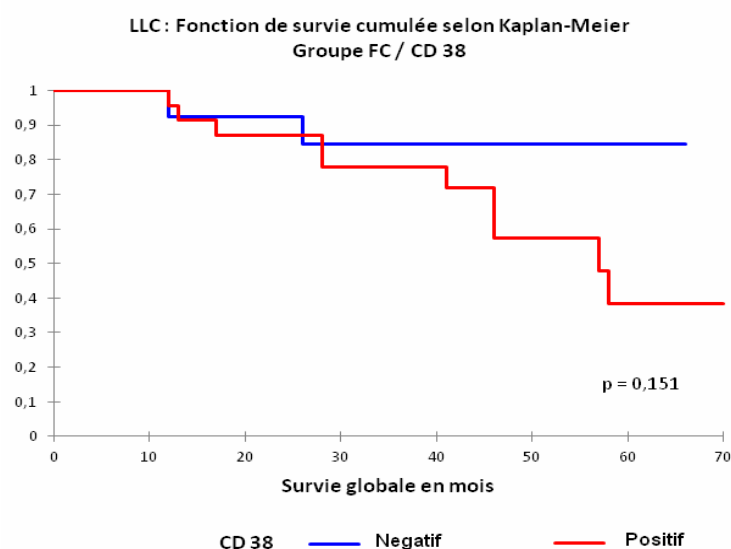


Figure 32 : Courbe de survie globale du groupe FC selon le CD 38

II.1.4.5.9 Courbe de survie sans événements selon le CD 38 du groupe FC

Elle montre (**figure 33**) :

- Pour le CD 38 négatif :
 - une médiane de survie non atteinte
 - une survie à 2 ans à 69,2 %
 - une survie à 4 ans à 60,6 %
 - un plateau de 60,6 % après 30 mois

- Pour le CD 38 positif :
 - une médiane de survie à 38 mois
 - une survie à 2 ans à 57 %
 - une survie à 4 ans à 30,5 %.
 - un plateau de 15,3 % après 51 mois

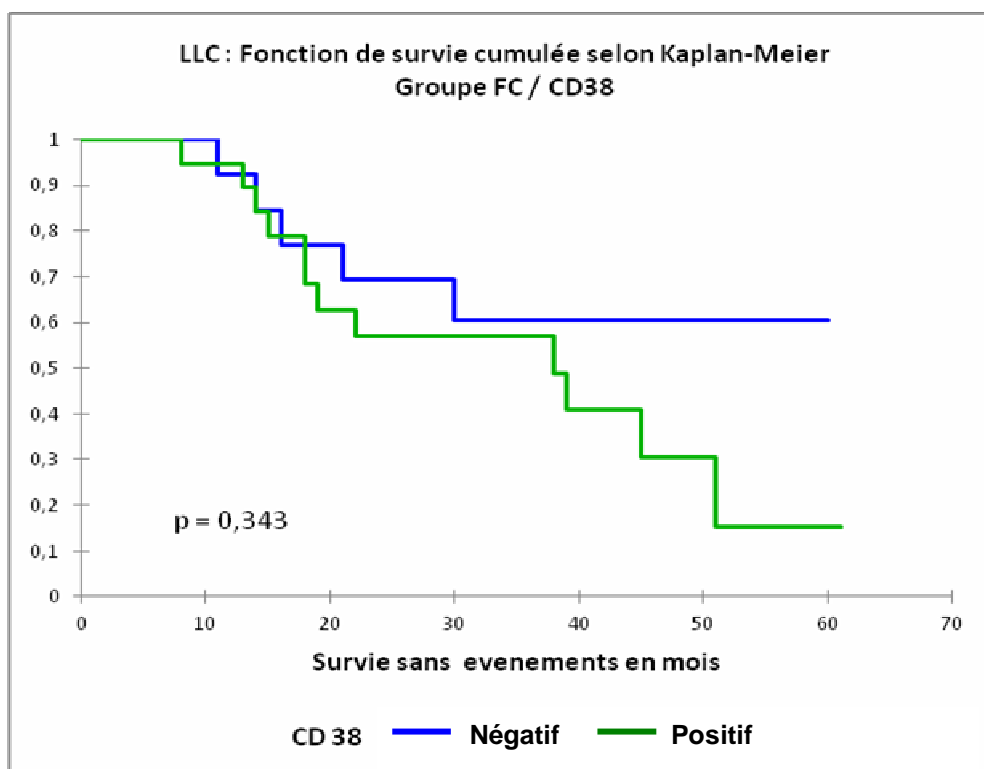


Figure 33 : Courbe de survie sans événements selon le CD 38 du groupe FC

II.1.4.5.10 Courbe de survie globale du groupe FC selon les anomalies cytogénétiques par FISH

Elle montre (**figure 34**):

- une médiane de survie non atteinte pour les pts :
 - présentant une del 13q14 isolée
 - présentant une del 6q21
 - ne présentant aucune anomalie

- une médiane de survie à :
 - 58 mois pour les pts ayant une trisomie 12
 - 57 mois pour les pts ayant une délétion ATM
 - 28 mois pour les pts ayant une délétion P53

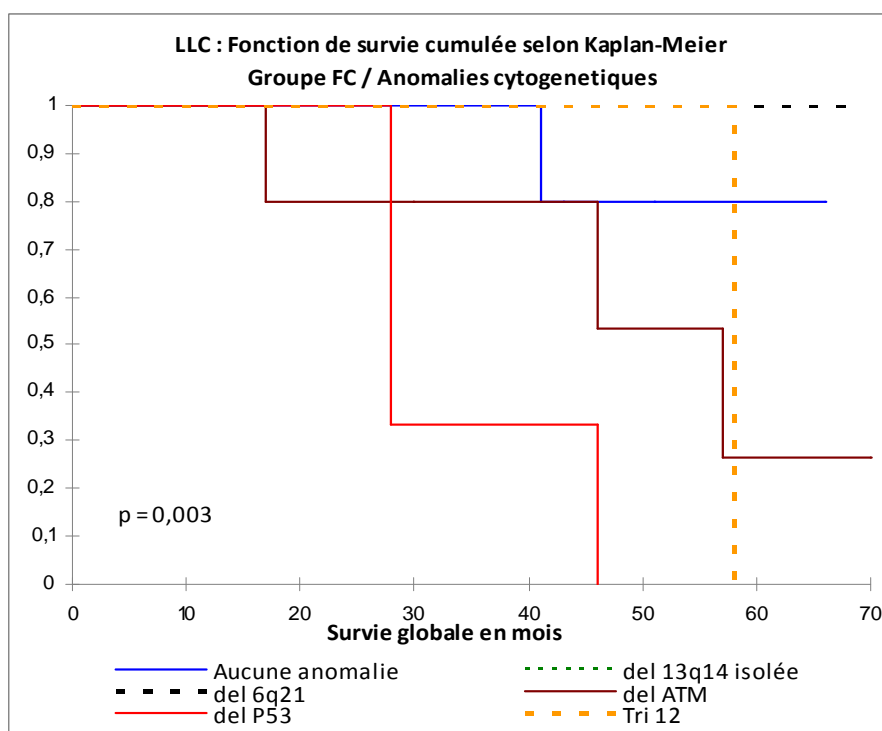


Figure 34 : Courbe de survie globale du groupe FC selon les anomalies cytogénétiques par FISH

II.1.4.5.11 Courbe de survie sans événements pour les pts de ce groupe FC selon les anomalies cytogénétiques par FISH

Elle montre (**figure 35**):

- une médiane de survie non atteinte pour les pts :
 - présentant une trisomie 12
 - ne présentant aucune anomalie
- une médiane de survie à :
 - 39 mois pour les pts ayant une délétion ATM
 - 39 mois pour les pts présentant une del 13q14 isolée
 - 22 mois pour les pts présentant une del 6q21
 - 18 mois pour les pts ayant une délétion P53

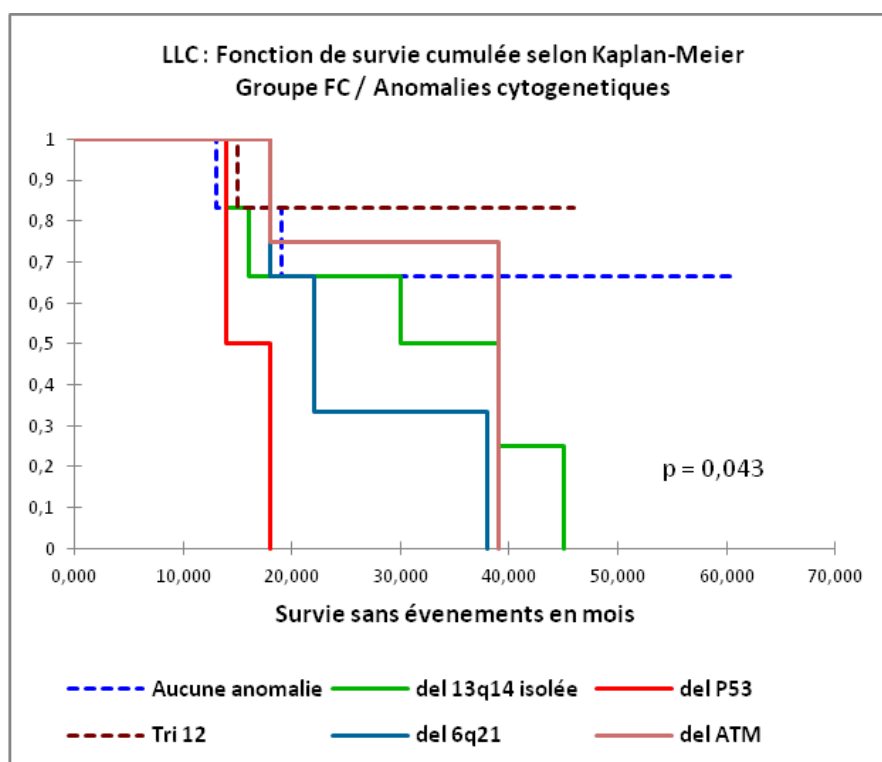


Figure 35 : Courbe de survie sans événements du groupe FC selon les anomalies cytogénétiques par FISH

II.1.5 Résultats du protocole RFC

II.1.5.1 Caractéristiques des patients

Le protocole RFC a été introduit chez nos patients dès lors qu'il a été confirmé comme gold standard par rapport au protocole FC.

De juin 2010 à Décembre 2011, 17 nouveaux patients sont inclus sous protocole RFC.

Il s'agit de 2 femmes et 15 hommes. Age moyen : 58,2 ans (46-65)

Pas d'antécédents personnels de cancer.

Antécédents de cancers familiaux dans deux cas : une sœur décédée suite à un adénocarcinome de l'utérus, un frère décédé suite à une néoplasie de type non précisé.

Profession : 6/18 sont des agriculteurs.

Délai diagnostique moyen : 6,3 mois (0 - 24).

Examen clinique :

ECOG = : 8 pts, = 1 : 9 pts.

Nous retrouvons 3 formes Bulky avec des adénopathies dépassant 10 cm de diamètre, et 3 cas avec un DS > 6 cm.

Une infection pulmonaire au diagnostic dans un cas.

Une atteinte médiastinale dans 6/17 cas, une atteinte sous diaphragmatique constante.

Hémogramme :

Hyperleucocytose moyenne de $148,6 \times 10^9/L$ (14 – 644)

Lymphocytose moyenne de $115,2 \times 10^9/L$ (10,9 – 440)

Hb moyen de 11,8 g/dl (6,6 – 15,2)

Plaquettes moyenne de $162 \times 10^9/L$ (66 – 296)

Cytologie :

L'étude du frottis sanguin retrouve sur les 17 pts, deux formes atypiques.

Le medullogramme fait de manière systématique retrouve une infiltration lymphocytaire en moyenne de 81% (50 – 100)

Score de Matutes : score 3 = 3 cas, score 4 = 8 cas, score 5 = 6 cas.

CD38 positif dans 11/17 cas = 64,7 %

Sur les 3 cas avec Matutes à 3, nous retrouvons une forme cytologique atypique et deux trisomies 12 isolées.

Un TCD négatif dans tous les cas.

Une hypogammaglobulinémie dans 4 cas (23,5 %)

La $\beta 2$ microglobuline élevée dans 11/14 fait (78,5 %)

LDH élevée dans 3 cas (17,6 %)

Une PBO faite dans tous les cas, retrouve : Une infiltration diffuse dans 11 cas (64,7 %)

Une infiltration nodulaire dans 3 cas

Une infiltration interstitielle dans 3 cas.

Classification Binet : stade B = 11 cas, Stade C = 6 cas.

II.1.5.2 Données cytogénétiques par FISH

Anomalies cytogénétiques : retrouvées dans 11 cas (64,7 %)

- Une anomalie simple = 7 cas
- 2 anomalies = 4 cas.

Les anomalies cytogénétiques se répartissent comme suit :

- del 13q14 dans 8 cas dont 4 délétions isolées (50 %), les cas associés à une del ATM dans deux cas, à une del P53 deux cas.
- Une trisomie 12 isolée dans deux cas (16,6%).
- Une délétion ATM associée à une del 13q14 dans 2 cas (11,8 %), toutes les deux forme bulky.
- Une délétion P53 dans 3 cas (25%), une fois isolée et deux fois associée à la del 13q14.

Les anomalies cytogénétiques à haut risque (2 del ATM et 3 del P53) sont de 45,4 %.

II.1.5.3 Evaluation du protocole RFC selon NCI :

- RC chez 13/17 pts (76,5 %), RPN chez 1 pt (5,9 %).
- Une RP chez une patiente (5,9 %).
- Echec chez 2 patients (11,7 %).

Sous protocole RFC, la réponse globale est de 88,3 %.

Comparaison des taux de RC et réponse globale entre FC et RFC (**Tableau X**)

	RC	Réponse globale
FC	15 cas/36	32 cas/36
RFC	13 cas/17	15 cas/17
p	0,038 S	0,693 NS

Tableau X : Comparaison des taux de RC et réponse globale entre FC et RFC (Khi2, correction de Yates)

II.1.5.4 Evaluation de la toxicité du protocole RFC

14 patients ont reçu le nombre total de cures.

2 patients ont reçu 4 cures : arrêt précoce du protocole pour une neutropénie grade 4 prolongée plus de 2 mois, et 1 patient a reçu 3 cures : décédé en progression.

Nombre total de cycles reçu est de 95.

Toxicité hématologique : (**Tableau XI**)

Neutropénie grade 3 dans 16/95 cycles soit 16,8 %, neutropénie grade 4 dans 22/95 cycles soit 23,1 %.

Lymphopénie < 400/ μ l dans 17/95 cycles soit 17,8 %.

La thrombopénie < 50 G/L dans un seul cycle soit 0,9%.

Durée moyenne d'aplasie : 11,4 jours sans GCSF.

	Neutropénie grade 3	Neutropénie grade 4	Lymphopénie < 400/ μ l	Thrombopénie < 50000/ μ l(G3)
FC	10 cycles/205	20 cycles/205	15cycles/205	3 cycles/205
RFC	16 cycles/95	22 cycles/95	17 cycles/95	1 cycle/95
Test (t)	0,630	0,589	0,613	0,666

Tableau XI : Comparaison des toxicités hématologiques : FC vs RFC

II.1.5.5 Complications infectieuses : 95 cycles reçus.

2 patientes ont reçus 4 cures : arrêt précoce du protocole pour neutropénie grade 4 de plus de 2 mois, les deux sont vivante, une en échec et une en rémission partielle.

1 patient a reçu 3 cures, décédé en progression avant la fin du traitement.

24 épisodes infectieux ont été noté soit 25,2 %, en grande majorité gérable par un traitement antibiotique en ambulatoire, il s'agit d'infections pulmonaire dans 41,4 % des cas.

Nous relevons une infection herpétique extensive lèvre supérieure et une partie de la joue, en post 6^{ème} cure, une hospitalisation et un traitement à base de Zovirax en perfusion ont été institué avec une évolution favorable.

II.1.5.6 Devenir des patients :

Les 13 pts en RC et 1 pt en RPN sont vivants après un recul maximal de 24 mois.

Une patiente en RP maintenue avec une survie globale de 20 mois.

Un patient en échec est décédé en progression et une patiente est vivante en échec.

Le patient décédé en échec est un patient au stade C, CD38 positif, ayant une del P53 isolée, n'a reçu que 3 cures RFC, et est décédé en progression.

II.1.5.7 Courbes de survie des pts sous protocole RFC

II.1.5.7.1 Courbe de survie globale pour les pts du groupe RFC

Elle montre **(Figure 36)** : une survie de 94,1 % mois à 2 ans ; notre recul maximal est de 26 mois

La médiane de survie n'est pas atteinte

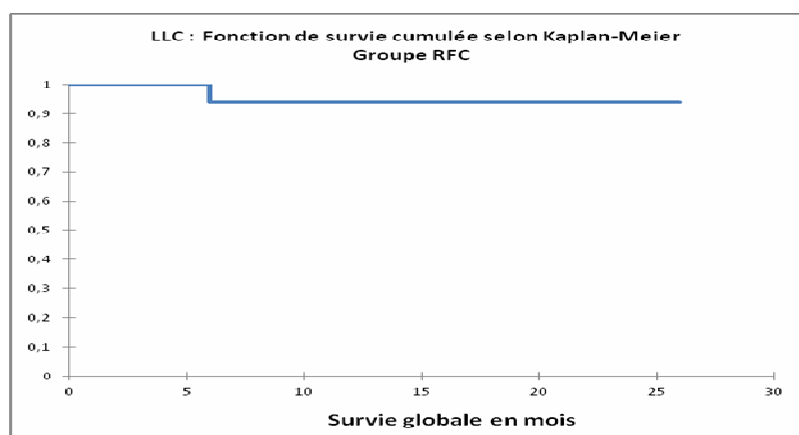


Figure 36 : Courbe de survie globale : groupe RFC

II.1.5.7.2 Courbe de survie globale du groupe RFC selon le stade de Binet

Elle montre (**Figure 37**) :

- une médiane de survie non atteinte pour le stade B
- une médiane de survie non atteinte pour le stade C

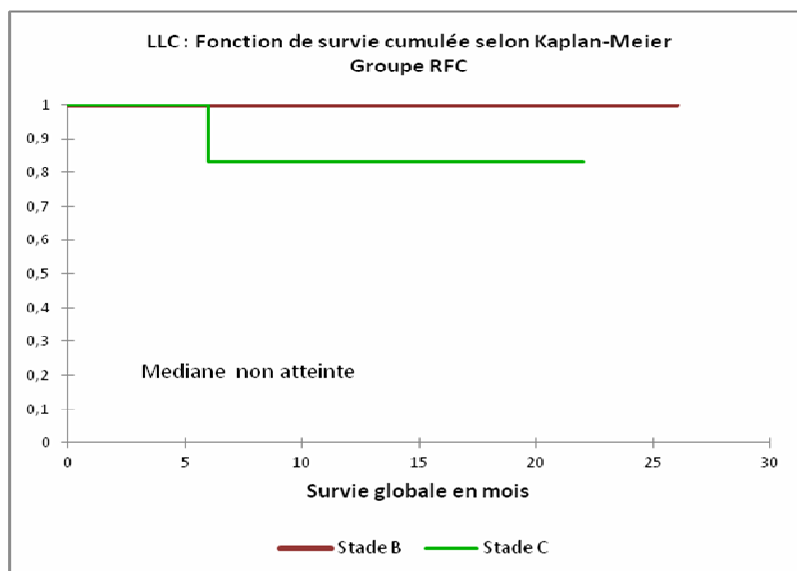


Figure 37 : Courbe de survie globale du groupe RFC selon le stade de Binet

II.1.5.7.3 Courbe de survie globale du groupe RFC selon le CD 38

Elle montre (**Figure 38**):

- une médiane de survie non atteinte pour les pts ayant un CD 38 négatif
- une médiane de survie non atteinte pour les pts ayant un CD 38 positif

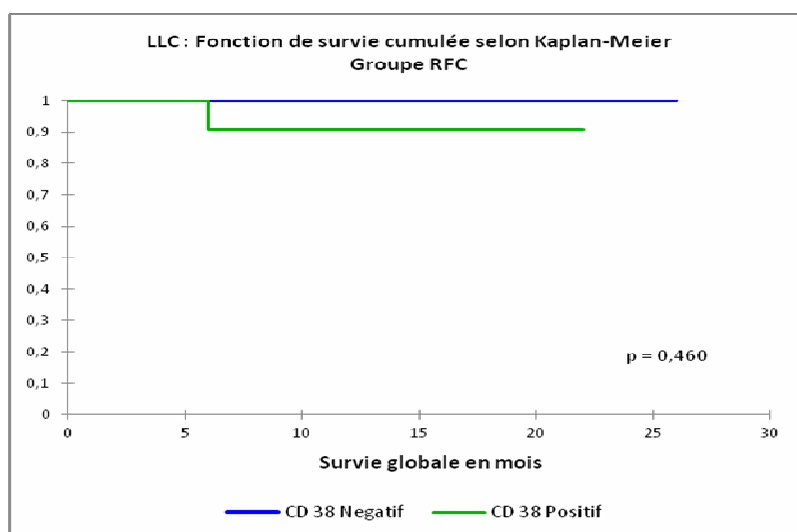


Figure 38 : Courbe de survie globale du groupe RFC selon le CD 38

II.1.5.7.4 Courbe de survie globale du groupe RFC selon les anomalies par FISH

Elle montre une médiane de survie non atteinte quelque soit l'anomalie (**Figure 39**)

