

Université SAAD DAHLEB - Blida 1 –  
Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire d'immunologie médicale, CHU ISSAAD Hassani Beni Messous  
Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé



## MÉMOIRE

En Vue de l'obtention du Diplôme de Master

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Chef d'option : Dr. SAADI L.**

*THEME*

**L'apport de l'immunophénotypage dans le diagnostic de  
la leucémie lymphoïde chronique**

*Présenté par*

**REGUE Selma**

Soutenu publiquement le 03/07/2018. Devant le jury composé de :

<b>M<sup>me</sup> SAADI L.</b>	Maître de Conférences A	USDB1	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> BENCHABANE.</b>	Maître de Conférences B	USDB1	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>r</sup> BELAID B.</b>	Maître Assistant A	CHU ISSAD Hassani	<b>Promoteur</b>
<b>M<sup>me</sup> ANANE A.</b>	Maître Assistante A	USDB1	<b>Co-promotrice</b>



## *Remerciements*

Je tiens à remercier dans un premier temps, Le professeur **DJIDJIK**, qui m'a permis d'effectuer mon stage au sein du laboratoire d'immunologie médicale au CHU ISSAAD Hassani.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon promoteur Mr **BELAID** de m'avoir accueillie au niveau de son unité, malgré les difficultés et le retard que j'ai eu, je le remercie de m'avoir encadré, orienté, d'être patient et de m'avoir supporté, ainsi que pour sa générosité et son partage de savoir. La réalisation de ce travail n'aurait pas vu le jour si vous ne m'avez pas accepté. Merci beaucoup. Je suis très reconnaissante.

Je remercie ma co-promotrice **M<sup>me</sup> ANANE** pour toute l'aide qu'elle m'a apportée, je me sens très chanceuse d'avoir travaillé avec elle, j'étais très touchée pour sa modestie, sa patience et sa générosité et son attention. Je vous remercie infiniment pour tout le temps que vous avez consacré pour moi. Le partage de ces connaissances et son expérience scientifique en toute circonstances m'ont permis de bien avancer et d'être optimiste. Vous m'avez inspiré.

Mes remerciements s'adressent aussi à **M<sup>me</sup> SAADI** qui m'a beaucoup soutenu et orienté, malgré ses occupations elle était toujours là à m'écouter et m'orienter. Je vous remercie de m'avoir donné le courage de poursuivre et d'avoir été très compréhensive durant tous ces mois. Merci beaucoup pour votre disponibilité, votre modestie ainsi que vos conseils judicieux qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

J'exprime toute ma reconnaissance à **M<sup>me</sup> BENCHABANE** pour son partage de savoir au cours de notre parcours et de nous avoir inspiré par sa passion envers la science ainsi que de nous avoir poussé à travailler très dure. Je vous remercie d'avoir bien accepté d'examiner ce modeste travail.

Au final, j'aimerais remercier toute personne et professeurs de notre université qui ont contribué à mon instruction ainsi que celle de milliers d'étudiants. De nous avoir poussé, nous faire rêver et à regarder plus haut.

## *Dédicaces*

Je dédie cet événement marquant de ma vie à la mémoire de mon frère Mehdi disparu trop tôt.

A mes parents que je ne remercierai jamais assez

A ma mère, ma championne et ma superwoman, je ne saurai jamais décrire ma gratitude pour toi, pour tes sacrifices, merci d'être la maman la plus forte et la plus douce, Merci d'être si inspirante et si courageuse, merci pour ton amour inconditionnel tu es à jamais mon idole.

A mon père, mon héros, aujourd'hui je me sens très heureuse car le sourire sur ton visage sera grâce à mon accomplissement, Merci pour ton amour et tous les sacrifices que tu fais pour nous papa.

A mes chères sœurs, Yasmine, Sabrina, Sarah, Houda et Farah, merci d'être ma source d'énergie et de mon bonheur, vous êtes simplement les meilleures sœurs au monde.

A mes chers frères, Riad, Amr, Mohamed merci d'avoir été toujours à mes côtés à me soutenir à chaque fois. Amr et Mohamed vous êtes les meilleurs beaux-frères au monde.

Je remercie aussi bien mes ami(e)s qui m'ont beaucoup soutenu, merci d'avoir toujours été prêts à m'aider : Hamri , Koudia , Aissani., Gourou , Chaima , Imane , Dabi , Fethia et Nesrine . Très chanceuse de vous avoir rencontré.



La leucémie lymphoïde chronique est la leucémie la plus fréquente en Europe et occupe la troisième place après les lymphomes en Algérie. Il s'agit d'une hémopathie lymphoïde faisant partie des syndromes lymphoprolifératifs B (SLP-B). Elle correspond à la prolifération et à l'accumulation de petits lymphocytes matures de la lignée B dans la moelle osseuse, le sang et les organes lymphoïdes. Bien qu'il soit difficile de séparer la leucémie lymphoïde chronique (LLC) de certains SLP-B, il est important de pouvoir les distinguer car leur traitement et leur évolution sont très différents.

Dans le but d'évaluer la place de la cytométrie en flux (CMF) dans le diagnostic différentiel de la leucémie lymphoïde chronique des autres syndromes lymphoprolifératifs B. Notre avons réalisé une étude rétro-prospective sur 101 patients, colligés au niveau de l'unité d'immunologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Beni Messous, chez qui la confrontation clinico-biologique et cytologique a permis de conclure au diagnostic du syndromes lymphoprolifératifs chroniques (SLPC) avec suspicion de LLC-B.

L'expression des molécules membranaires des cellules lymphoïdes tumorales a été appréciée par la cytométrie en flux. Une comparaison entre les niveaux d'expression chez les patients avec LLC et ceux avec un SLP-B non LLC a révélé des profils immunophénotypiques différents. Ainsi, le profil immunophénotypique de 68 patients (67,32%) est celui d'une LLC-B typique :  $CD19^+ CD20^{+faible}$ ,  $CD22^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD23^+$ ,  $FMC7^-$ ,  $CD79b^{-faible}$ ,  $sIg^{-faible}$ .

**Mot clés :** Syndromes lymphoprolifératifs B (SLP-B), Leucémie lymphoïde chronique (LLC), Immunophénotypage

سرطان الدم الليمفاوي المزمن هو اللوكيميا الأكثر شيوعا في أوروبا ويحتل المركز الثالث من حيث الإصابة بعد الليمفوما في الجزائر. يعتبر جزء من الأمراض الليمفاوية التكاثرية B هو نتيجة تكاثر و تراكم خلايا ليمفاوية ناضجة صغيرة B في نخاع العظم و الدم و الأعضاء الليمفاوية بالرغم من أنه من الصعب التفريق بين سرطان الدم الليمفاوي المزمن عن بعض الأمراض الليمفاوية التكاثرية B، من المهم القدرة على التمييز بينهما لأن علاجها وتطورهما مختلفان للغاية.

من أجل تقييم دور التعداد الخلوي المتعاقب في الشخيص التفريقي لسرطان الدم الليمفاوي المزمن من بين الأمراض الليمفاوية التكاثرية البائية الأخرى، أجرينا دراسة استرجاعية ومرتبقة ل 101 مريض تم جمعها على مستوى وحدة علم المناعة في المستشفى الجامعي ببني مسوس، حيث أدى التقييم السريري، البيولوجي والخلوي لهؤلاء لتشخيص متلازمة التكاثر اللمفاوي المزمن مع الإشتباه في سرطان الدم الليمفاوي المزمن.

تم تقييم التعبير عن الجزيئات الغشائية من طرف الخلايا السرطانية اللمفاوية عن طريق التعداد الخلوي المتعاقب. وأظهرت المقارنة بين مستويات هذا التعبير بين المرضى الذين يعانون من سرطان الدم الليمفاوي والذين يعانون من امراض ليمفاوية تكاثرية أخرى ملامح تعبيرية مختلفة، وهكذا فإن التعبير المناعي من ثمانية وستون مريضا؛ يمثل نموذج تعبيرى مناعي لخلايا سرطان الدم الليمفاوي المزمن المتمثل في ؛

:  $CD19^+ CD20^{+/faible}$ ,  $CD22^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD23^+$ ,  $FMC7^-$ ,  $CD79b^{-/faible}$ ,  $sIg^{-/faib}$

الكلمات المفتاحية ؛ سرطان الدم الليمفاوي، الأمراض الليمفاوية التكاثرية البائية، التعداد الخلوي المتعاقب.

## Abstract

Chronic lymphocytic leukemia is the most common leukemia in Europe and ranks third after lymphoma in Algeria. It is a lymphoid hemopathy that is part of lymphoproliferative B (SLP-B) syndromes. It corresponds to the proliferation and accumulation of small mature lymphocytes of line B in bone marrow, blood and lymphoid organs. Although it is difficult to separate chronic lymphocytic leukemia (CLL) from certain SLP-Bs, it is important to be able to distinguish them because their treatment and evolution are very different.

In order to evaluate the role of flow cytometry (CMF) in the differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia of other lymphoproliferative B syndromes. We conducted a retrospective study of 101 patients, collected at the unit level. of Immunology of the University Hospital Center of Beni Messous, for whom the clinico-biological and cytological confrontation led to the conclusion of the diagnosis of chronic lymphoproliferative syndromes (SLPC) with suspicion of LLC-B.

Expression of the membrane molecules of lymphoid tumor cells was assessed by flow cytometry. A comparison between expression levels in patients with CLL and those with SLP-B revealed different immunophenotypic profiles. Thus, the immunophenotypic profile of 68 patients (67.32%) is that of a typical B-CLL :

CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+/low</sup>, CD22<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, FMC7<sup>-</sup>, CD79b<sup>-/low</sup>, sIg<sup>-/low</sup>

Key words : Chronic lymphocytic leukemia , immunophenotypage ,

B cell lymphoproliferative syndromes .

<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. Généralités</b>	<b>2</b>
I. 1. Rappel sur le développement des lymphocytes B	2
I. 2. Les syndromes lymphoprolifératifs B	4
I. 3. La classification	4
I. 4. Lymphomagenèse B	4
I. 5. Les leucémies	5
<b>II. La leucémie lymphoïde chronique</b>	<b>6</b>
II. 1. Epidémiologie	6
II. 2. Etiologie	6
II. 3. Aspects physiopathologiques de la leucémie lymphoïde chronique	
II. 3. 1 Origines des cellules leucémie lymphoïde chronique	7
II. 3. 2 Facteurs génétiques	8
II. 3. 3 Facteurs moléculaires et immunologiques	10
<b>III. Prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique</b>	<b>16</b>
III. 1. Diagnostic	16
III. 1. 1 Clinique	16
III. 1. 2 Cytologique	16
III. 1. 3 Immunophénotypage de la LLC et des SLP-B	17
III. 1. 4 Facteurs pronostiques	20
III. 2. Thérapeutique	21
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>22</b>
<b>I. Matériel</b>	<b>23</b>
I. 1. Matériel biologique	23
I. 2. Matériel non biologique	23
<b>II. Méthodes</b>	<b>24</b>
II. 1. Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux	24
II. 2. Mode opératoire	27
<b>III. Analyse statistique</b>	<b>28</b>

<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	<b>29</b>
<b>III. Caractéristiques épidémiologiques et clinico-biologiques de la cohorte</b>	
III. 1. Répartition des patients selon le sexe	30
III. 2. Répartition des patients selon l'âge	31
III. 3. Hémogramme	32
III. 4. Les circonstances de découverte	33
III. 5. Analyse morphologique	34
<b>III. 6. Caractéristiques immunophénotypiques</b>	<b>35</b>
III. 6. 1. Classement et répartition étiologique des patients	37
III. 6. 2. Cas clinico-morphologiques particuliers et Immunophénotypage par marqueurs additionnels	39
III. 6. 3. Répartition des patients selon le type de syndrome lymphoprolifératif B	40
III. 6. 4. Les marqueurs de monoclonalité	41
<b>IV. Etude comparative entre les LLC et les autres SLPC non LLC</b>	<b>43</b>
IV. 1. Caractéristiques épidémiologiques et hématologiques des patients avec syndromes lymphoprolifératifs B	43
IV. 2. La fréquence de l'expression des antigènes dans LLC-B et SLP-B non LLC	45
<b>V. Résultats d'autres tests complémentaires</b>	
V. 1. Electrophorèse des protéines sériques	48
V. 2. Résultats du dosage des chaînes légères libres chez les patients avec LLC	50
<b>Conclusion</b>	<b>52</b>
<b>Perspectives</b>	<b>54</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>55</b>

**Figure 1 :** Activation des Lymphocyte B dans le centre germinatif des ganglions lymphatiques.

**Figure 2 :** Origine des différents lymphomes B les plus connus.

**Figure 3 :** Les origines cellulaires des cellules leucémiques LLC.

**Figure 4 :** Origine et Evolution clonale de la LLC

**Figure 5 :** Les voies moléculaires impliquées dans la pathogenèse de la LLC.

**Figure 6 :** Le microenvironnement des cellules LLC

**Figure 7 :** Un modèle pour la recirculation de la LLC, la modulation des récepteurs et les inhibiteurs utilisés dans la thérapie qui implique ce modèle.

**Figure 8 :** Principe de fonctionnement du cytomètre en flux

**Figure 9 :** Informations morphologiques des cellules analysées et séparation des différentes

**Figure 10 :** Aspect des scattergram FSC/SSC et CD19/CD3

**Figure 11 :** Répartition des patients selon le sexe

**Figure 12 :** Répartition des patients selon le sexe et par tranche d'âge

**Figure 13 :** Répartition des patients en fonction du pourcentage en lymphocytes B

**Figure 14 :** Répartition des patients selon le score de Matutes

**Figure 15 :** Répartition des patients selon le type de syndrome lymphoprolifératif B

**Figure 16 :** Résultats de l'immunophénotypage des marqueurs de la monoclonalité chez les patients LLC-B

**Figure 17 :** Résultats de l'immunophénotypage des marqueurs de la monoclonalité chez les patients souffrant de SLP-B non LLC.

**Tableau I** : Les altérations chromosomiques les plus rencontrés chez les patients avec LLC.

**Tableau II** : Système de score du Royal Marsden Hospital (score de Matutes)

**Tableau III** : Caractéristiques phénotypiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B

**Tableau IV** : Protocole de marquage commun au LLC-B

**Tableau V** : Répartition des patients avec hyperlymphocytose d'origine néoplasique

**Tableau VI** : Résultats de la distribution des intensités de fluorescence des différents marqueurs du panel d'exploration des SLP-B

**Tableau VII** : Répartition des patients avec hyperlymphocytose d'origine néoplasique

**Tableau VIII** : Résultats de la distribution des intensités de fluorescence des différents marqueurs du panel d'exploration des SLP-B

**Tableau IX** : Répartition des patients selon le score de Matutes

**Tableau X** : Nos résultats- Score des marqueurs de la HCL

**Tableau XI** : Score des marqueurs de la HCL (Matutes et al., 1994)

**Tableau XII** : Score des marqueurs de la HCL (Matutes et al., 1994)

**Tableau XII** : Caractéristiques épidémiologiques et hématologiques des patients avec syndromes lymphoprolifératifs B

**Tableau XIII** : La fréquence de l'expression des antigènes dans LLC-B et SLP-B non LLC.

**Tableau XIV** : résultats de l'électrophorèse des protéines sériques

**ATM** : Ataxia telangiectasia mutated protein  
**Ag** : Antigène  
**BCR** : B cell receptor  
**BCL-2** : B cell lymphoma 2  
**BLNK** : B cell linker (autre nom : SLP-65)  
**BTK** : Bruton's tyrosine kinase  
**CSH** : Cellule souche hématopoïétique  
**CG** : Centre germinatif  
**CDF** : Cellules dendritiques folliculaires  
**CP** : Centre de prolifération  
**Cellules LLC** : Cellules leucémiques de la LLC  
**CDR-3** : Complementarity determining region  
**CSH** : Cellule Souche Hématopoétique  
**CD** : Cluster de différenciation  
**CDR** : Complementarity determining region  
**CMF** : Cytométrie en flux  
**Cbl** : Casitas B-lineage lymphoma  
**CXCL** : Chemokine (C-X-C motif) ligand  
**Del (17p)** : Délétion de la région chromosomique 17p  
**Erk** : Extracellular signal-regulated kinase  
**HMS** : Hypermutation somatique  
**HCL** : leucémie à tricholeucocytes  
**Ig** : Immunoglobuline  
**Igs** : Immunoglobuline de surface  
**IgM/Ig** : Immunoglobuline de type M ou D  
**IGV** : Immunoglobuline variable region  
**IGH** : Locus du gène des chaînes lourdes  
**IGHV-M** : Ig variable region heavy chain mutated  
**IGHV-UM** : Ig variable region heavy chain unmutated



**ITAM** : Motif d'activation des récepteurs immuns

**LLC** : Leucémie lymphoïde chronique

**LAL** : Leucémie aigue lymphoblastique

**LAM** : Leucémie aigue myéloïde

**LMC** : Leucémie myéloïde chronique

**LB** : Lymphocyte B

**LCM** : lymphome du manteau

**LF** : lymphome folliculaire

**LZM** : lymphome de la zone marginale

**LPL** : leucémie prolymphocytaire

**Lyn** : V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase

**Mir /miRNA** : Micro ARN

**MDM-2** : Mouse double minute 2 homolog

**MBL** : Lymphocytose B monoclonale

**MyD88** : myeloïd differentiation primary response gene (88)

**MO** : Moelle osseuse

**NFS** : Numération Formule Sanguine

**Nf-κB** : Nuclear factor kappa-light chain enhancer of activated B-cells

**NK** : Natural killer

**Organes LS** : Organes lymphoïdes secondaire

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ProL** : Prolymphocytes

**PBS** : Tampon phosphate buffer Saline

**PE** : R-phycoérythrine

**PE-Cy5** : PE-cyanine 5

**PerCP** : Peridinine chlorophylle-protéine

**PMT** : Photomultiplicateur

**RAG** : Recombination activating genes

**SLP** : Syndromes Lymphoprolifératifs

**SH2** : Src homology domain type 2

**SLL** : Lymphoma lymphocytaire

**Src** : V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homologue.

**Syk** : Spleen tyrosine kinase

**SLVL** : lymphome splénique à lymphocytes velleux

**TP53** : tumor protein 53

**TLR** : Toll like receptor

**Agent orange :**

L'agent orange est un herbicide utilisé pendant la Guerre du Vietnam et qui était responsable de troubles nerveux. Ce gaz était préparé à base d'une substance chimique toxique, la dioxine (**Baumann et al., 2014**).

**Commutation isotypique (Switch) :**

Par un réarrangement des gènes codant pour la chaîne lourde des Ig des cellules B, ce phénomène va permettre de changer le type d'immunoglobuline (Ig) produite en réponse à un antigène donné. Ces Ig seront ensuite produites par les plasmocytes, qui constituent le stade ultime de la différenciation de la lignée cellulaire B (**Owen et al., 2013**).

**Cellules stromales mésenchymateuse (MSC) :**

L'ISCT (international society for cellular therapy) définit les CSM comme des cellules multipotentes isolées à partir de nombreux tissus (Moelle osseuse, tissu adipeux, placenta,) et qui associent trois critères : (1) leur propriété d'adhérence au plastique ; (2) leur phénotype spécifique ; (3) leur capacité à se différencier en 3 lignages : chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes. Les CSM pourraient jouer un rôle clé dans le développement tumoral

(**Roux et al., 2011**).

**Cellules nurse like (NLC) :**

Ces cellules correspondent à une contrepartie des macrophages associés aux tissus qui et sont associés aux leucémies. Ces derniers, jouent un rôle central dans la LLC, car elles favorisent la survie et la prolifération des cellules de la LLC (**Burger et al., 2000**).

**Hypogammaglobulinémie :**

L'hypogammaglobulinémie indique la diminution du taux de gammaglobulines (représentant les immunoglobulines G et M) dépistée par l'électrophorèse des protéides du sang (**Eichhorst et al., 2015**).

**Hypermutation somatique :**

Les hypermutations somatiques sont induites à la suite d'une stimulation antigénique, dans la zone sombre des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, à un stade où le lymphocyte B est appelé centroblaste. Ces modifications sont essentiellement ciblées sur la région variable des gènes d'immunoglobuline des cellules B activées. Les mutations introduites permettent la modulation, et donc dans certains cas l'augmentation de l'affinité pour l'antigène.

A la suite de ce phénomène, les lymphocytes B appelés centrocytes, qui expriment à leur surface des immunoglobulines de forte affinité pour l'antigène, seront sélectionnés grâce aux cellules folliculaires dendritiques au sein de la zone claire des centres germinatifs. L'AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), une enzyme exclusivement exprimée dans les centres germinatifs in vivo est responsable de ces hypermutations somatiques (**Owen et al., 2013**).

### **Les lymphomes :**

Ce sont des néoplasies se développant à partir de cellules souches donnant les lignées B ou NK/T. Deux grands groupes sont distingués : les lymphomes (ou maladies) de Hodgkin et les lymphomes non hodgkiniens (**Feller et al., 2004**) (**OMS., 2001**).

Les hématologistes ont souhaité conservé cette distinction ancienne en raison des différences existant entre ces deux groupes, dans leur présentation clinique, leur évolution, leur pronostic et la stratégie thérapeutique à leur appliquer. (**Diebold et al., 2008**).

### **Ombre de gumprecht :**

Les ombres de gumprecht, sont des anomalies correspondant à l'éclatement des lymphocytes lors de la réalisation des frottis sanguins. Les lymphocytes endommagés se présentent souvent en cas de leucémie lymphoïde chronique (**Kipps et al., 2017**).

### **Recombinaison VDJ :**

Au cours de ce phénomène les gènes codant pour les parties variables des Ig sont réarrangés. Ces réarrangements ont lieu aux différents stades du développement des précurseurs B qui permet de créer une grande diversité d'immunoglobuline nécessaires à la reconnaissance de l'immense variété des antigènes étrangers. Cette recombinaison permettra l'assemblage de deux chaînes lourdes Ig  $\mu$  et de deux chaînes légère ce qui conduit à la formation de la forme membranaire de l'immunoglobuline\_IgM exprimée à la surface des LB, le BCR (B-cell receptor) (**Owen et al., 2013**).

# *Introduction*

Les lymphocytes B sont un constituant majeur du système immunitaire. Cellules clefs de la réponse immunitaire humorale, ils sont à l'origine de la production des anticorps, molécules d'immunoglobulines qui jouent un rôle essentiel dans la destruction et la neutralisation des antigènes externes. Un défaut de fonctionnement ou de comportement de ces cellules peut être dévastateur (**Abbas et al., 2014**).

Les syndromes lymphoprolifératifs B correspondent à une prolifération maligne d'un clone lymphocytaire B. On en dénombre une cinquantaine qui sont caractérisés par une grande hétérogénéité aussi bien du point de vue clinique, pronostique, thérapeutique que du type de la cellule maligne à l'origine de la maladie (**Troussard et al., 2016**).

La leucémie lymphoïde chronique fait partie des SLP-B. Elle est la plus *fréquente* des leucémies de l'adulte en Europe *Occidentale*, et occupe en Algérie la troisième place après les lymphomes. Cette hémopathie maligne est identifiée depuis le début du XX<sup>ème</sup> siècle et malgré son caractère chronique souvent qualifié d'indolent, l'évolution « variable et imprévisible » de la maladie a longtemps été la règle au cours du suivi du patient (**Ahmed Nacer, 2014 ; Kipps et al., 2017**).

Une distinction précise de la LLC à partir des SLP-B non LLC est importante en termes de précision diagnostic, pronostic et traitement adéquat des patients. Cependant une différenciation basée uniquement sur la cytomorphologie et les présentations cliniques peut être difficile. La méthodologie la plus fiable pour le diagnostic de la LLC est l'immunophénotypage par cytométrie en flux (IFC). Ce dernier est habituellement réalisé chez tous les patients atteints de lymphocytose afin de confirmer le diagnostic de la LLC, suspectée par morphologie et données cliniques (**Tijana et al., 2014**).

A ce jour, il n'y a pas de marqueur unique exprimé exclusivement par les cellules LLC, mais un immunophénotype composite qui intègre de nombreux marqueurs de lymphocytes B différents et aide à distinguer la LLC des autres néoplasmes à cellules B matures.

L'objectif de notre étude rétro-prospective est de déterminer la valeur de chaque antigène leucocytaire membranaire dans le diagnostic différentiel de la leucémie lymphoïde chronique des autres SLP-B et de définir le profil immunophénotypique de la leucémie lymphoïde chronique chez 101 patients, recrutés au sein du CHU ISSAAD Hassani Beni Messous, afin de poser un diagnostic précis et orienter l'approche thérapeutique

## **I. Généralités**

### **I.1 Développement des lymphocytes B**

Le rôle du système immunitaire est de répondre à la diversité des antigènes (Ag) d'où le besoin de produire de la diversité. Les lymphocytes B sont un constituant majeur du système immunitaire. Cellules clefs de la réponse immunitaire humorale, elles produisent les anticorps, molécules d'immunoglobulines réparties en cinq classes chez l'Homme (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM).

Chaque lymphocyte est caractérisé par l'expression d'un seul récepteur de reconnaissance de l'antigène, lui conférant une spécificité unique. Ils sont générés à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) par un processus de différenciation complexe. Avant la naissance, le sac vitellin, le foie fœtal et la moelle osseuse sont les sites principaux de la différenciation des lymphocytes B. Après la naissance, les CSH sont nichées dans la moelle osseuse où elles poursuivent tout au long de la vie l'hématopoïèse (**Abbas et al., 2014**).

L'ontogenèse des LB peut être subdivisée en deux phases :

#### **1. Phase indépendante des antigènes**

La lymphopoïèse B débute dans la moelle osseuse (MO) à partir des précurseurs de cellules souches hématopoïétiques. C'est dans ce site qu'ils acquièrent les antigènes de différenciation (CD) signant leur engagement dans la lignée B. A ce stade, le lymphocyte Pro-B réalise une recombinaison de ses gènes VDJ (gènes des immunoglobulines) pour aboutir à la synthèse du récepteur B (BCR) et donc la génération des lymphocytes B (LB) immatures naïfs. Ces derniers, quittent la MO et passent par un stade B transitionnel où elles subissent une étape de sélection négative visant à éliminer les cellules exprimant un BCR potentiellement auto-réactif (**Abbas et al., 2014**).

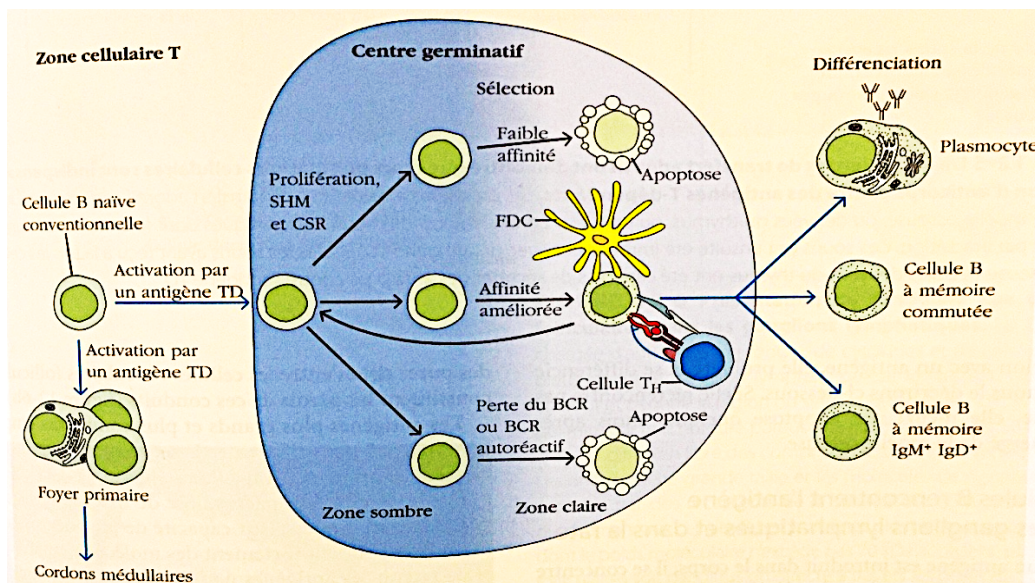
Les LB qui survivent à la sélection périphérique et deviennent matures, migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, lieux de rencontre de l'antigène où elles se différencient soit en lymphocytes B folliculaires conventionnels impliqués dans les réponses humorales dépendantes des lymphocytes T soit en lymphocytes B de la zone marginale qui sont impliqués dans les réponses humorales thymo-indépendantes (**Annexe I , Figure 1**) (**Owen et al., 2013**).

## 2. Phase dépendante des antigènes

Les LB folliculaires représentent 80% des cellules B de la rate et possèdent la capacité de coloniser les ganglions lymphatiques. Après activation par leur rencontre avec l'antigène, ils peuvent, soit se différencier rapidement en plasmocytes à IgM à courte durée de vie, soit pénétrer dans le centre germinatif (CG) des follicules lymphoïdes (Alberts, 2017).

A ce stade, les cellules B entrent dans la zone sombre du CG où en tant que centroblastes, et subissent des hypermutations somatiques (HMS) qui ont lieu sur les segments variables des chaînes légères (IGLV) et lourdes (IGHV) des récepteurs B (Annexe I, Figure 2). Ce mécanisme permet la production des Immunoglobulines (Ig) à haute affinité et les récepteurs des LB descendants appelés centrocytes, acquièrent de nouvelles propriétés. Par conséquent, les cellules avec les récepteurs qui ont une affinité accrue à l'antigène sont sélectionnés et peuvent subir une commutation isotypique au niveau de la zone claire du CG,

alors que les centrocytes avec des récepteurs d'une faible affinité ou qui lient les auto-antigènes sont éliminés (Figure 1) (Kelsoe., 1994 ; Chiorazzi et al., 2005).



**Figure 1** : Activation des Lymphocyte B dans le centre germinatif des ganglions lymphatiques. (Owen et al., 2013)

Cette voie de stimulation et de sélection nécessite généralement la coopération avec les LT et se produit dans les centres germinatifs. Cependant, le processus peut se dérouler sans cellules T et à l'extérieur des centres germinatifs, dans les zones marginales autour des follicules lymphoïdes (Toellner et al., 2002). Les deux processus conduisent à la différenciation des LB en cellules B mémoires ou en plasmocytes (Victora et Nussenzweig, 2012).



## **I.2 Les syndromes lymphoprolifératifs B**

Les syndromes lymphoprolifératifs B (SLP-B) correspondent à la prolifération maligne d'un clone lymphocytaire B, en général initialement au sein d'un territoire lymphoïde (ganglions, rate...) pouvant disséminer secondairement (moelle osseuse, sang...). Ils représentent un groupe relativement hétérogène d'hémopathies malignes tant par la nature de la cellule maligne et l'origine des différentes entités qui le composent que par les stratégies thérapeutiques spécifiques ou leur pronostic très variable (**Diebold et al, 2008**).

## **I.3 La classification**

La classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) décrit un peu plus de quarante entités de néoplasmes B définies par la combinaison de toutes les informations disponibles incluant les données cliniques, morphologiques, immunophénotypiques et cytogénétiques (**Swerdlow et al., 2016**) (**Annexe I, Tableau I et II**). Les SLP-B matures représente majoritairement des lymphomes non hodgkiniens qui peuvent être classés soit en lymphomes de type précurseurs B soit en lymphomes périphériques à cellules B matures qui sont les plus fréquents dans les pays occidentaux (85% des lymphomes). On distingue les lymphomes de bas grade (ou indolents) appelés « à petites cellules » des lymphomes de haut grade (ou agressifs) classiquement appelés « à grande cellules » (**Gisselbrecht, 2008**).

## **I.4 Lymphomagenèse B**

Chaque lymphome B a une origine qui peut-être précisément localisée à un stade de différenciation B. Ces derniers, sont fréquemment caractérisés par des translocations chromosomiques. Dans la moelle osseuse, la recombinaison des gènes VDJ des Ig est sous la dépendance de plusieurs enzymes : recombinaisons RAG1 et RAG2 qui coupent l'ADN double brin et l'ADN ligase qui relie les brins. Cette étape de cassures de l'ADN est très propice à l'apparition des translocations (**Lenz et Staudt, 2010 ; Nogai et al , 2011**). En revanche, le centre germinatif reste la source la plus probable de ces altérations, car l'hypermutation somatique et la commutation isotypique des Ig entraînent des modifications de l'ADN qui peuvent s'avérer pathologiques et qui peuvent donner naissance à des cellules B lymphomateuses (**Figure 2**).

Ces translocations chromosomiques impliquent un des loci des gènes des Ig et un proto-oncogène ce qui entraînent une dérégulation ainsi qu'une activation constitutive de l'oncogène. Le microenvironnement autour des cellules lymphomateuses joue un rôle important et contribue

à leur survie et leur prolifération via l'activation de leur BCR par la présentation de l'antigène (Küppers, 2005). Enfin, pour chaque type de lymphome ou presque, des mécanismes particuliers d'oncogenèse sont décrits (Dali et al., 2015 ; Troussard et Caen, 2016).

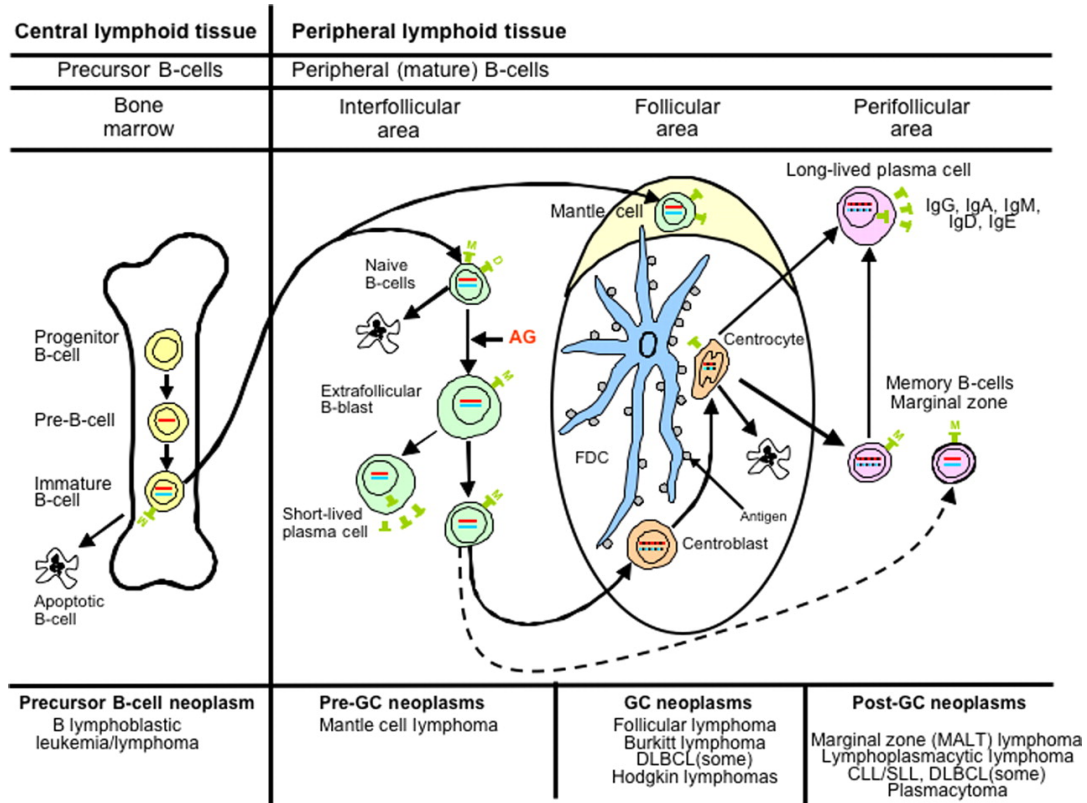


Figure 2 : Origine des différents lymphomes B les plus connus. (Jaffe et al., 2008)

### I.5 Les leucémies :

Les leucémies sont des maladies qui surviennent dans la moelle osseuse et qui se caractérisent par l'accumulation de leucocytes dans la moelle osseuse, le sang, et parfois d'autres organes.

Selon l'OMS, la leucémie est cliniquement et pathologiquement scindée selon la rapidité de sa progression en deux ; les leucémies aiguës (LA) et les leucémies chroniques (LC).

Ces derniers sont eux même classés en sous-groupes en fonction de l'origine des cellules tumorales : cellules lymphoïdes (leucémie aiguë lymphoïde (LAL) et leucémie lymphoïde chronique (LLC)) et myéloïdes (leucémie aiguë myéloblastique (LAM) et leucémie myéloïde chronique (LMC)). Les leucémies aiguës évoluent très rapidement (quelques mois) et se caractérisent par une accumulation de leucocytes immatures à haut potentiel prolifératif bloqués à un stade de la différenciation. Les leucémies chroniques évoluent plus lentement (plusieurs années) (Swerdlow, 2016).

## **II. Leucémie lymphoïde chronique**

La leucémie lymphoïde chronique est définie par l'OMS comme un SLP appartenant au groupe des néoplasies B matures. Cette dernière, se caractérise par une prolifération clonale et une accumulation des lymphocytes B mature  $\geq 5$  G/l dans le sang, la moelle osseuse et d'autres tissus lymphoïdes secondaires. Dans 5% des cas il peut s'agir de lymphocytes T. **(Swerdlow, 2008)**. La LLC est une maladie biologiquement et cliniquement très hétérogène où certains patients ne nécessitent jamais de traitement. D'autres, présentent une évolution agressive avec une mauvaise réponse à la thérapie conduisant à la mort en quelques mois. **(Kipps et al., 2017)**

### **II.1 Epidémiologie**

Les données épidémiologiques placent SLP-B matures en tant que problème de santé global substantiel. Dans le monde occidental, les lymphomes représentent 3 à 4% de toutes les tumeurs malignes **(Roman et Smith, 2011)**.

La LLC est la forme la plus courante de leucémie dans les pays occidentaux ; mais moins fréquente chez les personnes d'origine asiatique ou africaine. Elle est presque deux fois plus fréquente chez les hommes que chez les femmes **(Wendtner et al., 2012)**.

L'incidence mondiale de la LLC est estimée entre  $<1$  et 5,5 pour 100 000 personnes. La LLC est principalement une maladie des personnes âgées et sa prévalence augmente considérablement avec l'âge **(Redaelli et al., 2004)**.

En Algérie, L'incidence annuel de la LLC moyenne est estimée à 0,66 / 100.000 habitants. Cette faible incidence par rapport aux autres pays est expliquée par le jeune âge de la population et le diagnostic tardif. La répartition géographique des patients en fonction de leur lieu de résidence, montre que la majorité d'entre eux viennent du nord du pays en particulier le centre (0,80 / 100.000 habitants) et l'âge moyen au diagnostic est de 67,5 **(Dali et al., 2015)**.

### **II.2 Etiologie**

L'étiologie de la LLC reste non parfaitement connue. Le facteur de risque le plus évident est l'âge mais il existe de fortes preuves qu'une prédisposition génétique semble être pertinente dans la pathogenèse de la maladie **(Goldin et al., 2004)**. En ce qui concerne les facteurs environnementaux, la relation reste plutôt faible même si certaines associations aux pesticides, aux champs magnétiques, à l'élevage des animaux, aux virus et à l'exposition prolongée aux benzènes ont été trouvées. Récemment, l'exposition à l'agent Orange a été reconnu comme étant un facteur de risque pour la LLC **(Baumann et al., 2014)**.

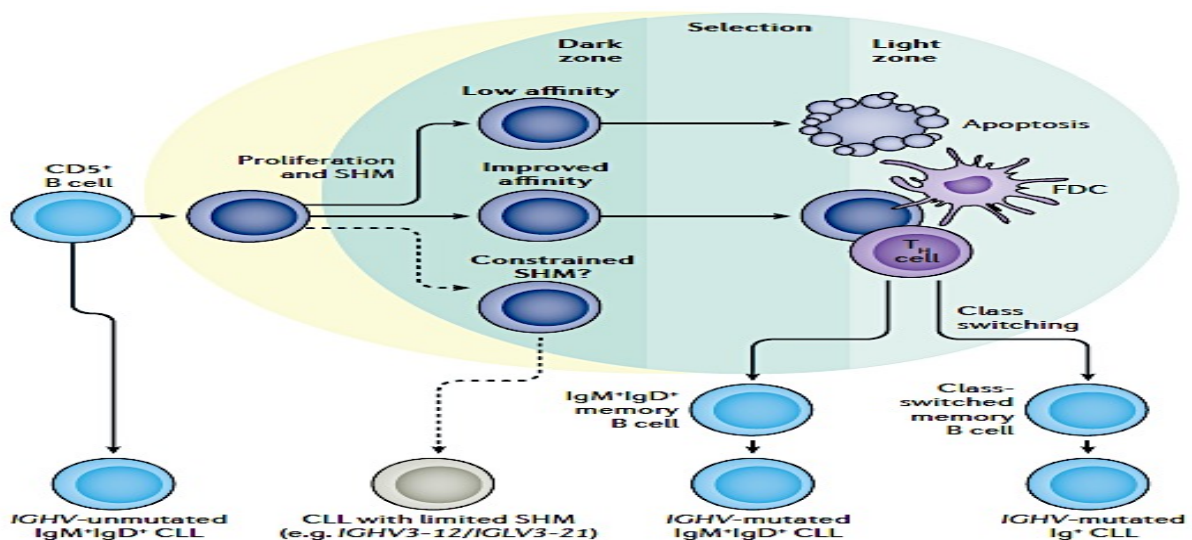
## II.3 Aspects physiopathologiques de la leucémie lymphoïde chronique

### II.3.1 Origine des cellules leucémiques LLC

Il a été démontré que la région variable de la chaîne lourde (IGHV) des BCR stratifie les patients atteints de LLC en deux sous-ensembles distincts qui présentent des résultats cliniques significativement différents. Ces sous-types se distinguent par le fait que les cellules LLC expriment les gènes de la région IGHV mutés ou non mutés, reflétant le stade de différenciation des LB normales dont elles sont issues (**Fabbri et Dalla-Favera, 2016**).

Les cellules LLC qui expriment IGHV non muté (IGHV-UM) proviennent d'une cellule B qui n'a pas subi de différenciation dans les centres germinatifs et qui peut dériver d'une cellule B naïve ou à partir d'une lignée séparée des précurseurs LB (**Hamblin et al., 1999**) (**Figure 3**). Les cellules LLC avec IGHV muté (IGHV-M) proviennent d'une LB post-germinale exprimant une Ig de surface qui a subi une HMS et dans certains cas, également une commutation isotypique. Ces derniers sont transcriptionnellement similaires aux cellules B mémoire (**Damle et al., 1999**). D'autres, expriment des Ig avec des mutations somatiques modestes, ces derniers pourraient dériver d'une LB qui a eu des HMS limitées, probablement d'un besoin limité de diversification et de sélection somatique (**Tobin et al., 2002**) (**Figure 3**).

Le sous-type IGHV-M semble être associé à un bon pronostic tandis que IGHV-UM est associé à un mauvais pronostic. Probablement en raison de différences de lésions génétiques, de degré d'évolution clonale et bien d'autres mécanismes (**Hamblin et al., 1999**).



**Figure 3 :** Les origines cellulaires des cellules leucémiques LLC (**Kipps et al., 2017**)

### II.3.2 Facteurs génétiques

Les altérations génomiques constituent la base des transformations leucémiques et l'évolution clinique variable de la LLC est déterminée, au moins d'une partie, par l'immunogénétique et l'hétérogénéité moléculaire de la maladie (**Hojjat-Farsangi et al., 2014**). Ces altérations peuvent inclure des altérations chromosomiques, des mutations somatiques, des modifications de l'expression des miARN et des modifications épigénétiques (**Döhner et al., 2000**) (Annexe I, Figure 3).

#### a. Altérations chromosomiques :

Environ 80% des patients atteints de LLC subissent au moins l'une des quatre altérations chromosomiques courantes (**Kipps et al., 2017**), regroupées dans le tableau I.

**Tableau I :** Les altérations chromosomiques les plus rencontrés chez les patients avec LLC. (Original)

Altérations chromosomiques	Patients affectés	Statut mutationnel associé	Pronostic	Gènes contenus dans la région délétère et qui sont affectés	Réfs
<b>Délétion 13q14</b>	50-60%	IGHV-M	Favorable	Mir15a, mir16a qui régulent l'expression des protéines inhibant l'apoptose où celles impliqués dans la progression du cycle cellulaire.	(Klein et al., 2010)
<b>Délétion 11q22-23</b>	20%	IGHV-UM	Défavorable	Le gène ATM impliqué dans la réparation de l'ADN	(Stankovic et al., 2014)
<b>Délétion 17p13</b>	7%	IGHV-UM	Très défavorable	Le gène suppresseur de tumeurs P53 impliqué dans l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire	(Landau et al., 2015)
<b>Trisomie 12 (une copie additionnel du chr12)</b>	16%	Indépendante du status mutationnel	Intermédiaire, Avec une incidence plus élevée de tumeurs secondaires	Non résolu, par contre l'oncogène MDM2 qui se trouve dans la même région que la copie additionnelle, semble être hyperexprimé chez les patients avec LLC.	(Strati et al., 2015)

### **b. Mutations somatiques**

Plusieurs études ont identifié des mutations somatiques récurrentes régulièrement observées dans des voies de signalisation importantes impliqués dans la réparation de l'ADN et cycle cellulaire, l'épissage de l'ARNm, la modification de la chromatine, les voies de signalisation WNT et NOTCH et bien d'autres voies (Wang *et al.*, 2011 ; Damm *et al.*, 2014). Ces anomalies peuvent également être associées avec les anomalies chromosomiques (Guièze *et al.*, 2015) (Annexe I, Figure 4).

### **c. Les altérations miARNs**

La LLC a été la première maladie humaine associée à des altérations du miARN. Le dérèglement extensif de l'expression du miARN dans la LLC peut contribuer à sa pathogenèse, (Bottoni et A Calin, 2013). De nombreux miARN avec une signature distincte ont été identifiés (Annexe I, Tableau II). Comme un exemple, mir-15a et mir-16 sont supprimés ou altérés chez environ 60% des patients atteints de LLC, les deux ciblent BCL2 et MCL1, qui codent pour des protéines anti-apoptotiques (Aqeilan *et al.*, 2010 ; Palacios *et al.*, 2015).

### **d. Les changements épigénétiques**

L'épigénome LLC montre une hypométhylation globale associée à une hyperméthylation locale (Cahill *et al.*, 2013). Une hétérogénéité de méthylation intra-tumorale substantielle associée à une complexité génétique accrue a pu être mise en évidence (Puente *et al.*, 2015) (Annexe I, Figure 4). Comme ces profils de méthylation sont un trait héritable, ils ont été utilisés pour retracer le type de cellule B normale à partir de laquelle les cellules LLC ont été dérivées. D'ailleurs, les cellules LLC qui utilisent l'IGHV-UM par rapport à l'IGHV-M ont généralement des motifs de méthylation distincts, qui se rapprochent respectivement de ceux des cellules B naïves et de mémoire, leurs cellules putatives d'origine (Oakes *et al.*, 2016).

## **II.3.3 Facteurs moléculaires et immunologiques**

### **1. Lymphocytose B monoclonale (MBL)**

La MBL est considérée comme un état pré-leucémique essentiel de la LLC représentant une prolifération clonale des cellules B avec une absence de symptômes liés à la maladie (Marti *et al.*, 2007). L'évolution de la MBL est probablement à la suite de l'accumulation progressive de lésions génétiques et de facteurs environnementaux (Rawstron *et al.*, 2008). Les analyses

cytométriques en flux et moléculaires des patients atteints de LLC ont démontré que presque tous les cas de LLC sont précédés de MBL, détectables jusqu'à 6 ans avant le moment du diagnostic de la LLC (**Landgren et al., 2009**).

La plupart des clones MBL présentent un génotype similaire à celle de la LLC du même groupe de l'IGHV. Cependant, la charge des lésions génétiques conductrices (drivers) est significativement plus faible dans MBL que dans la LLC pour les cas IGHV-M, ce qui suggère que la MBL peut représenter un état précurseur pré-maligne précoce de la LLC (**Landau et al., 2013**).

## **2. Evolution clonale**

La LLC a été considérée comme provenant de cellules B matures différenciées. Cependant, plusieurs sources de preuves suggèrent que les premières altérations génétiques aboutissant à la LLC pourraient se produire dans les CSH pluripotentes. Ces derniers peuvent présenter un devenir cellulaire biaisé vers la lignée des cellules B et une stimulation antigénique ultérieure peut conduire à la sélection et à l'expansion de cellules B matures, avec la génération de populations oligoclonales (**Kikushige et al., 2011**) (**Figure 4**).

La complexité de l'architecture clonale de la LLC et la preuve de principe que génétiquement divers sous-clones, non détectables par des méthodes conventionnelles, peuvent être mélangés avec le clone leucémique dominant ont été révélés par des études génomiques récentes (**Landau et al., 2013**). En effet, des mutations sous-clonales de TP53 ont été détectées chez 9% des patients non traités. Ces patients ont présenté le même phénotype clinique avec une faible survie que ceux ayant des lésions clonales de TP53. Au cours du temps, de petits sous-clones mutants en TP53 détectés avant l'initiation du traitement sont devenus la population prédominante et ont anticipé le développement de LLC chimio-réfractaire chez les patients nécessitant un traitement (**Rossi et al., 2014 ; Ferrando et al., 2017**).

En conclusion, la LLC n'est pas une maladie statique, elle a une architecture clonale qui change au fil du temps, influencée par les pressions de sélection. Des mutations sous-clonales dans la LLC peuvent être présentes au moment du diagnostic, mais seulement devenir évidentes au fil du temps. Ces derniers, peuvent contribuer aux variations observées dans le rythme de la maladie et la réponse à la thérapie.

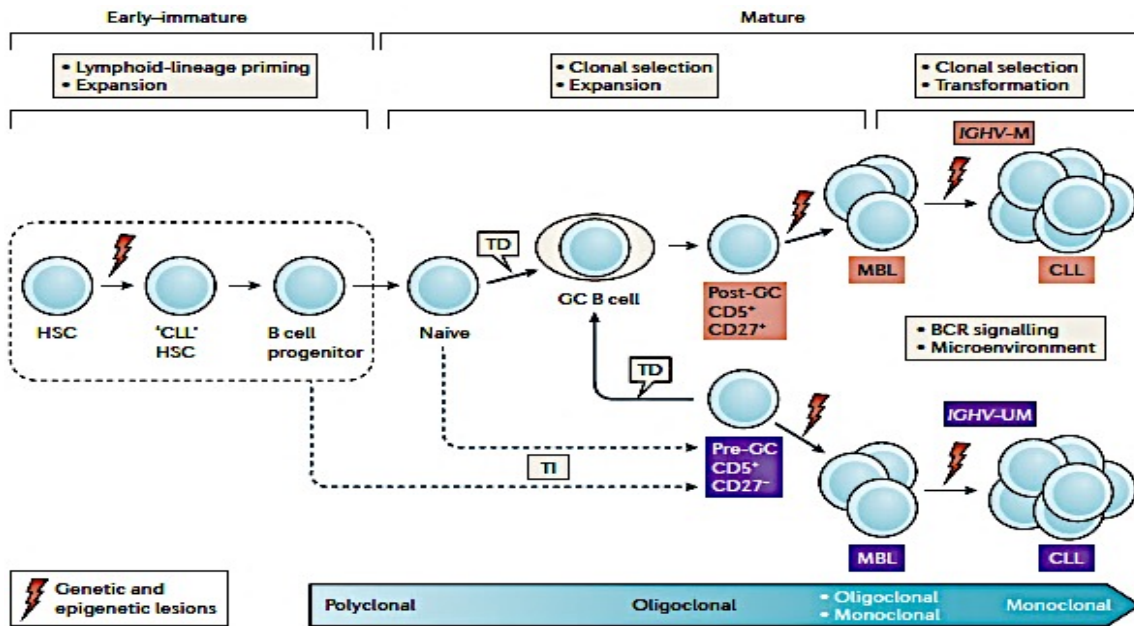


Figure 4 : Origine et Evolution clonale de la LLC. (Fabbri et Dalla-Favera , 2016)

### 3. Récepteur des cellules B (BCR) dans la LLC

Un BCR fonctionnel est nécessaire pour la survie des cellules B matures et est maintenu dans la LLC. Il semble que des recombinaisons particulières de la région variable des chaînes lourdes et légères soient favorisées chez différents patients atteints de LLC. Ceux-ci sont appelés « stéréotypés » et sont définis par une haute homologie de la région CDR3 (Messmer *et al.*, 2004). Le degré de similitude varie selon les groupes de patients. Dans certains cas, il existe des caractéristiques communes dans la partie du site de liaison apportées par la chaîne lourde H où chaque gène VH présente des modèles spéciaux de mutations et des combinaisons préférentielles avec un segment DH ou JH particulier. Dans d'autres groupes de cas, la similarité structurelle implique l'ensemble du site de liaison (VH, VL) (Fais *et al.*, 1998; Stevenson *et al.*, 2004).

#### a. Antigènes

Les résultats précédents suggèrent qu'un ensemble limité d'antigènes favorise la division des cellules leucémiques, augmentant ainsi la probabilité de mutations dangereuses de l'ADN. Cette hypothèse est soutenue par la constatation qu'environ 30% des patients ont des BCR similaires et dans 1% les immunoglobulines sont presque identiques (Widhopf *et al.*, 2004).

Plusieurs antigènes ont été suggérés pour conduire le processus malin, exogènes ainsi que des auto-antigènes (Myhrinder *et al.*, 2008) (Annexe I, Tableau IV).



#### **b. Signalisation autonome**

Il existe de plus en plus de preuves impliquant une signalisation indépendante de l'antigène induite par le BCR dans la LLC. Environ 50% des patients atteints de LLC expriment de tels épitopes auto-reconnaissants qui provoquent un signal tonique, constitutif et autonome du BCR (**Dühren-von Minden et al., 2012**). Ainsi, l'absence de mutations activatrices dans les gènes du BCR suggère que la signalisation autonome et les antigènes externes contribuent à la stimulation du récepteur (**Ten et Burger, 2014**).

#### **4. Stimulation antigénique des BCR :**

Cette exposition aux antigènes ou auto-antigènes est plus susceptible de se produire dans les tissus lymphoïdes après extravasation et migration, grâce à des processus médiés par des molécules d'adhésion et des gradients de chimiokines (**Burger, 2010**).

La division cellulaire se produit dans des agglomérats plus lâches connus sous le nom de centres de prolifération (CP), où des interactions avec l'antigène et d'autres éléments microenvironnementaux coalescent vraisemblablement pour favoriser la survie et la prolifération (**Burger et al., 2009**).

#### **5. La transduction du signal par BCR :**

La liaison de l'antigène à IgM de surface des LB conduit à l'activation des motifs d'activation ITAM dans les queues de CD79a et CD79b par les kinases de la famille SRC, y compris LYN, FYN et BLK5. La tyrosine kinase SYK est ensuite recrutée dans les ITAM phosphorylées par voie duale, ce qui entraîne l'activation de SYK par les kinases de la famille SRC. SKY recrute BLNK qui propage le signal aux composants de signalisation ; BTK et PLC $\gamma$ 2 menant à la mobilisation du calcium et à l'activation de plusieurs voies de signalisations en aval y compris ; la voie MAPK, PI3k/AKT et la voie NF $\kappa$ B. Ces événements conduisent à leur tour à l'activation des facteurs de transcription et à des changements dans l'expression des gènes favorisant la survie, la prolifération et la différenciation (**Packham et al., 2014 ; Young et Staudt, 2013**) (**Figure 5**). La signalisation BCR basale accrue est une stratégie du système immunitaire pour le silencing des cellules B auto-réactives. Ce mécanisme de tolérance est appelé l'anergie (**Gauld et al., 2005**).

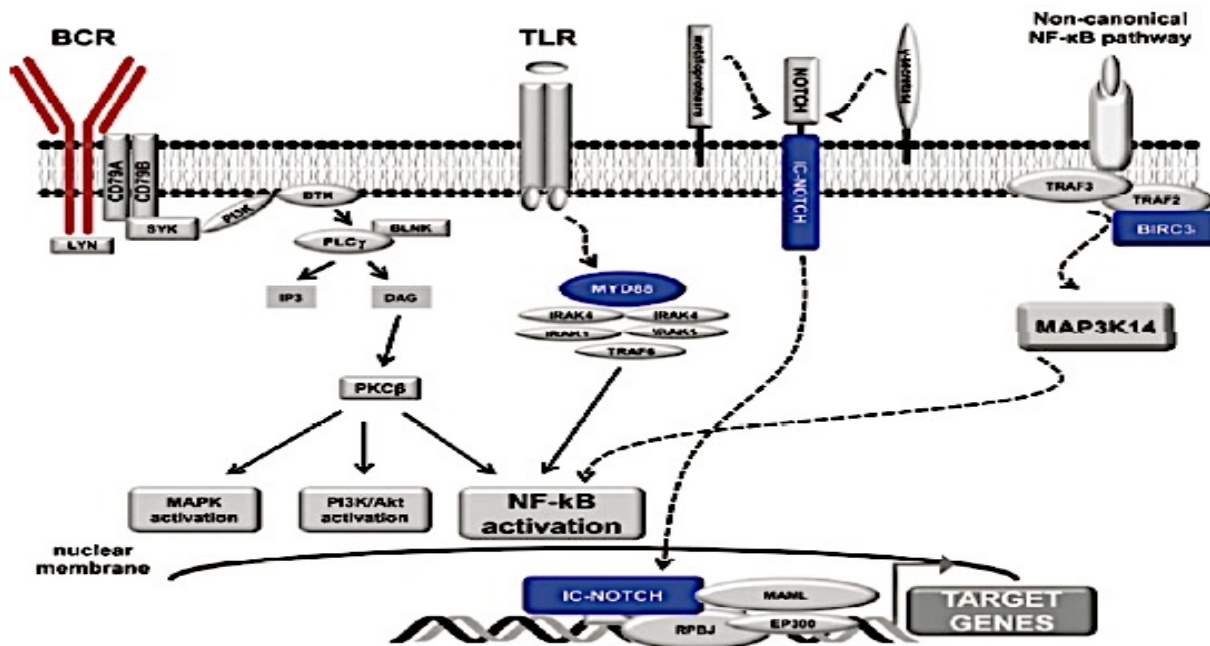


Figure 5 : Les voies moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la LLC. (Rossi et al., 2013)

## 6. Réponse de la signalisation BCR dans la LLC

La LLC est hétérogène et le résultat de la signalisation BCR varie d'une activation positive des LB à l'anergie. L'équilibre entre ces deux mécanismes déterminera le comportement de la tumeur. Cette distinction est susceptible d'expliquer les différences de pronostiques liées aux statuts mutationnels où les marqueurs de l'anergie sont plus importants dans IGHV muté, en revanche, les marqueurs de la signalisation positive sont associés aux gènes IGHV-UM non mutés (Getahun et al., 2016 ; Packham et al., 2014) (Annexe I, Figure 5 et 6).

### 6. 1 Cellules LLC anergiques

La réponse BCR prédominante dans LLC semble être l'anergie ce qui pourrait expliquer la nature chronique de la LLC. Le niveau de la signalisation basale est plus élevé dans les cellules LLC que dans les cellules normales (Muggen et al., 2015). Ces derniers, expriment également des signes de changements constitutifs dans les molécules de signalisation compatibles avec l'anergie. Ils semblent généralement être peu réactives à la stimulation quel que soit le niveau d'expression de IgMs et de IgDs (Apollonio et al., 2013).

Les caractéristiques de l'anergie sont plus évidentes dans les cas de gènes IGHV mutés où l'expression de l'IgM est particulièrement faible et le signal généré en aval du BCR est plutôt faible. En revanche, les cas portant des gènes IGHV non mutés ont une expression d'IgM plus

élevée conduisant à une activation intracellulaire robuste (**Mockridge et al., 2007**) .

Même si la plupart des cellules anergiques semblent surexprimer le BIM (pro-apoptotique) elles sont protégées de la mort. Ceci est probablement due à l'expression de la protéine MCL1 (induisant la survie) et à la surexpression du BCL-2 dont la fonction principale est de neutraliser le BIM. Une expression déséquilibrée des molécules pro et anti-apoptotiques contribue à une survie prolongée des cellules LLC anergiques. Bien que l'anergie puisse paraître moins dangereuse que la prolifération, il faut garder à l'esprit que cet état est réversible et ne peut donc être considéré comme inoffensif (**Packham et al., 2014**).

## **6.2 Cellules LLC prolifératives**

Même si l'anergie peut être la réponse prédominante dans LLC, il y a une fraction proliférative chez tous les patients. Il a été démontré que la signalisation BCR est la principale voie de régulation activée dans les cellules LLC au niveau des ganglions lymphatiques. Ainsi, les voies associées à la BCR dans les cellules LLC montrent une activation accrue qui est plus élevée dans les cas avec des gènes IGHV-UM par rapport aux IGHV-M dont l'activation est plus hétérogène. Une étude a noté une diminution de la positivité de Ki67 (un marqueur de prolifération) avec une activité réduite des voies BTK, PLC $\gamma$ , ERK et AKT, ce qui souligne l'importance du contrôle de la prolifération cellulaire par la signalisation BCR dans la LLC (**Herishanu et al., 2011 ; Cheng et al., 2014**).

## **7. Le microenvironnement de la LLC**

Les cellules LLC recirculent entre le sang périphérique et les organes LS, où elles prolifèrent dans des centres de prolifération. Les CP, sont des signes histopathologiques caractéristiques de la LLC et existent dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques. Par opposition aux centres germinatifs, dans ces centres de prolifération, les cellules LLC entrent en contact avec des cellules stromales mésenchymateuse (MSC), des cellules nurse like (NLC), ainsi que des cellules T (**Ten et Burger , 2014**) (**Figure 6**).

Le lien entre les cellules LLC et les cellules stromales ou NLC est régulé par des chimiokines, des récepteurs des chimiokines, des kinases et les molécules d'adhésion exprimées par les cellules LLC ou les cellules constituant le microenvironnement. Ce crosstalk est initiée par différents récepteurs après liaison à leurs ligands respectifs, par ex ; récepteurs de chimiokines, BCR, CD38, CD40 et TLR. Ces interactions entre les récepteurs et le microclimat de la LLC

conduisent à un certain nombre d'événements régulant le cycle cellulaire, l'apoptose, la prolifération et la migration des cellules leucémiques (Friedberg, 2011).

Un engagement avec des auto-antigènes peut se produire pendant ce transit, stimulant ainsi l'activation et la prolifération des cellules CLL si suffisamment d'aide par les LT est disponible. Cela fournit une niche favorable pour les cellules LLC, entraînant une résistance aux médicaments et la persistance de la maladie (Ramsay et Rodriguez-Justo, 2013).

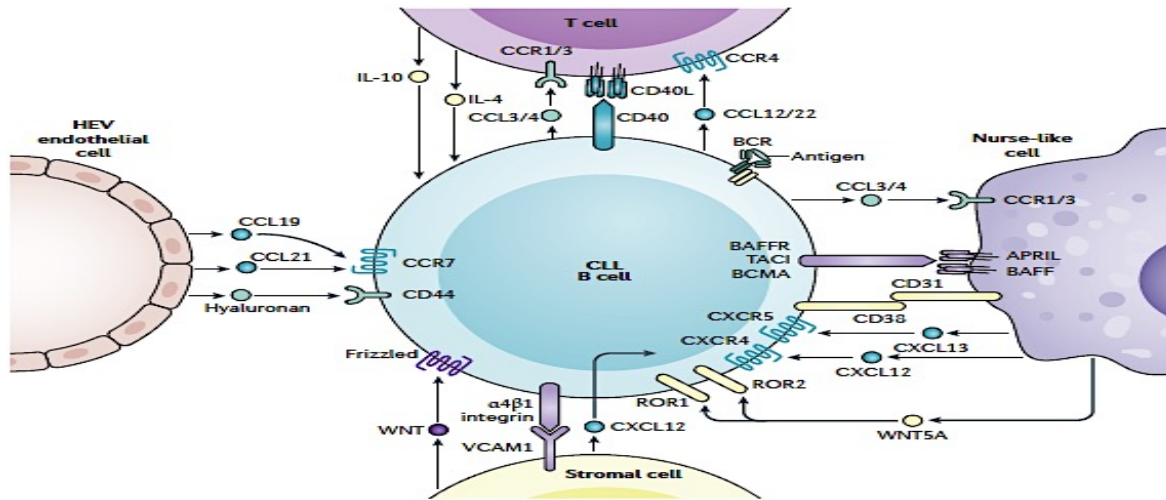


Figure 6 : Le microenvironnement des cellules LLC. (Kipps et al., 2017)

L'exposition à l'antigène dans les centres prolifératifs diminue l'expression de l'IgM, mais pas IgD (une caractéristique connue de l'énergie), et ceci avec des chimiokines locales, module d'autres récepteurs tels que CXCR4, menant à la sortie des cellules LLC dans le sang. En l'absence de stimulation, il y a une récupération de l'expression à la fois de l'IgM et CXCR4 qui initie les cellules pour la réentrée dans les tissus et leur re-stimulation par les antigènes dans d'autres cycles (Mockridge et al., 2007 ; Packham et al., 2014) (Figure 7).