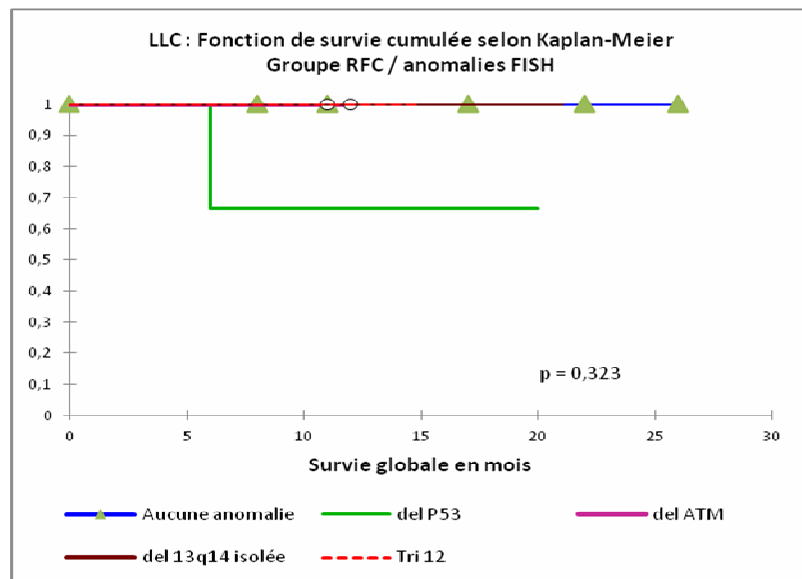


Figure 39: Courbe de survie globale du groupe RFC selon les anomalies cytogénétiques

II.1.5.7.5 Courbe de survie : comparaison FC/RFC

Elle montre : (**Figure 40**) une médiane de survie non atteinte pour les deux groupes et une différence de survie non significative

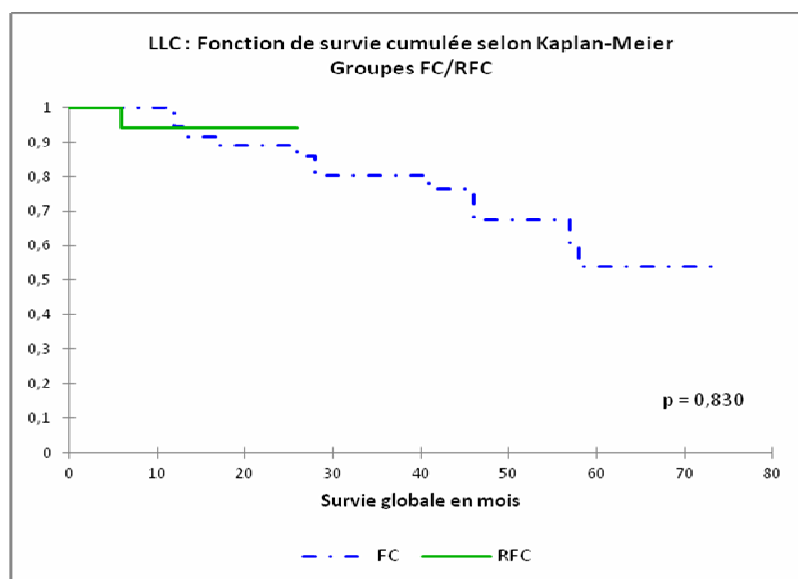


Figure 40 : Courbe de survie globale : comparaison FC/RFC

II.1.5.7.6 Courbe de survie globale : FC/RFC vs Non FC/RFC / CD 38 Négatif

Elle montre : **(Figure 41)** une différence de survie non significative

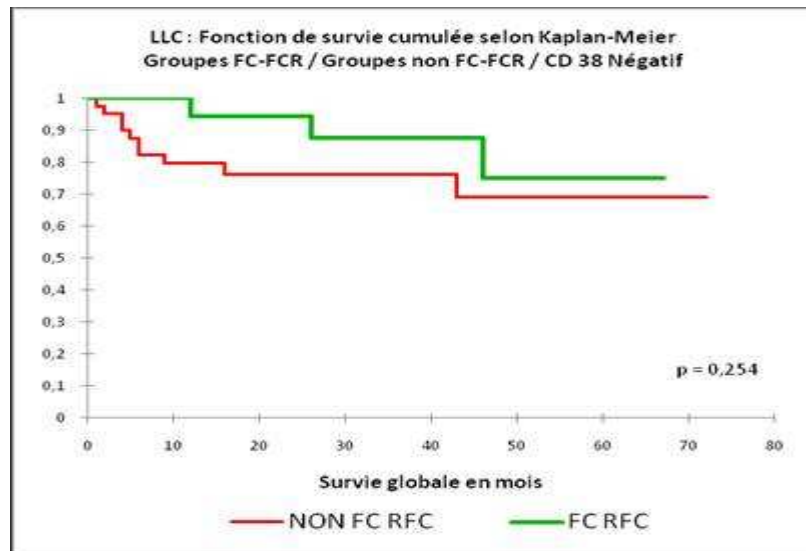


Figure 41 : Courbe de survie Comparaison FC/RFC vs Non FC/RFC / CD 38 Négatif

II.1.5.7.7 Courbe de survie globale : FC/RFC vs Non FC/RFC / CD 38 Positif

Elle montre : **(Figure 42)** une différence de survie significative

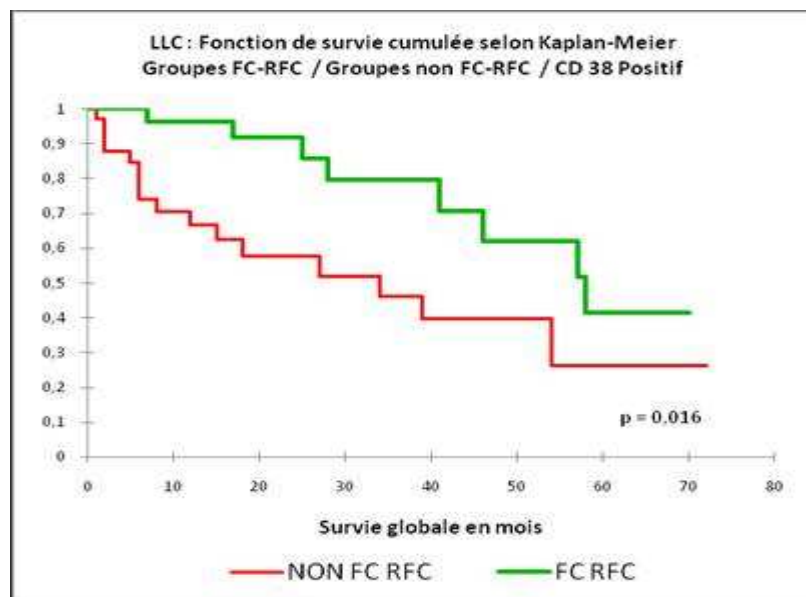


Figure 42 : Courbe de survie : comparaison FC/RFC vs Non FC/RFC / CD 38 Positif

III- DISCUSSION

III.1 Sur le diagnostic morphologique

Le diagnostic de LLC typique a été fait dans 81 % des cas sur les critères du FAB **(35)** Dans ce groupe, la population lymphocytaire était monomorphe faite en majorité (90%) de petits lymphocytes matures; les cellules atypiques étaient présentes à des taux ne dépassant pas 15 %.

La présence d'ombres de Gümprécht sur le frottis sanguin est un critère important pour le diagnostic cytologique de LLC ; il faut cependant relativiser son importance : : dans notre étude, les ombres de Gümprécht ont été retrouvées dans 5 cas présumés LLC non confirmés par la CMF ; ce signe peut être en effet trompeur ; la présence de noyaux nus traduit souvent le résultat d'un étalement de mauvaise qualité et il est possible de retrouver de pseudo ombres de Gümprécht dans les frottis sanguins de lymphomes B leucémisés à petites cellules **(36 ; 37)**; il est alors préférable d'effectuer la lecture au niveau de la zone de dépôt de la goutte de sang : à cet endroit les cellules lymphoïdes même fragiles y sont bien préservées.

III.2 Sur le diagnostic immunophénotypique

L'immunophénotypage a confirmé le diagnostic de LLC dans 78,5% des cas avec un score de Matutes ≥ 4 ; sur ce point, nos résultats rejoignent ceux de la littérature **(37 ; 41)** et ceux de deux équipes Algériennes **(251 ; 252)**.

Les LLC avec une morphologie typique sont plus souvent associées à un phénotype caractéristique (CD5 positif, CD23 positif, Slg : faible expression) avec un score de Matutes égal à 4 ou 5 (92 % des cas) alors que les LLC mixtes n'ont un score égal à 4 ou 5 que dans 33% des cas, résultats rejoignant ceux de la littérature **(40)**.

Dans 17 cas de LLC , le score de Matutes était = 3 ; le diagnostic de LLC a été retenu sur la base d'arguments cytologiques et immunophénotypiques concordants : une cytologie typique a été retrouvée dans 8 cas sur 17 ; sur le plan immunophénotypique, tous les patients de ce groupe avaient une expression constante caractéristique du CD5 et CD23, une monoclonalité Kappa (11 cas) ou Lambda (5 cas) d'expression faible et une expression faible du CD 20 chez 15 patients sur 17 ; ces caractéristiques sont aussi relevées dans de nombreuses études de la littérature **(40 ; 44)**

Une cytologie atypique a été retrouvée dans 9 cas sur les 17, dont deux étaient des LLC/PL et 7 des LLC atypiques ; ces résultats sont attendus en cas de score 3 : il a été effectivement décrit dans la littérature pour les LLC de score 3, une fréquente présentation cytologique et immunophénotypique atypiques **(38 ; 41)**

Par ailleurs, nous relevons dans le groupe de cytologie atypique, une remarquable fréquence de la trisomie 12 (5 cas sur 7 cytogénétiques faites soit 71,4 %) ; cette donnée est corroborée par des études concordantes de la littérature **(157 ; 164)**.

On note aussi dans ce groupe, une fréquence élevée (57 %) de la délétion P53 réputée de très mauvais pronostic, et aucune délétion 13q14 isolée réputée de bon pronostic, nos résultats rejoignent aussi sur cet aspect ceux de la littérature **(157 ; 253)**.

III.3 Sur la répartition des anomalies cytogénétiques

III.3.1 Les échecs du caryotype

Dans notre étude, le taux global d'échec du caryotype est de 60 %, incluant les mauvaises pousses cellulaires dans 27% des cas et les problèmes propres à la réalisation du caryotype (dénaturation, interprétation) dans 33% des cas.

Dans la littérature, le taux d'échec au caryotype par mitogènes classiques (TPA ou PMA) est très variable allant de 16 % à 50 % **(137 ; 139 ; 165)**.

L'utilisation de nouveaux facteurs stimulants les pousses cellulaires, oligonucléotides, IL2, a considérablement modifié le nombre et la qualité des mitoses dans la LLC ; ces améliorations ont contribué à remettre le caryotype au devant de la scène dans l'étude des anomalies cytogénétiques récurrentes de la LLC **(20 ; 129 ; 132)**

L'observation des lames au microscope en contraste de phase est une étape essentielle avant la réalisation d'un caryotype, afin d'apprécier la richesse des lames en mitoses ainsi que leurs qualité (longueurs, séparation) et la densité en cellules.

Une lame avec un étalement trop dense en cellules empêche les mitoses de s'étaler et ainsi entrave la dénaturation.

Des chromosomes trop courts ou trop longs avec des chevauchements seront difficile à dénaturer, séparer et à interpréter.

La qualité des mitoses obtenues à partir de culots congelés dépend de la qualité du fixateur : des mitoses mal conservées sont difficile à dénaturer. Dans notre série l'étude cytogénétique sur culot congelé a été faite dans 14 cas, sur les quels seulement 4 caryotypes ont pu être réalisés (10 % des caryotypes faits)

Il faut noter les problèmes propres à notre laboratoire en particulier la disponibilité des réactifs de bonne qualité dont dépend en grande partie la manipulation (la colchicine, les alcools, le colorant Giemsa....)

III.3.2 Anomalies retrouvées par FISH sur un caryotype normal

Dans 15 cas (53,6%) chez qui le caryotype n'a pas retrouvé d'anomalies, la FISH a retrouvé des anomalies observées dans un clone minoritaire dans la plupart des cas. Nos résultats comme ceux de la littérature indiquent que la FISH est une méthode simple, fiable et reproductible pour identifier des anomalies chromosomiques ciblées chez les patients atteints de LLC lorsque le caryotype n'a pu les révéler **(146,147;149)**.

III.3.3 Comparaison des résultats du caryotype aux séries de la littérature (Tableau XII)

Anomalies/ réf	Notre série 40 cas	Aoun (147) 72 cas	p	Glassman (146) 98 cas	p
Tri 12	6 (15 %)	9 (12,5%)	0,709 NS	6 (6,1 %)	0,178 NS
del 13q14	5 (12,5 %)	1 (1,4 %)	0,039 S	1 (1 %)	0,038 S
Anomalie du 14	1 (2,5 %)	3 (4 %)	0,939 NS	NP	
Anomalie du 11	1 (2,5 %)	2 (3%)	0,600 NS	11 (11,2 %)	0,187 NS
Anomalie du 17	3 (7,5 %)	5 (7 %)	0,784 NS	4 (4 %)	0,687 NS
Anomalie du 6	aucune	1(1,4 %)	0,784 NS	2 (20%)	0,900 NS
Caryotype complexe	aucun	1(1,4 %)	-	6 (6 %)	0,254 NS
Aucune anomalie	28 (70 %)	35 /15 (69 %)	0,046 S	70 (70 %)	0,866 NS

Tableau XII : Comparaison des résultats du caryotype aux séries de la littérature

Le taux de caryotype anormal de notre série rejoint celui de la littérature à l'ère des mitogènes classiques ; il en est de même pour la fréquence des anomalies récurrentes, sauf pour la del 13q14 où nous retrouvons une hausse significative dans notre série.

Dans la série de Aoun, parmi les anomalies détectées par FISH, 64 % avaient un caryotype normal ou sans anomalies. L'anomalie la plus fréquemment non détectée par caryotype dans sa série était la del 13q14 (24/ 33 cas = 72%). Dans notre série 18,5 % des anomalies détectées par FISH avaient un caryotype sans anomalies.

Dans la littérature, les taux d'anomalies retrouvées par caryotype ont été nettement améliorés par l'introduction des oligonucléotides et de l'IL2 comme facteurs mitogènes au point où leur fréquence est semblable à celle de la FISH **(136)**.

L'option dans notre laboratoire est d'utiliser cette nouvelle technique pour améliorer nos résultats.

III.3.4 Comparaison de nos résultats en FISH aux séries de la littérature (Tableau XIII)

Référence	Anomalies	del 13q	Tri 12	del ATM	del P53	del 6q21
Notre série : 100 pts	80 %	49 %	25 %	16 %	15 %	12 %
Dohner (148) : 325 pts	82 %	55 %	16 %	18 %	7 %	6 %
p =	0,678 NS	0,312 NS	0,114 NS	0,670 NS	0,015 S	0,070 NS
Qiu (254) : 143 pts	72,7 %	47,6 %	21,7 %	11,9 %	12,6 %	4,9 %
p =	0,193 NS	0,824 NS	0,545 NS	0,465 NS	0,589 NS	0,074 NS
Glassman (146) : 100 pts	64 %	44 %	11 %	23 %	12 %	NF
p =		0,478 NS	0,01 S	0,211 NS	0,535 NS	
Aoun (147) : 72 pts	72 %	46 %	21 %	7 %	3 %	NF
p =	0,163	0,682 NS	0,523 NS	0,074 NS	0,007 S	

Tableau XIII : Comparaison des nos résultats FISH avec la littérature.

La fréquence des anomalies récurrentes identifiées par FISH rejoint celle de la littérature. (**146 ; 147 ; 148 ; 254**) Dans une population chinoise sur 143 pts (**254**), les anomalies complexes (plus de 2 anomalies) sont plus fréquentes que dans notre série : 28 % vs 6,25 %

La del 13q14 est l'anomalie chromosomique la plus fréquemment rapportée dans les grandes séries de la littérature. Dans notre étude la fréquence de la del 13q14 rejoint celle de la littérature.

Les del 13q14 bialléliques (7,8%) et biclonales (9,8%) sont moins fréquentes que dans la série de Reddy (2006) à 11,2% et 12,5% respectivement, la prédominance du clone monoallélique dans la partie biclonale est semblable, à 2 cas / 5 = 40% (**149**).

La population de ce groupe est la plus jeune parmi les populations des anomalies récurrentes, suggérant la survenue de cette anomalie aux stades précoces de la maladie.

Aucun décès n'a été noté dans ce groupe, il n'y a pas de différence de survie que la délétion 13q14 soit monoallélique, biallélique ou biclonale. Le CD38 dans ce groupe est négatif dans 74 % des cas.

La fréquence de la trisomie 12 dans notre étude rejoint celle de la littérature (**147 ; 148 ; 254**), sauf pour la série de Glassman (**146**) où la différence est significative ($p= 0,01$).

La trisomie 12 est plutôt perçue comme un événement secondaire dans la pathogénie de la leucémie lymphoïde chronique ; elle est souvent retrouvée dans la LLC morphologiquement atypique et dans les stades avancés de la maladie. Ce dernier point est retrouvé dans notre étude ; en effet, la trisomie 12 est survenue dans les stades B et C dans 86,6% de nos cas. L'âge moyen de ce groupe trisomie 12 est de 64,4 ans; Il n'y a que 5 cas avec un score de Matutes égal à 3 dans ce groupe. Plus de la moitié de cette population est CD38 positif (53,3 %).

La fréquence de la del ATM rejoint celle de la littérature. Toutes les del ATM sont survenues dans les stades B et C, à un âge plus jeune (62,5 ans) Les 2/3 de la population délétée en ATM est CD38 positif.

Une association à très haut risque : del ATM + del P53 + del 6q21, a été notée dans notre série, dans ce cas une sonde spécifique du locus P53 a été utilisée et a permis de contrôler la double délétion retrouvée par la sonde utilisée en routine. La patiente a rapidement évolué en Richter et est décédée après 3 mois de survie.

Nous retrouvons plus de délétion P53 que dans la série de Dohner (**148**) et Aoun (**147**) ($p = 0,015$ et $p = 0,007$). Une explication possible se trouve dans la répartition des stades cliniques de la maladie ; en effet dans les séries de Dohner et Aoun, les stades A sont plus représentés que les stades C, ce qui est l'inverse dans notre série. Dans notre étude, les del P53 surviennent surtout dans le stade C dans 11/15 cas (73,3 %).

Dans ce groupe délétée en P53, on observe 38,8 % des décès de notre série. Ces données sont corrélées à celles de la littérature (**125, 180**) ; il est en effet bien démontré que la del P53 est l'anomalie cytogénétique qui a un impact pronostique péjoratif dans la LLC, tant par la résistance aux protocoles à base de fludarabine (**107**) que pour la survie globale (médiane = 32 mois) (**148**).

L'âge moyen dans ce groupe P53 est de 64 ans ; il est plus élevé que celui de la del 13q14 (59 ans)

La Fréquence de la del 6q21 est semblable à la série de Dohner (**148**) et Qiu (**254**). Cette anomalie se trouve associée dans 91,6% des cas.

III.3.5 Comparaison de nos résultats selon les anomalies cytogénétiques (FISH) et le stade de Binet avec la série de Qiu (Tableau XIV)

Référence	Fréquence Des anomalies	del1 3q14	Tri 12	del ATM	del P53	del 6q21
Notre série						
Stade A	88,2 %	64,7 %	17,6 %	0 %	11,7 %	5,8 %
Stade B	68,4 %	39,5 %	23,7 %	23,7 %	5,2 %	13 %
Stade C	86,6 %	51 %	28,8 %	15,5 %	24,4 %	11 %
Série de Qiu (254)						
Stade A	75,4 %	61,5 %	18,5 %	10,8%	9,2%	6,2 %
p =	0,418	0,967	0,783	0,354	0,884	0,598
Stade B	72,3 %	31,9%	23,4 %	10,6 %	4,3%	4,3 %
p =	0,877	0,873	0,821	0,187	0,767	0,277
Stade C	67,7 %	41,9 %	67,7 %	16,1 %	32,3%	3,2 %
p =	0,089	0,580	0,973	0,801	0,626	0,412

Tableau XIV : comparaison avec la série de Qiu des anomalies cytogénétiques selon le stade de Binet

Les anomalies récurrentes sont très fréquentes dans le groupe A (88,2 %) ; la délétion 13q14 isolée est la plus fréquente (58,8%) ; aucune délétion ATM n'a été notée ; dans un groupe théoriquement indolent, 2 del P53 (11,7 %) ont été relevées. Nous ne notons pas de différence significative avec la série de Qiu. Aucun décès n'a été noté dans ce groupe.

Les anomalies les plus fréquentes dans le groupe B sont la trisomie 12 et la del ATM avec 23,7 % des cas chacune, connues toutes les deux dans les formes bulky, de mauvais pronostic. Il n'y a pas de différence significative avec la série de Qiu (254).