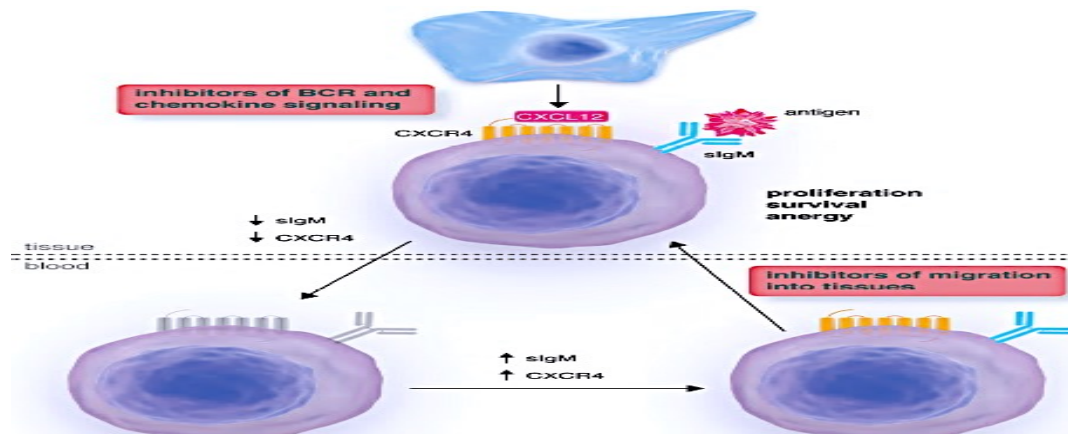


Figure 7 : Un modèle pour la recirculation de la LLC, la modulation des récepteurs et les inhibiteurs utilisés dans la thérapie qui implique ce modèle. (Packham et al., 2014)

### **III. La prise en charge de la LLC**

#### **III.1 Le diagnostic**

##### **1. Clinique**

Le plus souvent, les patients atteints de LLC sont asymptomatiques au moment du diagnostic, en revanche une minorité a des symptômes liés à la maladie. Les symptômes habituels de la LLC comprennent la fatigue involontaire une perte de poids, des sueurs nocturnes excessives, une fréquence accrue d'infections, qui pourraient être associées à une hypogammaglobulinémie. Certains, peuvent présenter des symptômes d'une cytopénie auto-immune. D'autres, peuvent également avoir développé des adénopathies, une hépatomégalie et une splénomégalie. Les ganglions lymphatiques agrandis peuvent être facilement palpables sur trois sites à l'examen physique : les régions cervicale, axillaire et inguino-fémorale (**Eichhorst et al., 2015**).

Sur l'hémogramme, un nombre de lymphocytes B supérieure à  $5 \times 10^9/L$  est détecté. Cette hyperlymphocytose est indispensable au diagnostic (**Hallek et al., 2008**).

##### **2. Cytologique**

L'examen attentif du frottis sanguin revêt une importance vitale et permet de différencier entre une LLC typique et des LLC atypiques (variantes de LLC). La LLC typique est caractérisé par de petits lymphocytes matures, d'aspect normal, à chromatine dense, sans nucléole et au cytoplasme très réduit. La LLC atypique peut être prolymphocytaire (proL) définie par la présence d'un contingent plus au moins important de lymphocytes de grande taille, avec cytoplasme plus abondant, chromatine lâche et nucléolé. Comme elle peut être une LLC mixte caractérisée par la présence de petits et de grands lymphocytes associés à des proL. Un contingent de proL supérieur à 55 % définit la leucémie à prolymphocytes (LPL) (**Xavier Troussard et al., 2013**) (**Annexe I, Figure 7**).

La présence d'ombres de grumprrecht est variable dans les 3 cas. Elle est prédominante dans la LLC typique. Outre que le diagnostic, le frottis sanguin peut permettre également d'évoquer certains diagnostics différentiels, notamment devant les aspects cytologiques atypiques (**Fissore-Magdelein et al., 2009**) (**Annexe I, Figure 8**).

### **3. Immunophénotypage de la LLC**

Lors de la suspicion d'une LLC ou autres SLP-B sur des arguments cliniques et sur une hyperlymphocytose persistante complétée par la découverte de lymphocytes anormaux sur le frottis sanguin, l'immunophénotypage lymphocytaire par la cytométrie en flux apporte des arguments pour affirmer la présence d'un clone malin lymphocytaire circulant dans un délai court. Ce dernier, peut-être réalisée sur une biopsie ganglionnaire, sur moelle osseuse ou sur sang périphérique pour les formes leucémisées comme dans le cas de la LLC (**Benattar et Flandrin, 2003**).

#### **➤ Panel lymphocytaire B**

Toute cellule hématopoïétique néoplasique exprime des clusters de différenciation (CD) qui sont des antigènes de surface membranaire et des marqueurs intracytoplasmiques. Ces marqueurs sont la signature d'une lignée normale ou d'un stade de maturation spécifique. L'analyse immunophénotypique des cellules hématolymphoïdes se base sur ce principe afin de définir la nature de la néoplasie et d'établir un diagnostic. Pour cela, différents types d'anticorps sont utilisés pour disséquer le phénotype des cellules hématolymphoïdes malignes (**Le Garff-Tavernier et al., 2013**).

L'analyse des LB par CMF est réalisée en plusieurs étapes afin d'obtenir une démarche pertinente et de limiter le coût de l'analyse. La construction du panel d'anticorps de marquage est donc une étape clé de l'analyse. Tout commence par l'identification de la population lymphocytaire B, puis en fonction du stade de maturation, l'affirmation de la clonalité de la population B, et enfin l'utilisation de marqueurs particuliers qui permet l'orientation vers un sous-groupe précis de lymphomes (**Bene et al., 2011**).

#### **➤ Identification de la population lymphocytaire B**

Le CD20 est la première molécule historiquement décrite et utilisée dans la caractérisation des lymphocytes B, cependant, son expression est plus restrictive que celle du CD19. En effet, le CD19 est présent tout au long de la maturation du LB et met en évidence les lymphocytes B immatures. Pour cela, son utilisation reste la plus courante pour fenêtrer la population lymphocytaire B. Malheureusement, certaines hémopathies B expriment faiblement le CD20 ou le CD19, ce qui rend difficile leur identification d'appartenance de lignée et nécessite la présence d'autres marqueurs de malignité pour aboutir au diagnostic (**De Tute, 2011**).

➤ **Stade de maturation du lymphocyte B**

L'utilisation de différents marqueurs de maturation permet de déterminer le stade de maturation du clone pathologique. Le plus important est le CD10. Le CD10 est exprimé par les cellules B immatures. Les cellules B matures ont une faible expression du CD10 (**Craig, 2007**).

➤ **Clonalité de la population B**

Physiologiquement deux tiers des lymphocytes B présentent une immunoglobuline de surface composée d'une chaîne légère Kappa et un tiers d'une chaîne légère Lambda. Ce ratio  $\kappa/\lambda$  est constant. Contrairement aux populations de lymphocytes B normales ou réactionnelles, les clones de SLP-B y compris LLC sont caractérisés par une restriction isotypique (Kappa ou Lambda). Ce phénomène traduit la notion de clonalité et on parle de déséquilibre du ratio  $\kappa/\lambda$  lorsque celui-ci est supérieur à 3 ou inférieur à 0.3. On peut également observer une absence totale d'expression d'immunoglobuline membranaire (**Craig et Foon, 2008**).

➤ **Marqueurs aberrants de la population clonale**

Après avoir fenêtré correctement la population clonale d'intérêt, la recherche d'expression des différents antigènes pathologiques permet de caractériser le clone et d'orienter dans la classification des hémopathies lymphoïdes. Le clone pathologique se distingue des cellules B normales par l'absence de marqueurs physiologiques des lymphocytes B ou par l'expression de marqueurs aberrants, par exemple, les CD5 et CD23 dans la leucémie lymphoïde chronique, ou encore les CD103, CD25, CD11c dans la leucémie à tricholeucocytes. (**Wood et al., 2007**). Les marqueurs d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des SLP-B sont récapitulés dans **Annexe I, Tableau V**.

**A. Cas de la leucémie lymphoïde chronique :**

La LLC fait partie des SLPC B les mieux définis phénotypiquement et dont les cellules sont facilement accessibles dans le sang périphérique. Suspecté sur l'hémogramme, le diagnostic de LLC est confirmé par une étude immunophénotypique qui permet de calculer un score ; score Royal Marsden Hospital appelé couramment le score de Matutes, de 0 à 5 selon l'expression ou non de divers antigènes. Un score supérieur ou égal à 4 affirme le diagnostic de LLC et élimine les autres causes d'hyper- lymphocytose. Les cas de LLC avec un score à 3 points sont soit des LLC avec un profil immunologique atypique, soit un autre SLP-B. Ils nécessitent donc des

investigations complémentaires comme l'ajout de nouveaux marqueurs comme le CD200, des études cytogénétiques et anatomopathologiques (**Moreau et al., 1997**).

**Tableau II :** Système de score du Royal Marsden Hospital (score de Matutes)  
(**Aurrant et al., 2013**)

<b>Cotation</b>	<b>1.</b>	<b>0.</b>
CD5	+	-
CD23	+	-
Expression slg monotypique	Faible	forte
FMC7	-	+
Expression de CD79b	Faible	forte

**B. Cas d'autres syndromes lymphoprolifératifs B :**

Un score de Matutes inférieur à trois exclut une LLC et correspond à un autre SLP-B. Pour cela, un nombre significatif de marqueurs est utilisé pour une caractérisation complète des syndromes lymphoprolifératifs. Une vingtaine d'anticorps sont requis pour la caractérisation de toutes néoplasies confondues. De plus, de nouveaux marqueurs de surface ou intracellulaires se rajoutent continuellement dans de nouvelles publications dans un but diagnostique ou pronostic. (**Le Garff-Tavernier et al., 2013**). Ces derniers ont été classés en quatre catégories selon l'expression de CD5 et CD10 (**Annexe I, Tableau VI**).

Aucun profil n'est spécifique d'un lymphome en particulier cependant la combinaison de ces antigènes peut permettre d'orienter le diagnostic. Il s'agit le plus souvent d'utiliser des panels d'anticorps qui permettent d'affirmer ou d'infirmer une hypothèse diagnostique formulée (**Tableau IV**).

L'analyse morphologique de la population lymphocytaire reste indispensable et doit être simultanée à la réalisation de l'immunophénotypage. Cette étude morphologique doit être réalisée par un cytologiste expérimenté, car elle peut également orienter le panel d'anticorps du fait de la présence de cellules caractéristiques comme les tricholeucocytes. L'interprétation conjointe de la cytologie et de l'immunophénotypage est indispensable, car elle permet de détecter les résultats faussement négatifs obtenus en CMF causés par un fenêtrage incorrect des données cytométriques (**Craig et Foon, 2008**).



En conclusion, l'immunophénotypage de la population lymphoïde B doit prendre en compte les informations cytologiques, les renseignements cliniques fournis par le prescripteur, les données génétiques, les résultats d'immunohistochimie pour aboutir à une analyse optimale des lymphocytes B et la classification de l'hémopathie. (Bene et al., 2011)

**Tableau III.** Caractéristiques phénotypiques des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (Craig et al., 2008)

	LLC	LPL-B	LCM	LF	LZM	HCL	SLVL	LPL-MW
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	+/-	+	-	-/+	-	-/+	-
CD23	+	-	-	-/+	-	-	-/+	-
slg	Faible ou -	++	++	++	++	+++	+++	Faible à moyenne
FMC7	Faible ou -	+	+	+	++	++	+++	+/-
CD22	Faible ou -	+	+	+	+	++	++	+
CD79b	Faible ou -	+	+	+	+	+	++	+
CD10	-	-/+	-	+/-	-	-/+	-	-
CD103	-	-	-	-	-/+	+	-	-
CD11c	-/+	-	-	-	+/-	+	+	-
CD25	-/+	-	-	-	+/-	+	-	+
CD43	++	-	-/+	-	-	-/+	-	-
CD20	Faiblement +	+	+	+	+	++	++	+

+ : généralement positif ; - : généralement négatif ; +/- : habituellement positif mais peut être négatif ; -/+ : habituellement négatif mais peut être positif.  
 slg: immunoglobulines de surface (évaluées par l'expression des chaînes légères kappa ou lambda), LLC: leucémie lymphoïde chronique, LPL-B: leucémie à polymphocytes B, LCM: lymphome du manteau, LF: lymphome folliculaire, LZM: lymphome de la zone marginale, HCL: hairy cell leukemia (leucémie à tricholeucocytes), LPL-MW: lymphome lymphoplasmocytaire/maladie de Waldenström

**4. Facteurs pronostiques :**

Les tests décrits dans cette partie ne sont pas nécessaires pour établir le diagnostic de la LLC, mais peuvent aider à prédire le pronostic ou à évaluer le fardeau de la tumeur. Ces tests peuvent être recommandés pour les patients qui souhaitent une meilleure prédiction de la vitesse à laquelle leur maladie pourrait progresser, mais il convient de souligner que l'indication du traitement ne dépend d'aucun de ces tests mais du stade clinique et de l'activité de la maladie.

➤ **La cytogénétique moléculaire :** la détection de certaines délétions chromosomiques a une signification pronostique et peut influencer les décisions thérapeutiques. Par exemple ; Les patients avec des cellules leucémiques qui ont del (17p) ont un pronostic inférieur et semblent être résistants à la chimiothérapie utilisant des médicaments alkylants (Grever et al., 2007).

➤ **Le statut mutationnel** : l'utilisation du VH3.21 et l'expression du ZAP-70 ou CD38 : Les patients avec un gène IGVH-UM (non muté) semble avoir un mauvais pronostic par rapport à ceux avec un gène IGVH-M. De plus, le gene VH3.21 est un marqueur pronostic défavorable indépendant du statut mutationnel (**Thorselius et al., 2006**). L'expression du ZAP-70 ou CD38 s'est révélé être en corrélation avec l'expression IGVH-UM et pour prédire un mauvais pronostic. (**Damle et al., 1999**)

➤ **Marqueurs sériques** : plusieurs études ont montré que les marqueurs sériques CD23, la thymidine kinase et  $\beta$ 2-microglobuline peuvent prédire la survie ou la progression de la maladie. Les tests de ces marqueurs doivent être normalisés et utilisés dans des essais cliniques prospectifs pour valider leur valeur relative à la prise en charge patients atteints de LLC (**Bergmann et al., 2007**).

➤ **Examen de la moelle osseuse** : L'étude de la MO par myélogramme et la biopsie ostéo médullaire n'est pas nécessaire au diagnostic, mais elle donne une idée plus précise sur l'infiltrat médullaire ou bien sur l'origine d'une cytopénie.

### **III.2 Thérapeutique :**

Le traitement des patients atteints de LLC peut inclure une chimiothérapie, une combinaison de chimiothérapie et d'immunothérapie ou des médicaments ciblant les voies de signalisation qui favorisent la croissance et / ou la survie des cellules LLC (par exemple, BCR et BCL-2) ou les voies qui régulent cette signalisation (**Eichhorst et al., 2015**) (**Annexe I, Tableau VI**).

Actuellement, le principal problème dans le traitement de la LLC est que, malgré des taux de réponse prometteurs ces dernières années, les patients présentant une maladie à haut risque semblent toujours rechuter avec une cinétique essentiellement inchangée. Au cours de ces rechutes, la maladie est souvent réfractaire aux chimiothérapies conventionnelles. Cibler les interactions immunitaires et microenvironnementales dans la LLC pourrait fournir les moyens de soulever la protection des cellules malignes dérivées de ces interactions et créer de fortes synergies avec les thérapies conventionnelles, permettant le contrôle de la LLC même dans les endroits où la maladie résiduelle survit (**Kipps et al., 2017**).

*Matériel*  
&  
*Méthodes*

## **II. Matériel et méthodes**

Notre étude a été réalisée au sein du Centre Hospitalo-Universitaire ISSAAD Hassani, laboratoire d'immunologie médicale, Beni Messous. Il s'agit d'une étude rétro-prospective réalisée sur 101 patients chez qui la confrontation clinico-biologique a permis de conclure au diagnostic du syndromes lymphoprolifératifs B matures (SLP-B) suspectée avec une LLC-B : une hyperlymphocytose sanguine persistante, confirmée par l'examen morphologique au microscope optique. De ce fait, l'objectif de notre étude était d'évaluer la place de la cytométrie en flux (CMF) dans le diagnostic différentiel de la leucémie lymphoïde chronique des autres syndromes lymphoprolifératifs B matures.

### **I. Matériel**

#### **I.1 Matériel biologique**

Notre étude a été réalisé sur 101 patients chez qui un immunophénotypage lymphocytaire sur sang périphérique a été effectué. Ces patients ont été sélectionnés après une étude de leurs dossiers médicaux. Ce qui a permis de créer une base de données (Excel) contenant les différents paramètres des 101 patients à partir des données archivées. Néanmoins, certains paramètres n'ont pas pu être évalués à la fin du recueil par manque de données.

#### **1.2 Matériel non biologique**

La réalisation de notre étude nécessite l'utilisation d'une variété d'appareillage et de réactifs. L'ensemble du matériel est illustré dans la partie **Annexe II**.

### **II. Méthodes**

Les 101 patients suspects pour une leucémie lymphoïde chronique et qui ont été recrutés dans l'unité d'immunologie cellulaire et de cytométrie en flux du laboratoire d'immunologie médicale, ont bénéficié d'un immunophénotypage lymphocytaire effectué par la cytométrie en flux. Pour cela, nous avons travaillé sur des prélèvements de sang périphérique. Ces derniers ont été effectués par ponction veineuse au niveau du pli du coude. Le sang prélevé a été recueilli sur des tubes en présence d'anticoagulant EDTA (éthylène diamine tétra acétique). Puis 5 ml du sang ont été récupérés dans des tubes BD, afin d'effectuer l'immunophénotypage lymphocytaire.

## II.1 Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux repose sur l'analyse de cellules en suspension marquées par des anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome. Les cellules sont injectées dans un flux laminaire continu et vont passer les unes derrière les autres devant plusieurs lasers. Leurs irradiations provoquent l'excitation des fluorochromes qui vont émettre leurs fluorescences respectives. Ces signaux sont captés par des détecteurs spécifiques et amplifiés par des photomultiplicateurs puis intégrés informatiquement pour étudier les différentes populations cellulaires de l'échantillon. Après l'analyse, les cellules peuvent être ensuite triées en fonction des différents paramètres analysés. (Figure 8)

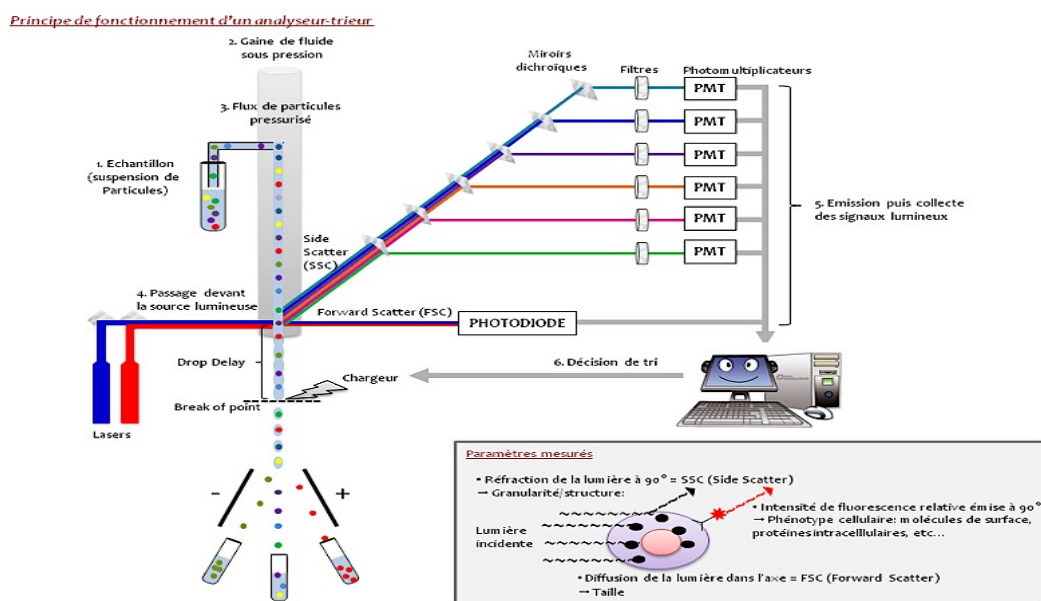


Figure 8 : Principe de fonctionnement du cytomètre en flux.

### a) Système fluide

La focalisation hydrodynamique permet d'effectuer une analyse multiparamétrique des cellules individualisées. Le défilement des cellules les unes derrière les autres est possible grâce à un principe de mécanique des fluides : l'hydrofocalisation. L'échantillon est introduit via la buse d'un injecteur qui permet de former un jet dans un liquide de gaine de la taille de l'orifice de la buse. Pour réaliser le flux, une pression plus faible est appliquée sur le liquide de gaine par rapport à celle appliquée sur l'échantillon ce qui permet de générer un flux et donc une analyse individuelle de chaque cellule (Ronot et al., 2006).

### **b) L'excitation lumineuse**

Le rayon du laser vient frapper perpendiculairement la cellule contenue dans le jet via des prismes et des lentilles optiques qui permettent de positionner avec précision le point d'intersection entre la cellule et le laser. Ce rayon permet d'exciter les fluorochromes couplés aux anticorps qui sont fixés sur la cellule.

### **c) Les fluorochromes**

La fluorescence est une émission de lumière résultant de l'excitation d'une molécule. Cette molécule absorbe l'énergie lors de son excitation à une longueur d'onde caractéristique puis émet cette énergie sous forme de lumière presque instantanément à une longueur d'onde plus grande. Les spectres d'absorption et d'émission sont propres à chaque fluorochrome (**Ronot et al., 2006**) (**Annexe II**).

### **d) Le système optique**

Les signaux lumineux émis après l'excitation par les lasers sont de différentes natures :

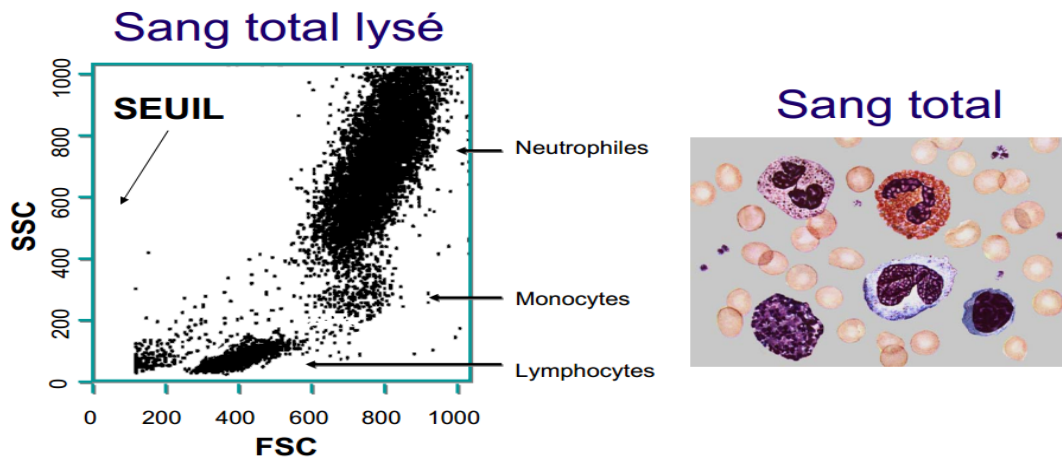
- La diffusion des signaux aux petits angles « forward scatter » (FSC) collectée dans l'axe du faisceau laser, donne des indications sur la taille de la cellule analysée ;
- La diffusion des signaux aux grands angles « side scatter » (SSC) collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux du laser, donne des informations sur la structure interne de la cellule (granularité et rapport nucléocytoplasmique) et permet de discriminer les différentes populations du sang. Le signal est faible pour les lymphocytes, un peu plus fort pour les monocytes, et élevé pour les granulocytes ;
- La fluorescence émise par les cellules marquées est récoltée à 90° par rapport au faisceau lumineux du laser. Les deux premières informations FSC et SSC permettent déjà de différencier les différentes populations cellulaires sanguines comme le montre la figure 9.

### **e) Traitement du signal lumineux**

Les signaux et rayons ainsi émis sont ensuite séparés par des filtres optiques (miroirs dichroïques et filtres) puis collectés par des photomultiplicateurs (PMT) ou des photodiodes afin d'être amplifiés, numérisés, analysés et stockés par un ordinateur

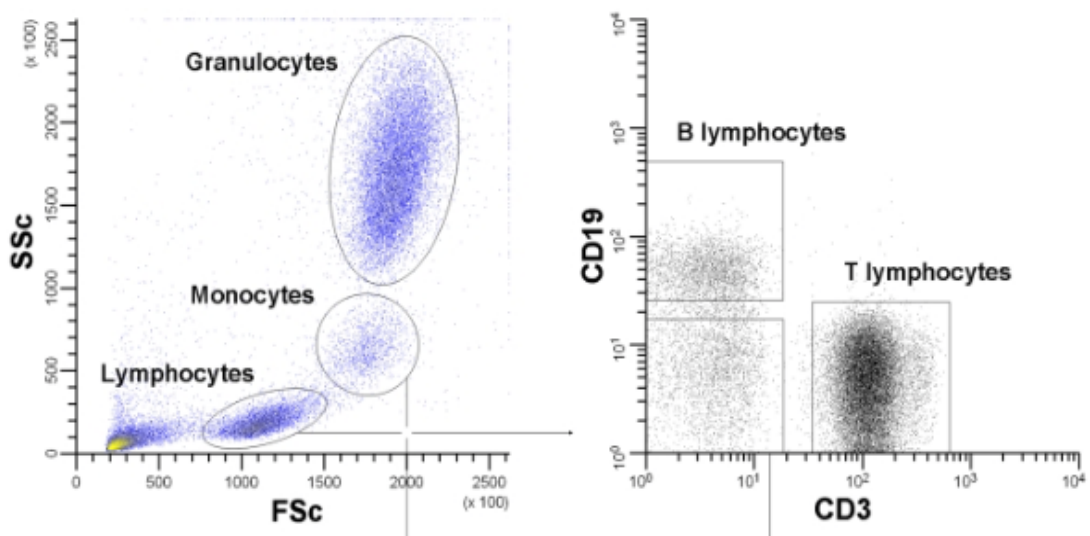
f) **Repérage des lymphocytes B matures**

Le scattergram FSC/SSC permet la caractérisation des différentes populations cellulaires sanguines y compris les lymphocytes B qui est la population d'intérêt dans notre étude, ainsi que d'éliminer les débris cellulaires.



**Figure 9 :** Informations morphologiques des cellules analysées et séparation des différentes populations sanguines

Le marqueur CD19 est spécifique des lymphocytes B. Il n'est pas présent sur les lymphocytes T ou NK, ni sur les autres leucocytes. Tandis que le marqueur CD3 est l'antigène commun utilisé pour identifier les lymphocytes T. En pratique une recherche de clonalité est réalisée lorsque les lymphocytes B sont supérieurs à 5G/L.



**Figure 10 :** Aspect des scattergrams FSC/SSC et CD19/CD3

## **II.2. Mode opératoire (Annexe II)**

Pour la construction du panel d'anticorps, un premier panel composé d'anticorps spécifiques permettant la mise en évidence d'une population clonale B avec une restriction isotypique (tube d'orientation).

Si la recherche s'avère positive, un panel étendu est déclenché, permettant de rechercher le stade de maturation qui a été évalué par CD44, la présence d'aberrations phénotypiques et de révéler des expressions caractéristiques d'une entité B. Les panels systématiquement utilisés dans le laboratoire concernent ceux utilisés pour l'évaluation du score de Matutes et bien d'autres marqueurs spécifiques aux SLP-B résumés dans le tableau V.

### **Les étapes**

- Déposer 100 ul du sang total dans le tube d'orientation
- Ajouter 3ml de la solution de lavage afin d'éliminer les immunoglobulines naturelles circulantes et qui interfèrent avec l'étude des chaînes légères kappa/lambda où des chaînes lourdes.
- Vortexer le tube et centrifuger à 0.5 RCF pendant 5 minutes, puis éliminer le surnageant
- Passer à un 2<sup>ème</sup> lavage avec les mêmes étapes précédentes
- Après élimination du surnageant, déposer les anticorps membranaires conjugués aux fluorochromes (marqueurs) selon la méthodologie indiquée dans le tableau 5.
- Vortexer et incubé pendant 20 minutes à l'abri de la lumière
- Pour éliminer l'excès d'anticorps après le marquage, ajouter 2ml de la solution de lyse puis mélanger par agitation rotative.
- Incuber pendant 10 minutes et centrifuger à 0.5 RCF pendant 5 minutes
- Verser le surnageant et l'éliminer.
- Ajouter 500ul du PBS, vortexer et le tube sera prêt pour la lecture par CMF grâce à BD FACSDive Software.

Si le marquage du tube d'orientation s'avère positif on passe à la préparation de quatre autres tubes avec des marqueurs qui pourraient permettre une orientation du diagnostic et une classification des SLP-B.



- Pour le premier tube, les étapes sont les mêmes c'est à dire avec 2 lavages cela est à cause du marqueur de l'IgM de surface qui peut s'interférer avec les Ig circulantes.
- Pour les 3 derniers tubes, les marqueurs seront ajoutés directement sans lavage.
- Les étapes qui suivent le marquage sont identiques de celles du tube d'orientation

**Tableau IV : Protocol de marquage commun au LLC-B**

<b>Tube d'orientation</b>	<b>CD19<sub>Percp</sub></b>	<b>Kappa<sub>FITC</sub></b>	<b>Lambda<sub>PE</sub></b>	<b>CD20<sub>APC-H7</sub></b>
<b>Volume rajouté</b>	5ul (marquage multiple)			1 ul
<b>Tube 1</b>	<b>CD103<sub>FITC</sub></b>	<b>CD79b<sub>PE</sub></b>	<b>CD19<sub>Percp-cy5.5</sub></b>	<b>IgM<sub>APC</sub></b>
<b>Volume rajouté</b>	4ul			
<b>Tube 2</b>	<b>CD5<sub>FITC</sub></b>	<b>CD10<sub>PE</sub></b>	<b>CD19<sub>Percp-cy5.5</sub></b>	<b>CD22<sub>APC</sub></b>
<b>Volume rajouté</b>	2ul			
<b>Tube 3</b>	<b>FMC7<sub>FITC</sub></b>	<b>CD23<sub>PE</sub></b>	<b>CD19<sub>Percp-cy5.5</sub></b>	<b>CD11c<sub>PE</sub></b>
<b>Volume rajouté</b>	2ul			
<b>Tube 4</b>	<b>CD38<sub>FITC</sub></b>	<b>CD56<sub>PE</sub></b>	<b>CD19<sub>Percp-cy5.5</sub></b>	
<b>Volume rajouté</b>	2ul			

### III. Analyse statistique

Les données recueillies ont été saisies sur le logiciel Microsoft Excel, afin d'obtenir des moyennes, des pourcentages, des écart types et des médianes ainsi que les histogrammes appropriés.

Le test khi deux a été utilisé pour comparer l'expression des marqueurs de surface entre les deux groupes ; patients avec leucémie lymphoïde chronique et celui des autres syndromes lymphoprolifératifs B, la différence est significative si  $P \leq 0,05$ .

*Résultats*  
&  
**Discussion**

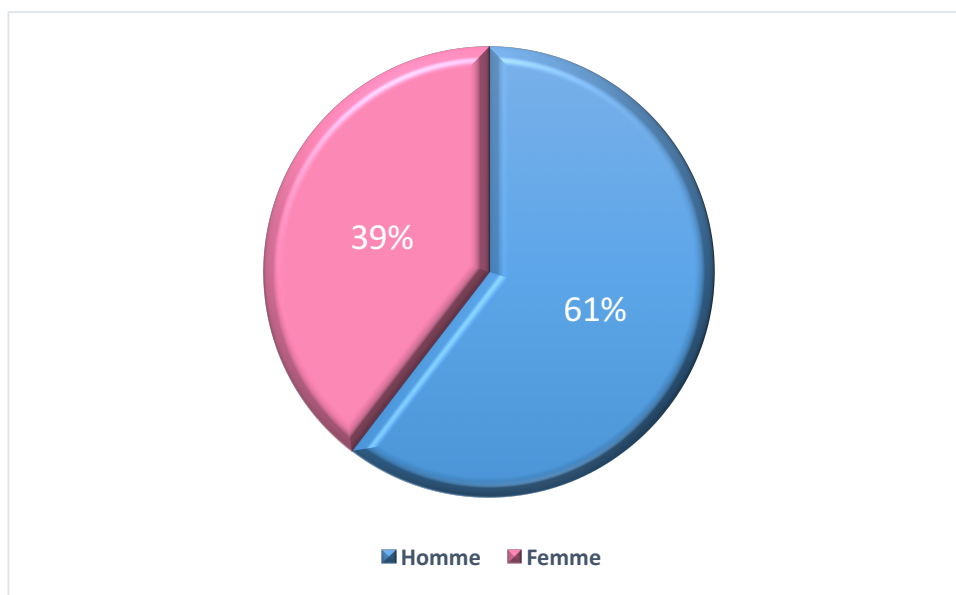
Notre étude a porté sur 101 patients, colligés au niveau de l'unité d'immunologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Beni Messous, chez qui la confrontation clinico-biologique a permis de conclure au diagnostic du syndromes lymphoprolifératifs chroniques (SLPC) avec suspicion de LLC-B : une hyperlymphocytose sanguine persistante, confirmée par l'examen morphologique au microscope optique. De ce fait, l'objectif de notre étude a été d'évaluer la place de la cytométrie en flux (CMF) dans le diagnostic différentiel de la leucémie lymphoïde chronique des autres syndromes lymphoprolifératifs B.

### **III. Caractéristiques épidémiologiques et clinico-biologiques de la cohorte**

#### **III.1. Répartition des patients selon le sexe**

Dans notre série, nous constatons une prédominance masculine chez les sujets diagnostiqués avec 61 cas, soit un pourcentage de 61% d'hommes contre 40 patientes, soit un pourcentage de 39% de femmes. Le sex ratio est de 1,53.

Ces résultats sont comparables à ceux retrouvés dans une étude Algérienne menée sur 29 patients (Kessal *et al.*, 2013), ainsi qu'avec ceux rapportés dans une étude brésilienne (93 cas) (Cardoso *et al.*, 2016).



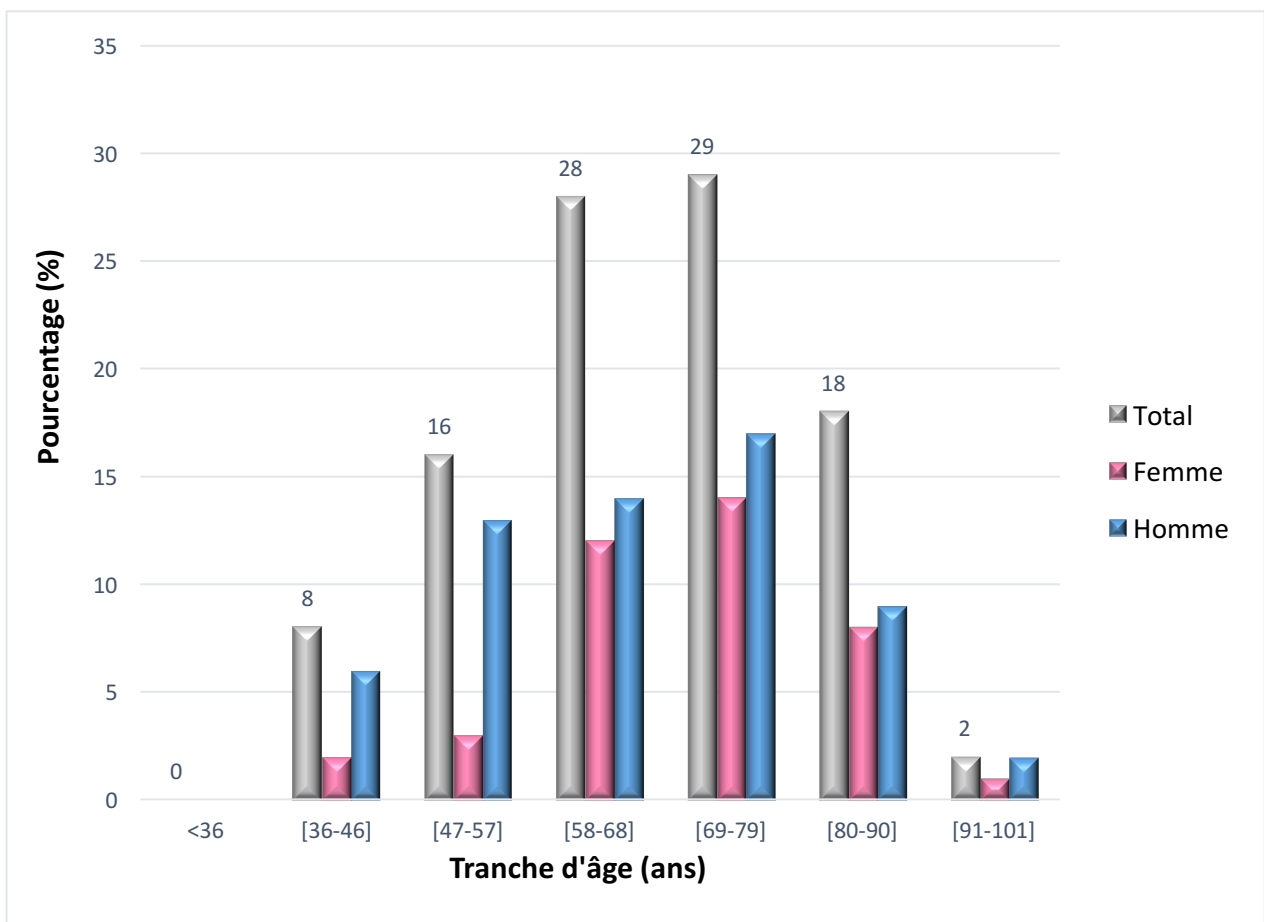
**Figure 11** : Répartition des patients selon le sexe.

### III.2 Répartition des patients selon l'âge

L'âge des patients au diagnostic allait de 36 à 94 ans, avec une moyenne de 66 ans  $\pm$ 14,5 et une médiane de 68 ans. La répartition selon les tranches d'âges est rapportée dans la figure X.

Les tranches d'âges les plus touchés se situent entre 58 ans et 79 ans, et représentent 57% de l'ensemble de la cohorte. Nous remarquons, par ailleurs, que quelle que soit la tranche d'âge considérée, les patients hommes étaient plus nombreux.

Ces résultats sont comparables à ceux rapporté par l'équipe de **Kessal ,(2013)** où la moyenne d'âge était de 67 ans ; mais différent de ceux d'une étude Égyptienne, qui a rapporté un âge moyen au diagnostic plus faible : 51 ans (**Abdel-Ghafar et al., 2012**).



**Figure 12** : Répartition des patients selon le sexe et par tranche d'âge

### III.3 Hémogramme

Les données de l'hémogramme varient d'un patient à l'autre (**Annexe III**). L'anémie, qui se définit par un taux anormalement bas d'hémoglobine, a été noté chez 14 patients, soit 16% (14/87). D'autres lignées ont également été atteintes, 16% des patients ont présenté une thrombopénie (11/70) (**Tableau V**).

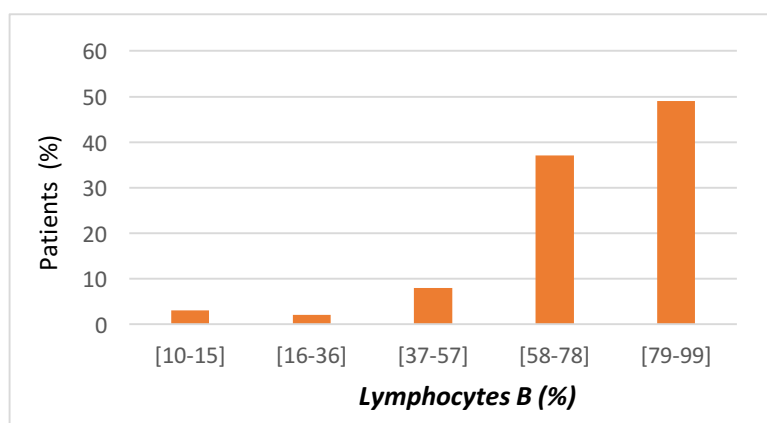
L'hémogramme a également permis de montrer une hyperlymphocytose de type B chez 96,9% des patients (96/99), confirmant par-là même l'hyperleucocytose observé chez 49/56 patients, en plus de 31 cas d'hyperleucocytose mentionnés dans les dossiers des patients. Une absence d'hyperleucocytose a été observé chez 3/99 patients, soit un pourcentage de 3%. (**Figure 13**)

**Tableau V** : Répartition de l'anémie et de la thrombopénie.

(N = nombre total de patients contrôlés pour l'hémoglobine et/ou les plaquettes)

L'Anémie et la Thrombopénie	Nombre de cas (n/N)	Pourcentage %
Anémie isolée	14/87	16
Thrombopénie	11/70	15,71
Anémie + Thrombopénie	0	0
Hyperleucocytose	80/87	91,95
Hyperlymphocytose	96/99	96,9

Les anomalies de l'hémogramme décrits sont comparables à celles rapportées par une étude menée sur une cohorte serbe de 211 patients (**Dragovic-Ivancevic et al., 2014**). En effet, une anémie a été détecté chez 16 % des patients et une thrombopénie chez 6%. La majorité des cas, présentaient une hyperleucocytose accompagnée d'une lymphocytose B avec une moyenne de 82 % qui est un peu plus élevé que celle retrouvée dans notre étude.



**Figure 13** : Répartition des patients en fonction du pourcentage en lymphocytes B

### III.4 Les circonstances de découverte

Les données cliniques des patients ont été rétrospectivement obtenues par la consultation des dossiers médicaux. Toutefois, certaines informations précieuses sont non consignées ou sommairement décrites dans les dossiers.

Les seules données cliniques disponibles concernent 79 cas. Pour lesquels les symptômes les plus rencontrés sont, par ordre décroissant, les syndromes tumoraux (Adénopathie, splénomégalie) et l'hypertension artérielle. Les principaux symptômes présentés par les malades au moment du diagnostic sont répertoriés dans le tableau VI.

**Tableau VI** : Répartition selon les circonstances de découverte

Manifestations cliniques	Nombre
Adénopathie	40
Splénomégalie	23
Non précisés	22
Hypertension artérielle	19
Adénopathie + Splénomégalie	16
Diabète non insulino-dépendant	6
Diabète de type 1 associé à une Hyperthyroïdie	5
Asthénie	3
Adénome de la prostate	3
Hépatomégalie	3
Asthme	1
Pancytopenie	1
Hypertrophie amygdale	1
Syndrome infectieux à répétition	1
Alzheimer	1
Ostéoporose	1

Nos résultats semblent être en adéquation avec les données de la littérature. En effet, l'adénopathie et la splénomégalie, constituent les critères diagnostic des SLP-B et impactent sur leur classification pronostic (**Sotto , 1999**).

L'association des maladies auto-immunes telle que retrouvée dans notre étude avec les SLP-B semble être sélective selon le type du syndrome, comme expliqué par Hemminki et ses collaborateurs (2016). Ils spéculent que l'origine développementale des LB pourrait proposer une justification mécaniste sur la réponse cancérogène aux stimuli auto-immuns (**Hemminki, Liu, Ji et Försti, 2016**)

### III.5 Analyse morphologique

Les données du frottis sanguins ont été rétrospectivement recueillies par la consultation du dossier médicale. Les seules données disponibles concernent 58 cas (47,4 %).

Chaque frottis sanguin, après coloration au May-Grünwald Giemsa, a été analysé au microscope par des hémato-cytologistes. L'interprétation cytologique considérant les caractéristiques morphologiques propres des cellules lymphoïdes, un dénombrement spécifique des lymphocytes villeux et des noyaux nus a été réalisé.

**Tableau VII** : Répartition des patients avec hyperlymphocytose d'origine néoplasique (N = 58)

Entités dépistées	n	Caractéristiques	%
LLC-B typique	27	Lymphocytose monotone, petits lymphocytes matures, chromatine nucléaire dense sans nucléole, ombre de Gumprecht	46,5
LLC-B atypique	4	Aspect hétérogène de petits et grands lymphocytes (Prolymphocytes < 10%), irrégularité du contour nucléaire,	6,8
Leucémie à tricholeucocytes	3	Cellules tumorales chevelus de grande taille, cytoplasme étendu faiblement et irrégulièrement basophile, fines projections cytoplasmiques, rapport nucléo-cytoplasmique bas.	5,1
Cas non classés	24	Hyperleucocytose accompagnée d'une lymphocytose	41

En raison d'anomalies lymphocytaires nucléaires et/ou cytoplasmiques caractéristiques et significatives (> 5% des lymphocytes), ou de lymphocytose avec lymphocytes à grains > 1 G/L, la conclusion de l'analyse cyto-morphologique avait orienté le diagnostic vers une lymphoprolifération néoplasique. La répartition, des entités observées, est présentée dans le tableau VII , ci-dessus. Ces dernières ont pu être classées selon les caractéristiques et les recommandations décrites par **Matutes et al. (2000)** et **Troussard et al. (2009)**

Toutefois, l'aspect morphologique observé ne permettant pas une orientation diagnostique formelle, l'hémato-cytologiste avait conseillé une confirmation par immunophénotypage des lymphocytes

### III.6 Caractéristiques immunophénotypiques

Un immunophénotypage lymphocytaire de dépistage a été réalisé par cytométrie en flux (CMF) multiparamétrique grâce à une combinaison de 15 anticorps monoclonaux. Cette combinaison est utilisée en routine au laboratoire et est optimisée pour la détermination de la répartition des sous-populations lymphocytaires T, B et NK, la détection de populations B monotypiques ou de populations T phénotypiquement anormales. L'expression des différents marqueurs est présentée dans le tableau ci-dessous.

L'expression du CD19 est positif pour l'ensemble de patients analysés soit les 101 cas, confirmant, ainsi, la lymphocytose de type B. D'autre part, les cinq autres antigènes qui construisent le score de Matutes (CD5, CD23, FMC7, CD79b, Ig de surface) ont montrés une expression qui varie entre faible, négatif et positif. Ces mêmes intensités d'expression ont été observées pour les autres marqueurs y compris : le CD38, le CD103, CD10 et le CD11c. Le CD56 semble être négatif pour l'ensemble des patients analysés, soit les 82 patients, excluant tout type de syndrome-NK.

Il a été montré que le CD19 était exprimé chez tous les patients, ce qui indique sa forte caractérisation des cellules B et fourni, par conséquent, un meilleur « gating » face au CD20. Ce dernier étant faiblement exprimé chez certains patients. Ces résultats sont similaires à ceux de l'étude de **Rawstron et al. (2018)** menée sur 154 patients. Dans notre étude, contrairement aux résultats rapportés par **Dragovic et al. (2014)** l'expression du CD22 était positive chez tous les patients, probablement en raison du nombre réduit de patients analysés pour ce marqueur. Pour l'ensemble des autres antigènes l'expression est très variable, cela est expliquée par le fait que ces résultats reflètent l'expression phénotypique de différentes entités pathologiques appartenant au groupe des syndromes lymphoprolifératifs B.



**Tableau VIII** : Résultats de la distribution des intensités de fluorescence des différents marqueurs du panel d'exploration des SLP-B

n : nombre de patients montrant un profil d'expression spécifique pour chaque marqueur analysé (Faible, Négatif, Positif) ; N : nombre total des patients analysés pour chaque marqueur.

Marqueurs	Expression normale	Intérêt dans le diagnostic des SLP-B	Intensité de l'expression % (n /N)		
			Positif	Négatif	Faible
<b>CD19</b>	Lymphocytes B et plasmocytes	Marqueur de la lignée B	100 (101/101)	/	/
<b>CD10</b>	Lymphocytes B et T immatures, minorité de lymphocytes B et T	LF	3,9 (4/101)	96 (97/101)	
<b>CD5</b>	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	LLC, LCM	73 (74/101)	25,7 (26/101)	0,9 (1/101)
<b>CD20</b>	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B	89,4 (51/57)		10,5 (6/57)
<b>CD22</b>	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B	100 (15/15)	/	/
<b>CD103</b>	Minorité de lymphocytes B	HCL et rare MZL	8,1 (6/74)	91,8 (68/74)	
<b>CD11c</b>	Quelques lymphocytes B et T	HCL, LPL, LZM, SLVL	52,3 (11/21)	28,5 (6/21)	19 (4/21)
<b>CD56</b>	Cellules NK	Discrimination d'un SLP de type NK	/	100 (82/82)	/
<b>CD79b</b>	Précurseurs B, plasmocytes. Expression variable sur LB	Marqueur de la lignée B	46,5 (47/101)	23,7 (24/101)	35,6 (36/101)
<b>FMC7</b>	Lymphocytes B matures	Diagnostic différentiel LLC/LCM	15,30 (15/98)	80,6 (79/98)	3 (3/98)
<b>CD23</b>	Faiblement positif dans les LB matures. Expression augmentée lors de l'activation	Diagnostic différentiel et autres SLP-B CD5+	74,2 (75/101)	24,7 (25/101)	0,9 (1/101)
<b>Ig de surface</b>	Lymphocytes B immatures /matures	Diagnostic différentiel et autres SLP-B	22,7 (23/101)	48,5 (49/101)	28,7 (29/101)
<b>CD38</b>	Cellules centro-folliculaires, cellules T immatures, plasmocytes	Différenciation plasmocytaires, Marqueur pronostique dans la LLC	6,1 (6/97)	87,6 (85/97)	6,1 (6/97)
<b>Chaîne légère Kappa (surface)</b>	Lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique	35,8 (28/78)	64,1 (50/78)	/
<b>Chaîne légère Lambda (surface)</b>	Lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique	16,6 (13/78)	64,3 (65/78)	/

LCM : lymphome du manteau ; LF : lymphome folliculaire ; HCL : leucémie a tricholeucocytes ; LZM : lymphome de la zone marginale, LPL : leucémie prolymphocytaire ; SLVL : lymphome splénique a lymphocytes villeux (SLVL)

**III.6.1 Classement et répartition étiologique des patients**

Pour répondre à l'objectifs de l'étude, les patients ont été classés selon leur entité pathologique. Ainsi, en fonction de la conclusion de l'immunophénotypage, des données cliniques, et de la cytologie, nous avons pu classer les différents SLP-B avec suspicion LLC. Les LLC ont été retenues sur un score de Matutes supérieur ou égal à 4 (**Tableau IX ; Figure 14**).

**Tableau IX** : Répartition des patients selon le score de Matutes

Marqueurs	Score de Matutes selon l'expression du marqueur	Score de Matutes					
		0	1	2	3	4	5
CD79b	0	9	7	10	7	3	0
	1	0	1	0	6	21	37
Ig de surface	0	9	5	4	9	6	0
	1	0	3	6	4	18	37
CD5	0	9	7	6	1	10	0
	1	0	1	4	12	14	37
FMC7	0	9	6	2	3	3	0
	1	0	2	8	10	21	37
CD23	0	9	7	8	6	2	0
	1	0	1	2	7	22	37
<b>Nombre de patients (n)</b>		9	8	10	13	24	37
<b>% (n /101)</b>		<b>8,9</b>	<b>7,9</b>	<b>9,9</b>	<b>12,87</b>	<b>23,76</b>	<b>36,6</b>

Le profil d'expression des marqueurs du score de Matutes nous a permis de répartir l'ensemble de la population diagnostiquée (101 cas) en trois groupes : LLC-B typique, LLC-B atypique et SLPC-B non LLC.

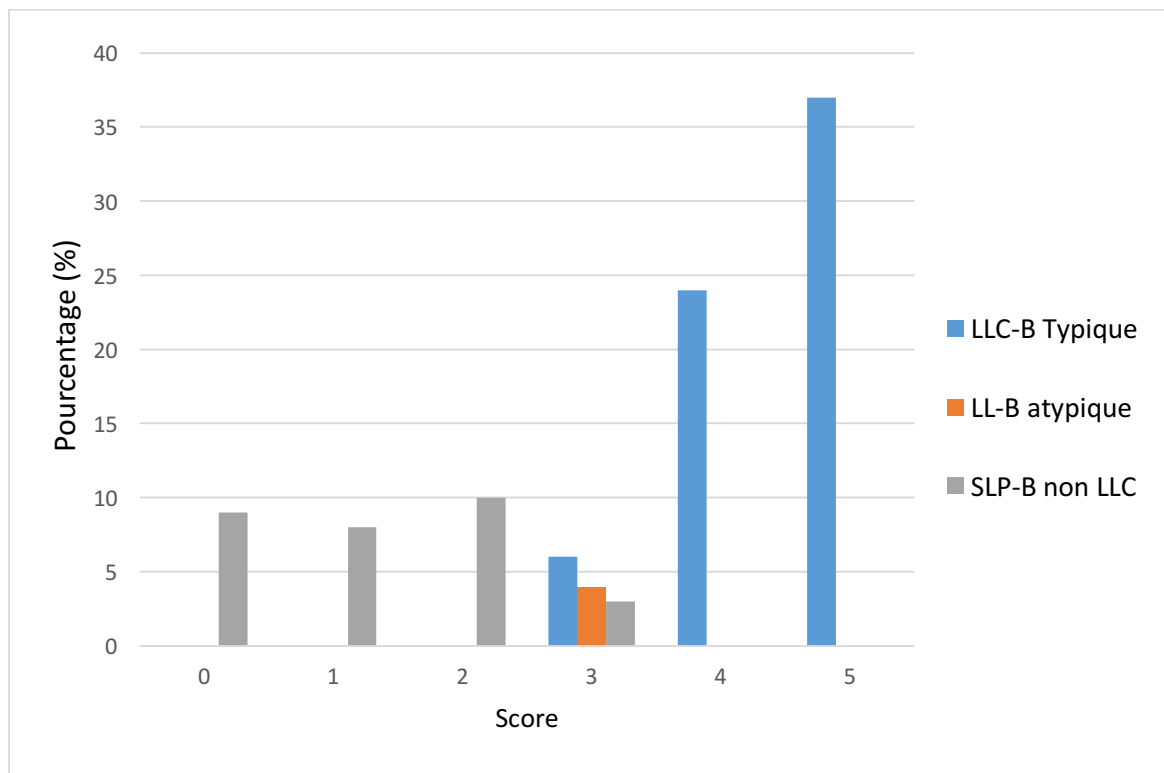
En effet, 60,39 % (61 cas) de notre population souffre d'une leucémie lymphoïde chronique confirmée par un score de 4 et 5. Un faible pourcentage de patients (26,73 %) a présenté un score inférieur à 3, permettant d'exclure formellement le diagnostic de la LLC en faveur d'un autre syndrome lymphoprolifératif chronique B.

Quant aux patients ayant présenté un score égal à 3 (12,87%), une confrontation aux résultats de la cytologie, a permis d'identifier 6 patients avec un aspect typique d'une LLC-B. Tandis que dans 4 cas, le frottis sanguin a révélé un phénotype atypique de LLC.

L'immunophénotypage de ces derniers a détecté une forte expression du CD5, CD23 accompagné d'une faible expression du CD20, nous conduisant à retenir le diagnostic d'une LLC atypique pour ces patients. Ces résultats sont identiques à ceux décrits dans la littérature (Troussard, 2007 ; Hallek *et al.*, 2008). Pour les deux autres cas (2/13), l'immunophénotypage nous a permis d'orienter le diagnostic vers d'autres SLPC-B non LLC.

Ainsi, parmi les 13 cas avec un score de Matutes égale à trois, 76,92% des patients ont été diagnostiqués pour une LLC contre 15,38 % diagnostiqués SLPC-B non LLC.

Par conséquent, 60,39% des LLC typiques ont un score de 5 ou 4 (6 % ont un score 3). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés en 2014 par Taoussi et son équipe (Centre Anti-Cancer de Blida) et qui avaient trouvé que 6,3% des LLC avaient un score de 3.



**Figure 14** : Répartition des patients selon le score de Matutes

### III.6.2 Cas clinico-morphologiques particuliers et Immunophénotypage par marqueurs additionnels

Dans notre étude, l'analyse cytologique de trois (03) frottis sanguins, a révélé la présence de cellules de grande taille, avec un noyau excentré, un cytoplasme étendu faiblement basophile avec de fines projections cytoplasmiques. Ces résultats permettaient d'orienter le diagnostic en faveur d'une leucémie à tricholeucocytes (HCL), mais pas de confirmer le diagnostic.

L'utilisation d'un panel d'anticorps additionnel, nous a permis de poser un diagnostic formel. En effet, l'immunophénotypage de la HCL se caractérise par quatre marqueurs positifs (**tableau X**) : CD11c, CD25, CD103 et CD123 qui permettent de la distinguer des autres hémopathies ayant des cellules villeuses ou chevelues. Les recommandations de la SFH (société française d'hématologie) préconisent de tester les CD11c, CD25, CD103 en première intention puis si un de ces marqueurs est négatif d'ajouter le CD123 afin de calculer le score associé aux HCL (**Matutes et al., 1994 ; Castaigne, 2011**).

**Tableau X** : Nos Résultats - Score des marqueurs de la HCL

Nos patients	CD11c	CD25	CD103	CD123	Score
1 <sup>er</sup> cas	Positif	Positif	Positif	/	3
2 <sup>ème</sup> cas	Positif	Positif	Positif	/	3
3 <sup>ème</sup> cas	Positif	Positif	Positif	/	3

**Tableau XI** : Score des marqueurs de la HCL (**Matutes et al., 1994**)

Marqueurs	1 point	0 point
CD11c	Positif	Négatif
CD25	Positif	Négatif
CD103	Positif	Négatif
CD123	Positif	Négatif

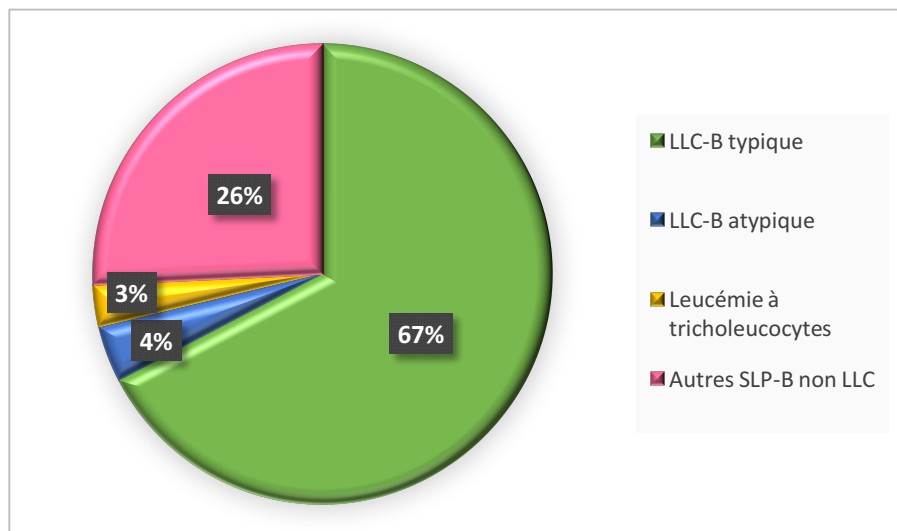
Selon la publication originale de Matutes *et al.*, 98% des HCL ont un score de 3 à 4. En pratique courante, pour les scores strictement supérieurs ou égale à 3 le diagnostic de HCL est vraisemblable, et pour les scores inférieurs ou égale à 2 d'autres hypothèses doivent être évoquées (**Matutes et al.,1994**).

Dans le cas des 27 autres patients SLP-B non LLC, le panel d'anticorps utilisé et l'absence de données histologiques, cytogénétiques et moléculaires, ne nous a pas permis d'établir un diagnostic étiologique de certitude.

En effet, l'analyse optimale des lymphocytes B et la classification formelle de l'ensemble des entités hémopathologiques nécessite l'apport des données cytologiques, cliniques, immunophénotypiques, immunohistochimiques et génétiques (Wood *et al.*, 2007 ; Craig et Foon, 2008 ; Béné *et al.*, 2011 ; de Tute, 2011 ; Baseggio et Felman, 2013 ; El Borgi *et al.*, 2013)

### III.6.3 Répartition des patients selon le type de syndrome lymphoprolifératif B

La démarche diagnostic adoptée pour notre cohorte (101 patients), nous a permis de distinguer les hémopathies suivantes : 68 patients, soit un pourcentage de 67,32%, présentaient une LLC-B typique et 4 cas (3,96%) diagnostiqués comme LLC-atypique. 26 patients (25,74%) étaient classés dans autres syndromes lymphoprolifératifs B non LLC. Enfin, 3 patients souffraient d'une leucémie à tricholeucocytes soit un pourcentage de 2,97%.



**Figure 15** : Répartition des patients selon le type de syndrome lymphoprolifératif B

Parmi les 101 patients qui ont été adressés, à l'unité d'immunologie, pour un diagnostic différentiel, la LLC a été confirmée pour 72 patients dont 4 présentaient une cytologie atypique (soit 6%). Nos résultats diffèrent, sensiblement, de ceux retrouvés dans une étude américaine

conduite sur 193 patients où la LLC atypique représentait 27% des LLC-B diagnostiquées. **(Marionneaux et al., 2014)**

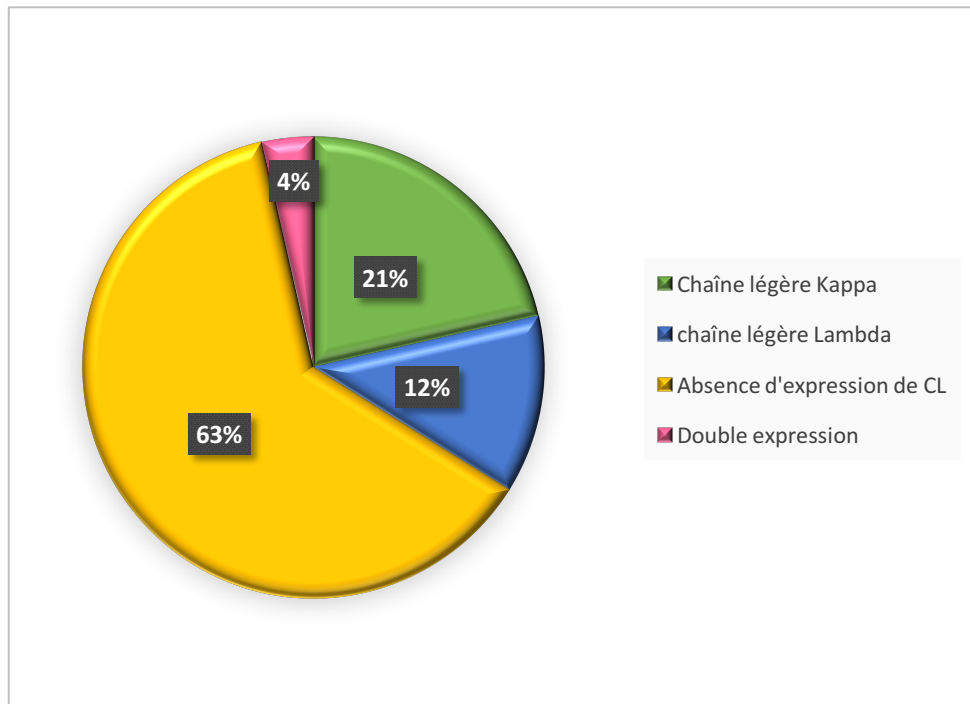
Par ailleurs, les cas de LLC atypique présentent une prévalence plus élevée de trisomie 12, sachant que la trisomie 12 est une anomalie associée à une évolution plus rapide de la LLC **(Matutes et al., 1996 ; Quijano et al., 2008)** . Ils ont, également, une prévalence augmentée de l'expression du CD38 (marqueur associé à un mauvais pronostic) **(Damle et al., 1999 ; Rassenti et al., 2008 ; Rosenquist et al., 2013)**

### **III.6.4 Les marqueurs de monoclonalité**

Après l'identification de l'appartenance des cellules à la lignée lymphoïde B, la nature tumorale de la prolifération doit être confirmée par la mise en évidence d'une monotypie, qui se définit par une restriction isotypique (chaînes légères *kappa* ou *lambda*), et qui constitue un critère majeur pour le diagnostic de SLP-B. L'utilisation de marqueurs particuliers permet l'orientation vers un sous-groupe précis de lymphome **(Le Garff-Tavernier et al ., 2013)**

#### **A. Chez les patients de type LLC :**

Les marqueurs de monoclonalité détectés par immunophénotypage chez 56 patients de type LLC, nous ont permis de révéler une absence d'expression des chaînes légères chez 35 patients (soit 63%), une double expression (*kappa* et *lambda*) chez 2 patients (4%). Ainsi que la mise en évidence d'une monotypie chez 19 patients, 21 % de type *kappa* (12 cas) et 12% de type *lambda* (7 cas).