Dans ce groupe, nous relevons 03 décès (7,8 % tous du stade B), présentant les anomalies suivantes : un sans anomalies cytogénétiques, 2 avec une trisomie 12 isolée.

Dans le stade C, les anomalies de haut risque (del ATM et del P53) représentent 37,7% des cas. De toute les del P53, 66,6 % se retrouvent dans ce stade. La del 13q14 isolée représente 28,8% des cas de ce stade. Il n'ya pas de différence significative avec la série de Qiu (254).

Dans ce groupe, 13 décès (72,2 %) sont relevés dont 4 présentent une del ATM et 7 présentent une del P53.

Si nous analysons tous les décès (18 cas) sur cet échantillon de malades (100 pts) selon les anomalies cytogénétiques, 61,1% font partie du groupe cytogénétique haut risque (del ATM, del P53)

L'analyse des anomalies cytogénétiques selon le CD38 retrouve dans la population CD38 négatif, une prédominance de la délétion 13q14 isolée à 42,5 %. Les anomalies à haut risque représentent 25,5 % des cas.

Dans le groupe CD38 positif, prédominent les del ATM et del P53, elles représentent 39,1 % des anomalies de ce groupe, population composée surtout de stade B et C.

Nos résultats corrélés à ceux de la littérature démontrent clairement que l'étude cytogénétique occupe une place clé dans l'évaluation du pronostic des patients atteints de leucémie lymphoïde chronique.

III.3.6 Commentaires sur le groupe FC

Le délai diagnostique est long, jusqu'à 24 mois, ce qui expliquerait la fréquence des stades avancés dans cette série de patients et ainsi les formes rapidement progressives.

PBO : L'infiltration diffuse connue de mauvais pronostic prédomine dans notre série à 74,2%

Dans ce groupe de patients traité par FC, nous notons une fréquence particulière des trisomies 12 (30,4 %), fait connu dans les formes d'atypie cytologique et dans les formes tumorales. Dans notre série de 7 patients avec trisomie 12, aucun patient n'a une forme tumorale ganglionnaire ; le DS > 6 cm dans 3 cas, une seule forme cytologique atypique, un stade C dans 3 cas, CD38 + dans 4 cas, PBO diffuse dans 3 cas.

Les anomalies à haut risque (del ATM et del P53) représentent un tiers des patients (34,7%).

- **La del P53** (3 cas) : le CD38 était positif dans tous les cas.

Sous protocole FC, tous étaient réfractaires à la fludarabine :

- Patient 52 ans, stade C, en RP après 6 cures avec tous les critères de la RC selon le NCI sauf la persistance d'une thrombopénie à moins de 100000/ μ l mais toujours supérieure à 50000/ μ l ; le patient a rechuté à 9 mois de la fin de la

chimiothérapie (moins d'un an), de ce fait s'inscrit parmi les malades réfractaires à la fludarabine, mis sous RFC en deuxième ligne, décédé en échec après 4 cures, survie globale : 46 mois.

- Patient 61 ans, stade C, en RPN après 6 cures, rechute à 11 mois de la fin de la chimiothérapie (réfractaire), décède rapidement d'un choc toxi-infectieux, avant le protocole de deuxième ligne avec une survie globale de 28 mois.

- Patient âgé de 49 ans, stade C, réfractaire primaire à la fludarabine, mis sous protocole de rattrapage type OFAR2, il est décédé en échec avec une survie globale de 25 mois.

- **La del ATM** (5 cas): 3/5 en stade C, le CD38 était positif dans tous les cas, une infiltration médullaire diffuse dans 4/5 des cas.

Les patients avec del ATM sous protocole FC :

- Un patient toujours en RC, survie globale 30 mois.

- Trois patients en RPN, un sans rechute avec une survie globale de 70 mois, la deuxième patiente a rechuté à 39 mois de la fin de la chimiothérapie, mise sous RFC en deuxième ligne, patiente décédée après une cure en échec.

Le troisième patient en RPN a rechuté à 18 mois, mis sous RFC x 6 soldé d'un échec thérapeutique, patient décédé en progression après 4 lignes thérapeutiques

- Un patient était en échec primaire et il est décédé en progression après 4 cures FC, avec un syndrome infectieux pleuro-pulmonaire, avec une survie globale de 17 mois.

Comparaison de nos résultats avec la littérature en matière de taux de RC et de réponse globale, sur 4 études (Tableau XV)

	Notre étude 36 pts	Catovsky (2007) (200) 196 pts	O'Brien (2001) (204) 34 pts	Eichhorst (2006) (175) 173 pts	Laurenti (2008) (205) 35 pts
RC (%)	41,6	38 p = 0,797	35 p = 0,763	23,8 p = 0,048	40 p = 0,921
RG (%)	89	94 p = 0,467	88 p = 0,772	94,5 p = 0,795	77 p = 0,316
PFS (mois)	39	-	> 41	48	23

Tableau XV : Comparaison de nos résultats avec la littérature en matière de taux de RC et de réponse globale, sur 4 études.

Une concordance avec nos résultats est retrouvée dans trois d'entre elles (**200 ; 204 ; 205**) ; une différence discrètement significative est noté concernant le taux de RC avec la série de Eichhorst (**175**).

Répartition de nos résultats RC (groupe FC) selon les anomalies cytogénétiques (Tableau XVI)

	Notre série		Série de Stilgenbauer 2008 (255)		p
	Nombre pts	RC (%)	Nombre pts	RC (%)	
Tous les patients	29	44,8	577	27	
Sans anomalies	6	50	40	30,9	0,579
del 13q14 isolée	6	50	66	31,2	0,599
Trisomie 12	7	85,7	14	25	0,001
del ATM	5	20	19	13,8	0,785
del P53	3	0	2	4,5	0,279
del 6d21*	6	16,6	-	-	-

* La del 6q21 est associée dans tous les cas, la RC est obtenue sur une association 13q14 + del 6q21.

Tableau XVI : Répartition de nos résultats RC (groupe FC) selon les anomalies cytogénétiques

Le meilleur taux de RC est obtenu dans le groupe trisomie 12, avec une différence significative avec la série de Stilgenbauer (**255**) ($p = 0,001$). Dans ce groupe, la trisomie 12 était isolée dans 4 cas sur 7, le stade B relevé dans 4 cas sur 7, sans forme bulky ganglionnaire, nous ne notons aucuns cas d'atypie immunophénotypique (pas de Matutes à 3) et un seul cas avec forme cytologique atypique.

Certaines études attribuent aux LLC avec trisomie 12 un impact négatif sur le pronostic en raison de son association fréquente à des formes immuno-morphologiques atypiques (**162,164**) ; dans notre étude, les caractéristiques relevées ne confèrent pas à ce groupe un caractère agressif particulier ; une étude importante (480 pts) (**165**) corrobore les résultats de notre travail

Dans ce groupe de del 13q14 isolée (6 cas), avec le FC nous avons obtenu de bonnes réponses avec 3 RC et 3 RPN ; parmi ces trois derniers patients en RPN, deux avaient arrêté leurs traitements à 3 cures ; une patiente suite à une neutropénie prolongée de plus de deux mois, le deuxième patient, protocole arrêté suite à une tuberculose pulmonaire sans preuve bactériologiques ni radiologique, il a été mis sous traitement anti tuberculeux pendant 6 mois, toujours vivant en RPN.

Les plus mauvais taux de RC sont obtenus dans le groupe cytogénétique haut risque (del ATM et del P53) avec 0% et 20% respectivement.

III.3.7 Commentaires sur le groupe RFC

En raison des résultats prometteurs du protocole RFC surtout en matière de prolongation de la survie sans progression et un espoir de prolongation de la survie globale, nous avons opté pour ce protocole en première ligne pour nos patients.

Il existe une différence significative ($p = 0,038$) dans le taux de RC en faveur du protocole RFC dans notre étude.

Il n'y a pas de différence significative ($p = 0,693$) en matière de réponse globale entre protocoles FC et RFC dans notre série.

Dans le groupe RFC, 2/3 des del P53 surviennent au stade C ; un patient est décédé en progression, une patiente vivante en rémission partielle et un patient vivant en RPN.

En raison d'un recul insuffisant, l'évaluation complète en termes de bénéfice sur la survie globale et la survie sans événements n'a pas été réalisée.

III.3.8 Commentaires sur le CD 38

Les deux groupes sont comparable sur le plan nombre, âge moyen et sexe, le groupe CD38 négatif comporte plus de stade A ($p = 0,037$), le groupe CD38 positif comporte plus de stade B ($p = 0,006$), il n'y a pas de différence de répartition du stade C.

Sur le plan cytogénétique le groupe CD38 négatif comporte plus de del 13q14 isolée connue pour leurs pronostic favorable ($p = 0,0005$). Il n'y a pas de différence dans la répartition des anomalies haut risque entre les deux groupes.

Commentaires sur le CD38 par rapport aux groupes thérapeutiques

Une analyse de la survie globale est faite selon ce paramètre sur deux groupes homogènes, le premier groupe est celui traité par protocoles FC ou RFC composé de 53 patients et le deuxième groupe est celui des patients non traités ou traités par d'autres protocoles que le FC et le RFC.

Nous avons noté une nette amélioration de la médiane de survie entre les deux groupes :

- Le groupe non FC non RFC : médiane de survie de 34 mois
- Le groupe FC-RFC : médiane de survie de 58 mois. $P = 0,016$

L'intérêt pronostique de l'expression membranaire du CD38 dans la LLC a été affirmé dans de très nombreuses études (**118 ;119**) Le CD 38 a d'abord été utilisée du fait de sa facilité d'étude en CMF comme marqueur de substitution à l'étude du statut

mutationnel des gènes Ig VH Cependant, même si le CD 38 ne peut pas totalement se substituer au statut mutationnel des Ig VH, son intérêt comme facteur pronostique indépendant a été très largement rapporté au cours de la LLC **(118)**. En analyse multi variée, l'expression de CD38 est un marqueur pronostique significatif vis-à-vis de la survie globale **(120)**. D'autres investigateurs ont confirmé le fait que l'expression du CD38 permet de prévoir la progression de la maladie, la réponse thérapeutique et la survie **(115 ; 116 ; 118)**.

Ainsi, l'utilisation du CD 38 pour évaluer le pronostic des LLC est une démarche qu'il faut utiliser car validée, en raison de sa facilité de réalisation sur sang périphérique, sous réserve de rigueur dans le choix des réactifs et de la méthodologie **(110)**. La combinaison de l'expression du CD 38 et du ZAP 70 apporte un plus dans la définition plus affinée de groupes pronostiques en termes de PFS et de survie globale **(71)**.

III.3.9 Toxicité

Comparaison de toxicité entre FC et RFC

Il n'ya pas de différence significative (p entre 0,589 et 0,666) entre les protocoles FC et RFC concernant la toxicité hématologique et non hématologique.

Comparaison de nos résultats de toxicité du FC avec la littérature : Tableau XVII

Cytopénies Grade III-IV	Notre Etude	Eichhorst (182)	p	Laurenti (212)	p
Neutropénie	30	96	0,0018	16	0,0003
Anémie	10	4	2,055	3	0,028
Thrombopénie	2	60	0,001	2	0,626

Tableau XVII : Comparaison de nos résultats de toxicité du FC avec la littérature

Les toxicités majeures observées dans notre étude sont hématologiques ; par rapport à deux études relevées dans la littérature, nous avons eu plus de toxicité sur les lignées granuleuses et érythrocytaires **(182 ; 212)**, cela est probablement lié à la plus grande fréquence des stades C dans notre série par rapport aux deux séries citées **(182 ; 212)** (p respectifs : 0,020 ; 0,001).

Il y a moins de toxicité sur les plaquettes dans notre étude par rapport à la série d'Eichhorst **(182)**.

Il n'y a pas de différence significative (p = 0,979) entre le taux de décès toxiques observé dans notre série avec l'étude d'Eichhorst **(182)**.

Conclusion

Le premier objectif de notre étude était l'application du score de Matutes pour le diagnostic de certitude de LLC. ; Sur 150 patients chez qui ce diagnostic a été évoqué, l'immunophénotypage nous a permis de le retenir dans 118 cas grâce à un score de Matutes supérieur à 4 ; dans 17 autres cas, le diagnostic de LLC a été validé par une confrontation cyto-immunophénotypique (score de Matutes = 3 et cytologie variable : typique = 8 cas, atypique = 9 cas. Ce dernier groupe souligne ainsi tout l'intérêt d'une bonne étude cytologique à la base du diagnostic de cette pathologie.

Le deuxième objectif de notre travail portait sur l'application du caryotype et de la FISH afin d'établir la répartition des anomalies cytogénétiques dans la LLC.

L'introduction et la mise en place des techniques cytogénétiques conventionnelles (caryotype) et moléculaire (FISH) dans la LLC à Blida est une première expérience en Algérie ; Cent (100) nouveaux cas de LLC ont été étudiés selon ces procédures.

Le premier constat porte sur la difficulté de réalisation d'un caryotype conventionnel dans cette pathologie, le taux global d'échec quelle qu'en soit la raison est de 60 %. Lorsque le caryotype était possible (40 % des cas), la fréquence des anomalies que nous relevons n'est pas différente de celle relevée dans la littérature.

La FISH interphasique et métaphasique a été entre nos mains un outil remarquable d'identification des anomalies ciblées, pour sa fiabilité (aucun échec enregistré), sa spécificité et sa reproductibilité dans cette pathologie. En identifiant 80 % d'anomalies ciblées dans notre travail, la FISH a ainsi considérablement amélioré les résultats du caryotype par mitogènes classiques.

Dans notre série la fréquence des anomalies récurrentes identifiées par FISH rejoint celle de la littérature. Nous avons comparé nos résultats à 4 séries de la littérature. La del 13q14 est de fréquence semblable ; lorsqu'elle est isolée, elle survient dans 58,8 % des stades A, et seulement dans 28,8 % des stades C ; elle représente 42,5 % des anomalies du groupe CD38 négatif. La trisomie 12 et la del ATM surviennent surtout aux stades B ; nous notons une différence significative en faveur de notre série quand à la fréquence de la trisomie 12 avec une seule série sur 4 de la littérature. Nous retrouvons de manière significative plus de del P53 que Dohner et Aoun ; 66,6% des del P53 surviennent au stade C de la maladie avec un âge moyen des patients plus avancé, suggérant son apparition dans les stades évolués et évolutifs de la maladie. Les del ATM et P53 représentent 39,1 % des anomalies du groupe CD38 positif.

Le troisième objectif de notre travail était de montrer l'intérêt pronostique de l'immunophénotypage et de la cytogénétique.

Le CD 38 a été évalué dans la majorité des cas de LLC que nous avons recruté (121 cas : 90 %) ; l'expression du CD38 dans notre étude a un impact pronostique significatif en analysant la survie globale.

La cytogénétique a une place considérable dans la stratification pronostique et thérapeutique, la del 13q14 isolée reste le marqueur d'une maladie indolente en particulier dans les stades précoces de la maladie, les del ATM et P53 identifient des groupes LLC de très haut risque à traiter de manière optimale en particulier les sujets de moins de 70 ans ; la del P53 reste le marqueur pronostique le plus péjoratif de cette pathologie.

Dans la LLC, des avancées thérapeutiques considérables ont amélioré la survie sans progression et même la survie globale grâce à l'immuno-chimiothérapie à base d'analogues des purines en tête la fludarabine et l'anti CD20 en particulier chez les sujets de moins de 70 ans. Notre série relativement jeune avec un âge moyen de 59 ans, était éligible de cette procédure. Le protocole FC (36 pts) et RFC (17 pts) ont été appliqués avec 41,6 % et 76,5 % de RC et 89 % et 88,3 % de RG respectivement. Il n'a pas été noté de différence significative de toxicité entre les deux protocoles.

Dans le groupe FC avec un recul de 17 à 70 mois, la médiane de survie est non atteinte, celle de la survie sans événement est de 39 mois sans différence significative selon le stade Binet ou l'état du CD38, le taux de β 2 microglobuline ou l'infiltration diffuse ou non diffuse de la PBO ; les anomalies cytogénétiques seules gardent leurs impacts pronostiques sous FC.

Dans le groupe RFC, le recul maximal est de 26 mois ; les médianes de survie globale et sans événements sont non atteintes, sans différences selon le CD38 ; pour la cytogénétique, seule la delP53 constitue un facteur pronostique défavorable.

L'introduction des protocoles FC et RFC a amélioré la médiane de survie globale avec une différence significative avec le groupe non traité par ces protocoles.

- 1 Muller-Hermelink HK, Montserrat E, Catovsky D, Harris NL.**
Chronic lymphocytic leukemia / small lymphocytic lymphoma.
In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues.
IARC Press Lyon, France; 2001: 127-130
- 2 Diehl LF, Karnell LH, Menck HR.**
The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia.
Cancer 1999; 86:2684-2692
- 3 Ait Ali H et al, pour le GALLC**
Approche épidémiologique de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) en Algérie
IXème Congrès National d'Hématologie, 10-12 Mai 2012
- 4 Anderson LA, Landgren O, Engels EA.**
Common community acquired infections and subsequent risk of chronic lymphocytic leukaemia.
Br J Haematol 2009; 147: 444-449
- 5 Mauro FR, Giammartini E, Gentile M, et al.**
Clinical features and outcome of familial chronic lymphocytic leukemia.
Haematologica 2006; 91:1117-1120
- 6 Toure O, Wei MH, Schmidt LS, et al.**
Identification of a novel chromosome region 13q21.33–q22.2 for susceptibility genes in familial chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2007; 109: 916-925
- 7 Ghia P, Caligaris-Cappio F.**
The origin of B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Semin Oncol 2006; 33:150 -156
- 8 Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al.**
Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors.
Blood 2002; 100:1177-1184
- 9 Maxime H, Kai X, Yen-Shing N, et al.**
Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B-cell precursors despite expressing different antibody reactivity.
The Journal of Clinical Investigation 2005; 115: 1636-1643
- 10 Jia L, Srinivasula SM, Liu F-T, et al.**
Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells.
Blood 2001; 98: 414-421

- 11 Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G.**
Mitochondria, the killer organelles and their weapons.
J Cell Physiol. 2002; 192:131-7.
- 12 Leger D.**
Etude des voies de signalisation cellulaire au cours de l'apoptose et de la différenciation mégacaryocytaire induites par la diosgénine dans la lignée érythroleucémique humaine HEL.
Rôle anti-apoptotique du léflunomide et voies de transduction du signal activées dans des lignées leucémiques humaine
These 2006 ; Université de Limoges
- 13 Olsson A, Diaz T, Aguilar-Santelises M, et al.**
Sensitization to TRAIL-induced apoptosis and modulation of FLICE-inhibitory protein in B chronic lymphocytic leukemia by actinomycin D.
Leukemia 2001; 15:1868-1877
- 14 Luo X, Budihardjo I, Zou H, et al.**
Bid, a bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.
Cell 1998; 94:481-490
- 15 Wieder T, Essmann F, Prokop A, et al.**
Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3.
Blood 2002; 97:1378–1387
- 16 Vogelstein B, Lane, Levine AJ.**
Surfing the p53 network.
Nature 2000; 408:307-310
- 17 Pettitt AR, Sherrington PD, Stewart G, et al.**
P53 dysfunction in B-cell chronic lymphocytic leukemia: inactivation of ATM as an alternative to TP53 mutation.
Blood 2001; 98:814-822
- 18 Johnston JB, Daeninck P, Verburg L, et al.**
p53, mdm-2, bax and bcl-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia.
Leuk Lymphoma 1997; 26: 435-449
- 19 Munk Pedersen I, Reed J.**
Microenvironmental interactions and survival of CLL B-cells.
Leuk Lymphoma 2004;45: 2365-2372
- 20 Trentin L, Cerutti A, Zambello R, et al.**
Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders.
Blood 1996; 87: 3327-3335

- 21 Patten P EM, Buggins AG S, Richards J, et al.**
CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment.
Blood, 15 May 2008; 111: 5173-5181
- 22 Deaglio S, Vaisitti T, Bergui L, et al.**
CD38 and CD100 lead a network of surface receptors relaying positive signals for B-CLL growth and survival.
Blood 2005; 105: 3042-3050
- 23 Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, et al.**
CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia
Blood 2006; 108:1135-1144
- 24 Kern C, Cornuel JF, Billard C, et al.**
Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway.
Blood 2004; 103:679-688
- 25 Granziero L, Ghia P, Circosta P, et al.**
Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2001; 97:2777-2783
- 26 Plate JM, Long BW, Kelkar SB.**
Role of beta2 integrins in the prevention of apoptosis induction in chronic lymphocytic leukemia B cells.
Leukemia 2000; 14:34-39
- 27 Lagneaux L, Delforge A, Dorval C, et al.**
Excessive production of transforming growth factor-beta by bone marrow stromal cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia inhibits growth of hematopoietic precursors and interleukin-production.
Blood 1993; 82: 2379-2385
- 28 Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, et al.**
VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3 : implication for apoptosis resistance.
Leukemia 2005; 19:513-523
- 29 Farahani M, Treweeke AT, Toh CH, et al.**
Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells.
Leukemia 2005; 19:524-530
- 30 Konig A, Menzel T, Lynen S, et al.**
Basic fibroblast growth factor (bFGF) upregulates the expression of bcl-2 in B cell chronic Lymphocytic leukemia cell lines resulting in delaying apoptosis.
Leukemia 1997; 11:258-265