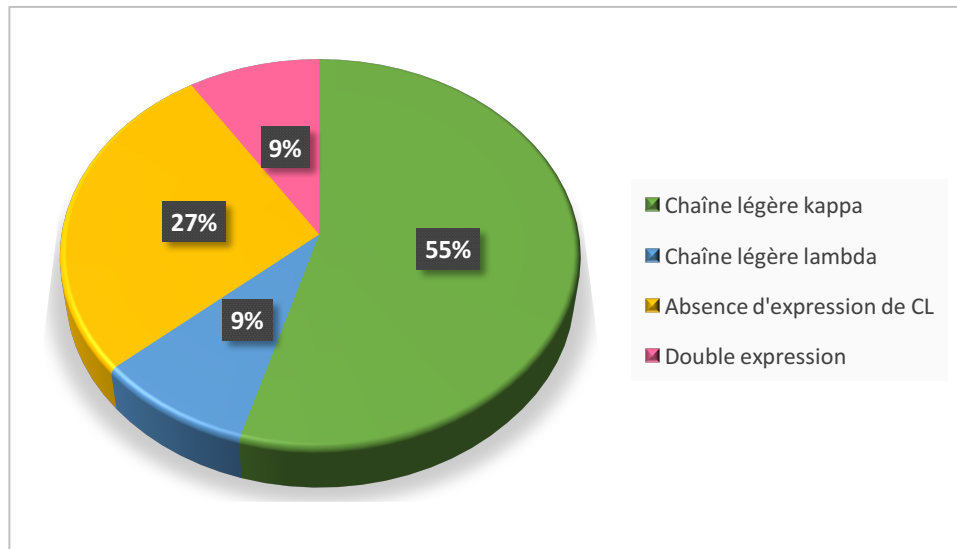


**Figure 16** : Résultats de l'immunophénotypage des marqueurs de la monoclonalité chez les patients LLC-B.

**B. Chez les patients classés autres SLP-B non LLC :**

Dans notre cohorte, les données de l'immunophénotypage ne nous ont pas permis de préciser le diagnostic pour 22 patients. Ces derniers, ont été classés dans le groupe des « autres syndromes lymphoprolifératifs non LLC ».

Néanmoins, l'analyse des marqueurs de monoclonalité, nous a permis de montrer une absence d'expression de chaînes légères pour 6 cas (27%) et une double expression chez 2 patients (9%). Une monotypie *lambda* retrouvée chez 2 patients, tandis que la majorité des patients de ce groupe présentait une restriction isotypique de type *kappa* (55%).



**Figure 17 :** Résultats de l'immunophénotypage des marqueurs de la monoclonalité chez les patients souffrant de SLP-B non LLC.

Physiologiquement deux tiers des lymphocytes B présentent une immunoglobuline de surface composée d'une chaîne légère Kappa et un tiers d'une chaîne légère Lambda. Ce ratio  $\kappa/\lambda$  est constant et ne varie pas en cas d'hyperlymphocytose réactionnelle.

Contrairement aux populations de lymphocytes B normales ou réactionnelles, les clones de SLPC-B matures sont caractérisés par une restriction isotypique (Kappa ou Lambda). Ce phénomène traduit la notion de clonalité et on parle de déséquilibre du ratio  $\kappa/\lambda$  lorsque celui-ci est supérieur à 3 ou inférieur à 0.3. On peut également observer une absence totale d'expression d'immunoglobuline membranaire (**Shimoura et al., 2013**).

Nos résultats nous ont permis de constater que la majorité des patients avec une LLC (63%) n'exprimait pas de chaînes légères contre seulement 27% chez les SLPC non CLL. En effet, tenant compte de la définition de **Martini et al., (1988)** on peut conclure à une absence d'expression membranaire lorsque on mesure moins de 15% de lymphocytes B kappa positifs et moins de 10% de lymphocytes B lambda positifs. Cette absence d'expression sur les lymphocytes B malins peut résulter de défauts opérant à n'importe quel niveau depuis la transcription du gène jusqu'à la translocation des protéines entièrement assemblées à la surface cellulaire (**Kaleem et al., 2000 ; Brozic et al., 2015**). Par ailleurs, la sensibilité et la spécificité de la cytométrie en flux est conditionnée par le choix d'anticorps de qualité (**Agrawal et al., 1992 ; Matutes, 1994 ; Fukushima et al., 1996 ; Horna et al., 2011**)



La double expression reste un phénomène rare. Dans notre cohorte, seulement 2 patients (LLC) ont présenté cette caractéristique. Des résultats comparables sont retrouvés dans deux études : l'une menée sur une cohorte indienne de 194 patients, 2 cas présentaient une LLC biclonale (**Ghodke et al., 2017**) ; l'autre menée sur une cohorte espagnole de 130 patients, 1 cas présentait une LLC biclonale (**Gonzalez-Campos et al., 1997**). Cette biclonalité résulte de la production de deux composants protéiques différents par un seul clone ou de deux clones malins différents. Enfin, la restriction monoclonale kappa semble être plus fréquente que celle de lambda (**Lewis et al., 2005**).

#### **IV. Etude comparative entre les LLC et les autres SLPC non LLC**

##### **IV.1 Caractéristiques épidémiologiques et hématologiques des patients avec syndromes lymphoprolifératifs B**

Les principales caractéristiques épidémiologiques et hématologiques de la LLC (groupe1) et des autres patients atteints de SLPC non LLC (groupe 2) ont été présentées dans le tableau XII. La population masculine dominait dans les deux groupes. Pour les autres caractéristiques étudiées aucune différence significative entre le groupe 1 et le groupe 2 n'a été relevée.

Ces résultats ont comparables à ceux retrouvés dans l'étude de **Tijana et al. (2014)** sauf pour les taux d'hémoglobines et de plaquettes. En effet, ils avaient noté une différence significative avec des taux augmentés dans le groupe des LLC.

**Tableau XII** : Caractéristiques épidémiologiques et hématologiques des patients avec syndromes lymphoprolifératifs B

Caractéristiques	Groupes des patients		P value	
	LLC (Groupe 1 / n= 72)	SLP-B non LLC (Groupe 2 / n= 29)		
<b>Sexe</b>	<i>Effectif</i>	N= 72	N=29	0,117 NS
	<i>Femme</i>	32	8	
	<i>Homme</i>	40	21	
<b>Age (ans)</b>	<i>Effectif</i>	N=72	N=29	0,99 NS
	<i>Moyenne ± SD</i>	67,9 ± 12,65	63,82 ± 14,23	
	<i>Médiane</i>	69	64	
	<i>Extrêmes</i>	38-94	36-90	
<b>Hémoglobine (g/dl)</b>	<i>Effectif</i>	N=55	N= 23	0,98 NS
	<i>Moyenne ± SD</i>	11,7 ± 2,69	11,81 ± 2,04	
	<i>Médiane</i>	11,9	11,9	
	<i>Extrêmes</i>	1,8-16,6	8,1-14,9	
<b>Plaquettes (g/L)</b>	<i>Effectif</i>	N =44	N=23	0,97 NS
	<i>Moyenne ± SD</i>	162,4 ± 66,56	164 ± 100	
	<i>Médiane</i>	161	149	
	<i>Extrêmes</i>	20-267	55-365	
<b>Globules blancs (Cellule /mm<sup>3</sup>)</b>	<i>Effectif</i>	N=41	N=17	0,99 NS
	<i>Moyenne ± SD</i>	40704 ± 28229	26646 ± 28336,9	
	<i>Médiane</i>	35000	13900	
	<i>Extrêmes</i>	9100-14400	1300-99500	
<b>Lymphocytes Totaux (%)</b>	<i>Effectif</i>	N=72	N=29	0,99 NS
	<i>Moyenne ± SD</i>	74,72 ± 13,85	63 ± 19,7	
	<i>Médiane</i>	77,7	63,5	
	<i>Extrêmes</i>	50-96	34-95	
<b>Lymphocyte B par rapport aux Lym Totaux (%)</b>	<i>Effectif</i>	N=72	N=29	0,98 NS
	<i>Moyenne ± SD</i>	76,7 ± 15,9	68 ± 21,8	
	<i>Médiane</i>	80	68	
	<i>Extrêmes</i>	41-96	45-93,5	

**IV.2 La fréquence de l'expression des antigènes dans LLC-B et SLP-B non LLC**

Pour déterminer l'apport de l'immunophénotypage dans le diagnostic de la leucémie lymphoïde chronique, nous avons analysés les données immunophénotypiques de l'ensemble de notre échantillon (101 cas). Une leucémie lymphoïde chronique a été confirmée pour 72 patients sur 101 et 29 patients ont pu être identifiés comme étant des SLP-B non LLC. Les caractéristiques immunophénotypiques de ces patients sont répertoriées dans le tableau XIII.

**Tableau XIII :** La fréquence de l'expression des antigènes dans LLC-B et SLP-B non LLC.

n : nombre de patients montrant un profil d'expression spécifique (Faible , Négatif, Positif) de l'antigène analysé . N : nombre total des patients analysés pour l'antigène.

Marqueurs	% (n/N)			P value
	Intensité	LLC-B	SLP-B non LLC	
CD19	Positif	100 (72/72)	100 (29/29)	/
	Négatif	/	/	
	Faible	/	/	
CD20	Positif	91(31/34)	87(20/23)	NS
	Négatif			
	Faible	9 (3/34)	13 (3 /23)	
CD22	Positif	100 (6/6)	100 (9/9)	/
	Négatif	/	/	
	Faible	/	/	
CD79b	Positif	12 (7/63)	93 (27/29)	< 0,0001
	Négatif	41(25/63)	7 (2/29)	
	Faible	47 (29/63)	/	
Igs	Positif	11 (8/72)	52 (15/29)	< 0,0001
	Négatif	54 (39/72)	34 (10/29)	
	Faible	35 (25/72)	14 (4/29)	
CD5	Positif	96 (69/72)	17 (5/29)	< 0,0001
	Négatif	4 (3/72)	79 (23/29)	
	Faible	/	4 (1/29)	
FMC7	Positif	4 (3/72)	44 (13/29)	< 0,0001
	Négatif	95 (68/72)	42 (12/29)	
	Faible	1 (1/72)	14(4/29)	
CD38	Positif	5 (3/72)	11 (3/28)	NS
	Négatif	90 (63/72)	78 (22/28)	
	Faible	5 (3/72)	11 (3/28)	
CD10	Positif	3 (2/72)	7 (2/29)	NS
	Négatif	97 (70/72)	93 (27/29)	
	Faible	/	/	
CD23	Positif	100 (72/72)	10 (3/29)	< 0,0001
	Négatif	/	86 (25/29)	
	Faible	/	4 (1/29)	
CD103	Positif	/	21 (6/28)	< 0,0001
	Négatif	100 (46/46)	79 (22/28)	
	Faible	/	/	
CD11c	Positif	64 (7/11)	40 (4/10)	0,0002
	Négatif	27 (3/11)	30 (3/10)	
	Faible	9 (1/11)	30 (3/10)	

Nous notons que les antigènes CD19 et CD22 sont exprimés chez tous les patients analysés, quel que soit le groupe, et l'antigène CD 20 est généralement exprimé dans les deux groupes. Tandis que, l'antigène CD10 présente une très faible fréquence d'expression dans les deux groupes (3% vs. 7%)

Les antigènes CD5 et CD23 sont plus fréquemment exprimés dans le groupe des LLC que dans celui des SLPC non LLC, respectivement (96% vs. 17%,  $p < 0,0001$ ) et (100% vs. 10%,  $p < 0,0001$ ). Par contre, l'antigène FMC7 se caractérise par une faible fréquence d'expression dans le groupe des LLC (4% vs. 44% ;  $p < 0,0001$ ) et l'antigène CD103 par une absence totale d'expression dans le groupe des LLC (0% vs. 21% ;  $p < 0,0001$ ).

L'analyse du composant du récepteur des lymphocytes B, le CD79b, a montré que cet antigène présente une fréquence d'expression sensiblement plus faible dans le groupe des LLC que dans le groupe des SLPC non LLC (12% vs. 93%,  $p < 0,001$ ).

La monoclonalité de la population de lymphocytes B (comme précité) révèle une plus grande fréquence d'expression pour les immunoglobulines de surface kappa. Cependant l'analyse des profils d'expression des sIg a révélé que plus de la moitié des patients LLC étaient sIg négative (54% vs. 34%,  $p < 0,0001$ ).

L'évolution clinique et la réponse au traitement diffèrent entre la LLC et les autres SLP-B non LLC. D'où l'intérêt d'établir un diagnostic précis. Bien que la LLC a un profil immunophénotypique relativement spécifique comparé à celui des autres SLP-B non LLC, il existe des chevauchements concernant l'expression de certains marqueurs membranaires. La détection de la population de cellules B du sang périphérique, basée sur l'expression de l'antigène CD19, ainsi que l'exploration de l'état de clonalité des cellules B par la restriction des chaînes légères sIg, représentent des informations très importantes fournies par l'immunophénotypage.

Tous les patients diagnostiqués avaient une hyperlymphocytose B et présentaient pour la plupart un statut monoclonal.

Afin d'estimer la valeur diagnostic des antigènes leucocytaires dans le diagnostic différentiel de la LLC : L'expression de trois antigènes de la lignée B (CD19, CD20, CD22), et de cinq antigènes, indispensables au score de Matutes, (CD5, CD23, FMC7, CD79b, sIg), l'antigène CD10, marqueur centrogerminatifs et le CD103 marqueur spécifique des HCL, y compris l'antigène pronostique CD38 ont été analysés.

Parmi les antigènes de la lignée B, le CD19 (antigène pan-B) était exprimé chez tous nos patients, faisant de lui un marqueur constitutionnel des lymphocytes B leucémiques. De même pour l'antigène CD20. Nos résultats sont similaires à ceux retrouvés dans la littérature (**D'Arena et al., 2000 ; Bene et al., 2011**). En revanche, de nombreux autres auteurs, estiment que l'expression du CD20 et l'expression du CD22 d'intensité modérée à forte, aussi bien dans le groupe des LLC que dans le groupe des SLP non LLC, ne fait pas d'eux de bons marqueurs pour le diagnostic différentiel de la LLC (**Delgado et al., 2003**). Cependant, l'évaluation de l'expression de CD20 chez les patients atteints de LLC pourrait s'avérer importante si une immunothérapie anti-CD20 était envisagée (**Pederson et al., 2002**).

Un des antigènes permettant le scoring des LLC est le CD5 (antigène pan-T), en situation non pathologique, il est exprimé sur le lymphocyte T et une sous population minoritaire de lymphocytes B (**Abbas et al., 2014**). Compte tenu de nos résultats et des données de la littérature, l'antigène CD5 pourrait jouer un rôle important dans le diagnostic différentiel de la LLC. En effet, les LLC se caractérisent par une positivité quasi-systématique du CD5. (**Pangalis et al., 1999 ; Deneys et al., 2001**)

De plus, contrairement au SLPC non LLC, l'ensemble de nos patients LLC expriment l'antigène CD23. Notre résultat est en adéquation avec les données de la littérature qui font de l'antigène CD23 l'un des marqueurs les plus importants dans le diagnostic différentiel entre la LLC et les lymphomes du manteau (**DiRaimondo et al., 2002**).

La négativité ou la faible expression de l'antigène FMC7 apparait, également, comme un marqueur important et est considéré comme le marqueur discriminant, le plus fort, dans le diagnostic différentiel de la LLC (**Matutes et al., 2010**).

Le CD79b est l'un des composants du complexe BCR, et est le dernier antigène à être incorporé dans le système de scoring en remplacement du CD22, permettant d'affiner le potentiel de discrimination entre la LLC et les autres SLP-B (**Moreau et al., 1997**). Dans notre cohorte la faible intensité ou la négativité du CD79 est noté dans le groupe LLC. La plus grande série de LLC publié à ce jour a fourni la preuve que l'expression membranaire de CD79b est grandement diminuée voire absente dans la majorité des cas LLC typiques (**Vela et al., 1999 ; Schlette et al., 2003**) Cette faible intensité est probablement induite par la faible densité en récepteurs B à la surface membranaire. Aussi, l'immunoglobuline de surface constitue un marqueur de choix dans le diagnostic différentiel des LLC.

Le CD38 est une glycoprotéine membranaire, qui témoigne de l'activation, de la maturation et de la prolifération cellulaire. Son intérêt comme facteur de pronostic a été démontré par différentes équipes. En effet, son expression par les cellules de LLC est associée à un mauvais pronostic et à une évolution rapide de la pathologie (**Chevallier et al., 2002** ; **Zucchetto et al., 2009** ; **Leković et al., 2011**)

Enfin, sur la base de nos données et de l'analyse par cytométrie en flux nous avons pu déterminer le profil immunophénotypique spécifique des cellule LLC de notre cohorte :

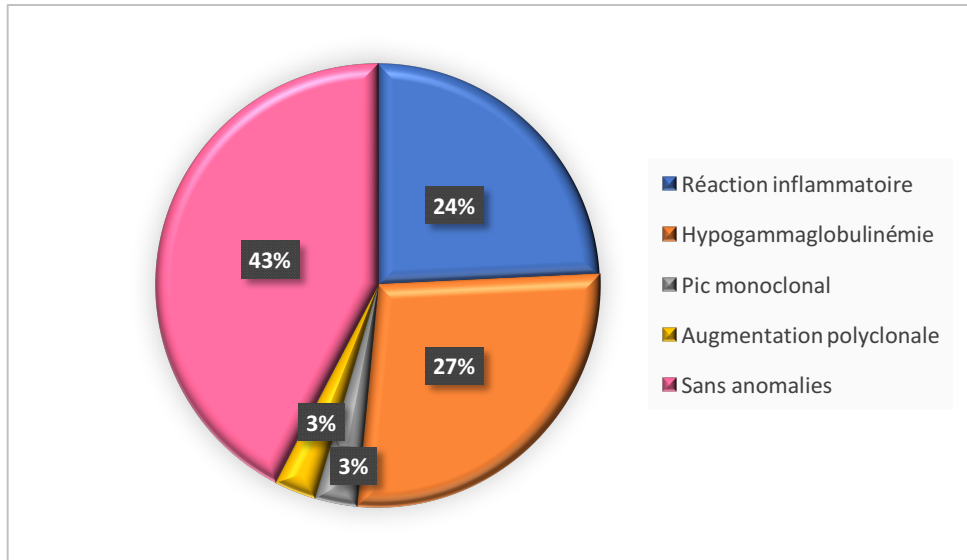
$$CD19^+ CD20^{+faible}, CD22^+, CD5^+, CD23^+, FMC7^-, CD79b^{-faible}, sIg^{-faible}.$$

### V.1 Electrophorèse des protéines sériques

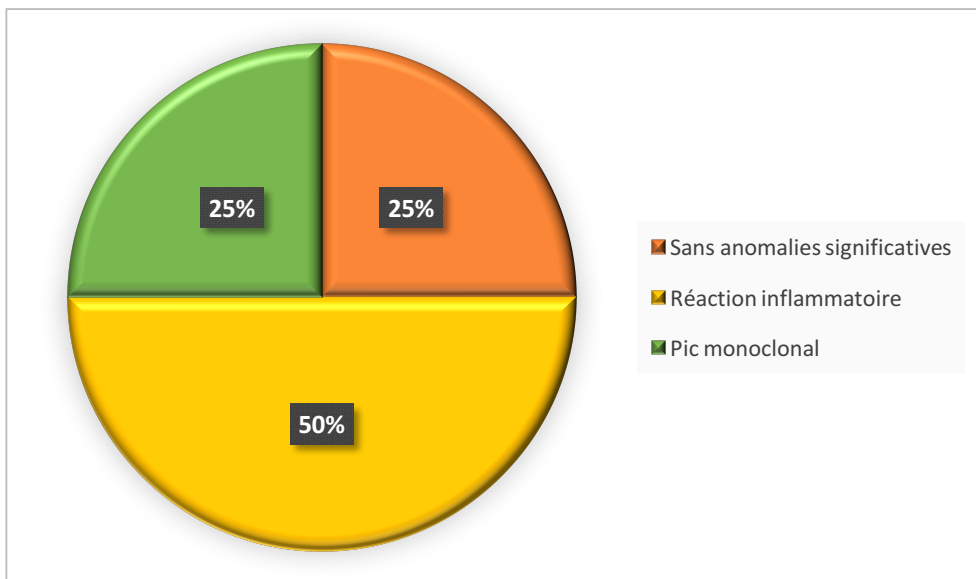
L'électrophorèse des protéines est un examen réalisé à la recherche de signes de complications ; il permet de repérer une diminution de certains anticorps (hypogammaglobulinémie) ou la présence d'immunoglobuline monoclonale pouvant être à l'origine de complications infectieuses.

**Tableau XIV** : résultats de l'électrophorèse des protéines sériques

	<b>Patients LLC (N= 29)</b>	<b>Patients avec SLP-B non LLC : (N = 8)</b>
<b>Sans anomalie</b>	43 %	25 %
<b>Hypogammaglobulinémie</b>	27 %	/
<b>Réaction inflammatoire</b>	/	50 %
<b>Réaction inflammatoire associée à une hypogammaglobulinémie,</b>	24 %	/
<b>Pic monoclonal</b>	3 % (IgG)	25 % (IgM de type kappa)
<b>Pic polyclonal</b>	3 %	/



**Figure 18** : Résultat d'électrophorèse des protéines sériques chez les patients avec LLC



**Figure 19** : Résultat d'électrophorèse des protéines sériques chez les patients avec SLP-B non LLC.

Une électrophorèse des protéines sériques a été réalisée sur 29 patients confirmés LLC, la majorité des patients (43%) ne présentait aucune anomalie ; soulignons tout de même la présence d'une hypogammaglobulinémie dans 27% de cas. Nous avons pu, également, distinguer 2 cas : le premier affichait un pic monoclonal dans la zone gamma de type IgG, identifié par immunofixation et le deuxième présentait une augmentation polyclonale.

Nos résultats sont comparables à ceux rapportés par la littérature : 49 % vs. 24 % (**Chauzeix et al., 2018**) voire 74% vs. 24% (**Parikh et al., 2015**).

L'hypogammaglobulinémie semble être l'immunodéficience la plus fréquente. Elle est plus prononcée lorsque la maladie est à stade plus avancé et constitue un facteur de risque important dans l'apparition des infections, cause majeure de la mortalité des patients avec LLC (**Mauro et al., 2017**). Ainsi, une EPS normale semble être associée à des stades précoces de la maladie en accord avec l'asymptomatologie des patients, faisant d'elle un marqueur de bon pronostic (**Parikh et al., 2015**).

Par ailleurs, la confrontation des données de l'EPS avec ceux de la cytométrie en flux nous ont permis d'expliquer la biconalité, phénomène rare, retrouvé chez un de nos patients. Enfin, la présence d'une gammapathie monoclonale, aurait un impact péjoratif sur la survie des patients (**Goli et al., 2018**).

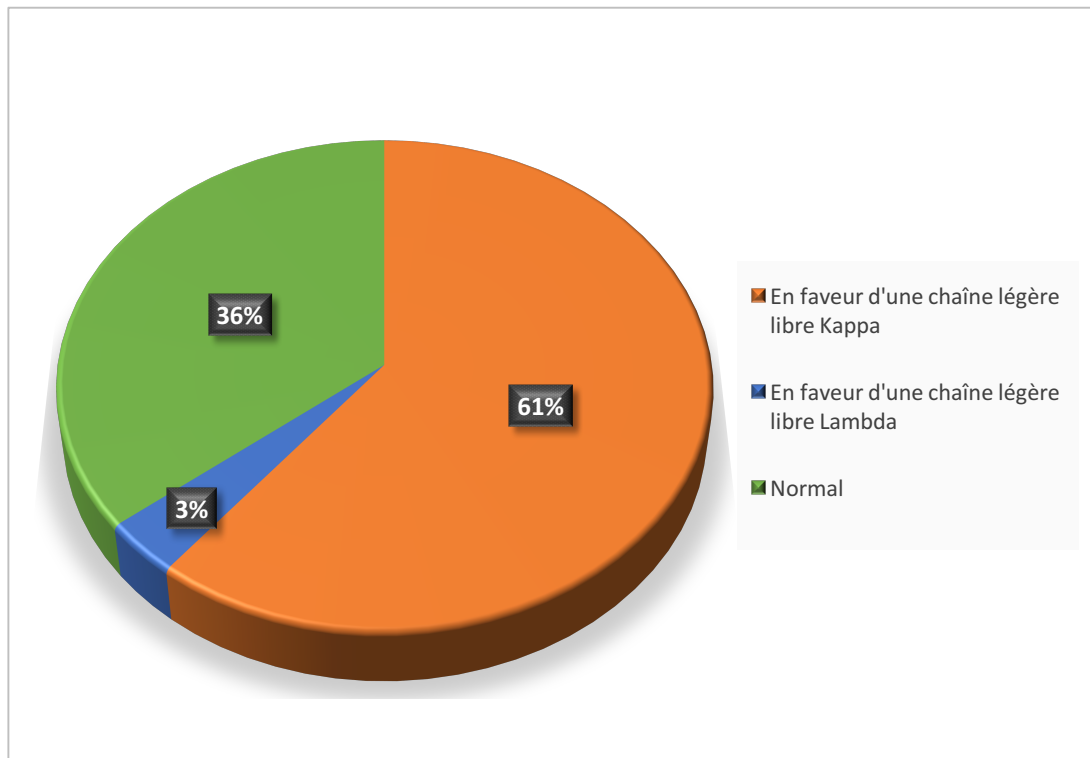
### **V.2 Résultats du dosage des chaînes légères libres chez les patients avec LLC**

Le dosage des chaînes légères libres sériques (« free light chain » ou FLC) par néphélométrie est une technique qui permet d'évaluer les taux de chaîne  $\kappa$  ou  $\lambda$  libres et de suivre le ratio RFLC ( $\kappa/\lambda$ ), Sachant que ce ratio est considéré comme normal lorsqu'il est compris entre 0,26-1,65.

La plupart de nos patients (64%) présentaient un ratio déséquilibré en faveur de la chaîne légère de type kappa chez 17 patients (soit 61%), contre un cas en faveur de la chaîne légère lambda (3%). Nos résultats se rapprochent de ceux de Sarris *et al.* (2013) qui rapportaient dans le cadre d'une étude menée sur 153 patients : une restriction de type kappa dans 69% de cas, et une restriction de type lambda dans 31% de cas. (**Figure 19**)

Une augmentation marquée des concentrations des chaînes légères libres clonale impacte défavorablement le pronostic.





**Figure 19 :** Résultats du dosage des chaînes légères libres chez les patients avec LLC

# *Conclusion*

## Conclusion

Ce travail met en évidence l'importance de l'immunophénotypage par cytométrie en flux dans la distinction de la leucémie lymphoïde chronique des autres SLP-B.

Les différents résultats obtenus concernent : les données clinico-biologiques, l'analyse morphologique, l'expression des molécules membranaires par immunophénotypage, l'électrophorèse des protéines sériques et le dosage des chaînes légères libres. Ils nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

Les circonstances de découverte sont très variables : une hyperleucocytose est généralement présente chez tous les patients ; d'autres anomalies ont été parfois dépistées à l'hémogramme, telles que l'anémie et la thrombopénie. L'adénopathie et la splénomégalie semblent être les manifestations cliniques prédominantes. Néanmoins, certains patients peuvent être asymptomatiques.

L'analyse morphologique occupe une place prépondérante dans le diagnostic de la LLC. Elle permet de distinguer entre une LLC typique et une LLC atypique ou un autre SLP-B. Si l'immunophénotypage est une analyse incontournable pour le diagnostic de la LLC son intérêt dans la classification des autres SLP-B non LLC reste discuté.

L'électrophorèse des protéines sériques couplée à l'immunofixation ainsi que le dosage des chaînes légères libres, tests complémentaires à visée pronostique, nous ont permis de détecter la présence d'une hypogammaglobulinémie et d'une gammapathie monoclonale, impactant défavorablement le pronostic.

## Perspective

La recherche d'une molécule ultime exprimé de manière spécifique sera toujours l'objectif principal des chercheurs. Décortiquer les aspects physiopathologiques de la maladie, réévaluer les marqueurs membranaires ou cytoplasmiques exprimés dans un but diagnostique pourraient être utiles, car on ne peut jamais prévoir les résultats, ni présager d'une découverte qui pourrait nous aider à une meilleure compréhension de la physiopathologie voire qui contribuerait à l'élaboration de nouvelles hypothèses.

En vue du nombre élevé de patients présentant une absence d'expression de chaînes légères dans notre étude, nous suggérons une évaluation intra-cytoplasmique des chaînes légères ainsi que l'utilisation de marqueurs monoclonaux membranaires pour une plus grande spécificité. Si l'affirmation d'une absence de chaînes légères est confirmée, on se retrouvera confronté à un phénotype rare et à une incidence qui n'a jamais été observée dans les autres populations !

En raison du manque de données cliniques, on ne pouvait pas faire une classification pronostique adéquate des patients, telles que celles suggérées par **Rai** et **Binet**, ni de faire des corrélations entre les manifestations cliniques et les résultats des tests pronostiques. Par ailleurs, l'introduction de tests complémentaires (moléculaires et cytogénétiques) pourrait s'avérer enrichissante, elle nous permettrait d'affiner le diagnostic différentiel des autres SLPC-B et contribuerait à une meilleure compréhension de l'étiologie.

*Références*  
*Bibliographiques*

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences.
- Abdel-Ghafar, A. A.-A., El, M. A. S. E. D., Telbany, H. M. M., & El-Sakhawy, Y. N. (2012). Immunophenotyping of chronic B-cell neoplasms: flow cytometry versus immunohistochemistry. *Hematology Reports*, *4*.
- Agrawal, Y. P., Hämäläinen, E., Mahlamäki, E. K., Aho, H., Nousiainen, T., Lahtinen, R., & Penttilä, I. M. (1992). Comparison of poly- and monoclonal antibodies for determination of B-cell clonal excess in a routine clinical laboratory. *European Journal of Haematology*, *48*, 49–55.
- Alberts, B. (2017). *Molecular biology of the cell*. Garland science.
- Apollonio, B., Scielzo, C., Bertilaccio, M. T. S., Ten Hacken, E., Scarfò, L., Ranghetti, P., ... others. (2013). Targeting B-cell anergy in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *121*, 3879–3888.
- Aqeilan, R. I., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2010). miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death and Differentiation*, *17*, 215.
- Aurrant, T., Callet-Bauchu, E., Cymbalista, F., Delmer, A., Dreyfus, B., Khac, F. N., ... others. (2013). Recommandations 2012 de la SFH pour le diagnostic, le traitement et le suivi de la leucémie lympho{"i}de chronique. *Hématologie*, *19*, 4–9.
- Baseggio, L., & Felman, P. (2013). Diagnostic des lymphocytoses hors LLC-typique. *Revue Francophone Des Laboratoires*, *2013*, 93–102.
- Baumann Kreuziger, L. M., Tarchand, G., & Morrison, V. A. (2014). The impact of Agent Orange exposure on presentation and prognosis of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *55*, 63–66.
- Benattar, L., & Flandrin, G. (2003). Nouvelles approches diagnostiques des lymphomes malins B. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 61, pp. 513–519).
- Bene, M. C., Nebe, T., Bettelheim, P., Buldini, B., Bumbea, H., Kern, W., ... others. (2011). Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*, *25*, 567.
- Bergmann, M. A., Eichhorst, B. F., Busch, R., Adorf, D., Stilgenbauer, S., Eckart, M. J., ... others. (2007). Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): results of the CLL1-Protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Am Soc Hematology*.
- Bottoni, A., & Calin, G. (2013). MicroRNAs as main players in the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *MicroRNA*, *2*, 158–164.
- Brozic, A., Marinsek, Z. P., Novakovic, S., & Prevodnik, V. K. (2015). Inconclusive flow cytometric surface light chain results; can cytoplasmic light chains, Bcl-2 expression and PCR clonality analysis improve accuracy of cytological diagnoses in B-cell lymphomas? *Diagnostic Pathology*, *10*, 191.
- Burger, J. A. (2010). Chemokines and chemokine receptors in chronic lymphocytic leukemia (CLL): from understanding the basics towards therapeutic targeting. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 20, pp. 424–430).

- Burger, J. A., Ghia, P., Rosenwald, A., & Caligaris-Cappio, F. (2009). The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*, *114*, 3367–3375.
- Cahill, N., Bergh, A.-C., Kanduri, M., Göransson-Kultima, H., Mansouri, L., Isaksson, A., ... others. (2013). 450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments. *Leukemia*, *27*, 150.
- Cardoso, C. C., de Moraes, A. C. R., Del Moral, J. A. G., & Santos-Silva, M. C. (2016). Mature B cell neoplasms: Retrospective analysis of 93 cases diagnosed between 2011 and 2014 in a University Hospital in southern Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, *38*, 121–127.
- Castaigne, S. (2011). Leucémie à tricholeucocytes. In *Thérapeutique du cancer* (pp. 837–846). Springer.
- Chauzeix, J., Laforêt, M.-P., Deveza, M., Crowther, L., Marcellaud, E., Derouault, P., ... others. (2018). Normal serum protein electrophoresis and mutated IGHV genes detect very slowly evolving chronic lymphocytic leukemia patients. *Cancer Medicine*.
- Cheng, S., Ma, J., Guo, A., Lu, P., Leonard, J. P., Coleman, M., ... Wang, Y. L. (2014). BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia*, *28*, 649.
- Chevallier, P., Penther, D., Avet-Loiseau, H., Robillard, N., Ifrah, N., Mahé, B., ... others. (2002). CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *116*, 142–150.
- Chiorazzi, N., Rai, K. R., & Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *352*, 804–815.
- Craig, F. E. (2007). Flow cytometric evaluation of B-cell lymphoid neoplasms. *Clinics in Laboratory Medicine*, *27*, 487–512.
- Craig, F. E., & Foon, K. A. (2008). Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, *111*, 3941–3967.
- D’Arena, G., Musto, P., Cascavilla, N., Dell’Olio, M., Di Renzo, N., & Carotenuto, M. (2000). Quantitative flow cytometry for the differential diagnosis of leukemic B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *American Journal of Hematology*, *64*, 275–281.
- Dali, N., Ali, H. A., Tibiche, A., Belhadri, F., Harieche, F., Nacer, R. A., ... others. (2015). Epidemiology and Clinical Features of Chronic Lymphoid Leukemia. Review of the Algerian Chronic Lymphoid Leukemia Study Group. *Am Soc Hematology*.
- Damle, R. N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S. L., ... others. (1999). Ig V Gene Mutation Status and CD38 Expression As Novel Prognostic Indicators in Chronic Lymphocytic Leukemia: Presented in part at the 40th Annual Meeting of The American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998. *Blood*, *94*, 1840–1847.
- Damm, F., Mylonas, E., Cosson, A., Yoshida, K., Della Valle, V., Mouly, E., ... others. (2014). Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discovery*, *4*, 1088–1101.

- de Martini, R. M., Turner, R. R., Boone, D. C., Lukes, R. J., & Parker, J. W. (1988). Lymphocyte immunophenotyping of B-cell lymphomas: a flow cytometric analysis of neoplastic and nonneoplastic cells in 271 cases. *Clinical Immunology and Immunopathology*, *49*, 365–379.
- de Tute, R. M. (2011). Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology*, *58*, 90–105.
- Delgado, J., Matutes, E., Morilla, A. M., Morilla, R. M., Owusu-Ankomah, K. A., Rafiq-Mohammed, F., ... Catovsky, D. (2003). Diagnostic significance of CD20 and FMC7 expression in B-cell disorders. *American Journal of Clinical Pathology*, *120*, 754–759.
- Deneys, V., Michaux, L., Leveugle, P., Mazzon, A. M., Gillis, E., Ferrant, A., ... De Bruyère, M. (2001). Atypical lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma immunologically very close: flow cytometric distinction by the use of CD20 and CD54 expression. *Leukemia*, *15*, 1458.
- Diebold, J., Molina, T., Le Tourneau, A., & Audouin, J. (2008). Hémopathies malignes: définition et différentes variétés selon la classification de l'OMS 2001. *Revue Francophone Des Laboratoires*, *2008*, 65–71.
- DiRaimondo, F., Albitar, M., Huh, Y., O'Brien, S., Montillo, M., Tedeschi, A., ... Keating, M. (2002). The clinical and diagnostic relevance of CD23 expression in the chronic lymphoproliferative disease. *Cancer*, *94*, 1721–1730.
- Döhner, H., Stilgenbauer, S., Benner, A., Leupolt, E., Kröber, A., Bullinger, L., ... Lichter, P. (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *343*, 1910–1916.
- Dragovic-Ivancevic, T., Kraguljac-Kurtovic, N., Knezevic, V., Bogdanovic, A., Mihaljevic, B., Bozic, B., & Gotic, M. (2014). The role of immunophenotyping in differential diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, *142*, 197–203.
- Dühren-von Minden, M., Übelhart, R., Schneider, D., Wossning, T., Bach, M. P., Buchner, M., ... others. (2012). Chronic lymphocytic leukaemia is driven by antigen-independent cell-autonomous signalling. *Nature*, *489*, 309.
- Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M., & Buske, C. (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *26*, v78–v84.
- El Borgi, W., Salah, N. Ben, Lakhal, F. Ben, Makni, L., Gouider, E., & Hafsia, R. (2013). Immunophénotypage des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B non LLC: confrontation avec l'histologie. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 71, pp. 693–697).
- Fabbri, G., & Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, *16*, 145.
- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., ... others. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, *102*, 1515–1525.
- Ferrando, A. A., & López-Otín, C. (2017). Clonal evolution in leukemia. *Nature Medicine*, *23*, 1135.
- Fissore-Magdelein, C., Riss, I., Dahmani, B., Malval, R., & Taillan, B. (2009). Une



hyperlymphocytose chez le sujet âgé n'est pas toujours une leucémie lympho{\i}de chronique (LLC). *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2009, 71–72.

Friedberg, J. W. (2011). CLL microenvironment: macro important. *Blood*, 117, 377–378.

Fukushima, P. I., Nguyen, P. K. T., O'grady, P., & Stetler-Stevenson, M. (1996). Flow cytometric analysis of kappa and lambda light chain expression in evaluation of specimens for B-cell neoplasia. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 26, 243–252.

Gauld, S. B., Benschop, R. J., Merrell, K. T., & Cambier, J. C. (2005). Maintenance of B cell anergy requires constant antigen receptor occupancy and signaling. *Nature Immunology*, 6, 1160.

Getahun, A., Beavers, N. A., Larson, S. R., Shlomchik, M. J., & Cambier, J. C. (2016). Continuous inhibitory signaling by both SHP-1 and SHIP-1 pathways is required to maintain unresponsiveness of anergic B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 213, 751–769.

Ghodke, K. A., Patkar, N. V, Subramanian, P. G., Gujral, S., Kadam, P. A., Tembhare, P. R., & others. (2017). Biclonal chronic lymphocytic leukemia: A study of two cases and review of literature. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 60, 84.

Gisselbrecht, C. (2008). *Les lymphomes non hodgkiniens*. John Libbey Eurotext.

Goldin, L. R., Pfeiffer, R. M., Li, X., & Hemminki, K. (2004). Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood*, 104, 1850–1854.

Goli, V. B., Jain, R., Bhat, G., Sainani, A., Advani, S. H., & others. (2018). Monoclonal gammopathy in chronic lymphocytic leukemia: A case report and review of its literature. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 39, 257.

Gonzalez-Campos, J., Rios-Herranz, E., De Blas-Orlando, J. M., Martin-Noya, A., Parody-Ruiz-Berdejo, R., & Rodriguez-Fernandez, J. M. (1997). Chronic lymphocytic leukemia with two cellular populations: a biphenotypic or biclonal disease. *Annals of Hematology*, 74, 243–246.

Grever, M. R., Lucas, D. M., Dewald, G. W., Neuberg, D. S., Reed, J. C., Kitada, S., ... others. (2007). Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *Journal of Clinical Oncology*, 25, 799–804.

Guièze, R., Robbe, P., Clifford, R., de Guibert, S., Pereira, B., Timbs, A., ... others. (2015). Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood*, 126, 2110–2117.

Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., ... others. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute--Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111, 5446–5456.

Hamblin, T. J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D. G., & Stevenson, F. K. (1999). Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94, 1848–1854.

- Hemminki, K., Liu, X., Ji, J., & Försti, A. (2016). Origin of B-cell neoplasms in autoimmune disease. *PloS One*, *11*, e0158360.
- Herishanu, Y., Pérez-Galán, P., Liu, D., Biancotto, A., Pittaluga, S., Vire, B., ... others. (2011). The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- $\kappa$ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *117*, 563–574.
- Hojjat-Farsangi, M., Moshfegh, A., Daneshmanesh, A. H., Khan, A. S., Mikaelsson, E., Österborg, A., & Mellstedt, H. (2014). The receptor tyrosine kinase ROR1--an oncofetal antigen for targeted cancer therapy. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 29, pp. 21–31).
- Horna, P., Olteanu, H., Kroft, S. H., & Harrington, A. M. (2011). Flow cytometric analysis of surface light chain expression patterns in B-cell lymphomas using monoclonal and polyclonal antibodies. *American Journal of Clinical Pathology*, *136*, 954–959.
- Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., & Isaacson, P. G. (2008). Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*, *112*, 4384–4399.
- Kaleem, Z., Zehnbauer, B. A., White, G., & Zutter, M. M. (2000). Lack of expression of surface immunoglobulin light chains in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *American Journal of Clinical Pathology*, *113*, 399–405.
- Karp, M., & Giannopoulos, K. (2013). Antigen stimulation in the development of chronic lymphocytic leukemia. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, *67*, 1204–1213.
- Kelsoe, G. (1994). B cell diversification and differentiation in the periphery. *Journal of Experimental Medicine*, *180*, 5–6.
- Kikushige, Y., Ishikawa, F., Miyamoto, T., Shima, T., Urata, S., Yoshimoto, G., ... others. (2011). Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, *20*, 246–259.
- Kipps, T. J., Stevenson, F. K., Wu, C. J., Croce, C. M., Packham, G., Wierda, W. G., ... Rai, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 16096.
- Klein, U., Lia, M., Crespo, M., Siegel, R., Shen, Q., Mo, T., ... others. (2010). The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*, *17*, 28–40.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, *5*, 251.
- Landau, D. A., Carter, S. L., Stojanov, P., McKenna, A., Stevenson, K., Lawrence, M. S., ... others. (2013). Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, *152*, 714–726.
- Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., ... others. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, *526*, 525.
- Landgren, O., Albitar, M., Ma, W., Abbasi, F., Hayes, R. B., Ghia, P., ... Caporaso, N. E. (2009). B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *360*, 659–667.
- Le Garff-Tavernier, M., Costopoulos, M., & Merle-Béral, H. (2013). Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs B. *Revue*

*Francophone Des Laboratoires*, 2013, 37–48.

- Leković, D., Mihaljević, B., Kraguljac-Kurtović, N., Peruničić-Jovanović, M., Bogdanović, A., Čolović, M., & Gotić, M. (2011). Prognostic significance of new biological markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 139, 753–758.
- Lenz, G., & Staudt, L. M. (2010). Aggressive lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 362, 1417–1429.
- Lewis, R. E., Cruse, J. M., Pierce, S., Lam, J., & Tadros, Y. (2005). Surface and cytoplasmic immunoglobulin expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Experimental and Molecular Pathology*, 79, 146–150.
- Marionneaux, S., Maslak, P., & Keohane, E. M. (2014). Morphologic identification of atypical chronic lymphocytic leukemia by digital microscopy. *International Journal of Laboratory Hematology*, 36, 459–464.
- Marti, G., Abbasi, F., Raveche, E., Rawstron, A. C., Ghia, P., Aurran, T., ... Vogt, R. F. (2007). Overview of monoclonal B-cell lymphocytosis. *British Journal of Haematology*, 139, 701–708.
- Matutes, E., Attygalle, A., Wotherspoon, A., & Catovsky, D. (2010). Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 23, 3–20.
- Matutes, E., Oscier, D., Garcia-Marco, J., Ellis, J., Coplestone, A., Gillingham, R., ... Catovsky, D. (1996). Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients. *British Journal of Haematology*, 92, 382–388.
- Matutes, E., Owusu-Ankomah, K., Morilla, R., Garcia Marco, J., Houlihan, A., Que, T. H., & Catovsky, D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8, 1640–1645.
- Matutes, E., & Polliack, A. (2000). Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, 4, 22–47.
- Mauro, F. R., Morabito, F., Vincelli, I. D., Petrucci, L., Campanelli, M., Salaroli, A., ... others. (2017). Clinical relevance of hypogammaglobulinemia, clinical and biologic variables on the infection risk and outcome of patients with stage A chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 57, 65–71.
- Messmer, B. T., Albesiano, E., Efremov, D. G., Ghiotto, F., Allen, S. L., Koltz, J., ... others. (2004). Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*, 200, 519–525.
- Mockridge, C. I., Potter, K. N., Wheatley, I., Neville, L. A., Packham, G., & Stevenson, F. K. (2007). Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood*, 109, 4424–4431.
- Moreau, E. J., Matutes, E., A'hern, R. P., Morilla, A. M., Morilla, R. M., Owusu-Ankomah, K. A., ... Catovsky, D. (1997). Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *American Journal of Clinical Pathology*, 108, 378–382.

- Muggen, A. F., Pillai, S. Y., Kil, L. P., Van Zelm, M. C., Van Dongen, J. J. M., Hendriks, R. W., & Langerak, A. W. (2015). Basal Ca<sup>2+</sup> signaling is particularly increased in mutated chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *29*, 321.
- Myhrinder, A. L., Hellqvist, E., Sidorova, E., Söderberg, A., Baxendale, H., Dahle, C., ... others. (2008). A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood*, *111*, 3838–3848.
- Nogai, H., Dörken, B., & Lenz, G. (2011). Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *29*, 1803–1811.
- Oakes, C. C., Seifert, M., Assenov, Y., Gu, L., Przekopowicz, M., Ruppert, A. S., ... others. (2016). DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, *48*, 253.
- Owen, J. A., Punt, J., & Stranford, S. A. (2013). Kuby immunology (pp. 427-444). New York: WH Freeman.
- Packham, G., Krysov, S., Allen, A., Savelyeva, N., Steele, A. J., Forconi, F., & Stevenson, F. K. (2014). The outcome of B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia: proliferation or anergy. *Haematologica*, *99*, 1138–1148.
- Palacios, F., Abreu, C., Prieto, D., Morande, P., Ruiz, S., Fernandez-Calero, T., ... others. (2015). Activation of the PI3K/AKT pathway by microRNA-22 results in CLL B-cell proliferation. *Leukemia*, *29*, 115.
- Pangalis, G. A., Angelopoulou, M. K., Vassilakopoulos, T. P., Siakantaris, M. P., & Kittas, C. (1999). B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, and lymphoplasmacytic lymphoma, including Waldenström's macroglobulinemia: a clinical, morphologic, and biologic spectrum of similar disorders. In *Seminars in hematology* (Vol. 36, pp. 104–114).
- Parikh, S. A., Leis, J. F., Chaffee, K. G., Call, T. G., Hanson, C. A., Ding, W., ... others. (2015). Hypogammaglobulinemia in newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia: Natural history, clinical correlates, and outcomes. *Cancer*, *121*, 2883–2891.
- Pederson, I. M., Buhl, A. M., Klausen, P., Geisler, C. H., & Jurlander, J. (2002). The chimeric anti-CD20 antibody rituximab induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells through a p38 mitogen activated protein-kinase-dependent-mechanism. *Blood*, *99*, 1314–1319.
- Puente, X. S., Beà, S., Valdés-Mas, R., Villamor, N., Gutiérrez-Abril, J., Martín-Subero, J. I., ... others. (2015). Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, *526*, 519.
- Quijano, S., López, A., Rasillo, A., Sayagués, J. M., Barrera, S., Sánchez, M. L., ... others. (2008). Impact of trisomy 12, del (13q), del (17p), and del (11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *74*, 139–149.
- Ramsay, A. D., & Rodriguez-Justo, M. (2013). Chronic lymphocytic leukaemia--the role of the microenvironment pathogenesis and therapy. *British Journal of Haematology*, *162*, 15–24.
- Rassenti, L. Z., Jain, S., Keating, M. J., Wierda, W. G., Grever, M. R., Byrd, J. C., ... others. (2008). Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in

- predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *112*, 1923–1930.
- Rawstron, A. C., Bennett, F. L., O’connor, S. J. M., Kwok, M., Fenton, J. A. L., Plummer, M., ... others. (2008). Monoclonal B-cell lymphocytosis and chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *359*, 575–583.
- Rawstron, A. C., Kreuzer, K. A., Soosapilla, A., Spacek, M., Stehlikova, O., Gambell, P., ... Montserrat, E. (2018). Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, *94*, 121–128.
- Redaelli, A., Laskin, B. L., Stephens, J. M., Botteman, M. F., & Pashos, C. L. (2004). The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukaemia. *European Journal of Cancer Care*, *13*, 279–287.
- Roman, E., & Smith, A. G. (2011). Epidemiology of lymphomas. *Histopathology*, *58*, 4–14.
- Rosenquist, R., Cortese, D., Bhoi, S., Mansouri, L., & Gunnarsson, R. (2013). Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leukemia & Lymphoma*, *54*, 2351–2364.
- Rossi, D., Ciardullo, C., Spina, V., & Gaidano, G. (2013). Molecular bases of chronic lymphocytic leukemia in light of new treatments. *Immunology Letters*, *155*, 51–55.
- Rossi, D., Khiabani, H., Spina, V., Ciardullo, C., Brusca, A., Famà, R., ... others. (2014). Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *123*, 2139–2147.
- Schlette, E., Medeiros, L. J., Keating, M., & Lai, R. (2003). CD79b expression in chronic lymphocytic leukemia: association with trisomy 12 and atypical immunophenotype. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *127*, 561–566.
- Shimoura, Y., Sato, Y., Takata, K., Orita, Y., Nakamura, S., Mano, S., & Yoshino, T. (2013). Usefulness of Immunoglobulin Light-Chain Restriction on Immunocytochemical Double Staining for the Cytological Diagnosis of B Cell Non-Hodgkin’s Lymphoma. *Acta Cytologica*, *57*, 84–90.
- Sotto, J.-J., & Sotto, M.-F. (1999). Diagnostic des syndromes lymphoprolifératifs chroniques. *Revue Française Des Laboratoires*, *1999*, 21–25.
- Stankovic, T., & Skowronska, A. (2014). The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *55*, 1227–1239.
- Stevenson, F. K., & Caligaris-Cappio, F. (2004). Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, *103*, 4389–4395.
- Strati, P., Abruzzo, L. V., Wierda, W. G., O’Brien, S., Ferrajoli, A., & Keating, M. J. (2015). Second cancers and Richter transformation are the leading causes of death in patients with trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, *15*, 420–427.
- Swerdlow, S. H. (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *WHO Classification of Tumours*, *22008*, 439.

- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., ... others. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, *127*, 2375–2390.
- ten Hacken, E., & Burger, J. A. (2014). Microenvironment dependency in Chronic Lymphocytic Leukemia: The basis for new targeted therapies. *Pharmacology & Therapeutics*, *144*, 338–348.
- Tobin, G., Thunberg, U., Johnson, A., Thörn, I., Söderberg, O., Hultdin, M., ... others. (2002). Somatically mutated Ig VH3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *99*, 2262–2264.
- Toellner, K.-M., Jenkinson, W. E., Taylor, D. R., Khan, M., Sze, D. M.-Y., Sansom, D. M., ... MacLennan, I. C. M. (2002). Low-level hypermutation in T cell--independent germinal centers compared with high mutation rates associated with T cell--dependent germinal centers. *Journal of Experimental Medicine*, *195*, 383–389.
- S.Taoussi, S.Oukid, Y.Bouchakor, MT. Abad-. (2012). Répartition des anomalies cytogénétiques dans la leucémie lymphoïde chronique –IXème Congrès National d’Hématologie, Tlemcen
- Troussard, X. (2007). Diagnostic, pronostic et traitement chez les patients avec une leucémie lymphoïde chronique. *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée*, *22*, 313–318.
- Troussard, X., & Caen, C. H. U. (n.d.). Syndromes Lymphoprolifératifs Chroniques (SLPC). *Revue Algérienne d’Hématologie* .
- Troussard, X., & Cornet, E. (2009). Leucémie à tricholeucocytes: un nouveau regard. *Correspondances En Onco-Hématologie*, *4*, 32–38.
- Troussard, X., Cornet, E., Bardet, V., Couaillac, J.-P., Fossat, C., Luce, J.-C., ... others. (2013). Full blood count normal reference values for adults in France. *Journal of Clinical Pathology*, jclinpath--2013.
- Vela, J. A. G., Delgado, I., Benito, L., Monteserin, M. C., Alonso, L. G., Somolinos, N., ... Ona, F. (1999). CD79b expression in B cell chronic lymphocytic leukemia: its implication for minimal residual disease detection. *Leukemia*, *13*, 1501.
- Victoria, G. D., & Nussenzweig, M. C. (2012). Germinal centers. *Annual Review of Immunology*, *30*, 429–457.
- Wang, L., Lawrence, M. S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., ... others. (2011). SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *365*, 2497–2506.
- Wendtner, C. M., Dreger, P., Gregor, M., Greil, R., Knauf, W., Schetelig, J., ... Stilgenbauer, S. (2012). Chronic lymphocytic leukemia. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, *137*, 1162.
- Widhopf, G. F., Rassenti, L. Z., Toy, T. L., Gribben, J. G., Wierda, W. G., & Kipps, T. J. (2004). Chronic lymphocytic leukemia B cells of more than 1% of patients express virtually identical immunoglobulins. *Blood*, *104*, 2499–2504.
- Wood, B. L., Arroz, M., Barnett, D., DiGiuseppe, J., Greig, B., Kussick, S. J., ... Wallace, P. (2007). 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal

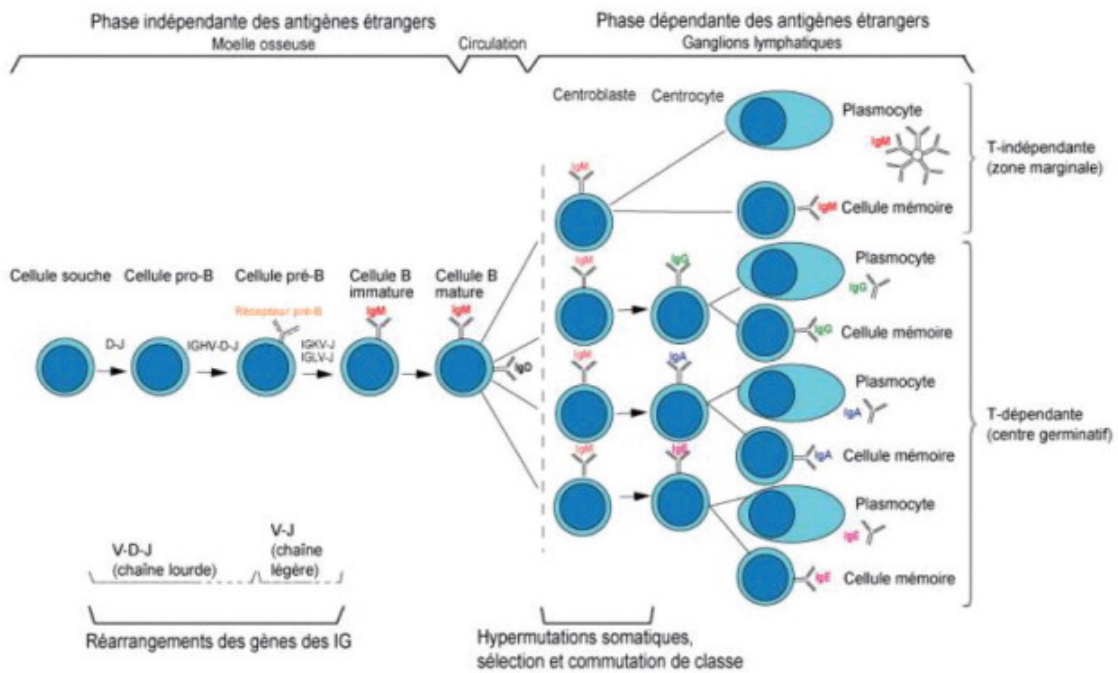
reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 72.

Young, R. M., & Staudt, L. M. (2013). Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12, 229.

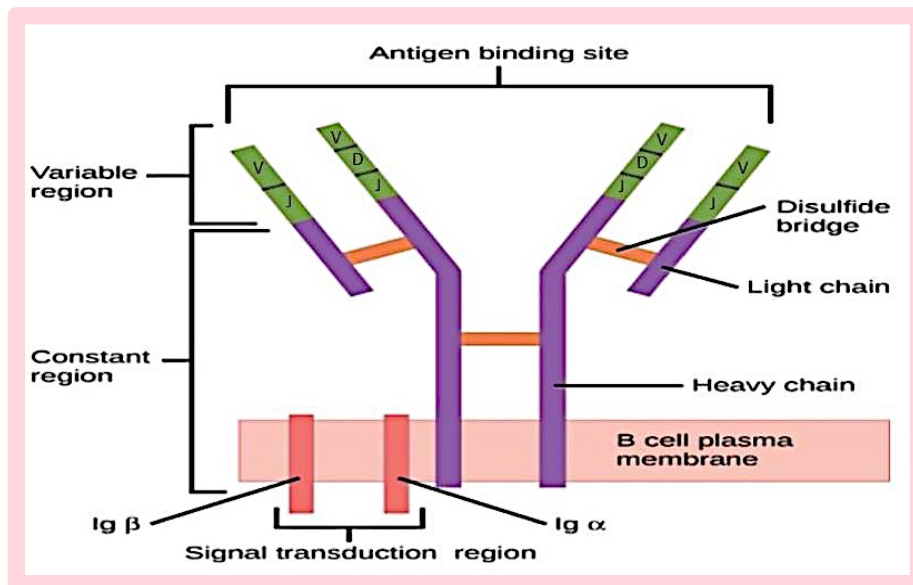
Zucchetto, A., Benedetti, D., Tripodo, C., Bomben, R., Dal Bo, M., Marconi, D., ... others. (2009). CD38/CD31, the CCL3 and CCL4 chemokines, and CD49d/vascular cell adhesion molecule-1 are interchained by sequential events sustaining chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Cancer Research*, 69, 4001–4009.