- 31 Jones DT, Ganeshaguru K, Anderson RJ, et al.**
Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil-and radiation-induced apoptosis.
Blood 2003; 101: 3174-3180
- 32 Bartik MM, Welker D, Kay NE.**
Impairments in immune cell function in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Semin Oncol 1998; 25: 27-33
- 33 Clive S , Zent, MD and Neil E. Kay, MD.**
Autoimmune complications in chronic lymphocytic leukemia (CLL).
Best Pract Res Clin Haematol 2010; 23 (1) : 47-59
- 34 Nowakowski, G., Hoyer, JD, Shanafelt, TD, et al.**
Using smudge cells on routine blood smears to predict clinical outcome in chronic lymphocytic leukemia : a universally available prognostic test.
Mayo Clin Proc. 2007; 82(4): 449-453
- 35 Bennett J M, Catovsky D, Daniel MT, et al.**
The French-American-British (FAB) Cooperative Group. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias.
J Clin Pathol 1989; 42:567-584
- 36 Matutes E**
Differential diagnosis in chronic lymphocytic leukaemia
Best Practice and Research Clinical Haematology 2007; 20: 367-384
- 37 Matutes E, Attygalle A, Wotherspoon A, Catovsky D**
Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL)
Best Practice and Research Clinical Haematology 2010; 23: 3-20
- 38 Dillman RO, Beauregard JC, Lea JW, et al**
Chronic lymphocytic leukemia and other chronic lymphoid proliferations: Surface marker phenotypes and clinical correlations.
J Clin Oncol 1983 ; 1:190-197
- 39 Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al.**
The immunological profile of B cell disorders and proposal of the scoring system for the diagnosis of CLL.
Leukemia 1994; 8:1640-1645.
- 40 Matutes E, Polliack A.**
Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia.
Rev Clin Exp Hematol 2000; 4: 22-47

- 41 Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al.**
Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b).
Am J Clin Pathol 1997; 108: 378-382.
- 42 Geisler CH, Larsen JK, Hansen NE et al.**
Prognostic Importance of flow cytometric Immunophenotyping of 540 consecutive patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1991; 78: 1795-1802
- 43 Gattei V, Bulian P, Del Principe MI**
Relevance of CD49d protein expression as overall survival and progressive disease prognosticator in chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2008; 111: 865-873
- 44 Guillaume N, Alimardani G, Capiod JC, Claisse JF.**
Pertinence des analyses cytologiques et immunophénotypiques dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique
Ann Biol Clin 2002; 6: 673-681
- 45 Cro L, Ferrario A, Lionetti M, et al.**
The clinical and biological features of a series of immunophenotypic variant of B-CLL.
European Journal of Haematology 2010; 85: 120-129
- 46 Del Poeta G, Del Principe M I, Zucchetto A et al.**
CD69 is independently prognostic in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive clinical and biological profiling study;
Haematologica 2012; 97: 279-287
- 47 Hallek M, Cheson B D, Catovsky D, et al.**
Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2008; 111: 5446-5456
- 48 Moreno Carol, Villamor Neus, Colomer Dolors , et al.**
Clinical significance of minimal residual disease, as assessed by different techniques, after stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2006; 107: 4563-69
- 49 Rawstron A C, Villamor N , Ritgen M , et al.**
International standardisation approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia 2007; 2: 956-964
- 50 Mauro FR, De Rossi G, Burgio VL, et al.**
Prognostic value of bone marrow histology in chronic lymphocytic leukemia. A study of 335 untreated cases from a single institution.
Haematologica 1994; 79: 334-341

- 51 Molika S.**
Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment.
Leuk lymphoma 1994; 13: 203-214.
- 52 Gordon DS, Jones BM, Browning SW, et al.**
Persistent polyclonal lymphocytosis of B lymphocytes.
N Engl J Med. 1982; 307(4): 232-6.
- 53 Sokolowska-Gillois J.**
Lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés : une série monocentrique de 33 patientes.
Mémoire du diplôme d'études spécialisées de biologie médicale.
Faculté de Médecine de Nancy. 2009
- 54 Ghia P, Prato G, Scielzo C, et al**
Monoclonal CD5+ and CD5- B lymphocyte expansions are frequent in the peripheral blood of the elderly.
Blood 2004; 103: 2337-42
- 55 Siavash Piran et al.**
Clinical, phenotypic, and genetic characteristics of non-CLL type monoclonal B lymphocytosis
Blood 2011, 118 : Abstract 5209
- 56 Felman P, Merle-Béral H.**
Aspects cytologiques et immunophénotypiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques
Rev Fr Lab 1999 ; 313 : 31-7
- 57 Del Giudice , Osuji N, Dexter T, et al.**
B-CELL prolymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia have distinctive gene expression signatures.
Leukemia 2009; 23, 2160-67.
- 58 Jennings CD and Foon KA**
Recent advances in Flow cytometry : Application to the diagnosis of hematologic malignancy.
Blood 1997 ; 90: 2963-2892.
- 59 Gong JZ, Lagoo AS, Peters D, et al**
Value of CD23 determination by flow cytometry in differentiating Mantle Cell Lymphoma from Chronic Lymphocytic Leukemia/Small Lymphocytic Lymphoma.
Am J Clin Pathol 2001 ; 116 : 893-9.
- 60 Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al.**
Clinicopathological definition of Waldenstrom's macroglobulinemia: consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenstrom's Macroglobulinemia.
Semin Oncol 2003; 30:110–115.

- 61 **Gotić M, Kraguljac N, RolovićZ, Radosević N, Bosković D.**
Immunophenotyping of leukemic cells in the diagnosis of hairy cell leukemia.
Srp Arh Celok Lek. 2000; 128 (5-6):157-64.
- 62 **Cornfield DB, Mitchell Nelson DM, Rimsza LM, et al.**
The diagnosis of hairy cell leukemia can be established by flow cytometric analysis of peripheral blood, even in patients with low levels of circulating malignant cells.
Am J Haematol 2001; 67: 223-226
- 63 **Dong H Y, Weisberger J, Liu Z, Tugulea S**
Immunophenotypic analysis of CD103+ B-Lymphoproliferative disorders.
Am J Clin Pathol 2009; 131: 586-595.
- 64 **Catovsky D, Matutes E.**
Splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes/splenic marginal-zone lymphoma.
Semin Hematol 1999; 36:148-154.
- 65 **Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, et al.**
Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia.
Blood 1991;78: 3269-3274.
- 66 **Shirono K, Hattori R, Takatsuki K.**
A new classification of clinical stages of adult T-cell leukemia based on prognosis of the disease.
Leukemia 1994; 8:1834-1837.
- 67 **Youn H, Kim Y, Hoppe RT.**
Mycosis fungoides and Sézary syndrome.
Semin Oncol 1999; 26 :276-289.
- 68 **Loughran TP.**
Clonal diseases of large granular lymphocytes.
Blood 1993; 82:1-14.
- 69 **Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, al.**
Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1975; 46 : 219-234
- 70 **Binet JL., Auquier A, Dighiero G, et al.**
A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis.
Cancer.1981; 48: 198-206.
- 71 **Morilla A , De Castro D G, Del Giudice I, et al.**
Combinations of ZAP-70, CD38 and IGHV mutational status as predictors of time to first treatment in CLL.
Leukemia and lymphoma 2008; 49: 2108-2115.

- 72 Galton DAG.**
The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia.
Can Med Assoc J 1966; 94: 1005-10
- 73 Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C.**
Lymphocyte doubling time in Chronic lymphocytic leukemia : analysis of its prognostic significance
Br J Haematol 1986; 62:567-75.
- 74 Molica S, Alberti A**
Prognostic Value of the lymphocyte doubling time(LDT) in Chronic Lymphocytic Leukemia
Cancer.1987 Dec 1; 60(11): 2712-6.
- 75 Oscier D, Fegan C, Hillmen P, et al.**
Guidelines on the diagnosis and management of chronic lymphocytic leukemia.
Brit J Haematol 2004; 125: 294-317.
- 76 Johansson P, Eisele L, Klein-Hitpass L, Sellmann L, Dührsen U, Dürig J, Nüchel H.**
Percentage of smudge cells determined on routine blood smears is a novel prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia.
Leuk Res. 2010; 34: 892-898.
- 77 Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, et al**
Bone marrow histologic pattern : the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia : a multivariate survival analysis of 329 cases.
Blood 1984; 64: 642-8
- 78 Han T, Barcos M, Emrich L, et al.**
Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia : correlation with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data.
J Clin Oncol 1984; 6: 562-570
- 79 Ferrarini M, Chiorazzi N.**
Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia.
Semin Hematol 2004; 41: 207-223
- 80 Maloum K, Settegrana C, Chapiro E, et al.**
Ig VH gene mutational status and LPL/ADAM29 gene expression as clinical outcome predictors in CLL patients in remission following treatment with oral fludarabine plus cyclophosphamide.
Ann Hematol 2009; 88: 1215-1221
- 81 Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, et al.**
MicroRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival.
Blood 2010; 116: 945-952

- 82 Erikci AA, Karagoz B, Ozyurt M, et al**
HLA-G expression in B chronic lymphocytic leukemia : a new prognostic marker ?
Hematology 2009; 14: 101-105
- 83 Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G et al.**
Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial.
Lancet. 2010;376: 1164-74
- 84 Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al.**
National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia : revised guidelines for diagnosis and treatment.
Blood 1996 ; 87 : 4990-4997
- 85 Keating MJ, Flinn I, Jain V et al.**
Therapeutic role of Alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine : results of a large international study.
Blood. 2002 ; 99 : 3554-3561
- 86 Monserrat E, Moreno C, Esteve J et al.**
How I treat refractory CLL.
Blood. 2006 ; 107 : 1276-1283.
- 87 Zenz T, Gribben JG, Hallek M et al.**
Risk categories and refractory CLL in the era of chemoimmunotherapy.
Blood. 2012 ; 119 : 4101-4107.
- 88 Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al**
Serum beta2-microglobulin and serum thymidine kinase Predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma
Leuk Lymphoma.1996; 22: 439-447
- 89 Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al.**
Early results of a chemoimmunotherapy regimen of Fludarabine, cyclophosphamide and Rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2005 ; 23 :4079-88
- 90 Delgado J, Pratt G, Phillips N, et al.**
Beta2-microglobulin is a better predictor of treatment-free survival in patients with chronic lymphocytic leukemia if adjusted according to glomerular filtration rate.
Br J Haematol 2009; 145: 801-805
- 91 Berrebi A, Bassous L, Haran M.**
The significance of elevated beta 2- microglobulin in chronic lymphocytic leukemia : evidence of in vitro secretion following activation of CLL cells.
Leukemia research 2010; 34: 248-249

- 92 Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al.**
Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early non smoldering chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1999; 93:1732-1737
- 93 Sarfati M, Chevret S, Chastang C, et al.**
Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1996 ; 88 : 4259-64
- 94 Meuleman N, Stamatopoulos B, Dejeneffe M, et al**
Doubling time of soluble CD23: a powerful prognostic factor for newly diagnosed and untreated stage A chronic lymphocytic leukemia patients.
Leukemia 2008; 22:1882-1890
- 95 Hallek M, Langenmayer I, Nerl C, et al 87**
Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, non smoldering chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1999;93:1732-1737.
- 96 Letestu R, Lévy V, Eclache V, et al.**
Prognostic of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients : the strength of routine parameters.
Blood 2010; 116: 4588-90
- 97 Maffei R, Martinelli S, Santachiara R, et al.**
Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2010; 116: 584-592
- 98 Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al.**
Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors.
J Clin Invest. 1998;102:1515-25.
- 99 Opezzo P, Dighiero G.**
What do somatic hypermutation and class switch recombination teach us about chronic lymphocytic leukemia.
Curr Top Microbiol Immunol.2005; 294:71-89
- 100 Thorsélius M, Kröber A, Murray F, et al.**
Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21 using chronic lymphocytic leukemia patients independent of géographic origin and mutational status.
Blood 2006; 107: 2889-94

- 101 Tobin G, Thunberg U, Laurell A, et al.**
Patients with chronic lymphocytic leukemia with mutated VH genes presenting with Binet stage B or C form a subgroup with a poor outcome.
Haematologica 2005; 90: 465-9.
- 102 Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK.**
Unmutated IgVH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic Leukemia.
Blood 1999; 94: 1848-1854.
- 103 Vasconcelos Y, Davi F, Levy V, et al.**
Binet's staging system and VH genes are independent but complementary prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2003; 21:3928-32
- 104 Hayat A, O'Brien D, O'Rourke P, et al.**
CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia and Lymphoma 2006 ; 47 : 2371-2379
- 105 Damle RN, Wasil T, Fais F, et al.**
Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1999; 94:1840-1847.
- 106 Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al**
ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin variable region mutations in chronic lymphocytic leukemia.
N Eng J Med 2003; 348: 1764-75
- 107 Byrd JC , Gribben J G, Peterson B L, et al.**
Select high risk genetic features predict earlier progression following chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab in chronic lymphocytic leukemia : justification for risk-adapted therapy.
J Clin Oncol 2006; 24: 437-443
- 108 Del Poeta G, Del Principe M I, Consalvo M A I, et al.**
The addition of rituximab to fludarabine improves clinical outcome in untreated patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia
Cancer 2005; 104: 2743-52.
- 109 Kay N E, O'Brien S M, Pettitt A R and Stilgenbauer S**
The role of prognostic factors in assessing 'high risk' subgroups of patients with chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia 2007 ; 21, 1885-1891.

- 110 Krober A, Seiler T, Benner A, et al.**
VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia,
Blood 2002;100: 1410-1416.
- 111 Orlandi EM, Pascutto C, Zibellini S, et al.**
Biological markers and prognostic scoring systems in chronic lymphocytic leukemia.
Br J Haematol 2009;147, 396-410.
- 112 Thornton PD., Fernandez C, Giustolisi GM., et al.**
CD38 expression as a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia.
Hematol J. 2004; 5: 145-151.
- 113 Gentile M, Mauro FR, Calabrese E, et al.**
The prognostic value of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia patients studied prospectively at diagnosis : a single institute experience.
Br J Haematol 2005; 130: 549-57.
- 114 Bagli L, Zucchini A, Innoceta AM, et al.**
Immunoglobulin VH genes and CD38 expression analysis in B-Cell chronic lymphocytic leukemia.
Acta Haematologica 2006, 116; 72-74.
- 115 Ibrahim S, Keating M, Do K-A, et al.**
CD38 expression as an important prognostic factor in B-CLL.
Blood, 2001, 1:181-186.
- 116 Dürig J, Naschar M, Schmücker U et al.**
CD38 expression is a important prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia 2002; 16:30-35.
- 117 Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR**
Relationship between P53 dysfunction, CD38 expression and IgVH mutation in chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2002; 100:1404-1409.
- 118 Del Poeta G , Maurillo L, Venditti A, et al**
Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2001; 98: 2633-2639
- 119 Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, et al.**
CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease.
Blood 2002; 99:1023-1029

- 120 Ghia P, Guida G, Stella S, et al**
The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression.
Blood 2003; 101: 1262-1269.
- 121 Mainou-Fowler T, Dignum HM, Proctor SJ, Summerfield GP.**
The prognostic value of CD38 expression and its quantification in B Cell chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia and Lymphoma 2004; 45: 455-462
- 122 Cocco AE, Osei ES, Thut DM , et al.**
Bimodal cell populations are common in chronic lymphocytic leukemia but do not impact overall survival.
Am J Clin Pathol 2005; 123: 818-25.
- 123 Del Principe MI , Del Poeta G, Buccisano F, et al.**
Clinical significance of ZAP-70 protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2006 ; 108 :853-861.
- 124 Pavlovsky C., Pardo L, Pavlovsky MA, et al.**
Is assessment of surface CD38 expression worthwhile as a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia patients.
Hematology 2008; 13: 24-27
- 125 Chevallier, Penther D, Avet-Loiseau H, et al.**
CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia.
Br J Haematol 2002;116:142-50.
- 126 Chang CC et Cleveland R P.**
Conversion of CD38 and/or myeloid-associated marker expression status during the course of B-CLL : association with a change to an aggressive clinical course.
Blood 2002; 100: 1106
- 127 Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al.**
ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile.
Blood 2003; 101:4944-4951
- 128 Krober A , Bloehdorn J, Hafner S, et al.**
Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2006 ; 24 : 969-75.
- 129 Vroblova V, Vrbacky F, Hrudkova M, et al.**
Significant change in ZAP-70 expression during the course of chronic lymphocytic leukemia.
Eur J Haematol 2010; 84:513-517.

- 130 Catherwood MA, Matthews C, Niblock R, et al.**
ZAP70 mRNA quantification in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Eur J Haematol 2006; 76: 294-298.
- 131 Vener C, Gianelli U, Cortelezzi A, et al.**
ZAP-70 immunoreactivity is a prognostic marker of disease progression in chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia and lymphoma, 2006; 47: 245-251.
- 132 R Zanotti, A Ambrosetti, M Lestani, et al.**
ZAP-70 expression, as detected by immunohistochemistry on bonemarrow biopsies from early-phase CLL patients, is a strong adverse prognostic factor.
Leukemia 2007; 21:102-109.
- 133 Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al.**
ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukemia.
Lancet 2004; 363: 105-111.
- 134 Chaar BT, Schergen K, Grosso LE.**
Discordance of ZAP70 in patients with chronic lymphocytic leukemia.
Int. Jnl. Lab. Hem2008; 30: 36-40.
- 135 Rassenti LZ, Jain S, Keating M J, et al.**
Relative value of ZAP70, CD38, and immunoglobulin mutation statut in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2008; 112: 1923-1930
- 136 Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C.**
Immunostimulatory oliginucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients : a study of 132 cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression.
Blood 2006; 108: 3152-3160
- 137 Juliusson G & Gahrton, G.**
Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implications.
Cancer Genetics and Cytogenetics, 1990; 45:143–160.
- 138 Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al.**
Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities.
N Eng J of Med 1990; 323: 720-4.
- 139 Buhmann R, Kurzeder C, Rehkla J, et al.**
CD40L stimulation enhances the ability of conventional metaphase cytogenetics to detect chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells.
Br J Haematol 2002; 118: 968-975

- 140 Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W and Haferlach T**
Comprehensive genetic characterization of CLL : a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVH status and immunophenotyping.
Leukemia 2007 ; 21 : 2442-51.
- 141 E Van Den Neste, V Robin, J Francart et al.**
chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine.
Leukemia 2007 ; 21 :1715-1722.
- 142 Mayr C, Speicher M R, Kofler D M, et al.**
Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2006; 107:742-51.
- 143 Woyah JA, Heerema NA, Zhao J, et al.**
Dic(17 ;18)(p11.2 ;p11.2) is a recurring abnormality in chronic lymphocytic leukemia associated with aggressive disease.
Br J Haematol 2010;148 : 754-759.
- 144 Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, et al.**
Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages.
Leukemia Research 2010; 34:63-68.
- 145 Rossi D, Deambrogi C, Monti S, et al.**
BCL3 translocation in CLL with typical phenotype : assessment of frequency, association with cytogenetic subgroups, and prognostic significance.
Br J Haematol 2010; 150: 700-730.
- 146 Glassman AB, Hayes KJ.**
The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis and prognosis of chronic lymphocytic leukemia.
Cancer Genetics and cytogenetics 2005; 158: 88-91.
- 147 Aoun P, Blair HE, Smith LM, et al.**
Fluorescence in situ Hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-CLL/ Small Lymphocytic lymphoma.
Leukemia and lymphoma, August 2004; 45:1595-1603.
- 148 Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., et al.**
Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia
N Eng J of Med 2000; 343: 1910-6
- 149 Reddy KS.**
CLL profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel.
Br J Haematol 2005;132: 705-722.