# *Annexes*





**Figure 1.A. :** Les stades de maturation et de différenciation des lymphocytes B. (Eclache *et al.*, 2013)



**Figure 2.A. :** Structure du récepteur BCR des lymphocytes B. Le BCR est caractérisé par sa diversité, qui permet au système immunitaire de reconnaître une vaste gamme d'antigènes étrangers. Ce dernier est composé de deux composantes : l'unité de reconnaissance (l'immunoglobuline liée à la membrane de surface) et l'unité de transmission composée des co-récepteurs CD79a ou  $Ig\alpha$  et CD79b ou  $Ig\beta$ . L'Ig est composé de 2 chaînes lourdes (H) et 2 chaînes légères (L). Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des régions variables des deux chaînes définit le site de fixation à l'antigène. La région Constante est le déterminant de l'isotype d'immunoglobuline du BCR. Il y a 5 isotypes différents : IgM, IgG, IgA, IgE et IgD. (Alberts *et al.*, 2017)

Tableau I.A. : Les principales entités des lymphomes à grandes et à petites cellules B. (Diebold *et al.*, 2008)

<p><b>Tumeurs développées à partir de précurseurs B</b> Lymphome/leucémie lymphoblastique B</p>
<p><b>Tumeurs développées à partir des lymphocytes périphériques B</b></p> <p>Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire Leucémie prolymphocytaire Lymphome lymphoplasmocytaire (Immunocytome) Leucémie à tricholeucocytes Lymphome de la zone marginale de type MALT Lymphome splénique de la zone marginale Lymphome ganglionnaire de la zone marginale Lymphome folliculaire Grade I, II</p>
<p>Lymphome des cellules du manteau Plasmocytome/myélome multiple Lymphome diffus à grandes cellules B Lymphom B médiastinal Lymphome de Burkitt</p>

Lymphomes indolents

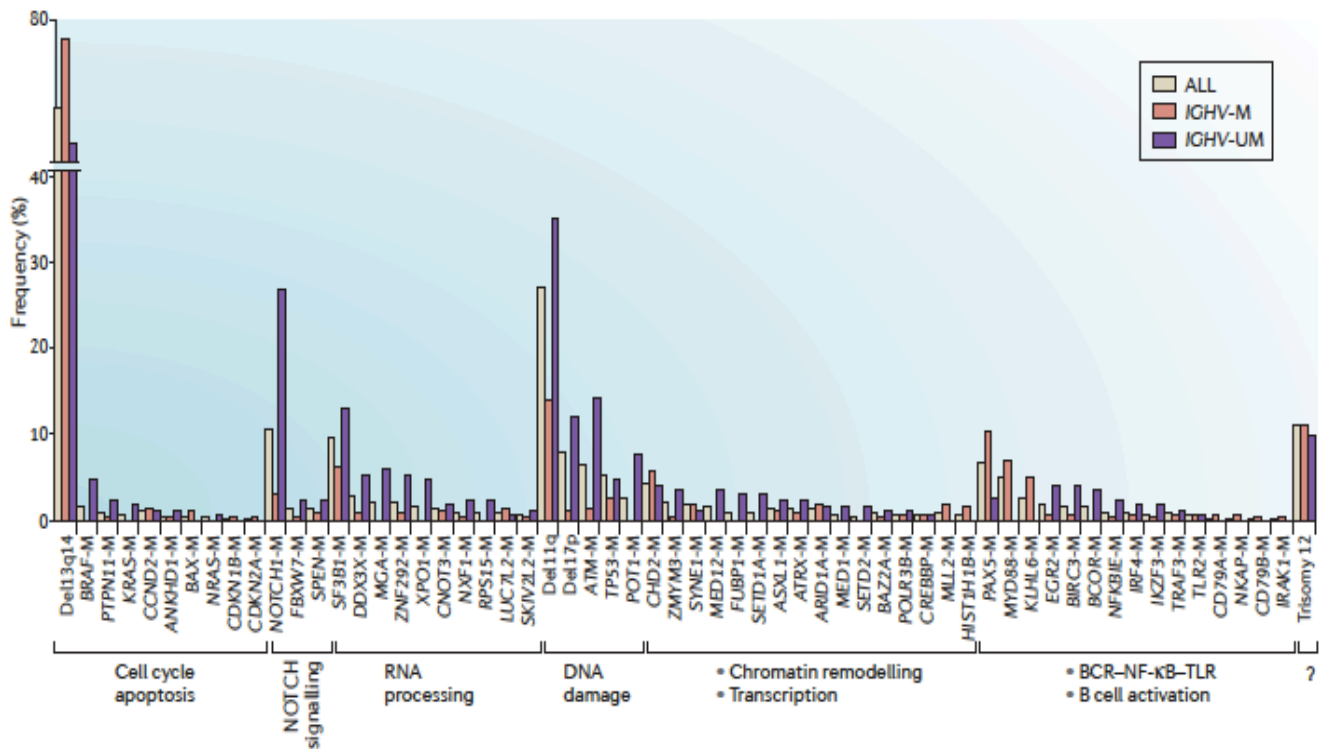


Figure 3.A. : Les altérations génétiques dans la leucémie lymphoïde chronique (Fabbri *et al.*, 2016)

**Tableau II.A. :** Classification des tumeurs du tissu lymphoïde de type B selon l'OMS 2016. (Swerdlow *et al.*, 2016)

Néoplasies lymphoïdes B matures
Leucémie lymphoïde chronique / Lymphome lymphocytaire
Lymphocytose B monoclonale *
Leucémie pro-lymphocytaire B
Lymphome de la zone marginale splénique
Leucémie à tricholeucocytes
<i>Lymphome / Leucémie B splénique, non classable</i>
<i>Lymphome B diffus à petites cellules de la pulpe rouge splénique</i>
<i>Leucémie à tricholeucocytes - variant</i>
Lymphome lymphoplasmocytaire
Macroglobulinémie de Waldenström
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS) IgM *
Maladie des chaînes lourdes $\mu$
Maladie des chaînes lourdes $\gamma$
Maladie des chaînes lourdes $\alpha$
Gammopathie monoclonale de signification indéterminée ( <i>Monoclonal Gammopathy Unkwon Signifaction</i> ) IgG/IgA *
Myélome multiple
Plasmocytome solitaire osseux
Plasmocytome extra-osseux
Maladie des dépôts d'immunoglobulines monoclonales *
Lymphome de la zone marginale extra-ganglionnaire du tissu lymphoïde associé aux muqueuses (MALT)
Lymphome de la zone marginale ganglionnaire
<i>Lymphome de la zone marginale ganglionnaire de type pédiatrique</i>
Lymphome folliculaire
Néoplasie folliculaire <i>in situ</i> *
Lymphome folliculaire de type duodéal *
Lymphome folliculaire de type pédiatrique *
<i>Lymphome à grandes cellules B avec réarrangement de IRF4 *</i>
Lymphome centro-folliculaire cutané primitif
Lymphome à cellules du manteau
Néoplasie à cellules du manteau <i>in situ</i> *
Lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL), sans autre spécificité (NOS)
de type B du Centre Germinatif *
de type Activé B *
Lymphome à grandes cellules B, riche en lymphocytes T/histiocytes
DLBCL primitif du système nerveux central
DLBCL primitif cutané, de type jambe
DLBCL EBV+, NOS *
<i>Ulcère cutanéomuqueux EBV+*</i>
DLBCL associé à une inflammation chronique
Granulomatose lymphomatoïde
Lymphome médiastinal (thymique) primitif à grandes cellules B,
Lymphome à grandes cellules B intravasculaire
Lymphome à grandes cellules B, ALK+
Lymphome plasmablastique
Lymphome des séreuses
<i>DLBCL HHV8*, sans autre spécificité *</i>
Lymphome de Burkitt
<i>Lymphome Burkitt-like avec aberration 11q *</i>
Lymphome B de haut grade, avec réarrangement de MYC et BCL2 et/ou BCL6*
Lymphome B de haut grade, NOS *
Lymphome B inclassable, avec des aspects intermédiaires entre un DLBCL et un lymphome de Hodgkin classique

Tableau III.A. : Les micro RNA significatives identifiés dans la LLC. (Kipps *et al.*, 2017)

**MicroRNAs of identified significance in CLL**

MicroRNA	Chromosomal location	Gene(s) affected in CLL
<i>mir-15a, mir-16-1</i>	13q14	<i>BCL2, CCND1, TP53</i>
<i>mir-17-5p</i>	13q31	<i>BCL2</i>
<i>mir-21</i>	17q23	<i>BCL2</i>
<i>mir-26a</i>	3p22.2	<i>PTEN</i>
<i>mir-29a/b</i>	7q32	<i>TCL1, MCL1, CDK6</i>
<i>mir-29c</i>	1q32	<i>MCL1, TCL1</i>
<i>mir-34a</i>	1p36	<i>BCL2, SIRT1</i>
<i>mir-34b</i>	11q23	<i>TCL1</i>
<i>mir-106b</i>	7q22	<i>ITCH</i>
<i>mir-146a</i>	5q33.3	<i>IRAK1, TRAF6</i>
<i>mir-150</i>	19q13	<i>FOXP1, GAB1</i>
<i>mir-155</i>	21q21	<i>INPP5D, AICDA, SPI1, CEBPB, QKI</i>
<i>mir-181b</i>	9q33	<i>BCL2, TCL1, MCL1</i>
<i>mir-223</i>	Xq12	<i>HSP90B1</i>
<i>mir-342-3p</i>	14q32.2	<i>E2F1</i>
<i>mir-650</i>	22q11	<i>EBF3, ING4, CDK1</i>
<i>mir-3676</i>	17p13	<i>TCL1</i>

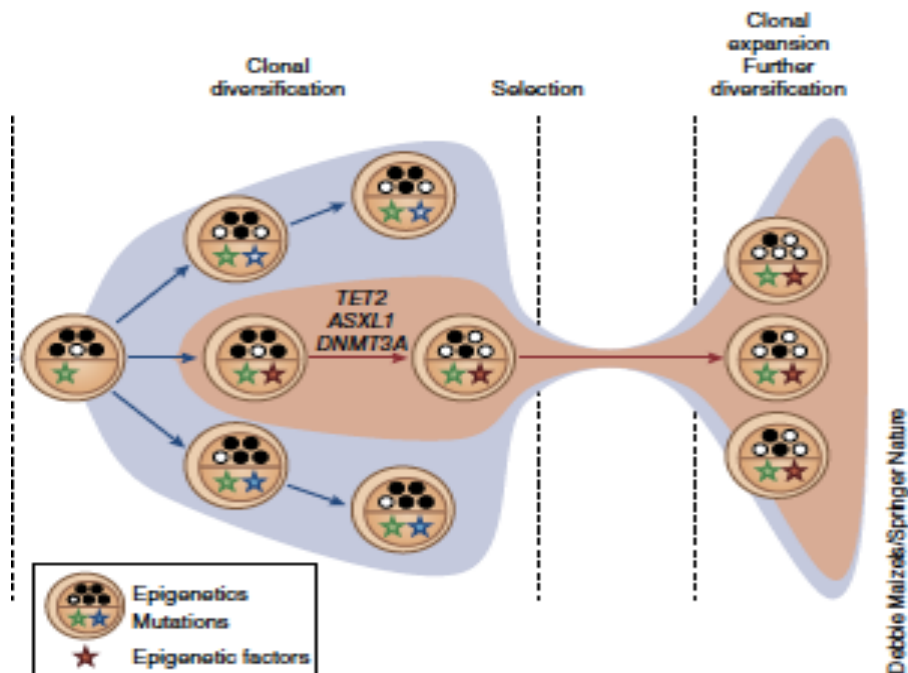


Figure 4.A. : La contribution de l'épigénétique dans l'évolution de la LLC (Adolfo *et al.*, 2017)

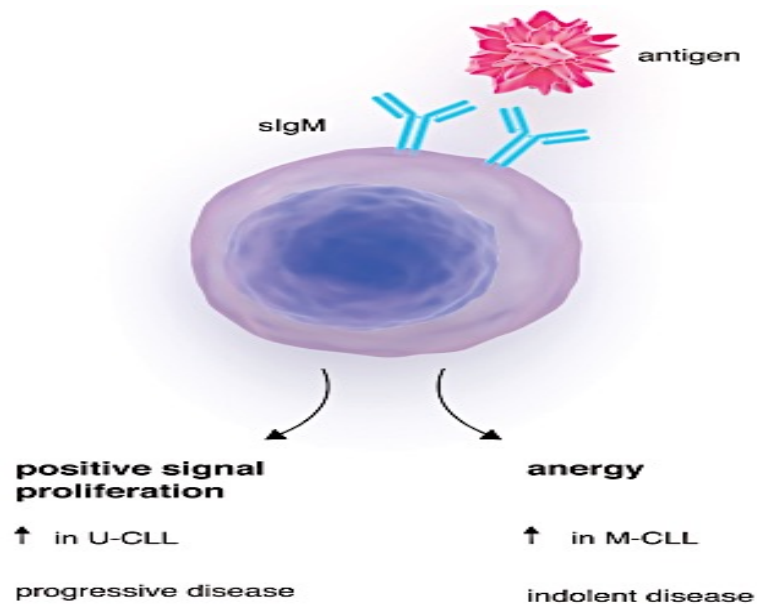


Figure 5.A. : Les réponses différentielles de la signalisation BCR et la variabilité clinique dans la LLC. (Packham *et al.*, 2014)

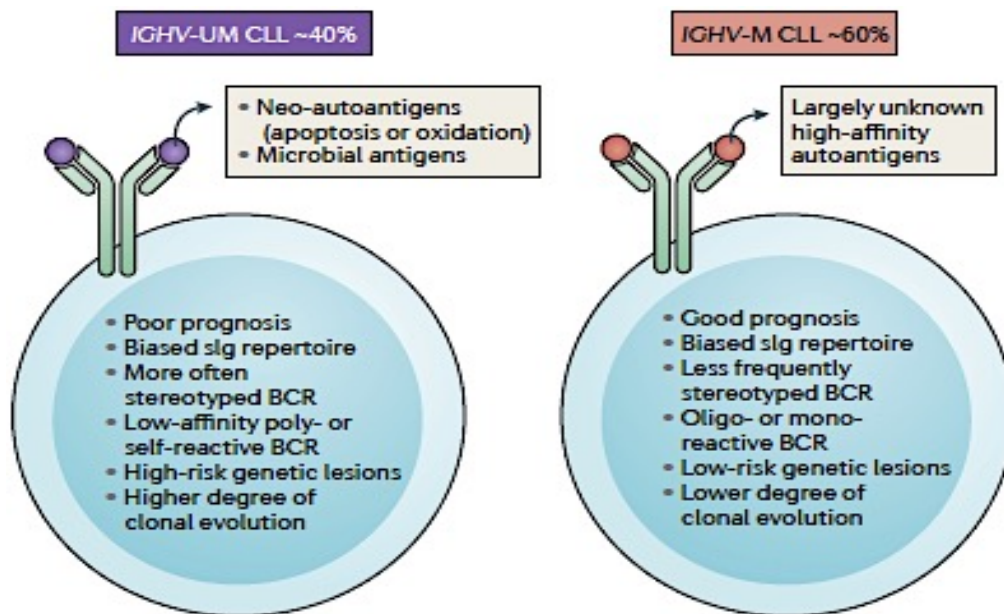


Figure 6.A. : Caractéristiques cliniques et biologiques des sous types IGHV-M et IGHV-UM (Fabbri *et al.*, 2016)



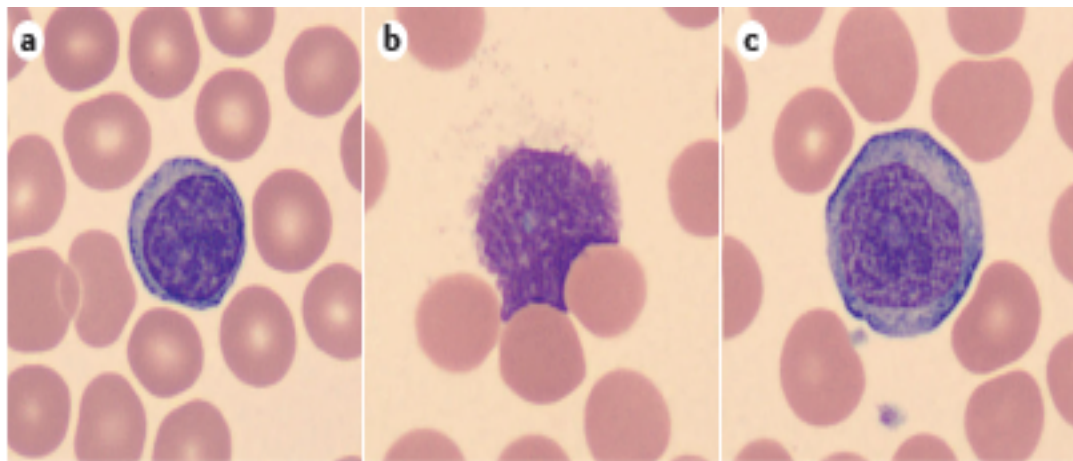


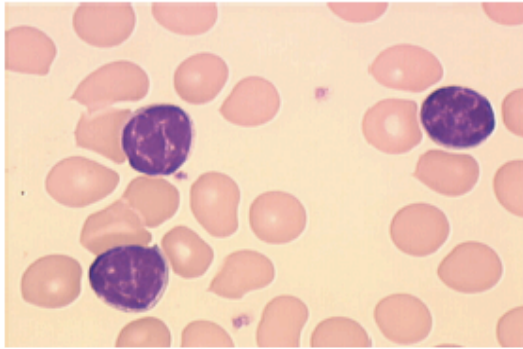
Figure 7.A. : Un frottis sanguin d'un patient atteint de LLC. Sang coloré au May-Grundwald Giemsa montrant une LLC. a : lymphocyte B , b : une cellule éclaté (ombre de gumprecht) , c : prolymphocyte . Grossissement x 500 (Kipps *et al.*, 2017).

Tableau IV.A. : Réactivités antigéniques rapportées dans la LLC. (Karp et Giannopoulos, 2013)

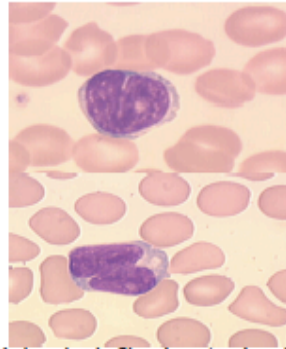
Antigen	Stereotyped BCRs	Non-stereotyped BCRs	References
oxLDL	IGHV1-18UM	subset#1	10, 51
	IGHV1-2UM	subset#1	
	IGHV4-34M	subset#4	
	IGHV1-69UM	subset#6	
	IGHV4-39UM	subset#8	
	IGHV3-21UM	subset#9	
	IGHV1-2UM	subset#28	
<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. cloacae</i>	IGHV3-30.3UM	subset#32	5, 51
CMV	IGHV4-34M	subset#4	44, 45, 60
EBV	IGHV4-34M	subset#4	44, 45
HCV	IGHV4-59M	subset#13	44
$\beta$ -(1,6)-glucan	IGHV3-7M	V3-7Sh*	38
MYHIIA	IGHV1-2UM	subset#1	17, 18, 44
	IGHV1-3UM	subset#1	
	IGHV1-18M	subset#1	
	IGHV1-69UM	subset#6	
	IGHV4-34M	subset#4	
	IGHV4-39UM	subset#8	
	IGHV1-69UM	subset#9	
	IGHV3-21UM	subset#9	
IGHV1-2UM	subset#28		
Vimentin	IGHV1-2UM	subset#1	44, 51, 56
	IGHV1-3UM	subset#1	
	IGHV1-5-7UM	subset#1	
	IGHV4-39UM	subset#8	
Filamin B	IGHV1-5-7UM	subset#1	51, 56
	IGHV3-30.3UM	subset#32	
Cofilin-1	IGHV3-21M	subset#2	51
	IGHV1-69UM	subset#5	

\*defined by Hoogeboom *et al.* [38]; BCR – B cell receptor; IGHV – immunoglobulin variable heavy chain; oxLDL – oxidized low density lipoprotein; *S. pneumoniae* – *Streptococcus pneumoniae*; *S. pyogenes* – *Streptococcus pyogenes*; *E. faecium* – *Enterococcus faecium*; *E. faecalis* – *Enterococcus faecalis*; *E. cloacae* – *Enterococcus cloacae*; CMV – cytomegalovirus; EBV – Epstein-Barr virus; HCV – hepatitis C virus; MYHIIA – nonmuscle myosin heavy chain IIA.

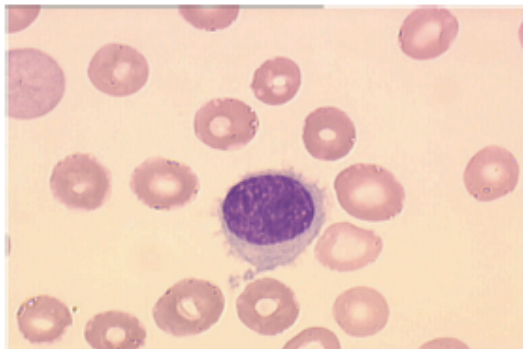
Figure I. Aspects morphologiques des différents syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (SLPC-B).



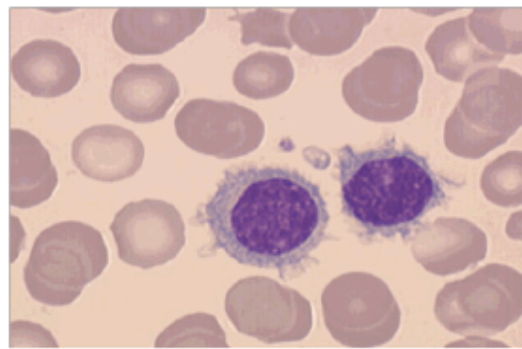
Leucémie Lymphoïde Chronique LLC.



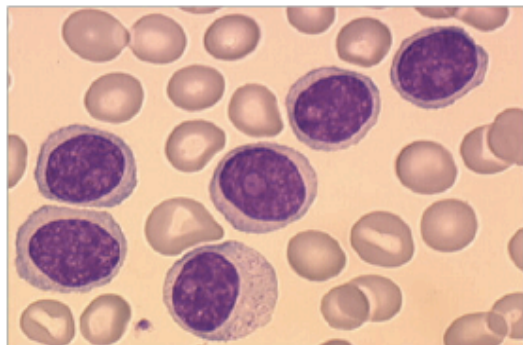
Leucémie Lymphoïde Chronique Atypique LLC Atyp.



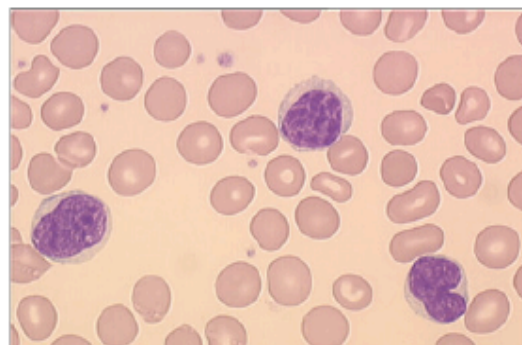
Leucémie à tricholeucocytes (forme classique) HCL-C.



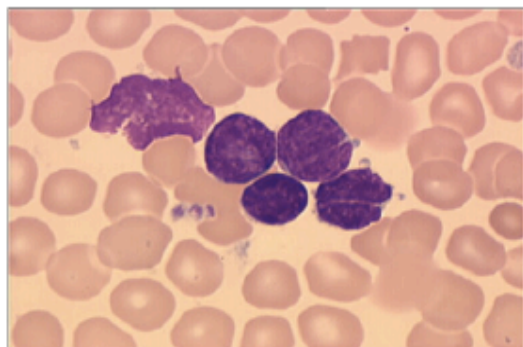
Lymphome splénique de la zone marginale SMZL.



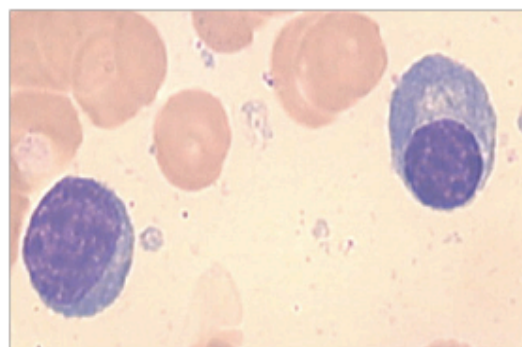
Leucémie à polymphocytes LPL-B.



Lymphome à cellules du manteau LCM.



Lymphome folliculaire LF.



Lymphome lymphoplasmocytaire LP.

**Figure 8.A. :** Aspects morphologiques des différents syndromes lymphoprolifératifs chroniques B (SLPC-B). (Troussard *et al.*, 2016)

**Tableau V.A. :** Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B.

Tableau I – Antigènes d'intérêt dans le diagnostic et le suivi des syndromes lymphoprolifératifs chroniques B.		
Marqueur	Expression normale	SLP-B
CD5	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	LLC, LCM
CD10	Lymphocytes B et T immatures (centre germinatif), polynucléaires neutrophiles, minorité de lymphocytes B et T matures	LF
CD11c	Quelques lymphocytes B et T	HCL. Parfois faible expression dans LLC, LPL, LZM, SLVL
CD19	Lymphocytes B et plasmocytes	Marqueur de la lignée B
CD20	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B. Faible intensité d'expression dans LLC
Chaines légères (kappa et lambda) en surface	Lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique
Chaines légères (kappa et lambda) en intracytoplasmique	Plasmocytes, lymphocytes B	Indicateur de restriction isotypique
CD22	Lymphocytes B	Marqueur de la lignée B. Faible intensité d'expression dans LLC
CD23	Faiblement positif dans les lymphocytes B matures. Expression augmentée lors de l'activation.	Diagnostic différentiel LLC et autre syndrome lymphoprolifératif chronique CD5+
CD24	Expression intermédiaire sur précurseurs B et T.	LZM
CD25	Lymphocytes B et T activés.	HCL, associé à CD103, CD11c et CD123. Rares LPL, LZM, LCM, MW
CD27	Marqueur d'activation des lymphocytes T. Lymphocytes B mémoires.	LLC, SLVL, MZL, LPL-MW
CD38	Cellules centro-folliculaires, cellules T immatures, plasmocytes	Différenciation plasmocytaire Marqueur pronostique dans la LLC
CD43	Lymphocytes T et minorité de lymphocytes B	Expression aberrante dans la LLC Rares LCM et LZM
CD45	Marqueur pan-leucocytaire	Intérêt pour la distinction des hémopathies matures et immatures
CD49d	Lymphocytes B, T, NK, monocytes, plasmocytes	Marqueur pronostique dans la LLC
CD79b	Précurseurs B, plasmocytes. Expression variable sur lymphocytes B	Marqueur de la lignée B. Faible intensité d'expression dans LLC
CD81	Lymphocytes B et T	Intérêt diagnostique dans le MM. MRD LLC
CD103	Minorité de lymphocytes B.	HCL et rares MZL
CD160	Lymphocytes NK et T CD8	HCL (LLC ?)
CD200	Macrophages, cellules dendritiques, mastocytes, polynucléaires, lymphocytes B, lymphocytes T activés	Diagnostic différentiel LLC/LCM
FMC7	Lymphocytes B matures	Diagnostic différentiel LLC/LCM et autre syndrome lymphoprolifératif CD5+
Bcl-2	Lymphocytes T, minorité de lymphocytes B	FL
ZAP-70	Lymphocytes T, NK, précurseurs B	Marqueur pronostique dans la LLC

MRD : maladie résiduelle minimale, LLC : leucémie lymphoïde chronique, LF : lymphome folliculaire, LCM : lymphome de manteau, LZM : lymphome de la zone marginale, LPL-B : leucémie à prolifération B, MM : myélome multiple, LPL-MW : lymphome lymphoplasmocytaire/maladie de Waldenström, SLP-B : syndrome lymphoprolifératif chronique B, SLVL : lymphome splénique à lymphocytes villoeux, HCL : hairy cell leucémie (leucémie à tricholeucocytes). Adapté d'après Craig et al. (3)



**Tableau VI.A. :** Agents thérapeutiques ciblant Le récepteur BCR et ces voies de signalisation (Pleyer *et al.*, 2009)

<b>Table 1   Agents targeting the BCR and downstream signaling pathways in CLL</b>			
<b>Substance</b>	<b>Mechanism of action</b>	<b>Agent with additive or synergistic activity</b>	<b>Research status</b>
Dasatinib	Lyn-inhibition, lower levels of Bcl-xL and Mcl-1, elevated p53	Fludarabine <sup>a</sup>	Cell lines and primary CLL cells <sup>39</sup>
Imatinib	Abl-inhibition	Chlorambucil <sup>b</sup>	<i>In vitro</i> <sup>132</sup>
NU7026	Kinase inhibitor	Chlorambucil <sup>b</sup>	<i>In vitro</i> <sup>43</sup>
Genistein	Kinase inhibitor, ZAP-70	Fludarabine	Primary CLL cells <sup>133</sup>
Dasatinib (and imatinib)	c-Abl-inhibition, prevent antiapoptotic CD40-program, restore drug sensitivity	Restores sensitivity to fludarabine, bortezomib, roscovitine, ABT737	Primary lymph node and peripheral blood CLL samples <sup>125</sup>
PP2 SU6656	Lyn inhibition	ND	<i>In vitro</i> , primary CLL cells <sup>23</sup>
U-0126 PD-98059	MEK1 inhibitor	Purine analogs 2-Cda <sup>a</sup>	EHEB CLL cell line, primary CLL cells <sup>54</sup>
LY294002	PI3K-inhibitor	ND	<i>In vitro</i> , primary CLL cells <sup>48</sup>
LY333531	PKC $\beta$ inhibitor	ND	<i>In vitro</i> , primary CLL cells <sup>48</sup>
Bis I	PKC inhibitor (classic and novel isoforms)	PI3K-inhibitor <sup>a</sup>	<i>In vitro</i> , primary CLL cells <sup>48</sup>
Staurosporine UCN-01	PKC inhibitor (nonselective)	ND	Phase I/II in CLL, <i>in vitro</i> , primary CLL cells <sup>45</sup>
PKC412	PKC inhibitor (classic isoforms)	ND	<i>In vitro</i> , primary CLL cells and cell lines <sup>134</sup>
Bryostatin-1	PKC modulator	Rituximab <sup>a</sup> , fludarabine <sup>a</sup>	Phase II in CLL <sup>45,51,135,136</sup>
Rottlerin	PKC $\delta$ and PKC $\theta$ inhibitor, reduction of Mcl-1 and XIAP	Vincristine <sup>b</sup>	Primary CLL cells <sup>49</sup>
APO866	Inhibits biosynthesis of NAD <sup>+</sup> (involved in DNA-repair)	ND	Phase I/II in refractory CLL <sup>137</sup>
GSK690693	AKT	ND	Phase I in hematological malignancies <sup>138</sup>
Plerixafor (AMD3100), T140, TC14012, TN14003	Inhibitors of SDF-1/CXCR4 signaling, inhibits stromal mediated protection	Fludarabine <sup>a</sup>	Phase I/II in CLL Phase II in other NHL, <i>in vitro</i> , primary CLL samples <sup>86</sup>
TCP168, AMD3465	Inhibitors of SDF-1/CXCR4 signaling, inhibits stromal mediated protection	Fludarabine <sup>a</sup>	<i>In vitro</i> , primary CLL samples <sup>139</sup>
Anti-CCR7-Ab	Anti-CCR7-Ab potential blockage of CLL entry into secondary lymphoid tissue	ND	<i>In vitro</i> , primary CLL samples <sup>88</sup>

**Matériel non biologique :**

**1. Les équipements :**



Pipettes et micropipettes



*Vortex*



Centrifugeuse



**Cytomètre en flux a 8 couleurs (BD FACS CANTO II) :**

Équipé de trois lasers : bleu (488 nm), rouge (633 nm) et violet (405 nm) et d'un passeur d'échantillon haut débit permettant l'automatisation du passage des échantillons en plaque.

## 2. Les tampons

- PBS (phosphate buffered saline)
- Solution de lavage (Cell wash)
- Solution de la lyse : BD FACS Lysing solution
- Liquide de gaine pour le cytomètre en flux

## 3. Les réactifs utilisés :

**Tableau VII.A. :** Liste des réactifs utilisés pour l'immunophénotypage LLC-B.

Réactifs	Fabricant
<b>BD oncomark CD19<sub>Percp</sub> / Kappa<sub>FITC</sub> / Lambda<sub>PE</sub> / CD20<sub>APC-H7</sub></b>	Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New-Jersey, USA
<b>BD oncomark CD103<sub>FITC</sub> / CD79b<sub>PE</sub> / CD19<sub>Percp-cy5.5</sub> / IgM<sub>APC</sub></b>	
<b>BD oncomark CD5<sub>FITC</sub> / CD10<sub>PE</sub> / CD19<sub>percp-cy5.5</sub> / CD22<sub>APC</sub></b>	
<b>BD oncomark FMC7<sub>FITC</sub> / CD23<sub>PE</sub> / CD19<sub>Percp-cy5.5</sub> / CD11c<sub>PE</sub></b>	
<b>BD oncomark CD38<sub>FITC</sub> / CD56<sub>PE</sub> / CD19<sub>Percp-cy5.5</sub></b>	



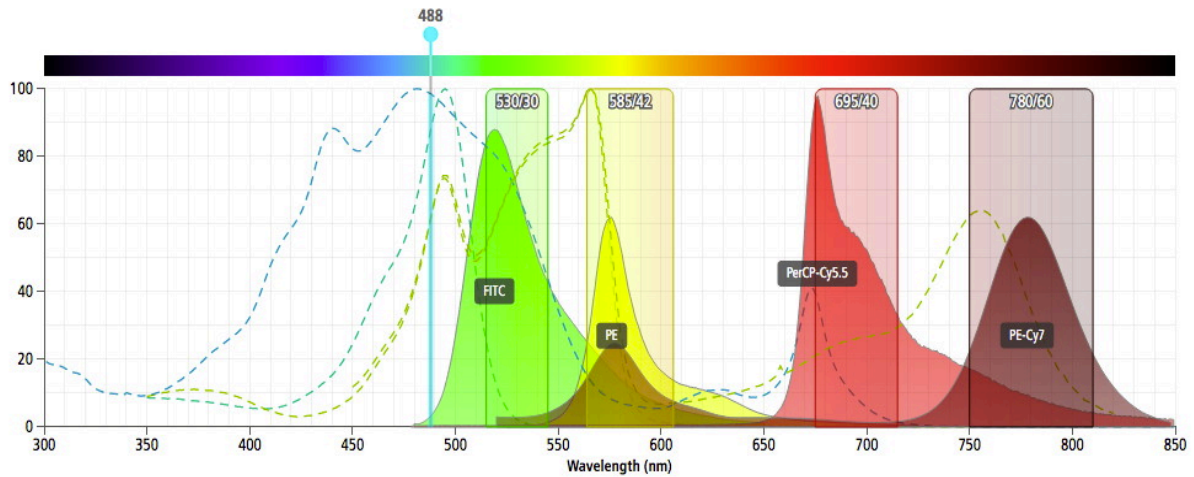


Figure 9.A. : Exemple de longueurs d'ondes de différents fluorochromes

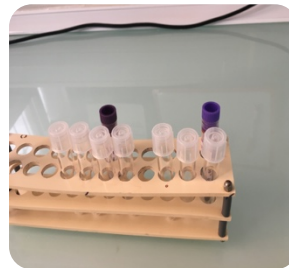
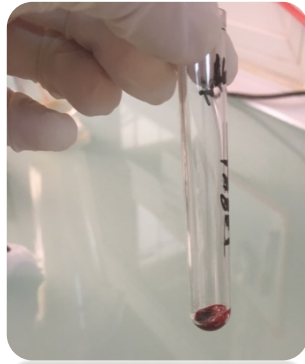
Fluorochrome	Fluorescence Emission Color	Em-Max (nm)
Brilliant Violet™ 421	Blue	421
BD Horizon™ V450	Blue	448
Pacific Blue™	Blue	452
BD Horizon™ V500	Green	500
Alexa Fluor® 488	Green	519
FITC	Green	519
PE	Yellow	578
BD Horizon PE-CF594	Orange	612
APC	Red	660
Alexa Fluor® 647	Red	668
PE-Cy™5	Red	667
PerCP	Red	678
PerCP-Cy™5.5	Far Red	695
Alexa Fluor® 700	Far Red	719
PE-Cy™7	Infrared	785
APC-Cy7	Infrared	785
BD APC-H7	Infrared	785

Figure 10.A. : Caractéristiques des fluorochromes les plus utilisés

**Mode opératoire :**

1. Prélèvement sanguin sur tube EDTA

Préparation des tubes



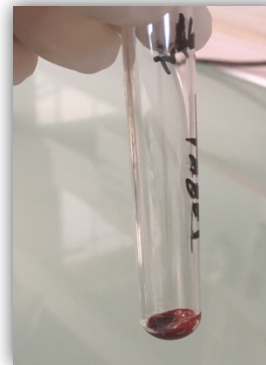
2. Le dépôt du sang sur les tubes

3. Lavage des échantillons (Tube d'orientation, ou le tube contenant IgMs



4. Vortex et centrifugation a 0.5RCF pendant 5 minutes

5. Elimination du surnageant





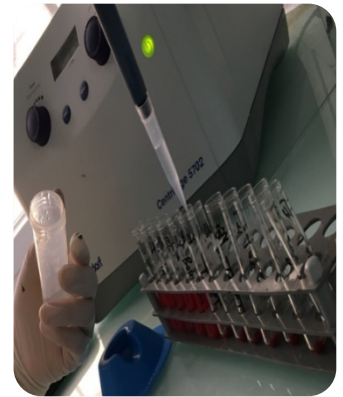
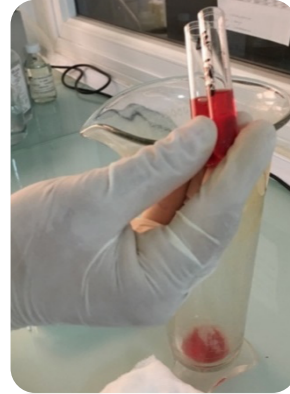
6. Dépôt des marqueurs (anticorps monoclonaux conjugués aux fluorochromes)

Vortex et incubation pendant 20 minutes à l'abri de la lumière.