- 150 Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al.**
Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2006; 24: 4634-4641.
- 151 Mabuchi H, Fujii H, Calin G, et al.**
Cloning and characterization of CLLD6, CLLD7, and CLLD8 novel candidate genes for leukemogenesis at chromosome 13q14, a region commonly deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Cancer Res 2001; 61:2870-7.
- 152 Corcoran MM, Rasool O, Liu Yet al.**
Detailed molecular delineation of 13q14.3 loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Blood 1998; 91:1382-90.
- 153 Calin GA., Dumitru CD., Shimizu M,et al.**
Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia .
Proc Natl Acad Sci 2002; 99:15524-15529.
- 154 Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al.**
miR15 and miR16 induce apoptosis by targeting Bcl-2.
Proc Natl Acad Sci 2005; 102 : 13944-9.
- 155 Stockero K J, Fink S R, Smoley S A, et al.**
Metaphase cells with normal G-bands have cryptic interstitial deletions in 13q14 detectable by fluorescence in situ hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia .
Cancer Genet Cytogenet, 2006; 166: 152-156.
- 156 Guarini A, Gaidano G, Romana F, et al.**
Chronic lymphocytic leukemia patients with highly stable and indolent disease show distinctive phenotypic and genotypic features.
Blood 2003; 102: 1035-1041
- 157 Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, et al.**
A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia.
Br J Haematol 2009; 148: 544-550.
- 158 Chena C, Avalos J S, Bezares R F, et al.**
biallelic deletion 13q14 in patients with chronic lymphocytic leukemia : cytogenetic, FISH and clinical studies.
Eur J Haematol 2008; 81: 94- 99.
- 159 Hernandez JA., Rodriguez AE., Gonzalez M, et al.**
A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia.
Haematologica 2009; 94: 364-371

- 160 Cotter FE, Auer R.L.**
Genetic alteration associated with chronic lymphocytic leukemia.
Cytogenet Genome Res 2007; 118: 310-319
- 161 Porpaczy E, Bilban M, Heinze G, et al.**
Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with trisomy 12.
European journal of clinical investigation 2009; Vol. 39: 568-575
- 162 Que TH, Marco JG, Ellis J, et al.**
Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by FISH: analysis by stage, immunophenotype and morphology.
Blood, 1993; 82: 571-575.
- 163 Tam CS., Otero-Palacios J, Abruzzo LV, et al.**
Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype : a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in situ hybridization in 510 patients.
Br J Haematol 2008; 141:36-40
- 164 Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J GJ, et al.**
Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients.
Br J Haematol 1996; 92 : 382-8.
- 165 Geisler CH., Philip P, Egelund Christensen B, et al.**
In B-Cell Chronic Lymphocytic leukemia chromosome 17 abnormalities and not trisomy 12 are the single most important cytogenetic abnormalities for the prognosis: a cytogenetic and immunophenotypic study of 480 unselected newly diagnosed patients.
Leukemia research 1997; 21: 1011-23.
- 166 Guarini A, Marinelli M, Tavoraro S, et al.**
ATM gene alteration in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression.
Haematologica 2012 ; 97 :47-55
- 167 J R Neilson, R Auer, D White, et al.**
Deletions at 11q identify a subset of patients with atypical CLL who consistent disease progression and reduced survival.
.Leukaemia 1997; 11:1929-1932.
- 168 Stilgenbauer S, Liebisch P, Schroder JMR, et al. 1996.**
Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-q23.1 in lymphoproliferative disorders.
Proc Natl Acad Sci 1996; 93; 59: 11837-11841.
- 169 Starostik P, Manshouri T, O'Brien S, et al.**
Deficiency of the ATM Protein expression defines an aggressive subgroup of B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Cancer Research 1998; 58: 4552-4557.

- 170 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 2007; 25: 5448-5457.
- 171 A Carter, K Lin, P D Sherrington, et al**
Imperfect correlation between P53 dysfunction and deletion of P53 and ATM in chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia 2006 ; 20 : 737-40.
- 172 Cejkova S, Rocnova L, Potesil D, et al.**
Presence of heterozygous ATM deletion may not be critical in the primary response of chronic lymphocytic leukemia cells to Fludarabine.
Journal of compilation 2008; 82: 133-142.
- 173 Döhner H, Stilgenbauer S, James M R, et al.**
11q deletion identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis.
Blood 1997; 89: 2516-22.
- 174 Stilgenbauer S, Bullinger L, Lichter P & Döhner H**
Genomic aberrations and V(H) gene mutation status in pathogenesis and clinical course.
Leukemia 2002; 16: 993-1007.
- 175 Dickinson JD, Gilmore J , Iqbal J, et al.**
11q22.3 deletion in B-chronic lymphocytic leukemia is specifically associated with bulky lymphadenopathy and ZAP 70 expression but not reduced expression of adhesion/cell surface receptor molecules.
Leukemia and lymphoma 2006; 47: 231-244.
- 176 Dicker F, Herholz H, Schnittger S et al.**
The deletion of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype.
Leukemia 2009, 23, 117-124.
- 177 Farconi F, Rinaldi A, Kwee I, et al.**
genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion.
British J Haematol 2008; 143: 532-36.
- 178 Rudenko HC, Else M, Dearden C, et al.**
Characterising the TP53-deleted subgroup of chronic lymphocytic leukemia : an analysis of additional cytogenetic abnormalities detected by interphase fluorescence in situ hybridisation and array-based comparative genomic hybridisation.
Leukemia and Lymphoma 2008; 49:1879-1886.

- 179 Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, et al.**
Monoallelic and biallelic inactivation of P35 gene in chronic lymphocytic leukemia : Selection, impact on survival, and response to DNA damage.
Blood 2009; 114: 5307-5314
- 180 Cordone I, Masi S, Romana F, et al.**
P53 expression in B-Cell Chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis.
Blood 1998 ; 91 : 4342-4349.
- 181 Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al.**
P53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies.
Blood 1994; 84: 3148-57
- 182 Eichhorst, BF, Busch R, Hopfinger G, et al.**
Fludarabin plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2006 ; 107 : 885-891.
- 183 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 2009; 114: 2589-2597
- 184 Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, et al**
De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity : the M.D. Anderson and Mayo clinic experience.
Blood 2009; 114: 957-964
- 185 Best OG, Gardiner AC, Davis ZA, et al.**
A subset of Binet stage A CLL patients with TP53 abnormalities and mutated IgVH genes have stable disease.
Leukemia 2009; 23:212-214
- 186 Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al.**
Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with P53 mutations and deletions.
Blood 2004; 103: 3278-81.
- 187 Zhang Y, Matthiesen P, Harder S, et al.**
A 3-cM commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization.
Genes chromosomes Cancer 2000; 27: 52-8.

- 188 Morrison VA.**
Infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukemia: Pathogenesis, spectrum of infection and approaches to prophylaxis.
Clinical Lymphoma and Myeloma 2009; 5: 365-370
- 189 Eichhorst BF, Busch R, Schweighofer C, et al.**
Due to low infection rates no routine anti-infective prophylaxis is required in younger patients with chronic lymphocytic leukaemia during fludarabine-based first line therapy.
Br J Haematol 2006; 136:63-72.
- 190 Tsopra OA, Ziros PG, Lagadinou ED, et al.**
Disease-Related anemia in chronic lymphocytic leukemia is not due to intrinsic defects of Erythroid Precursors: A possible pathogenetic role for tumor necrosis factor-alpha.
Acta Haematologica 2009; 121: 187-195
- 191 Strati P, Caligaris-Cappio F.**
A matter of debate in chronic lymphocytic leukemia : is the occurrence of autoimmune disorders an indicator of chronic lymphocytic leukemia therapy ?
Current opinion in Oncology 2011; 23 : 455-460.
- 192 Zent CS, Ding W, Schwager SM, et al.**
the prognostic significance of cytopenia in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma.
Br J Haematol 2008, 141: 615-621.
- 193 Mauro FR, Foa R, Cerretti R, et al.**
Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia : clinical, therapeutic, and prognostic features.
Blood 2000 ; 95 : 2786- 2792.
- 194 Visco C, Novella E, Peotta E, et al.**
Autoimmune hemolytic anemia in Patients with chronic lymphocytic leukemia is associated with Ig VH status.
Hematologica 2010; 95:1230-1232
- 195 Borthakur G, O'Brien S, Wierda W, et al.**
Immune anaemias in patients with chronic lymphocytic leukaemia treated with fludarabine, Cyclophosphamide and Rituximab- incidence and predictors.
Br J Haematol 2007; 136: 800-805.
- 196 Maddocks-Christianson K, Slager SL, Zent CS, et al.**
Risk factors for development of a second lymphoid malignancy in patients with chronic lymphocytic Leukemia.
Br J Haematol 2007, 139: 398-404.

- 197 Rossi D, Gaidano G.**
Biological and clinical risk factors of chronic lymphocytic leukemia transformation to Richter syndrome.
Br J Haematol 2008; 142: 202-215.
- 198 Tsimberidou AM, Keating MJ.**
Richter syndrome. Biology, incidence, and therapeutic strategies.
Cancer; 2005; 103: 216-228.
- 199 Tsimberidou AM, O'Brien S, Khouri I, et al**
Clinical outcomes and prognostic factors in patients with Richter's syndrome treated with chemotherapy or chemoimmunotherapy with or without stem-cell transplantation.
J Clin Oncol 2006; 24: 2343-2351.
- 200 Criel A, Michaux L, de Wolf-Peters C.**
The concept of typical and atypical chronic lymphocytic leukemia.
Leuk Lymphoma 1999; 33:33-45
- 201 Flinn IW, Grever MR.**
Chronic lymphocytic leukemia. (Review).
Cancer Treat Rev 1996; 96: 1-13.
- 202 Weiss MA, Glenn M, Maslak P, et al.**
Consolidation therapy with high-dose cyclophosphamide improves the quality of response in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine as induction therapy.
Leukemia 2000; 14:1577-82
- 203 CLL Trialists' Collaborative Group.**
Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials.
J Natl Cancer Inst 1999; 91: 861-868
- 204 Keating MJ., O'Brien S, Lerner S, et al**
Long term Follow up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving Fludarabine regimens as initial therapy.
Blood 1998 ; 92:1165-1171.
- 205 Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, et al.**
Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia.
N Engl J Med 2000; 343: 1750-7.
- 206 Leporrier M, Chevret S, Cazin B, et al**
Randomised comparison of fludarabine, CAP, and CHOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients.
Blood 2001; 98:2319-2325.

- 207 Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al.**
Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial.
Lancet 2007; 370 : 230-9.
- 208 Shustik C, Turner A R, Desjardins P, et al**
Oral fludarabine in untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia 2010 ; 24: 237-239.
- 209 Karlsson KA, Strömberg M, Jönsson V, et al.**
Cladribine (CdA) gives longer response duration than fludarabine and high-dose intermittent chlorambucil as first-line treatment of symptomatic chronic lymphocytic leukemia.
Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2007; **110**: 630.
- 210 Robak T , Blonski J Z, Wawrzyniak E, et al.**
Activity of cladribine combined with cyclophosphamide in frontline therapy for chronic lymphocytic leukemia with 17p13/TP53 deletion.
Cancer 2009; 115:94-100
- 211 O'Brien S M, Kantarjian H M, Cortes J, et al.**
Results of the Fludarabine and Cyclophosphamide Combination Regimen in Chronic Lymphocytic Leukemia
J Clin Oncol 2001; 19, 5: 1414-1420.
- 212 Laurenti L, De Padua L, Tarnani M, et al.**
Oral fludarabine and cyclophosphamide as front line chemotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia. The impact of biological parameters in the response duration.
Ann Hematol 2008; 87: 891-898.
- 213 Laurenti L, De Padua L, Tarnani M, et al.**
Comparison between oral and intravenous fludarabine plus cyclophosphamide regime as front-line therapy in patients affected by chronic lymphocytic leukemia : influence of biological parameters on the clinical outcome.
Ann Hematol 2011; 90: 59-65.
- 214 Hainsworth J D, Litchy S, Barton H, et al**
Single-agent Rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma.
J Clin Oncol 2003; 21:1746-51.
- 215 J E Castro, D F James, J D Sandoval-Sus et al.**
Rituximab in combination with high-dose methylprednisolone for the treatment of chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia 2009; 23: 1779-89.

- 216 Hallek M, Fingerle-Rowson G, Fink A- M, et al.**
Immunochemotherapy with Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Versus Fludarabine and Cyclophosphamide (FC) Improves Response Rates and Progression-Free Survival (PFS) of Previously Untreated Patients (pts) with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)
Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2008; 112: 325.
- 217 Tam C S , O'Brien SM , Wierda W, et al**
Long-term results of Fludarabine, Cyclophosphamide, and Rituximab regimen as initial therapy of chronic lymphocytic leukemia.
Blood.2008; 112: 975-980
- 218 Vicki Morrison.**
Infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukemia: pathogenesis, spectrum of infection, and approaches to prophylaxis.
Clinical Lymphoma and Myeloma 2009; 9: 365-370
- 219 Robak T, Moiseev S, Dmoszynska A, et al**
Rituximab, Fludarabine, and Cyclophosphamide (R-FC) Prolongs Progression Free Survival in Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Compared with FC Alone: Final Results from the International Randomized Phase III REACH Trial
Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 112: Abstract 1
- 220 Badoux XC, Keating MJ , Wang X , et al.**
Fludarabine, cyclophosphamide, and Rituximab chemoimmunotherapy is highly effective Treatment for relapsed patients with CLL. Xavier C.
Blood 2011; 117: 3016-3024
- 221 Foon KA, Boyiadzis M, Land SR, et al.**
Chemoimmunotherapy with low-dose Fludarabine and Cyclophosphamide and high dose Rituximab in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia..
J Clin Oncol 2009 ; 27 : 498-503
- 222 Bosh F, Abrisqueta P, Villamor N, et al**
Rituximab, Fludarabine, Cyclophosphamide, and Mitoxantrone: a new, highly active chemoimmunotherapy regimen for chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2009; 27: 4578-4584
- 223 O'Brien S, Kantarjian HM, Thomas DA et al.**
Alemtuzumab as treatment of residual disease after chemotherapy in patient with chronic lymphocytic leukemia.
Cancer 2003; 98: 2657-2663
- 224 Hillmen P, Skotnicki A B, Robak T, et al.**
Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol. 2007; 25: 5616-23

- 225 Wierda WG, Chiorazzi N, Dearden C, et al.**
Chronic lymphocytic leukemia : new concepts for future therapy.
Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia 2010 ; 10 : 369-378
- 226 Zent CS, Call TG, Shanafelt TD, et al.**
Early treatment of high-risk chronic lymphocytic leukemia with Alemtuzumab and Rituximab.
Cancer 2008 ; 113 :2110-8
- 227 Hainsworth JD, Vasquez ER, Spigel DR, et al.**
Combination therapy with fludarabine and Rituximab followed by Alemtuzumab in the first-line treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma.
Cancer 2008; 112: 1288-95
- 228 Schweighofer CD, Ritgen M, Eichhorst F, et al.**
Consolidation with Alemtuzumab improves progression-free survival in patients with CLL in first remission-long term follow-up of a randomized phase III trial of the German CLL study group (GCLLSG).
Br J Haematol 2008; 144:95-98
- 229 Parikh SA, Keating MJ, O'Brien S, et al.**
Frontline chemoimmunotherapy with fludarabine, cyclophosphamide, Alemtuzumab, and Rituximab for high-risk chronic lymphocytic leukemia.
Blood. 2011; 118:2062-2068
- 230 Tsimberidou AM, Wierda WG, Plunkett W, et al.**
Phase I-II Study of Oxaliplatin, Fludarabine, Cytarabine, and Rituximab combination therapy in patients with Richter's syndrome or fludarabine –refractory chronic lymphocytic leukemia.
J Clin Oncol 2008; 26: 196-203
- 231 Tsimberidou AM, Wierda WG, Wen S, et al.**
Results of a phase I-II clinical trial of oxaliplatin, fludarabine, cytarabine, and Rituximab combination therapy in patients with aggressive, relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL) and Richter syndrome (RS).
Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), Nov 2010; 116: 923.
- 232 Tonino SH., van Gelder M, Eldering E, et al.**
R-DHAP is effective in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia..
Leukemia 2010; 24: 625-654
- 233 O'Brien S, Moore J O, Boyd T E, et al.**
5-year survival in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia in a randomized, phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without Oblimersen.
J Clin Oncol. 2009; 27: 5208-5212

- 234 O'Brien S, Moore J O, Boyd T E, et al.**
Randomised phase III trial of Fludarabine plus Cyclophosphamide with or without Oblimersen sodium (bcl2 antisense) in patients with relapsed or refractory Chronic Lymphocytic Leukemia.
J Clin Oncol. 2007; 25:1114-20
- 235 Brown JR, Tesar B, Werner L, et al,**
Obatoclox in combination with Fludarabine and Rituximab (FR) Is Well-Tolerated and Shows Promising Clinical Activity in Relapsed CLL/SLL
ASH 2011, Abstract 2865
- 236 Lin TS, Heerema NA, Lozanski G, et al.**
Flavopiridol (Alvocidib) induces Durable Responses in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) patients with High-Risk Cytogenetic Abnormalities
ASH Annual Meeting Abstracts 2008 112:46
- 237 Awan FT, Johnson AJ, Lapalombella R, et al.**
Thalidomide and lenalidomide as new therapeutics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia.
Leukemia and lymphoma 2010; 51: 27-38
- 238 Wendtner C, Fraser G, Goldberg SL, et al,**
Interim Results for the Safety and Efficacy of Different Lenalidomide Starting Dose Regimens in Subjects with Relapsed or Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (CC-5013-CLL-009 Study)
ASH 2011 abstract 2859
- 239 Ferrajoli A, O'Brien S, Wierda W, et al,**
Lenalidomide as Initial Treatment of Elderly Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)
ASH 2008, Abstract 45
- 240 Wierda WG , Kipps TJ, Mayer J, et al.**
Ofatumumab as single-agent CD20 immunotherapy in Fludarabine refractory CLL.
J Clin Oncol 2010; 28:1749-55
- 241 Byrd JC, O'Brien S, Flinn IW, et al.**
Phase I study of Lumiliximab with delayed pharmacokinetic and pharmacodynamic measurements in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia.
Clin Cancer Res. 2007 ; 13 :4448-55
- 242 Tournilhac O, Cazin B, Leprêtre S et al.**
Impact of frontline fludarabine and cyclophosphamide combined treatment on peripheral blood stem cell mobilization in B-cell chronic lymphocytic leukemia.
Blood 2004 ; 103 :363-365.

- 243 Moreno C.**
Hematopoietic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia.
Hematology Education : the education program for the annual congress of the European hematology association. 2012 ; 6 :101-110.
- 244 Milligan DW, Fernandes S, Dasgupta R, et al.**
Results of the MRC pilot study show autografting for younger patients with chronic lymphocytic leukemia is safe and achieves a high percentage of molecular responses.
D W. Milligan and al.
Blood 2005; 105: 397-404
- 245 Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, et al**
Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia : a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC.
Blood 2011; 117: 6109-6119
- 247 Michallet M, Chevret S, Brand R.**
Autologous and allogeneic transplantation versus conventional chemotherapy in chronic lymphocytic leukemia.
Bone Marrow Transplant, (2003) 31, S48. (abstract)
- 246 Dreger P, Corradini P, E Kimby, et al.**
Indication for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia : the EBMT transplant consensus.
Leukemia 2007; 21: 12-17
- 248 Sorror M L, Storer B E, Sandmaier B M, et al.**
Five year follow-up patients with advanced chronic lymphocytic leukemia treated with allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning.
J Clin Oncol 2008 ; 26 : 4912-20
- 249 Dreger P, Döhner H, Ritgen M, et al.**
Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia : long-term clinical and MDR results of the German study group CLL3X trial.
Blood. 2010 ; 116 : 2438-2447
- 250 Delgado J, Pillai S, Phillips N et al.**
Does reduced-intensity allogeneic transplantation confer a survival advantage to patients with poor prognosis chronic lymphocytic leukemia ? A case-control retrospective analysis.
Ann.Oncol.2009 ; 20 : 2007-2012

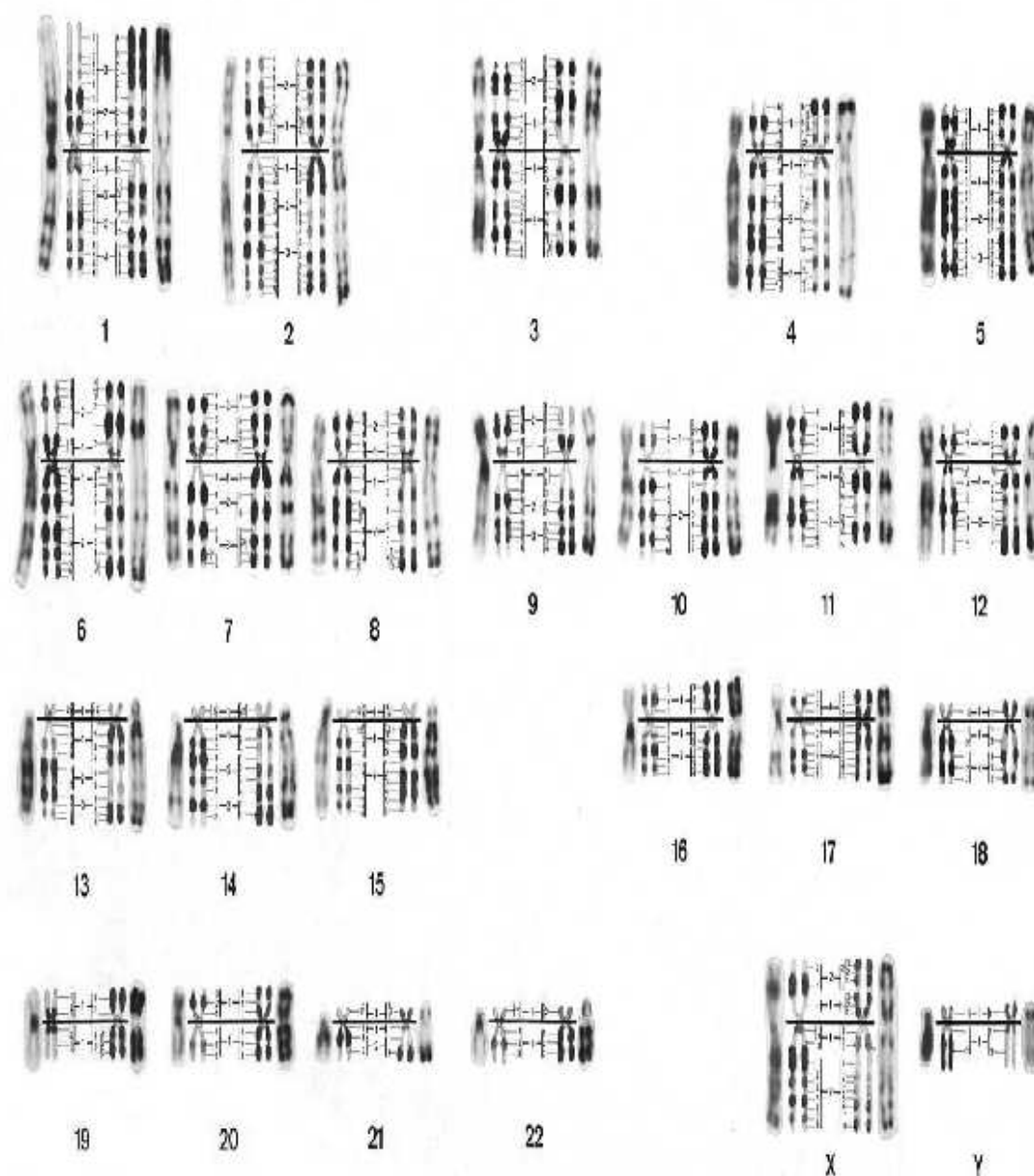
- 251 Hamladji RM, Ahmed Nacer R, Benakli M, et al**
Intensification thérapeutique suivie d'autogreffe de cellules souches périphériques (CSP) dans la leucémie lymphoïde chronique (LLC)
Abstract 9 p 11
IXème Congrès National d'Hématologie 10-12 mai 2012 Tlemcen.
- 252 Rahmoune N, Ahmed Nacer R, Benakli M, et al**
Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) avec un conditionnement d'intensité réduite (RIC) dans la leucémie lymphoïde chronique : étude rétrospective de 10 patients
Abstract 8 p 10
IXème Congrès National d'Hématologie 10-12 mai 2012 Tlemcen.