7. Rajout de la solution de lyse

Vortex et incubation pendant 10 minutes

Centrifugation à 0.5 RCF pendant 5min



8. Verser le surnageant et l'éliminer



9. Rajout du PBS, les tubes sont prêts pour la lecture par le cytomètre en flux



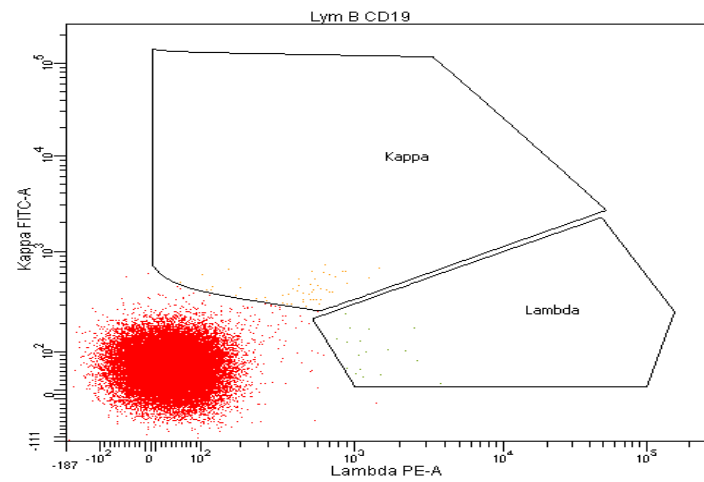
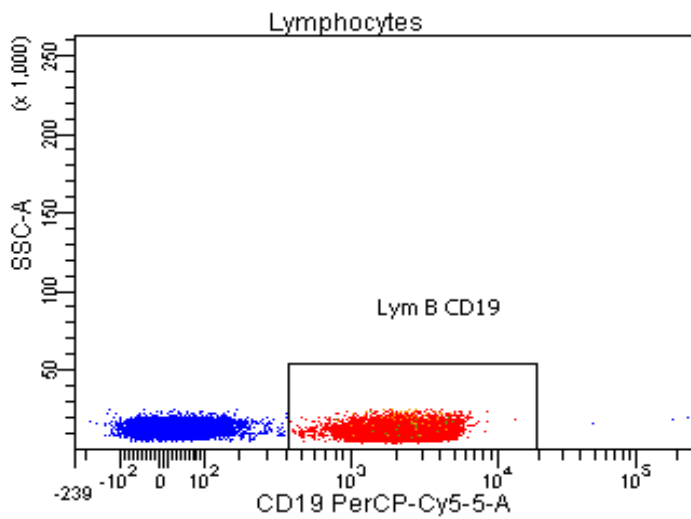
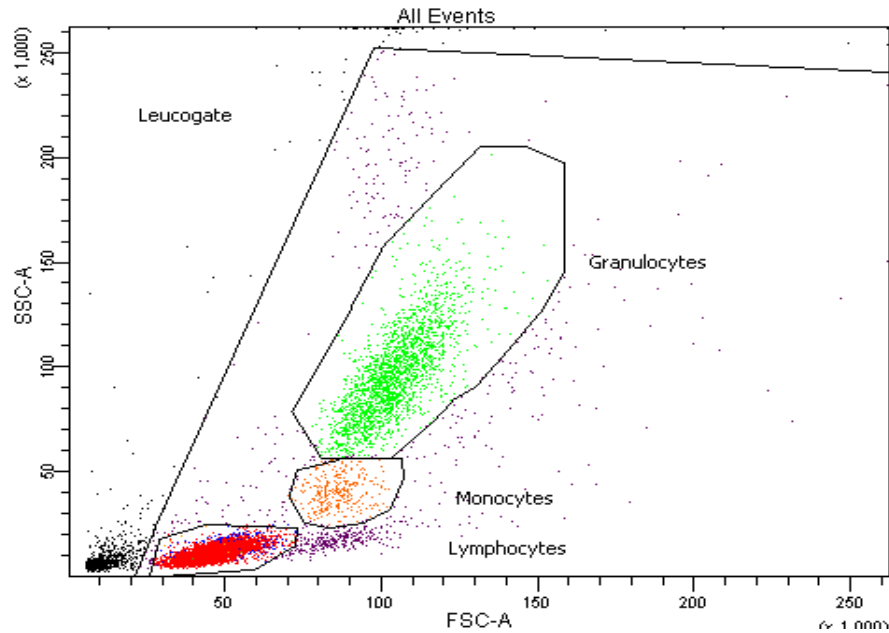
Tableau VIII.A. : résultats de l'hémogramme des patients de notre série. Normes (Troussard et al., 2014)

Paramètres de l'Hémogramme	Nombre de patients	Caractéristiques	Valeurs	Normes*
Hémoglobine (g/dl)	N = 87	Moyenne ± SD	11,7 ± 2,5	11-17
		Médiane	11,9	
		Extrêmes	1,8-16,6	
Plaquettes (g/L)	N = 70	Moyenne ± SD	162,9 ± 78,4	100-400
		Médiane	153,5	
		Extrêmes	40-365	
Globules blancs (Cellule /mm <sup>3</sup> )	N = 56	Moyenne ± SD	36583,7 ± 28745,5	3500-10000
		Médiane	26400	
		Extrêmes	1300-144000	
Lymphocytes Totaux (%)	N = 101	Moyenne ± SD	72,4 ± 14,8	15-50
		Médiane	73	
		Extrêmes	34-96	
Lymphocyte B par rapport aux lymphocytes Totaux (%)	N = 99	Moyenne ± SD	74,2 ± 18,1	10-15
		Médiane	78	
		Extrêmes	10-97	



Résultat du marquage par cytométrie en flux d'un des 101 patients

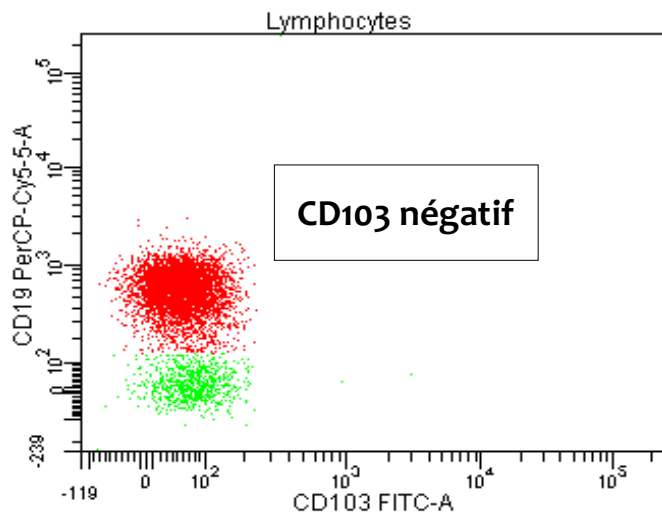
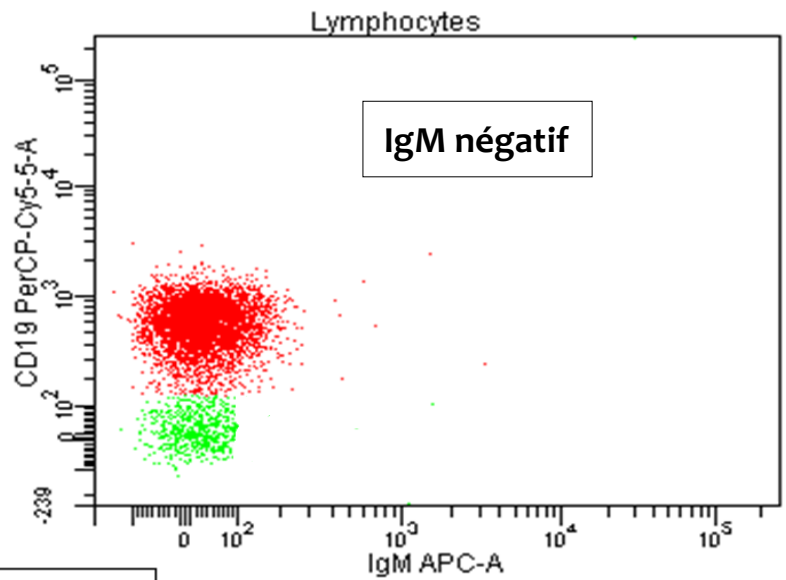
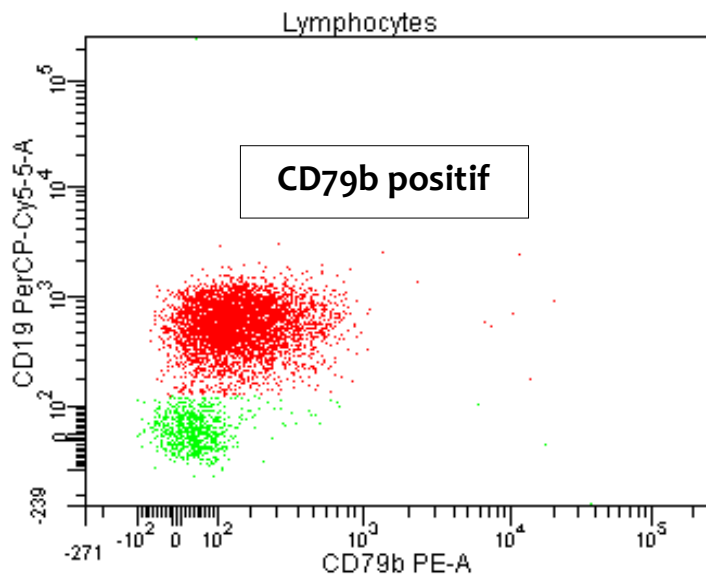
Tube d'orientation



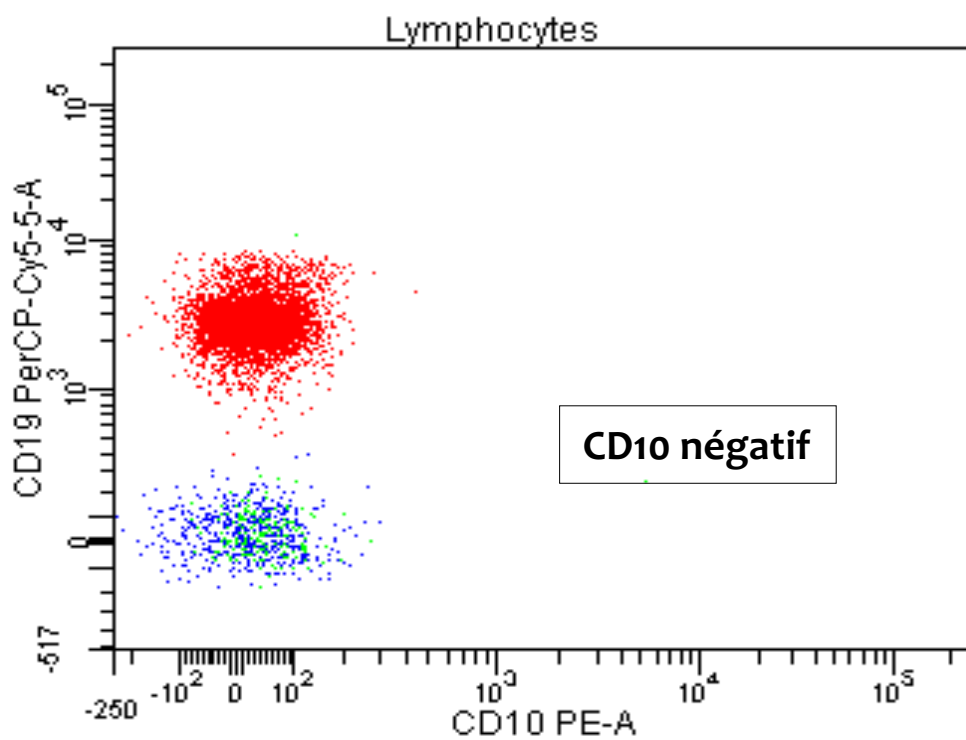
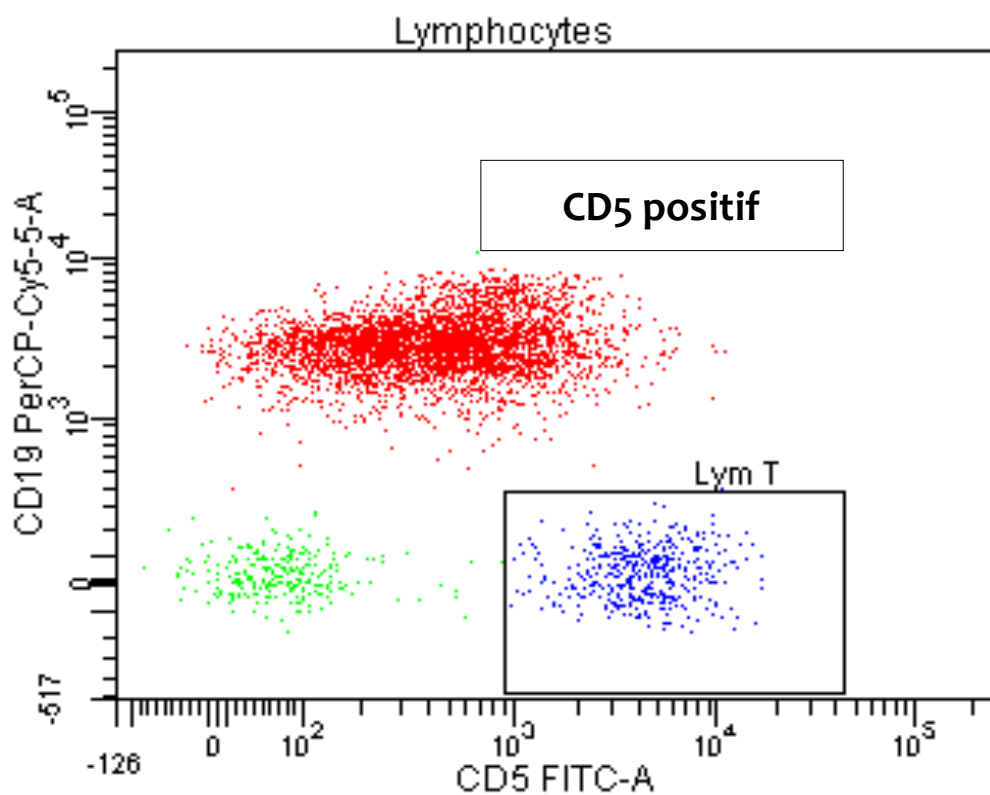
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	59,860	####	100.0
Leucogate	55,596	92.9	92.9
Lymphocytes	40,132	72.2	67.0
Lym B CD19	33,685	83.9	56.3

Lym B CD19	33,685	83.9	56.3
Kappa	49	0.1	0.1
Lambda	18	0.1	0.0

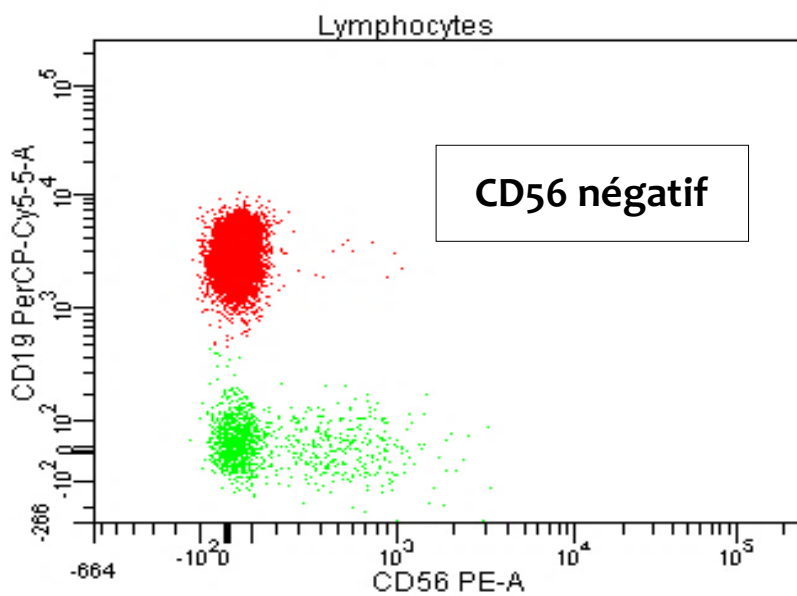
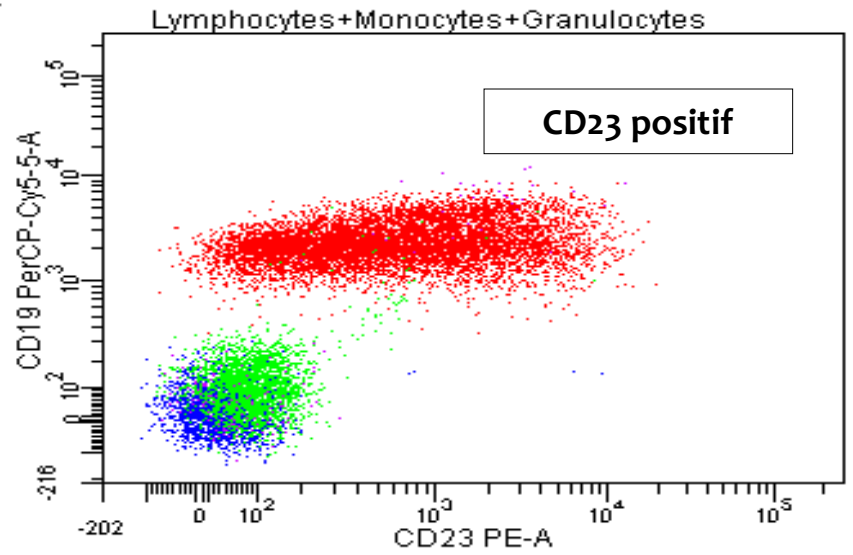
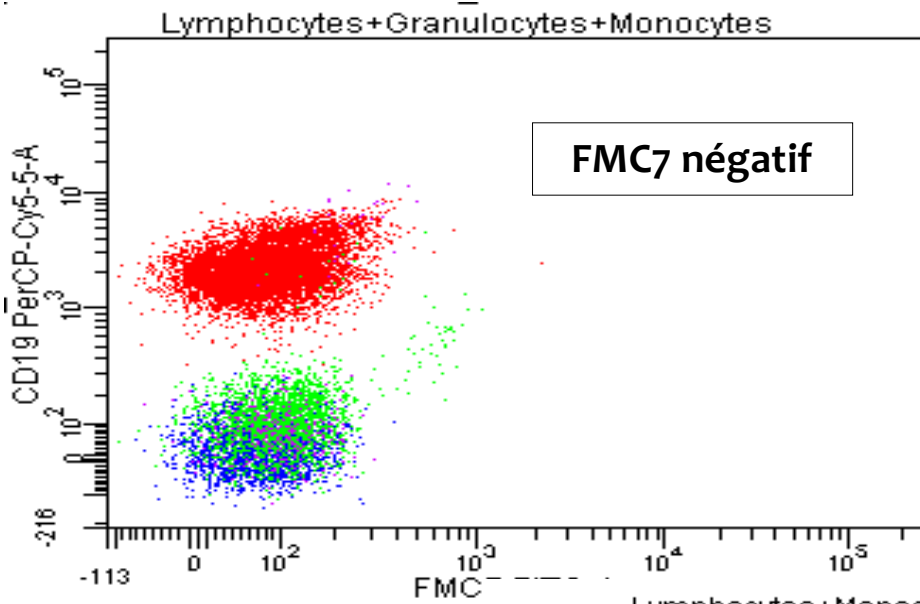
Tube 1



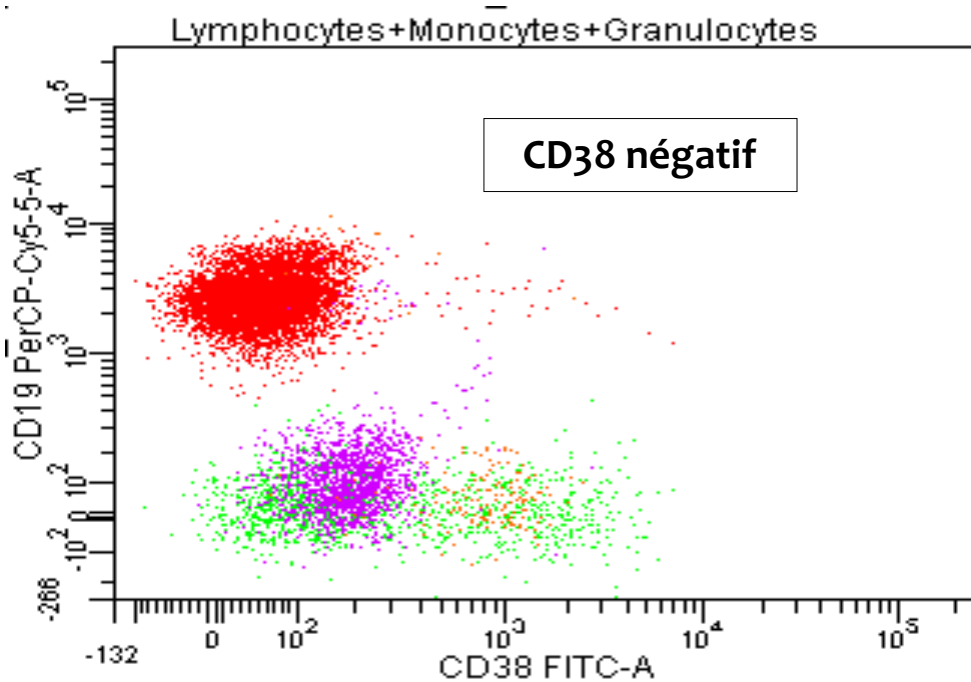
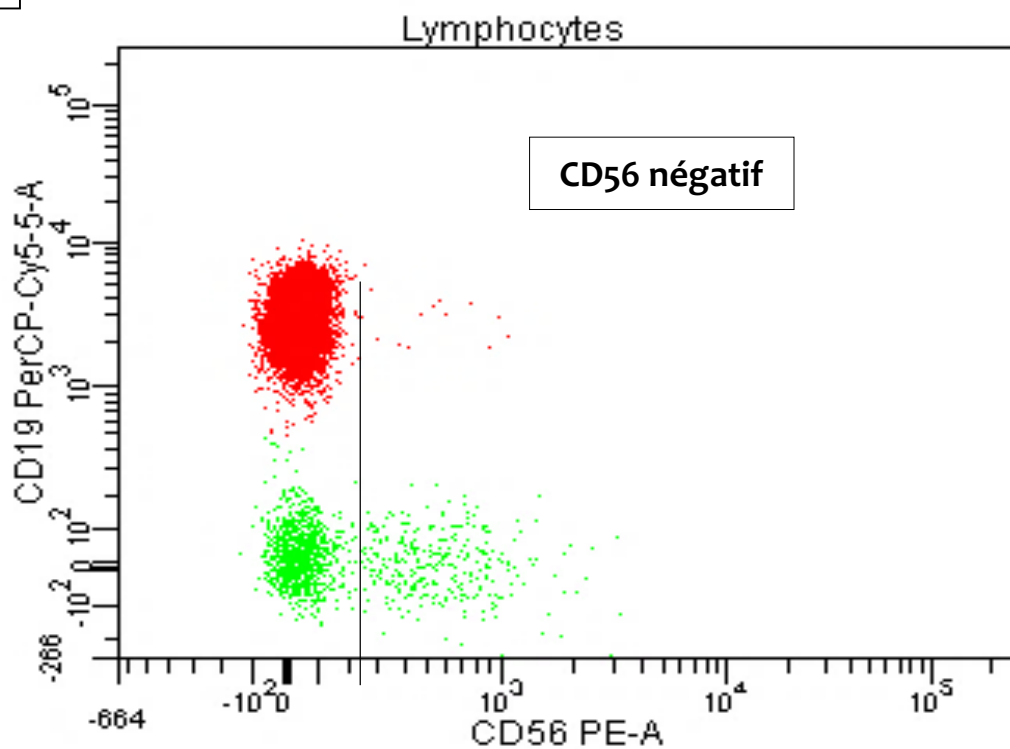
Tube 2



Tube 3



Tube 4



Marqueurs	Expression	Marqueurs	Expression
CD5	Positif	CD20	Positif
CD79b	Positif faible	CD22	/
FMC7	Négatif	CD103	Négatif
CD23	Positif	CD38	Négatif
IgM	Négatif	CD44	Positif
CD10	Négatif	CD56	Négatif

Cotation	1	0
CD5	Positif	Négatif
CD23	Positif	Négatif
Expression sIg monotypique	Faible	Forte
FMC7	Négatif	Positif
Expression de CD79b/CD22	Faible	Fort

**Score de matutes**

Antigène	Expression	Score de Matutes
CD5	Positif (faible)	1
CD79b	Négatif	1
FMC7	Négatif	1
CD23	Positif	1
Immunoglobuline de surface	Négatif	1

Score de Matutes: 5/5

**Aventis Internat 306**

Dr J.N. MUNCK  
Service d'Hématologie  
Institut Gustave Roussy  
Villejuif

AVENTIS INTERNAT EST DIRIGÉ PAR : WILLIAM BERREBI, PATRICK GEPNER, JEAN NAU

## LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE

### Diagnostic, évolution, pronostic

**LMC** = syndrome myéloprolifératif prédominant sur la lignée granulocytique ; anomalie de la cellule souche totipotente ; présence d'un **chromosome de Philadelphie**

**ASTHÉNIE** **SPLÉNOMÉGALIE**  
Pesanteur abdominale

**COMPLICATIONS**  
Rarement : transformation d'emblée

**DÉCOUVERTE FORTUITE**  
**NFS systématique +++ :**  
- hyperleucocytose avec myélorémie  
- thrombocytose isolée (femme jeune)

#### ÉLÉMENTS DU DIAGNOSTIC de LMC (EN PHASE CHRONIQUE)

##### HÉMOGRAMME

- Hyperleucocytose : 50-300 G/l avec polynucléose (30-50%), myélorémie (myélocytes et métamyélocytes +++), mais promyélocytes < 10%, myéloblastes et blastes < 5%, basophilie et éosinophilie très fréquentes
- ± Anémie modérée, normocytaire, arégénérative
- ± Thrombocytose

##### MYÉLOGRAMME

- Frottis riche, hyperplasie granulocytose
- Intérêt de l'examen :  
→ aspirer de la moëlle pour le caryotype  
→ confirmer la phase chronique : ni hiatus, ni blocage de maturation, (blastes < 10%, blastes et promyélocytes < 20%)

##### CYTOGÉNÉTIQUE

**Caryotype médullaire :**  
**chromosome de Philadelphie (Ph)**  
t(9;22)(q34;q11) et/ou RT-PCR : présence d'un transcrit Abi-bcr sur sang ou moëlle

##### AUTRES

- Hyperuricémie
- Phosphatases alcalines leucocytaires : abaissées
- Biopsie médullaire (non systématique ++): aspect de syndrome myéloprolifératif

##### ÉVOLUTION

- Médiane de survie 3 à 6 ans
- **Transformation "inéductable"** en leucémie aiguë 1/3 lymphoblastique, 2/3 non lymphoblastique :  
- parfois après phase d'accélération  
- altération de l'état général, adénopathies, fièvre, sueurs, douleurs osseuses, anémie, thrombopénie profonde, autres anomalies du caryotype, blastes moëlle > 30%
- **Autres complications** = 3 mois  
- infections, hémorragies (thrombopathie), thromboses artérielle ou veineuse, hyperuricémie (goutte, insuffisance rénale, colique néphrétique), infarctus splénique, hématome sous capsulaire voire rupture de la rate, infarctus osseux, leucostase pulmonaire et cérébrale, infiltration viscérale par cellules leucémiques (transformations) : nodules cutanés, infiltrats pulmonaires.

##### DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL

- En l'absence de t(9;22) (ou d'Abi-bcr) :**
- Leucémie myélomonocytaire chronique (monocytose > à 1 G/l)
  - Splénomégalie myéloïde : érythroblastémie, polikilocytose, dacryocytes, grosse rate, myélofibrose à la BOM
  - LMC atypique : (Ph-, Abi-bcr-)
  - Vague et thrombocythémie essentielle ont parfois hyperleucocytose et myélorémie modérées
  - Réaction leucémoïde (infections)

##### TRAITEMENT

##### LMC EN PHASE CHRONIQUE : PRINCIPALES INDICATIONS DU TRAITEMENT DE FOND

- 40-60 ans et donneur familial HLA compatible : essayer interféron INFα (± ARA-C SC ± HYDREA au début) → évaluation à 6 - 9 mois :  
- efficacité = diminution voire disparition du Ph → poursuivre INF (maintenance)  
- pas d'efficacité : allogreffe de moëlle (AGMO)
- < 40 ans et donneur familial : AGMO dans la première année suivant le diagnostic
- < 50 ans sans donneur familial : essayer INFα → si pas d'efficacité : rechercher donneur pour AGMO non apparenté (rarement envisagé après 50 ans)
- > 60 ans : HYDREA® en continu, discuter INFα si l'état général le permet

##### MESURES SYMPTOMATIQUES

hydratation et allopurinol

##### FACTEURS DE MAUVAIS PRONOSTIC

- Âge > 60 ans
- Rate > 10 cm sous le rebord costal
- Blastes > 3% sang ; > 5% moëlle
- Basophilie > 7% sang ; > 3% moëlle
- Hyperplaquetteuse > 700 G/l
- Autres :  
- rémission de courte durée  
- autres anomalies du caryotype  
- éosinophilie > 15%  
- non réponse à l'interféron



**Jusqu'où ira son affinité pour la vie?**

**HTA, post-IDM compliqué d'insuffisance cardiaque**  
Prévention des complications cardiovasculaires chez les patients à haut risque vasculaire ayant une pathologie artérielle ischémique confirmée (textes complets dans les mentions légales)

Mentions légales :  
cliquez sur le nom du produit