Annexe 1

Représentation en bandes des 46 chromosomes humains : Bandes G à gauche, Bandes R à droite

Ici sexe masculin

ISCN, Cytogenet Cell Genet, 21, 6, 1978



Annexe 2

Critères de réponse selon le NCIWG

Réponse complète (RC) :

Tous les critères suivants sont indispensables pour une période au moins égale à 2 mois :

- disparition totale des signes fonctionnels présents au diagnostic,
- régression de 100% de tous les sites tumoraux périphériques et profonds initialement présents,
- lymphocytose sanguine $\leq 4000/\text{mm}^3$,
- polynucléaires neutrophiles $\geq 1500/\text{mm}^3$,
- hémoglobine $> 110 \text{ g/L}$,
- plaquettes $> 100\ 000/\text{mm}^3$,
- myélogramme : $< 30\%$ de lymphocytes,
- biopsie ostéo-médullaire : absence de nodule lymphoïde.

Réponse partielle nodulaire (RP- Nod) : Tous les critères de CR sont nécessaires, sauf la biopsie ostéo-médullaire où la présence de nodules lymphoïdes est acceptée.

Réponse partielle (RP) :

- disparition totale des signes fonctionnels présents au diagnostic,
- régression $\geq 50\%$ de tous les sites tumoraux périphériques et profonds initialement présents,
- au moins un critère parmi les suivants :
 - polynucléaires neutrophiles $\geq 1500/\text{mm}^3$
 - hémoglobine $> 110 \text{ g/L}$ ou augmentation de plus de 50%
 - plaquettes $> 100\ 000/\text{mm}^3$

Progression/Echec :

- augmentation $\geq 50\%$ des sites tumoraux initialement présents ou apparition de nouveaux sites,
- augmentation $\geq 50\%$ de la lymphocytose sanguine.

Maladie stable : Regroupe les autres situations

Critères de progression du NCIWG (National Cancer Institute Sponsored Working Group)

(1) Existence d'au moins 1 signe clinique d'évolutivité :

- Amaigrissement $\geq 10\%$ du poids du corps
- Température $> 38^\circ\text{C}$ évoluant depuis au moins 2 semaines
- Sueurs nocturnes trempant le linge
- Asthénie marquée avec PS > 1

(2) Anémie et/ou thrombopénie auto-immunes réfractaires à un traitement par corticothérapie.

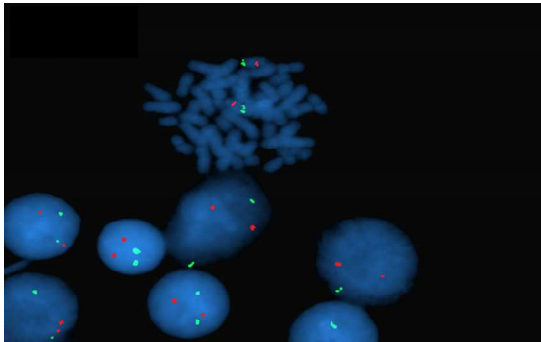
(3) Volumineuse splénomégalie (débord splénique $> 6 \text{ cm}$ par rapport à l'auvent costal).

(4) Volume ganglionnaire rapidement croissant ou adénopathie $> 10 \text{ cm}$ dans son plus grand axe.

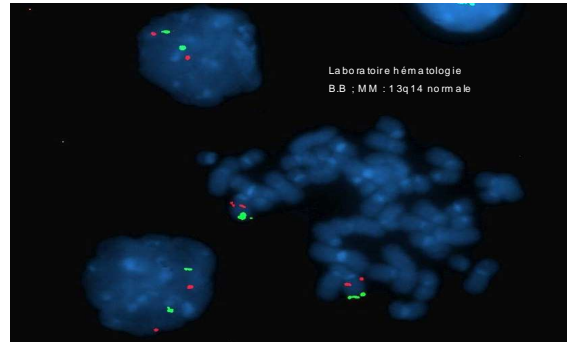
(5) Temps de doublement lymphocytaire : $> 50\%$ en 2 mois, ou $> 100\%$ en moins de 6 mois.

Annexe 3

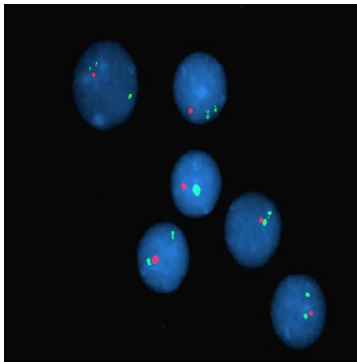
LLC : Images FISH et Caryotypes : Chromosome 13



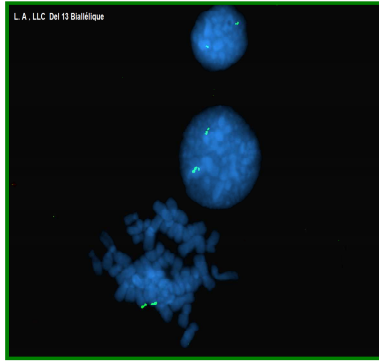
LLC : FISH : 13q14 normale sur mitose et noyaux



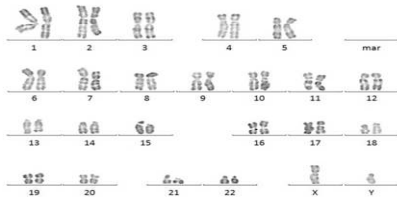
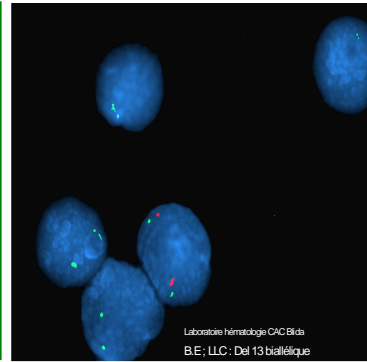
LLC : FISH : 13q14 normale sur mitose et noyaux



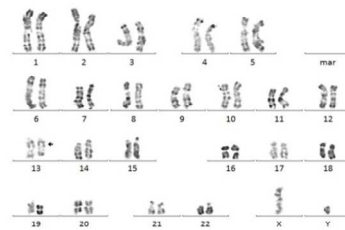
LLC : FISH : 13q14 mono allélique



LLC : FISH : del 13q14 bi allélique sur mitose et noyaux



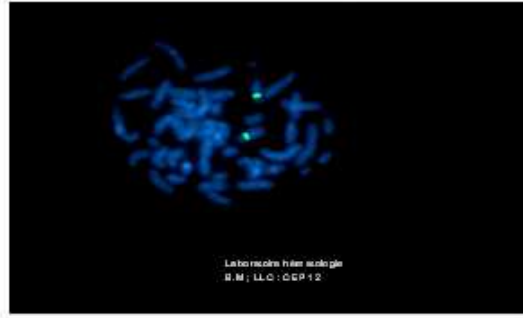
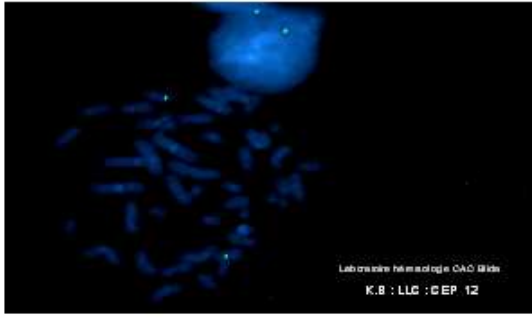
LLC : Caryotype : délétion 13q14



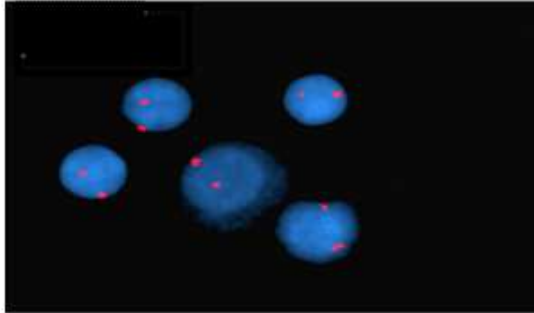
LLC : Caryotype : délétion 13q14

Annexe 4

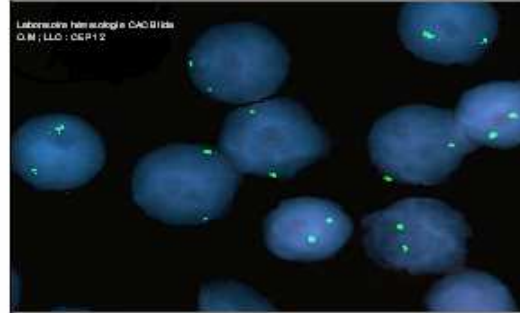
LLC : Images de caryotypes et de FISH : Chromosomes 12



LLC : Chromosomes 12 normaux : Mitoses : FITC



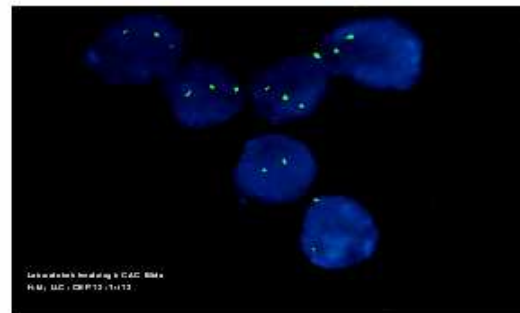
LLC : Chromosomes 12 normaux : Mitoses : F



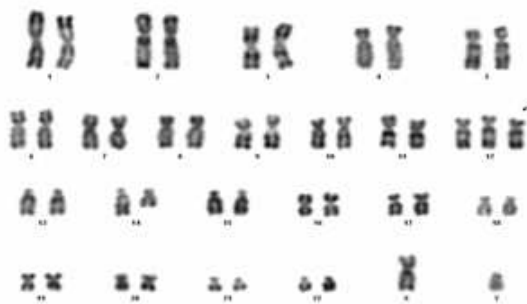
LLC : Chromosomes 12 normaux sur noyaux : Rhodamine



LLC : Chromosomes 12 normaux sur noyaux : FITC

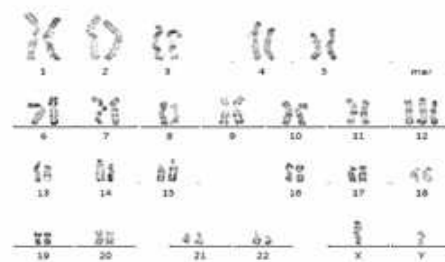


LLC : Trisomie 12 sur mitose et noyau : FITC



LLC : Caryotype : Trisomie 12

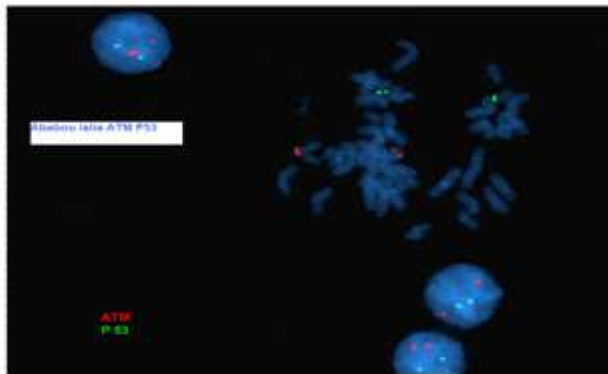
LLC : Trisomie 12 sur noyaux : FITC



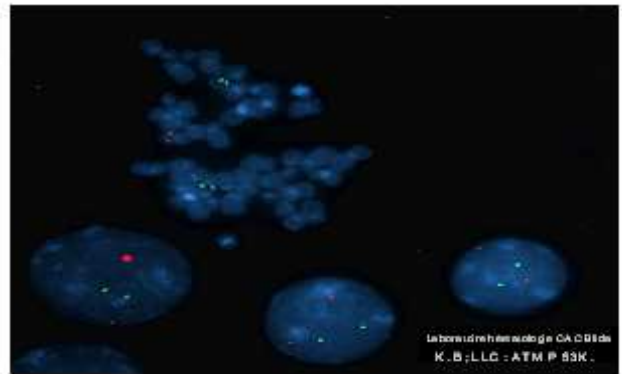
LLC : Caryotype : Trisomie 12

Annexe 5

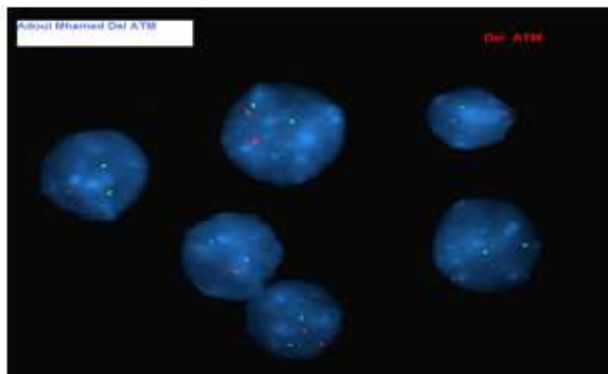
LLC : Images FISH et Caryotypes : Chromosome 11



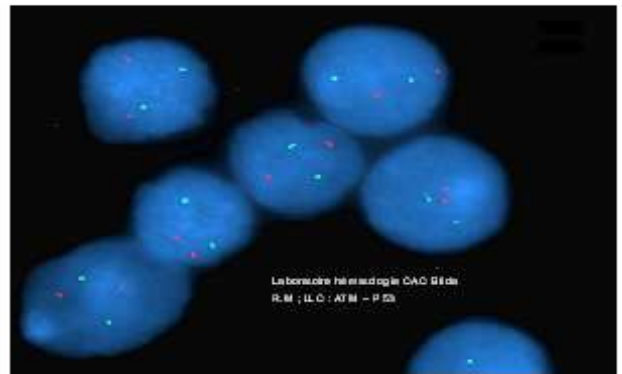
LLC : Locus ATM (11q22) (rouge) et P53(17p13) (vert)
Mitose et noyaux normaux



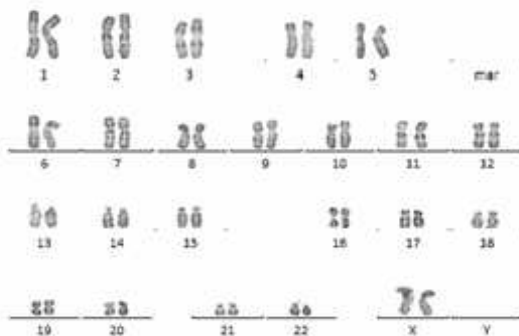
LLC : Locus ATM (11q22) (rouge) et P53(17p13) (vert)
Mitose et noyaux normaux



LLC : Locus ATM (rouge) et P53 (vert)
del ATM sur noyaux



LLC : Locus ATM (rouge) et P53 (vert)
del ATM sur noyaux



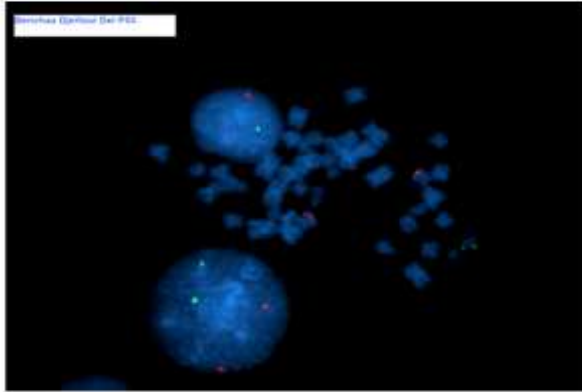
LLC : Caryotype normal



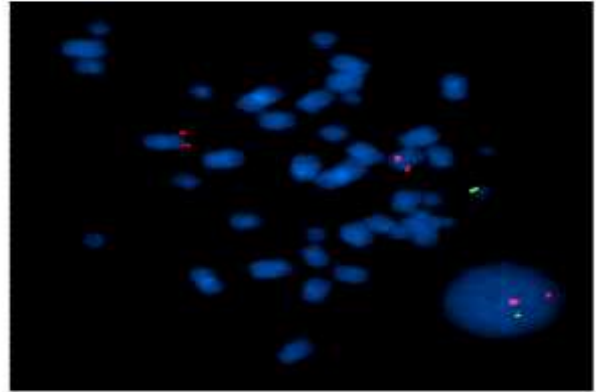
LLC : délétion 11q22

Annexe 6

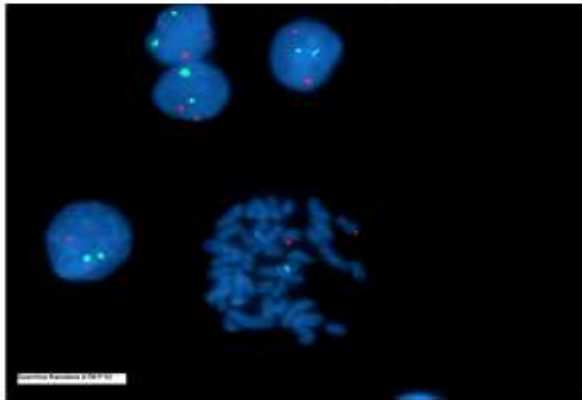
LLC : Images FISH et Caryotypes : Chromosome 17



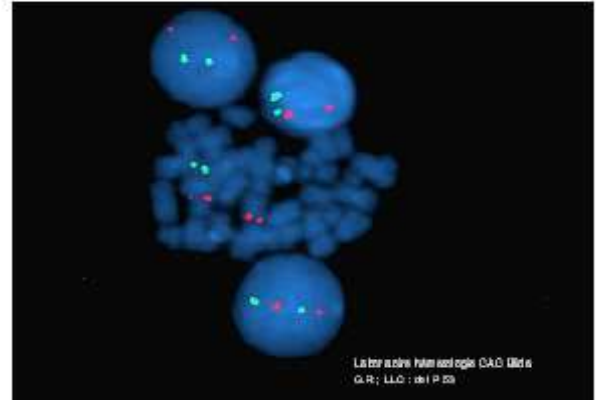
LLC : Locus P53 (17p13) (vert) : del P53 sur mitose et noyau



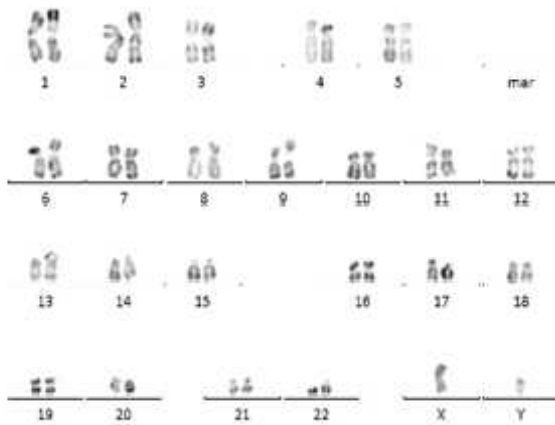
LLC : Locus P53 (17p13) (vert) : del P53 sur mitose et noyau



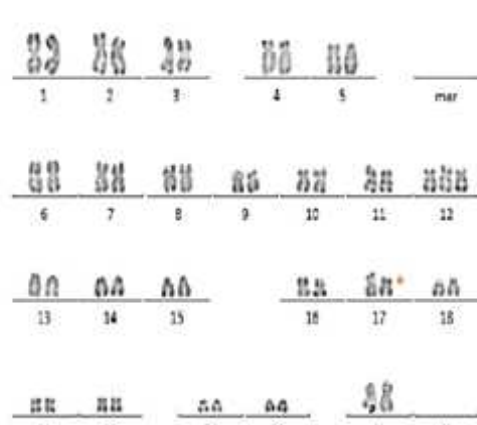
LLC : Locus P53 (17p13) (vert) : del P53 sur mitose



LLC : Locus P53 (17p13) (vert) : del P53 sur mitose



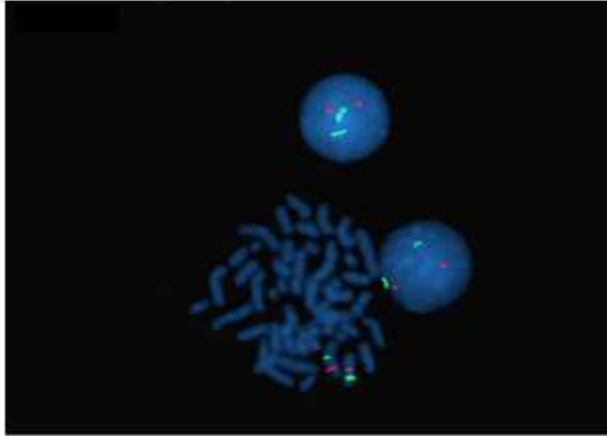
LLC : Caryotype : del 17p13



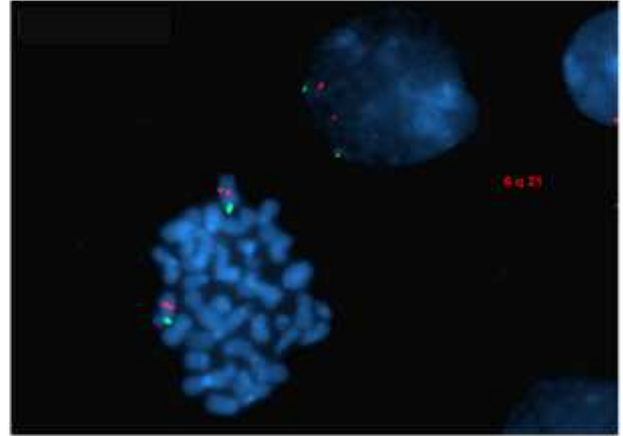
LLC : Caryotype : tri 12+ del 17p13

Annexe 7

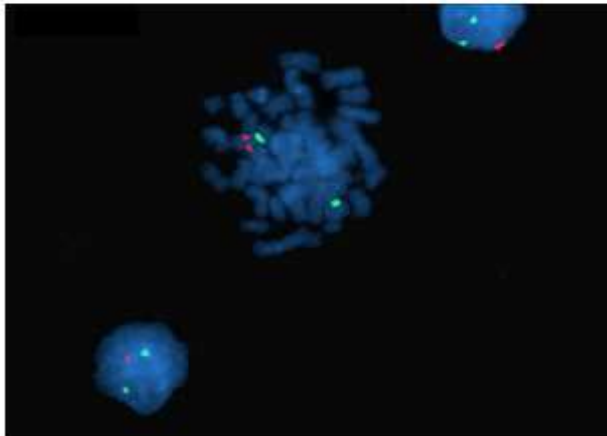
LLC : Images FISH : chromosome 6



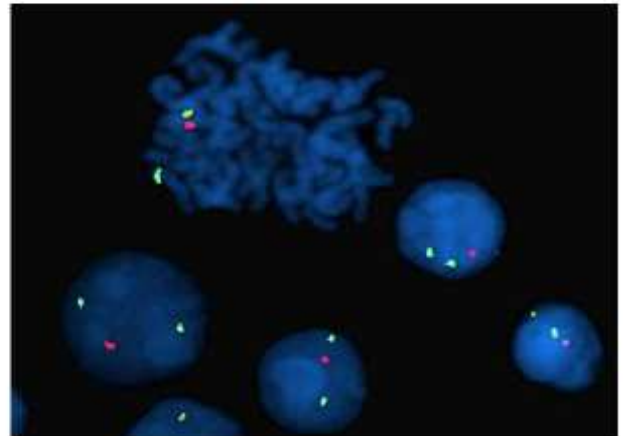
LLC : locus 6q21 (rouge) ; CEP 6 (vert)
Mitose et noyaux normaux



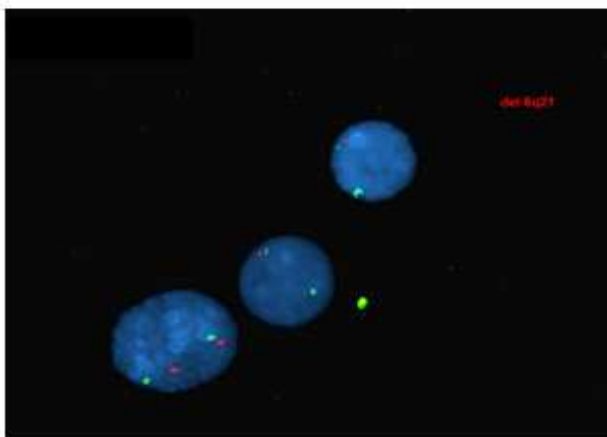
LLC : locus 6q21 (rouge) ; CEP 6 (vert)
Mitose et noyaux normaux



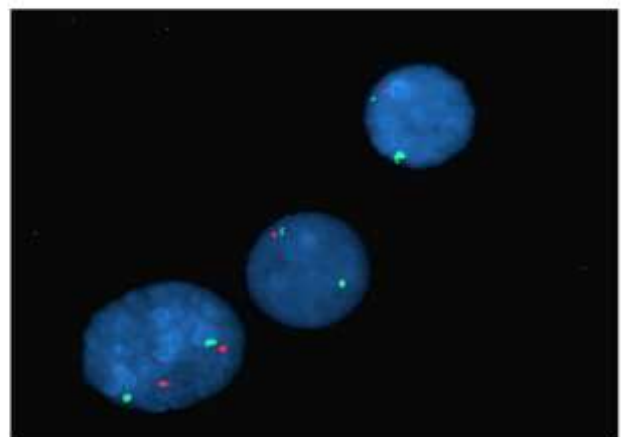
LLC : locus 6q21 (rouge) ; CEP 6 (vert)
del 6q21 sur mitose et noyaux



LLC : locus 6q21 (rouge) ; CEP 6 (vert)
del 6q21 sur mitose et noyaux



LLC : locus 6q21 (rouge) ; CEP 6 (vert)
del 6q21 sur noyaux



LLC : locus 6q21 (rouge) ; CEP 6 (vert)
del 6q21 sur noyaux

Classement OMS des grades de toxicité

Toxicité	grade 0	grade 1	grade 2	grade 3	grade 4
Hématologique					
(Adulte) Hémoglobine	≥ 11 g/100 ml ou ≥ 6,8 mmol/l	9,5-10,9 g/100 ml ou 5,6-6,7 mmol/l	8-9,4 g/100 ml ou 4,95-5,5 mmol/l	6,5-7,9 g/100 ml ou 4-4,9 mmol/l	< 6,5 g/100ml ou < 4 mmol/l
Leucocytes (× 1000/mm ³)	≥ 4	3-3,9	2-2,9	1-1,9	< 1
Polynucléophiles (× 1000/mm ³)	≥ 2	1,5-1,9	1-1,4	0,5-0,9	< 0,5
Plaquettes (× 1000/mm ³)	≥ 100	75-99	50-74	25-49	< 25
Hémorragie	Absence	Pétéchies	Modérée	Moyenne	Très importante
Gastro-intestinale					
Bilirubine	< 1,25 × N(a)	1,25-2,5 × N	2,6-5 × N	5,1-10 × N	> 10 × N
Transaminases	< 1,25 × N(a)	1,25-2,5 × N	2,6-5 × N	5,1-10 × N	> 10 × N
Phosphatases alcalines	< 1,25 × N(a)	1,25-2,5 × N	2,6-5 × N	5,1-10 × N	> 10 × N
Muqueuse buccale	Sans changement	Douleurs, ulcères	Érythèmes, ulcères Alimentation impossible	Ulcération Alimentation liquide seulement	Alimentation impossible
Nausées vomissements	Absence	Nausées	Vomissements transitoires	Vomissements nécessitant traitement antiémétique	Vomissements incoercibles
Urinaire					
Protéinurie	Absence	1 + < 0,3 g/100 ml	2 + 3 + 0,3-1 g/100 ml	4 + > 1 g/100 ml	Syndrome néphrotique
Hématurie	Absence	Microscopique	Macroscopique	Macroscopique + caillot	Anurie
Pulmonaire					
Fièvre médicamenteuse	Absence	Léger symptôme < 38 °C	Dyspnée d'effort 38 °C- 40 °C	Dyspnée de repos > 40 °C	Repos au lit complet Fièvre avec hypotension
Réaction allergique	Absence	Oedème	Bronchospasme n'appelant pas réanimation	Bronchospasme appelant réanimation	Choc anaphylactique
Cutanée					
Alopécie	Absence	Érythème	Desquamation Vésicules Prurit	Suintement Desquamation Ulcération	Dermatite exfoliative Nécrose appelant exérèse
Infectieuse					
Neurologique					
Etat de conscience	Vigile	Assouplissements	Somnolence < 50% des heures d'éveil	Somnolence > 50% des heures d'éveil	Coma
Périphérique	Absence	Paresthésie et/ou diminution des réflexes tendineux	Paresthésies sévères et/ou faiblesse modérée	Paresthésies intolérables et/ou diminution importante de la force motrice	Paralyse
Constipation (b)	Absence	Légère	Modérée	Météorisme abdominal	Météorisme et vomissements
Douleur (c)	Absence	Légère	Modérée	Sévère	Intolérable
Cardiaque					
	Absence	Ne nécessitant pas l'arrêt du traitement (à détailler)	Nécessitant l'arrêt du traitement (à détailler)		

(a) N = Limite supérieure de la valeur normale

(b) A l'exclusion des ralentissements de transit secondaires à l'emploi de narcotiques.

(c) Seules sont à considérer les douleurs en rapport avec le traitement et non les douleurs liées à la maladie

Annexe 9 : Liste et caractéristiques des données des patients

Nom	Prenom	Age	Sexe	GB (x103)	Lymphos (x103)	Hb	plaquettes	Type Cytologique	Score Matutes	CD38	Diagnostic	PBO	μ2 nucleolaire	Stade	Culture	Caryotype	FISH 2	Survie globale	Devenir	FC ou RFC
Ber	Mohamed	70	M	18,6	13,7	11,5	185	Atypique	4	P	LLC	NF		B	echec caryo		del ATM isolée	10	VV	NON
Bel	Yamina	59	F	21,8	14,6	14,5	132	Typique	4	P	LLC	NF	NF	B	echec caryo		del 13q14 + del 6q21	19	VV	NON
Bou	Aicha	51	F	24,4	17,1	14,1	293	Typique	4	N	LLC	NF		A		46,XX	del 13q isolée	15	VV	NON
Ben	Mohamed	46	M	21,4	18,6	14,1	82	Atypique	4	N	LLC	NF		C	Culot congelé	Echec	del 13q14 biallelique	37	VV	NON
Ben	Saadia	70	F	28,3	22,6	14	253	Typique	4	NF	LLC	NF		A		46,XX	Aucune anomalie	9	VV	NON
Abm	Azouaou	59	M	27	25,9	5,1	37	Atypique	3	P	LLC	NF		C		47,XY,+12	Tri12 isolée	6	DCD	NON
Ben	Laid	48	M	54,3	41	11,4	97	Typique	4	N	LLC	DIF	2,5	C	pas de mitoses		del 13q14 isolée	49	VV	FC
Abe	Kheira	54	F	63,6	59,1	10,8	106	Typique	5	N	LLC	DIF	5,8	B		46,XX	Aucune anomalie	67	VV	FC
Aba	Lalia	55	F	67,5	59,1	10,6	171	Typique	4	N	LLC	DIF	2,6	B	Culot congelé	46,XX	Aucune anomalie	43	VV	FC
Ben	Elhadj	62	M	79,5	70,7	11,6	104	Typique	4	P	LLC	DIF	2,8	B		47,XY,+12,del(13)(q14)	Tri 12 + del 13q14	17	VV	FC
Ben	Abdelkader	64	M	80,3	75,1	8,8	18	Typique	5	P	LLC	NF		C	echec caryo		del 13q14 + del P53	8	DCD	NON
Bou	Mohamed	52	M	85,9	81,6	12,1	29	Typique	4	P	LLC	DIF	NF	C		46,XY,del(13)(q14)	del 13q 14 isolée	51	VV	FC
Bou	Sgheir	60	M	91,5	82,1	14,9	117	Typique	5	P	LLC	NF		B	pas de mitoses		Aucune anomalie	54	DCD	NON
Bou	Fatma	76	F	92,2	83	10	182	Atypique	3	N	LLC	NF		A		47,XX,+12,del(17)(p13)	Tri12+ del P53	5	VV	NON
Aou	Ahmed	77	M	96,2	83,5	7,4	24	Typique	4	N	LLC	NF	NF	C		46,XY	Aucune anomalie	17	VV	NON
All	Laalia	69	F	107,3	86,6	10,1	83	Typique	5	P	LLC	Interst	7,2	C	Culot congelé	47,XX,+12	Tri 12 isolée	39	VV	FC
Ben	Kheira	63	F	97,1	92,2	8,1	142	Atypique	4	P	LLC	NF		C	echec caryo		del 13q14 biconale + del P53	9	VV	NON
Bou	Abdelkarim	63	M	120	100	14,4	117	Typique	5	N	LLC	NF		B		46,XY	del 13q isolée	69	VV	NON
All	Allel	59	M	121,6	102	14,4	165	Typique	4	P	LLC	DIF	4,5	B		46,XY	Aucune anomalie	11	VV	RFC
Ber	Mansour	65	M	140	110	7,6	140	Typique	5	P	LLC	DIF	7,4	C	echec caryo		del P53 + Tri 12	7	DCD	RFC
Bou	Mohamed	70	M	137,8	121,2	13	126	Typique	3	P	LLC	NF		A	pas de mitoses		Tri12 isolée	3	VV	NON
Ben	Amer	62	M	250,3	124	7,9	92	Typique	4	N	LLC	DIF	10	C		46,XY,4del(13)(q14),4del(17)(p13)	del 13q14 + del P53	19	VV	RFC
Bra	Yamina	75	F	137	131,5	8	168	Atypique	3	N	LLC	NF		C	echec caryo		del 13q14 + del P53	1	DCD	NON
Bou	Ali	56	M	137,7	135	11,8	166	Typique	3	N	LLC	NF		B	pas de mitoses		tri 12 isolée	43	DCD	NON
Ber	Lakhdar	54	M	148	140	6,6	66	Typique	3	N	LLC	DIF	NF	C	pas de mitoses		del 13q 14 isolée	7	VV	RFC
Ben	Kouider	63	M	159,9	150,9	9,2	91	LLC/PL	4	NF	LLC	DIF	2,9	C		46,XY	Aucune anomalie	51	VV	FC
Bou	Abdelkader	63	M	240	160	4,9	174	Typique	4	N	LLC	NF		C	pas de mitoses		del 13q14 isolée	11	VV	NON
Bad	Mohamed	60	M	163,2	163,2	9,1	107	Typique	4	P	LLC	DIF	NF	C		46,XY	Aucune anomalie	41	DCD	FC
Aou	Mohamed	54	M	195,5	194	10,2	147	Typique	4	P	LLC	Nod	NF	B		46,XY	del 13q14 biallelique + del 6q21	68	VV	FC
Bou	Douadi	48	M	209,3	200	9,4	180	Typique	5	NF	LLC	NF		C	echec caryo		Aucune anomalie	29	VV	NON
Bou	Mhamed	78	M	213,3	211,2	7,4	104	Typique	4	P	LLC	NF		C	pas de mitoses		del 13q14 + Trit2+ del ATM	5	VV	NON
Ado	Mhamed	56	M	249	239	8,2	111	Typique	5	P	LLC	DIF	2	C	Culot congelé	Echec	del ATM + del 6q21	46	DCD	FC
Ben	Boualem	64	M	275,9	269	11,5	111	Typique	5	P	LLC	DIF	2,9	B	pas de mitoses		Aucune anomalie	34	VV	FC
Azi	Larbi	66	M	343	295	12,9	207	Typique	5	N	LLC	NF	NF	A		46,XY	del 13q14 isolée	20	VV	NON
Ade	Mohamed	61	M	353,3	296,7	9,4	141	LLC/PL	3	P	LLC	Interst	2,6	C	pas de mitoses		del P53 + del 13q14	28	DCD	FC
Ben	Messouda	48	F	359,6	304	10,1	146	Typique	5	NF	LLC	NF	NF	B	pas de mitoses		del 13q14 + del ATM	72	VV	NON
Ben	Rachid	70	M	139	104,9	12,2	187	Typique	5	N	LLC	NF		B	pas de mitoses		del 13q14 + del ATM	60	VV	NON

Nom	Prenom	Age	Sexe	GB (x103)	Lymphos (Hb	plaquette:	Type Cyto	Score Mat	CD38	Diagnostic	PBO	iz microsc	Stade	Culture	Caryotype	FISH 2	Survie glo	Devenir	FC ou RFC
Maa	Abdelkader	54	M	29,7	25,5	13,6	248	Typique	5	P	LLC	Nod	0,6	B	echech caryo		del 13q14 + del 6q21	66	VV	FC
Kel	Brahim	64	M	91,3	84,3	11,3	115	Typique	5	P	LLC	DIF	1	B		46,XY,del(13)(q14)	del 13q14 isolée	34	VV	FC
Dou	Mohamed	48	M	176	176	6,3	64	Atypique	5	N	LLC	DIF	1,2	C		46,XY	del 13q14 biclonale	65	VV	FC
Her	Mohamed	51	M	61,5	56	12,5	166	Typique	4	P	LLC	echech	1,6	B	Culot congelé	Echec	Tri 12 isolée	58	DCD	FC
Med	Rabah	65	M	146,4	98,8	10,8	148	Typique	4	P	LLC	DIF	1,7	B	pas de mitoses		Aucune anomalie	67	VV	FC
Leb	Saada	49	F	62,6	59,7	5,3	59	Typique	4	P	LLC	DIF	1,8	C	echech caryo		del 13q14 + del ATM + del 6q21	57	DCD	FC
Mer	Kheira	63	F	17,6	14,8	12,7	97	Typique	3	P	LLC	DIF	2	C	echech caryo		tri 12 isolée	12	VV	RFC
Gue	Ramdhane	49	M	146,6	114	4,7	26	Typique	4	P	LLC	DIF	2,5	C	Culot congelé	46,XY,del(17)(p13)	del P53,del 6q21	25	DCD	FC
Gue	Abdelkader	63	M	116,2	96,8	15,2	296	Typique	5	N	LLC	Nod	2,7	B	echech caryo		del 13q14 + del ATM	11	VV	RFC
Lak	Djelloul	46	M	79,3	72,9	14,8	122	Typique	5	N	LLC	DIF	2,8	B	pas de mitoses		del 13q 14 isolée	15	VV	RFC
Kad	Elhadj	55	M	15,5	10,9	13,9	144	Atypique	3	P	LLC	DIF	4	B		47,XY,+12	Tri 12 isolée	15	VV	RFC
Hou	Farah	50	M	48,5	32,6	15,5	138	ATypique	5	N	LLC	DIF	4,4	B		46,XY	TRI 12 isolée	28	VV	FC
Has	Fatma	37	F	519,6	514,4	6,7	165	LLC/PL	5	NF	LLC	Nod	4,8	C	Culot congelé	Echec	del 13q14 + del 6q21	42	VV	FC
Lou	Ahmed	59	M	203	182,7	12,8	134	Typique	4	P	LLC	DIF	4,9	B		46,XY	TRI 12 + del ATM	30	VV	FC
Khe	Djilali	69	M	29,5	26,6	9,5	80	Typique	4	P	LLC	Nod	5,5	C	Culot congelé	Echec	ATM isolée	17	DCD	FC
Gue	Bengoucef	64	M	644	440	7	105	Typique	4	P	LLC	DIF	6,5	C	pas de mitoses		del 13q 14 isolée	21	VV	RFC
khe	Ali	65	M	14	11,5	14,7	237	Atypique	5	N	LLC	DIF	7,7	B		46,XY	Aucune anomalie	26	VV	RFC
Lal	Bouamama	61	M	207	119	14,5	250	Typique	4	P	LLC	Interst	NF	B		46,XY	Aucune anomalie	9	VV	RFC
Che	Hannachi	38	M	49	40	14,5	140	Typique	4	N	LLC	NF		A	echech caryo		del 13q14 + del 6q21	66	VV	NON
Dza	Slimane	52	F	50,1	41,6	12,9	109	Typique	5	P	LLC	NF		B	pas de mitoses		del 13q14 + del ATM	72	VV	NON
Fel	Mohamed	55	M	207,4	170	9,3	173	Typique	4	N	LLC	NF		C	Culot congelé	Echec	Aucune anomalie	32	VV	NON
Kla	Moulay	56	M	16,7	10,5	15,7	190	Typique	4	P	LLC	NF		B		46,XY	Aucune anomalie	16	VV	NON
Men	Tahar	57	M	26,7	25,5	5,8	56	Typique	4	N	LLC	NF		C		46,XY	TRI12 + del P53	29	VV	NON
Laa	Laaredj	58	M	68,8	67	12,6	90	Atypique	3	P	LLC	NF		C	echech caryo		Tri12 + del P53	15	VV	NON
Hen	Mustapha	58	M	15,6	11,4	12,2	109	Typique	5	N	LLC	NF		A	echech caryo		del 13q14 isolée	27	VV	NON
Kre	Mohamed	59	M	417,7	355,5	7,8	90	Typique	4	P	LLC	NF		C	echech caryo		del 13q14 isolée	5	VV	NON
Hou	Mohamed	65	M	26,7	21,8	14,2	288	Typique	4	N	LLC	NF		A		46,XY	del 13q14 isolée	15	VV	NON
Dje	Mohamed	65	M	216,8	144	11	202	Atypique	5	N	LLC	NF		B	pas de mitoses		Tri12 isolée	69	VV	NON
Far	Khaled	68	M	29,8	20,9	13,6	171	Typique	5	N	LLC	NF		A	Culot congelé	46,XY	del 13q isolée	38	VV	NON
Koh	Hlima	69	F	14,2	9,3	12,2	262	Typique	3	P	LLC	NF		B	pas de mitoses		Aucune anomalie	4	VV	NON
Ham	Fetouma	69	F	24,1	20	13	150	Typique	5	N	LLC	NF		A	pas de mitoses		del 13q14 isolée biallelique	67	VV	NON
Kou	Mahmoud	71	M	173,4	156,5	10,4	100	Typique	5	P	LLC	NF		B	pas de mitoses		tri 12 isolée	18	DCD	NON
Cho	Abdelkader	75	M	165	148,5	10,8	108	Typique	4	P	LLC	NF		B	pas de mitoses		Tri12 isolée	2	DCD	NON
Cha	Ahmed	75	M	62,3	61,7	9,4	99	Typique	5	N	LLC	NF		C	pas de mitoses		del 13q14 + Tri12 + del ATM	9	VV	NON
Kou	Yamina	76	F	202	161,6	10	270	Typique	3	N	LLC	NF		A	echech caryo		tri 12 isolée	5	VV	NON
Kor	Maamer	76	M	33,8	26	9,5	369	Atypique	3	N	LLC	NF		C	echech caryo		TRI 12 isolée	9	VV	NON
Chi	Fettouma	80	F	55,8	50,2	13,5	109	Typique	5	N	LLC	NF		A	pas de mitoses		Aucune anomalie	12	VV	NON

Nom	Prenom	Age	Sexe	GB (x103)	Lymphos (x1)	Hb	plaquettes	Type Cytoloq	Score Matut	CD38	Diagnostic	PBO	µ2 MICROCLOON	Stade	Culture	Caryotype	FISH 2	Survie globa	Devenir	FC ou RFC
Bel	Mohamed	57	M	87,1	71,9	5,6	116	Typique	4	NF	LLC	DIF	1,5	C			NF	61	VV	FC
Der	Dernaoui	52	M	63,3	55,9	11,2	119	Typique	4	NF	LLC	DIF	1,6	B			NF	34	VV	FC
Tit	Mohamed	59	M	120,89	114,8	10,7	216	Typique	4	N	LLC	Nod	2,5	B		46,XY	Aucune anomalie	22	VV	RFC
Mok	Lalgia	65	F	149,1	139	9	111	Typique	4	N	LLC	Nod	2,8	C	Culot congelé	Echec	del 13q14 isolée biclonale	39	VV	FC
Oth	Ahmed	50	M	17,4	12,1	14	130	Typique	4	P	LLC	Interst	3,4	B		46,XY	Aucune anomalie	17	VV	RFC
Tsa	Mohamed	61	M	235,9	231,2	9,8	159	Typique	4	P	LLC	Nod	3,6	C		46,XY	Aucune anomalie	22	VV	RFC
Chi	Saad	65	M	94,7	90	11,6	307	Typique	4	NF	LLC	DIF	3,9	B			NF	12	DCD	FC
Ser	Khaididja	60	F	75,1	66,4	12,9	198	Typique	4	P	LLC	DIF	4,4	B	pas de mitoses		del 13q14 + del P53	20	VV	RFC
Zmi	Med ouali	67	M	71,04	63,7	12,2	124	Typique	4	P	LLC	DIF	4,4	B	Culot congelé	46,XY,del(11)(q22q23)	del ATM isolée	70	VV	FC
Oua	Mohamed	52	M	48,3	42	12,8	55	Typique	5	N	LLC	DIF	5,8	C	Culot congelé	46,XY	del P53	46	DCD	FC
Moh	Abdelah	69	M	157,8	122,8	5,1	144	Typique	4	N	LLC	DIF	5,8	C		46,XY	del 13q14 isolée	45	VV	FC
Mok	Lakhdar	55	M	213,9	200	10,4	205	Typique	5	P	LLC	DIF	6,3	B	pas de mitoses		del 13q14 + del ATM	12	VV	RFC
Mok	Mohamed	66	M	247,8	237,9	9,5	90	Typique	4	N	LLC	Interst	7,5	C		47,XY,+12,del(14)(q13q31)	TRI 12 isolée	33	VV	FC
Sel	Selmi	47	M	110	92400	13,4	130	Typique	5	P	LLC	Interst	NF	B		46,XY	del 13q14 isolée	11	VV	RFC
Sen	Abdelmalek	55	M	164,2	149	11,6	155	Atypique	4	N	LLC	NF	NF	B	echec caryo		del 13q14 biallelique, del ATM, del 6q21	61	VV	NON
Bou	Fatma	57	F	49,1	45,5	7,7	82	Typique	4	NF	LLC	DIF	NF	C			NF	13	DCD	FC
Sma	Benmira	67	M	446	444,2	5,6	105	Typique	4	N	LLC	DIF	NF	C		46,XY	Tri12 + del 13q14	47	VV	FC
Rez	Brahim	47	M	29,4	23,6	13,1	169	Typique	4	NF	LLC	NF		A	echec caryo		del 13q14 isolée	5	VV	NON
Sou	Said	54	M	221	147	6	35	LLC/PL	3	N	LLC	NF		C			NF	5	DCD	NON
Raa	Tahar	59	M	19,6	15,1	7	102	Typique	5	N	LLC	NF		C	pas de mitoses		del 13q14 isolée biclonale	25	VV	NON
Rah	Messaouda	60	F	60,8	55,3	12,4	89	Typique	5	N	LLC	NF		C	Culot congelé	46,XX	del 13q14 isolée	72	VV	NON
Mou	Bouزيد	62	M	53,8	22,3	11,6	153	Typique	4	NF	LLC	NF		A	pas de mitoses		del 13q14 isolée	8	VV	NON
Zou	Elalia	64	F	33,2	27,7	13,8	83	Typique	4	N	LLC	NF		C		46,XX	Tri12 isolée	68	VV	NON
Nou	Rabea	65	F	67,6	63,5	6,4	231	Atypique	5	N	LLC	NF		C	echec caryo		del 13q14 isolée	18	VV	NON
Laz	Yamina	66	F	78,5	63,6	11	283	Typique	4	P	LLC	NF		B			NF	34	DCD	NON
Sam	Mohamed	68	M	63,1	35,9	20,9	250	Typique	5	N	LLC	NF		A	echec caryo		del 13q14 isolée	15	VV	NON
Mes	Zakia	68	F	44,6	35,3	12	214	Typique	5	N	LLC	NF		A	echec caryo		del 13q14 isolée biclonale	66	VV	NON
Rab	Boussad	70	M	133,1	118,7	11,2	139	Typique	5	N	LLC	NF		B	pas de mitoses		del P53 + del 6q21	44	VV	NON
Zed	Mbarek	72	F	290	280	6,9	43	Atypique	4	P	LLC	NF		C	echec caryo		del 6q21 isolée	65	VV	NON
Nou	Zohra	73	F	20,4	16,1	12,8	232	Atypique	4	N	LLC	NF		C	echec caryo		del ATM+ del P53+ del 6q21	4	DCD	NON
Ouk	Said	74	M	13,6	8,1	9,6	215	Typique	4	P	LLC	NF		C	echec caryo		Tri12+ del ATM	2	DCD	NON
Tah	Khaididja	74	F	61,7	53,4	11	173	Typique	3	P	LLC	NF		A			NF	2	DCD	NON
Abe	Chaib	74	F	29,3	26,2	13	175	Typique	4	P	LLC	NF		B			NF	5	DCD	NON
Laz	Rabah	75	F	212	157	5,7	70	Typique	4	N	LLC	NF		C			NF	6	DCD	NON
Nem	Fatma	75	F	135	105	12	245	Typique	3	P	LLC	NF		A	echec caryo		del P53	13	VV	NON
Hou	Dahmane	79	M	273,7	110,6	8,2	136	Typique	4	P	LLC	NF		C			NF	15	DCD	NON
Dra	Ali	91	M	103,2	90,8	11,4	105	Typique	4	P	LLC	NF		A			NF	36	VV	NON

Nom	Prenom	Age	Sexe	GB (x103)	Lymphos (x1)	Hb	plaquettes	Type Cytoloq	Score Matut	CD38	Diagnostic	PBO	iz Microclon	Stade	Culture	Caryotype	FISH 2	Survie globa	Devenir	FC ou RFC
Beh	Abdelkader	72	M	11,7	8,1	9,5	159	Typique	1	55+	FL	NF		SLP			NF			
Cha	Yakout	57	F	12,2	8,8	11	244	Atypique	2	53,6	LNH	NF		SLP			TRI 12 isolée			
Bou	Nadir	52	M	13	11,8	11,8	124	LLC/PL	2	96+	LPL	NF		SLP			del P53 isolée			
Mez	Fatiha	60	F	13	7,2	12	164	Atypique	1	31,8	ZML	NF		SLP			NF			
ikh	Ahrahmane	76	M	15,5	13	4,5	78	LLC/PL	5	P	LLC	NF		C			NF	1	DCD	NON
Cher	Zoulikha	70	F	17	8	12,6	239	Typique	3	28,4	MCL	NF		SLP			NF			
Gho	Kheira.	74	F	17,1	11,1	12	126	Typique	4	N	LLC	NF		B			NF	53	VV	NON
Reg	Amar	82	M	17,5	10,3	12,5	228	Typique	5	P	LLC	NF		B			NF	6	DCD	NON
Oua	Dhaouia	77	F	20,7	14,9	12	160	Atypique	3	P	LLC	NF		B			NF	6	DCD	NON
Kes	Ahmed	68	M	25,5	22,9	12,4	168	Typique	2	90+	MCL	NF		SLP			NF			
Dja	Zohra	73	F	28,3	24,7	12,8	310	Typique	4	NF	LLC	NF		B			NF	3	DCD	NON
Bel	Fatma	63	F	29	19	8	181	Atypique	1	15+	ZML	NF		SLP			NF			
Bou	Abdelkader	79	M	33,81	29,33	7,4	115	Typique	5	N	LLC	NF		C			NF	27	VV	NON
Ked	Habib	58	M	37,4	29,8	12,4	148	Typique	2	32+	MCL	NF		SLP			Tri12 + del13q14, CCND1 neg			
Bou	Bengoucef	68	M	43,8	36,6	12,6	140	Typique	5	N	LLC	Interst	NF	B			NF	52	VV	FC
Ahm	Abdelkader	73	M	44,7	38,7	10,9	86	Typique	5	N	LLC	DIF	1,8	C			NF	12	DCD	FC
Abe	Ahmed	72	M	46	44,2	8,7	49	Typique	5	N	LLC	NF		C			NF	26	VV	NON
Adi	Hamda	61	F	51,8	44,7	10,7	176	Typique	5	P	LLC	NF		B			NF	49	VV	NON
Ben	Bengoucef	77	M	57,1	55,3	7,2	98	Typique	2	11	LNH	NF		SLP			TRI 12 isolée			
Bou	Fatma	72	F	59,8	51,9	4,4	399	Typique	4	P	LLC	NF		A	AHAI		NF	18	VV	NON
Cha	Zohra	66	F	63,5	55,9	14,4	222	Atypique	2	90++	MCL	NF		SLP			Tri 12 + del 13q14, CCND1 neg			
Bou	Serhane	78	M	65,2	55,4	9,9	357	Typique	5	P	LLC	NF		C			NF	12	DCD	NON
Ter	Farouk	63	M	66	38,2	13,1	125	Typique	1	81,9+	MCL	NF		SLP			NF			
Aza	Houria	66	F	68,9	65,4	12,2	95	Typique	2	26F	ZML	NF		SLP			Tri 12 isolée			
Maa	Friha	75	F	69,5	59	14	153	Typique	5	P	LLC	NF		B			NF	43	VV	NON
Med	Atia	72	F	82,4	75	7,6	208	Atypique	5	P	LLC	NF		C			NF	39	DCD	NON
Tal	Talha	67	M	92,4	66,5	12,1	268	Typique	5	N	LLC	DIF	1,2	B			NF	26	DCD	FC
Tai	Fatma	71	F	93,9	82,3	10,3	204	Typique	5	N	LLC	NF		A			NF	16	DCD	NON
Sel	Abdelkader	74	M	116,5	106,4	10,4	92	Typique	2	20	MCL	NF		SLP			NF			
Moh	Zohra	75	F	117,8	105	11	241	Typique	5	P	LLC	NF		B			NF	46	VV	NON
Mes	Djillali	77	M	125,7	99,5	8,5	179	Typique	5	N	LLC	NF		C			NF	9	DCD	NON
Att	Bakhta	86	F	129	110	8,9	199	Typique	5	NF	LLC	NF		C			NF	15	DCD	NON
Mer	Abdelkader	73	M	134	105	9,7	192	Typique	3	1,2	FL	NF		SLP			NF			
Bas	Mohamed	58	M	138,2	109,7	7,4	234	Typique	5	NF	LLC	NF		C			NF	2	DCD	NON
Bou	Mansour	51	M	145,5	144,2	7,6	127	Typique	5	N	LLC	NF		C			NF	4	DCD	NON
Gou	Zohra	66	F	167,7	145,8	7,4	151	Typique	4	P	LLC	NF		C			NF	27	DCD	NON
Ann	Fatma	74	F	174,4	164	9,6	220	Typique	5	N	LLC	NF		C			NF	6	DCD	NON
Abd	Kheira	75	F	195	159	8	105	Typique	4	N	LLC	NF		C			NF	2	DCD	NON
Bou	Laalia	75	F	420	285	7,4	81	Typique	2	76+	FL	NF		SLP			NF			

Figure 1 : Voies mitochondriales de l'apoptose	5
Figure 2 : Voie extrinsèque de l'apoptose	6
Figure 3 : Sonde GLI (12q13) / SE 12	71
Figure 4 : Sonde DLEU (13q14) / 13qter	72
Figure 5 : Sonde p53 (17p13) / ATM (11q22)	72
Figure 6 : Sonde 6q21 / SE 6	73
Figure 7 : Mitose à chromosomes trapus	78
Figure 8 : Mitose de bonne qualité	78
Figure 9 : Correspondance entre cytologie et score de Matutes	95
Figure 10 : Répartition des anomalies cytogénétiques retrouvées au caryotype	96
Figure 11 : Répartition des anomalies cytogénétiques par FISH	97
Figure 12 : Représentation de la del 13q14 associée	98
Figure 13 : Représentation de la trisomie 12 associée	99
Figure 14 : Représentation de la del ATM associée	100
Figure 15 : Représentation de la del P53 associée	101
Figure 16 : Représentation de la del 6q21 associée	102
Figure 17 : Anomalies cytogénétiques au stade A	103
Figure 18 : Anomalies cytogénétiques au stade B	104
Figure 19 : Anomalies cytogénétiques par FISH au stade C	105
Figure 20 : Anomalies cytogénétiques dans les groupes CD38+ et CD38-	109
Figure 21 : Courbe de survie globale du groupe Non FC/RFC	109
Figure 22 : courbe de survie globale du groupe Non FC ou RFC selon stade de Binet	110
Figure 23 : Courbe de survie selon le CD 38 du groupe Non FC/ RFC	111
Figure 24 : Survie globale selon les anomalies par FISH, groupe Non FC/RFC	112
Figure 25 : Courbe de survie globale : protocole FC	118
Figure 26 : Courbe de survie sans événements du groupe FC	119
Figure 27 : Courbe de survie globale du groupe FC selon le stade de Binet	119
Figure 28 : Courbe de SSE selon le stade de Binet du groupe FC	120
Figure 29 : Courbe de survie globale du groupe FC selon la $\beta 2$ microglobuline	121
Figure 30 : Courbe de SSE du groupe FC selon la $\beta 2$ microglobuline	121
Figure 31 : Courbe de survie globale du groupe FC selon le type d'infiltration à la PBO	122
Figure 32 : Courbe de survie globale du groupe FC selon le CD 38	122
Figure 33 : Courbe de survie sans événements selon le CD 38 du groupe FC	123
Figure 34 : Courbe de survie globale du groupe FC selon les anomalies par FISH	124
Figure 35 : Courbe de SSE du groupe FC selon les anomalies cytogénétiques par FISH	125
Figure 36 : Courbe de survie globale : groupe RFC	129
Figure 37 : Courbe de survie globale du groupe RFC selon le stade de Binet	130
Figure 38 : Courbe de survie globale du groupe RFC selon le CD 38	130
Figure 39 : Courbe de survie globale du groupe RFC selon les anomalies cytogénétiques	131
Figure 40 : Courbe de survie globale : comparaison FC/RFC	131
Figure 41 : Courbe de survie Comparaison FC/RFC vs Non FC/RFC / CD 38 Négatif	132
Figure 42 : Courbe de survie : comparaison FC/RFC vs Non FC/RFC / CD 38 Positif	132

Annexe 11

Liste des tableaux	Page
Tableau I : Système de scoring selon Matutes E	13
Tableau II : Classification de Rai	21
Tableau III : Classification révisée de Rai : Catégorie de risque et survie médiane	21
Tableau IV : Classification de Binet	22
Tableau V : Classification de Binet et niveau de risque	22
Tableau VI : Incidence des autres SPLC dans le type cytologique de LLC évoqué	94
Tableau VII : LLC : 135 cas : Correspondance entre cytologie et score de Matutes	94
Tableau VIII : Comparaison des résultats par caryotype et FISH	106
Tableau IX : Expression du CD 38 selon l'âge, le sexe, le stade, la cytologie et les anomalies cytogénétiques	108
Tableau X : Comparaison des taux de RC et réponse globale entre FC et RFC (Khi2, correction de Yates)	128
Tableau XI : Comparaison des toxicités hématologiques : FC vs RFC	128
Tableau XII : Comparaison des résultats du caryotype aux séries de la littérature	135
Tableau XIII : Comparaison des nos résultats FISH avec la littérature	136
Tableau XIV : comparaison avec la série de Qiu des anomalies cytogénétiques selon le stade de Binet	138
Tableau XV : Comparaison de nos résultats avec la littérature en matière de taux de RC et de réponse globale, sur 4 études.	140
Tableau XVI : Répartition de nos résultats RC (groupe FC) selon les anomalies cytogénétiques	141
Tableau XVII : Comparaison de nos résultats de toxicité du FC avec la littérature	143

Annexe 12 : FICHE TECHNIQUE LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE

HOPITAL: DH: FC: Date DC:

NOM: PRENOM: Sexe:

Date de Naissance: Lieu: Adresse:

Profession: 0: NP 1: Sans 2: administration 4: Agric 5: indust 6: Autres

Antécédents: Cancer dans la famille 0: Non 1: Oui 2: NP (si oui: lien de parenté):

Maladies associées: 0: non 1: cœur 2: HTA 3: diabète 4: cancer 5: autre:

Motif de la première consultation: Date de début: Etat général selon ECOG:

Adénopathies: CERV: H M B G DT Plus grand diamètre: cm

AXIL: G DT Plus grand diamètre: cm

ING: G DT Plus grand diamètre: cm

Rate: non palpable DS: cm Splénectomie Hépatomégalie: Absente Présente Flèche hépatique: cm

Amygdales	Infiltration cutanée	Médiastin	Abdomen	Autre: préciser
Oui	Oui	Oui	Oui	
Non	Non	Non	Non	

Infection: oui non localisation: type: nombre d'épisodes:

GB	Lymphos %	ProLym %	G Lym %	PN %	Hb	Ret %	Plaquet	Ombre Gump

Myélogramme: 0: NF cellularité: MK Lymphocytes: % GR % Erb % Prolympho %

PBO: 0: NF 1: Nodulaire 2: Diffus 3: interstitielle

EDP+AIE: Alb: g/l. Gammaglob: g/l IgG: g/l. IgA: g/l. IgM: g/l. Picmonoclonal: type: g/l

Test Coombs	VS	LDH	CRP	B ₂ micro G	CD 23 serique	Thym Kinase

STADE: I II III IV A B C

Immunohistochimie:

CD	19	5	23	FM7	79b	k	λ	20	22	25	10	38	43	IgM	IgD	11c	103	138	3	4	8
%																					
Intensité																					

Score Matutes:

Cytogénétique: - Caryotype:

- FISH:

Chimiothérapies reçues:

Chimiothérapie	1ere intention:	2ème intention:	3ème intention:
Nombre de cures			
Étalement			
Résultat: RC, RPN, RP, Ech			
Durée de RC en mois			

Etat final: 0: DCD 1: V_{RC} 2: V_{RPN} 3: V_{RP} 4: Progression

Survie globale en mois: en RC en RPN en RP en Echec/ progression

Date des dernières nouvelles: