

# la leucémie lymphoïde chronique

## A- Définition

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est l'hémopathie lymphoïde B mature avec phase circulante la plus fréquente chez l'adulte. Elle est caractérisée par une expansion clonale de petits lymphocytes matures monomorphes, à noyau rond ou légèrement irrégulier, retrouvés dans le sang, la moelle osseuse, la rate et les ganglions<sup>1</sup>. Des formes prolymphocytaires et des paraimmunoblastes peuvent également être observés, formant des centres de prolifération dans les tissus infiltrés<sup>1</sup>.

Selon les classifications OMS 2008 et 2016<sup>1,46</sup>, la LLC est caractérisée par la présence d'au moins 5 G/L de lymphocytes monotypiques.

Le terme de lymphome lymphocytaire est réservé aux cas avec atteinte ganglionnaire, avec un compte de lymphocytes monotypiques inférieur à 5 G/L dans le sang<sup>1,46</sup>.

La notion de lymphocytose B monoclonale correspond à la présence d'une population lymphocytaire B monotypique circulante inférieure à 5 G/L, sans signe clinique associé<sup>1,46</sup>.

## B- Epidémiologie

Il existe des différences épidémiologiques selon les régions géographiques. En effet, la LLC est moins fréquente dans les populations africaines et asiatiques que dans la population caucasienne<sup>121</sup>. L'incidence de la LLC est plus de 10 fois inférieure dans la population asiatique et cela serait dû à des particularités génétiques dans la mesure où cette différence reste valable chez des sujets d'origine asiatique vivant dans les pays occidentaux, ce qui serait en faveur d'une prédisposition génétique de la LLC<sup>1,122</sup>.

Le sex ratio homme/femme est de 1,5 à 2,1<sup>1</sup>.

L'incidence est de 2 à 6 cas pour 100 000 habitants par an et augmente avec l'âge jusqu'à 12,8/100 000 habitants à l'âge de 65 ans<sup>1</sup>.

En France, l'incidence de la LLC et du lymphome lymphocytaire a été estimée à 4464 nouveaux cas en 2012<sup>123</sup>. L'incidence augmente avec l'âge et passe de 1,2 pour 100 000 de 40 à 44 ans à 52,5 pour 100 000 de 90 à 94 ans chez l'homme<sup>123</sup>. Selon ces données, l'âge médian au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et de 74 ans chez la femme. L'incidence observée entre 1980 et 2012 dans cette étude est en augmentation (1934 nouveaux cas répertoriés en



1980, 3014 nouveaux cas en 1990, 4017 en 2000 et 4481 en 2010), probablement en raison de l'augmentation de l'espérance de vie et d'un meilleur accès aux outils diagnostiques.

Aux Etats-Unis, l'incidence ajustée à l'âge de la LLC est estimée à 4,1 pour 100 000 habitants<sup>124</sup>. En 2015, le nombre de nouveaux cas de LLC était de 14 620<sup>125</sup>.

## C- Etiologies

### 1- Facteurs de risque génétiques

Il existe probablement une prédisposition génétique à la LLC. Une prédisposition familiale est décrite dans 5 à 10 % des cas de LLC avec 2 cas ou plus décrits dans la même famille<sup>126,127</sup>. Le risque global est augmenté de 2 à 7 fois chez les apparentés au 1<sup>er</sup> degré d'un patient atteint de LLC<sup>1</sup>. Des cas de familles avec une transmission semblant autosomique dominante de la LLC ont été décrits<sup>128</sup>. Le risque est également augmenté en cas d'hémopathie lymphoïde dans la famille. L'âge de survenue en cas de LLC familiale a été décrit comme diminué<sup>129</sup>. Cependant une étude à partir des bases de données du cancer en Suède ne trouve pas de différence significative<sup>130</sup>.

Certaines équipes ont étudié la présence de polymorphismes génétiques pouvant constituer des facteurs de risque. Une étude par SNP-array, réalisée sur 206 familles présentant des cas de LLC issues d'Europe et d'Amérique, a permis d'identifier trois loci potentiellement intéressants situés en 2q21, 18q21 et 6p22<sup>131</sup>. En 2q21, le gène le plus pertinent identifié est *CXCR4*. Une équipe a séquencé ce gène dans 186 cas de LLC familiales, comparées à 213 cas contrôles, mettant en évidence 3 polymorphismes pouvant entraîner des conséquences fonctionnelles délétères sur le plan protéique<sup>132</sup>. Le locus 6p22 a également été étudié. Il concerne le locus du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Cependant son implication reste peu claire<sup>133</sup>.

Certains polymorphismes ont été décrits comme facteurs prédisposants. Par exemple, des SNP dans les gènes *IRF4*, *LEF1* et *BCL2* ont été décrits<sup>134</sup>. De plus, un SNP entraînant une diminution d'expression de mir15a et mir16-1 a été retrouvé dans des cas de LLC familiales. Cela entraînerait une augmentation de l'expression de ZAP70 et BCL2, aboutissant à une augmentation de la signalisation du BCR et des signaux anti-apoptotiques<sup>134</sup>.

Cependant, l'étude de polymorphismes isolés a donné des résultats peu concluants. L'association de plusieurs variants de faible risque est possible<sup>133</sup>. Des études d'association génétique pangénomique ou GWAS (pour Genome Wide Association Studies) ont été réalisées. Les SNP étudiés sont fréquents dans la population générale avec une fréquence d'au moins 5 %. Une équipe a ainsi réalisé en 2008 l'analyse de 299 983 SNP chez 1529 patients atteints de LLC, comparés à 3115 cas contrôles et a mis en évidence 6 loci à risque : 2q13,



2q37.1, 6p25 (proche du gène *IRF4*), 11q24, 15q23, 19q13<sup>135</sup>. Actuellement, 30 loci ont été identifiés dans les études GWAS comme entraînant une susceptibilité à la LLC<sup>136</sup>. Cependant, la fonction de ces différents loci reste encore méconnue. La plupart de ces SNP sont localisés dans des régions non codantes ou intergéniques, suggérant un rôle de régulation génique<sup>133</sup>.

## 2- Facteurs de risque environnementaux

Il a été démontré que l'exposition professionnelle à certains toxiques peut augmenter le risque de développer un certain nombre de cancers<sup>2</sup>. Cependant, pour la LLC, il n'a pas été prouvé de lien clair entre exposition à des toxiques et survenue de la maladie. En particulier, l'exposition aux radiations ionisantes a été étudiée, et aucune relation n'a pu être mise en évidence aussi bien dans le cadre d'une exposition professionnelle qu'après exposition aux armes nucléaires ou traitement dans le cadre de cancers solides<sup>137,138</sup>. Quelques études rapportent cependant un risque augmenté, avec notamment une surmortalité liée à la LLC en cas d'exposition à de faibles doses de radiations ionisantes<sup>139</sup>. De même, une équipe retrouve un lien entre exposition au radon et LLC<sup>140,141</sup>. Cependant, ceci reste controversé et n'a pas été confirmé dans une autre étude chez des sujets travaillant dans des mines d'Uranium<sup>142</sup>.

L'exposition aux champs magnétiques et électriques a également été étudiée et ne retrouve pas d'association significative<sup>143,144</sup>. Une étude norvégienne retrouve un risque augmenté de LLC chez les sujets vivant à proximité de lignes à haute tension, mais de façon non significative<sup>145</sup>.

L'exposition aux ultra-violets a été peu étudiée et montrerait une relation inverse, avec effet protecteur sur l'apparition de la LLC et des LNH-B en général<sup>146,147</sup>.

Plusieurs études retrouvent un risque augmenté de LLC chez les agriculteurs<sup>148,149,150,151,152,153,154</sup>. Certains types de pesticides sont mis en évidence tels que les organophosphorés<sup>153</sup>. L'exposition aux insecticides augmente le risque de LLC<sup>134</sup>.

Cependant, l'impact de ces différents facteurs reste difficile à établir du fait du faible nombre de cas de LLC, l'âge d'apparition tardif, ou le regroupement des cas de LLC avec d'autres types de leucémies ou de lymphomes<sup>155</sup>.



### 3- Facteurs liés au mode de vie

Le lien entre tabac et cancer est bien établi. Sa relation avec l'apparition de la LLC a été étudiée et il n'a pas été mis en évidence de façon claire d'impact dans le cas de la LLC<sup>155</sup>. De même, l'effet de l'utilisation de teintures capillaires reste controversé.

L'impact de l'indice de masse corporelle ou du régime a également été étudié et ne met pas en évidence de lien clair avec la survenue de la LLC<sup>155,156</sup>. Une étude récente en Espagne montre un risque augmenté en cas de régime occidental par rapport au régime méditerranéen<sup>157</sup>.

### 4- Antécédents médicaux

Les études concernant les antécédents médicaux des patients atteints de LLC se sont particulièrement intéressées aux maladies auto-immunes et ne montrent pas de relation significative avec l'apparition de la LLC<sup>155,158</sup>. L'anémie de Biermer serait associée à un risque plus élevé<sup>159</sup>.

Les antécédents de transfusion sanguine pourraient avoir un rôle dans la survenue de la LLC, mais cet aspect reste controversé<sup>160,155</sup>.

Certaines infections virales augmentent le risque de LLC, en particulier l'infection par le VHC ou les herpesvirus par exemple<sup>134,154,161</sup>. Les antécédents de pneumonies constituent un facteur de risque<sup>161,162</sup>. Cependant, il se peut qu'elles soient en fait une conséquence de l'immunodéficience liée à l'apparition de la LLC<sup>155</sup>.

## D- Physiopathologie

### 1- Origine cellulaire

L'origine cellulaire dans la LLC est une question majeure restant encore débattue. En effet, les classifications actuelles cherchent à mettre en relation le type d'hémopathie et sa contrepartie cellulaire normale. Les cellules de la LLC sont CD5+, CD23+. Ce phénotype diffère de la plupart des sous-populations B normales<sup>163</sup>. Ainsi, la maladie dériverait de cellules B CD5+<sup>164,165</sup>. Il a été proposé que la LLC dériverait d'une sous-population lymphocytaire B spécifique distincte présente dans les amygdales<sup>166</sup>. D'autres auteurs ont montré que les cellules de la LLC présentent des similarités avec les cellules de la zone marginale splénique<sup>167</sup>. Certains supposent qu'il s'agit de cellules B naïves conventionnelles du fait de cas présentant



un statut IGHV non muté avec des réarrangements stéréotypés communs<sup>168</sup>. Par ailleurs, des études de profils d'expression génique montrent des caractéristiques communes quelque soit le statut mutationnel IGHV, suggérant une origine cellulaire commune<sup>169,170</sup>. Le profil des cellules de LLC se rapproche de celui de cellules B CD5+ sanguines retrouvées chez des sujets sains, les cas IGHV non mutés correspondant à des cellules B matures CD5+, CD27- sanguines et les cas IGHV mutés étant proches de cellules post-GC CD5+, CD27+<sup>171</sup>.

## 2- Sélection par l'antigène

L'étude des réarrangements des gènes des immunoglobulines dans la LLC a mis en évidence l'utilisation récurrente de certaines régions variables chez des patients différents<sup>163</sup>. On parle de BCR stéréotypé. Certains de ces réarrangements VDJ sont dans un très grand nombre de cas associés à un réarrangement donné d'*IGK* ou *IGL*<sup>95,172</sup>. Suivant les caractéristiques des différents stéréotypes, l'immunoglobuline présente des profils distincts de réactivité à l'antigène<sup>173,174,175</sup>. Il a été montré que certains auto-antigènes tels que le facteur rhumatoïde réagissent avec le BCR de cellules de la LLC<sup>176</sup>. D'autres BCR de LLC réagissent contre des antigènes viraux tels que la protéine pUL32 du cytomégalo virus<sup>177</sup>. Ceci suggère qu'un ou plusieurs antigènes pourraient être responsables de la sélection des différents répertoires exprimés dans la LLC. La présence de néo- ou auto-antigène ou de cellules apoptotiques, agissant en synergie avec des agents pathogènes bactériens pourraient favoriser l'émergence de progéniteurs de LLC ou des cellules malignes, via la production en continu de BCR avec des caractéristiques structurales particulières<sup>178</sup>.

## 3- Altérations génétiques

### *a- Anomalies cytogénétiques*

De nombreuses anomalies cytogénétiques récurrentes sont retrouvées dans la LLC. Les principales sont la délétion du bras long du chromosome 13 (del(13q)), la trisomie 12, la délétion du bras long du chromosome 11 (del(11q)), et la délétion du bras court du chromosome 17 (del(17p)). Ces anomalies sont associées à un pronostic différent. Ces différentes anomalies et leur impact pronostique seront détaillées dans le paragraphe sur les marqueurs pronostiques de la LLC (page 101).



## *b- Mutations somatiques*

Avec l'apparition du NGS, de nombreuses mutations somatiques ont été mises en évidence. Les principales concernent les gènes *TP53*, *NOTCH1*, *BIRC3* et *SF3B1*. De nombreuses études se sont intéressées à l'impact pronostique de ces différentes mutations. Ceci est développé dans le paragraphe sur les marqueurs pronostiques de la LLC (G-3-Mutations récurrentes hors *IGHV*, page 111).

## *c- Modifications épigénétiques*

Des dérégulations épigénétiques sont retrouvées dans les cancers et entraînent l'activation d'oncogènes ou la sous-régulation de suppresseurs de tumeur, aboutissant à la prolifération cellulaire<sup>179</sup>.

Dès la fin des années 1980, une équipe s'est intéressée à la méthylation d'oncogènes tels que *MYC* dans la LLC et d'autres hémopathies en comparaison à des leucocytes de donneurs sains<sup>180</sup>. La méthylation de l'ADN entraîne une inactivation génique. Ils ont montré une hypométhylation de ces différents gènes dans la LLC. Au début des années 1990, une autre équipe démontre une hypométhylation génomique globale dans la LLC<sup>181</sup>. Ces résultats ont été confirmés plus récemment<sup>182,183</sup>. De plus, une hypométhylation des séquences satellites alpha serait un marqueur pronostique associé à une survie sans traitement plus courte<sup>183</sup>. L'hypométhylation globale dans la LLC a été également mise en évidence avec les techniques de NGS en 2012, et toucherait principalement l'intérieur des gènes et les séquences enhancer<sup>184</sup>. Ceci a été confirmé par une autre équipe, retrouvant une hypométhylation des enhanceurs et des motifs de liaison aux facteurs de transcription, alors que les régions transcrites étaient hyperméthylées<sup>185</sup>. Les gènes affectés par cette hyperméthylation peuvent être de différents types : suppresseurs de tumeurs, codant des facteurs de transcription, ou des miARN ou des gènes impliqués dans la survie et la prolifération, ou associés à un pronostic donné<sup>186</sup>. Par exemple, la méthylation d'un ou plusieurs sites CpG dans l'intron 1 de *ZAP70* est corrélée à une perte d'expression du gène, à un statut *IGHV* muté et un bon pronostic<sup>187,188,189</sup>.

Le profil de méthylation a été étudié suivant les sous-groupes de LLC, en particulier suivant le statut mutationnel *IGHV*. Une étude retrouve 3265 sites CpG méthylés différemment<sup>184</sup>. En se basant sur la méthylation des îlots CpG, il est possible de regrouper les cas de LLC en 3 catégories distinctes : les NBC-like LLC (pour Cellules B naïves), les MBC-like LLC (pour Cellules B mémoires) et les i-LLC (pour intermédiaires). Les NBC-like LLC regroupent majoritairement les cas *IGHV* non mutés et sont associées à un pronostic péjoratif ; les MBC-like LLC rassemblent les cas *IGHV* mutés et ont un pronostic favorable ; les i-LLC ont des caractéristiques intermédiaires et dériveraient d'un autre sous-type cellulaire, possiblement des cellules B exposées à l'antigène mais n'étant pas passées par le centre germinatif<sup>184</sup>. Cependant, récemment, l'étude du méthylome dans différents stades de maturation



lymphocytaire B montre que certaines anomalies décrites dans la LLC sont en fait retrouvées dans des cellules normales<sup>185,190</sup>. Il faudra donc revoir les anomalies décrites et les comparer aux stades de développement B pour définir les modifications réellement pathogéniques<sup>186</sup>.

Dans la LLC, il a été montré que le profil de méthylation de l'ADN est relativement stable au cours du temps et hautement similaire dans les cellules sanguines (quiescentes) et nodulaires (proliférantes)<sup>191</sup>. Ceci implique donc que la méthylation aberrante retrouvée dans la LLC est un événement précoce dans la lymphomagenèse. Il existerait cependant des modifications subtiles et non récurrentes du profil de méthylation au cours du temps et en fonction des traitements à l'échelon individuel<sup>184</sup>. Il a été montré qu'une augmentation de l'hétérogénéité de la méthylation est corrélée avec une complexité génétique sous-clonale avancée, suggérant une co-évolution de nouveaux profils de méthylation avec les altérations génétiques<sup>192</sup>. Cette hétérogénéité de la méthylation qui apparaîtrait au hasard est associée à une évolution clinique péjorative<sup>193</sup>. Les auteurs parlent de méthylation désordonnée et suggèrent que cela constitue, comme l'instabilité génétique, un mode d'évolution et de survie pour les cellules cancéreuses.

Des modifications dans la régulation des enzymes modifiant les histones contribuent également à l'initiation et la progression des cancers<sup>194</sup>. Dans la LLC, l'expression aberrante d'EZH2 (pour Enhancer of Zest homolog 2) et les mutations affectant les composants des complexe de remodelage de la chromatine sont impliqués dans la pathogénèse de la LLC<sup>186</sup>.

EZH2 est une sous-unité de PRC2 (pour Polycomb Repressive Complex 2) qui catalyse la triméthylation de H3K27, entraînant une extinction transcriptionnelle<sup>186</sup>. *EZH2* peut être muté et surexprimé dans différents types de cancers. Dans la LLC, seule la surexpression d'EZH2 a été rapportée<sup>186</sup>. Elle touche principalement les cas IGHV non mutés<sup>195</sup>. Elle est associée à une fréquence diminuée des altérations de *TP53* parmi les LLC IGHV non mutées. Elle entraîne une augmentation de la triméthylation de H3K27 et est liée à une augmentation de la viabilité cellulaire. A l'inverse, il a été montré que la sous-régulation d'EZH2, via l'utilisation d'inhibiteurs, provoque une apoptose<sup>195</sup>. Les mécanismes responsables de cette surexpression d'EZH2 sont multiples. La sous-expression de miR-101 a été démontrée dans les cancers et dans la LLC<sup>196,197</sup>. Celui-ci se lie à l'ARNm d'EZH2 et entraîne sa dégradation. Le microenvironnement pourrait également influencer l'expression d'EZH2<sup>186</sup>. La stimulation des cellules de LLC par le CD40L entraîne l'activation de la voie NFκB non canonique et induit l'expression d'EZH2 responsable de la sous-régulation de gènes associés avec la sénescence cellulaire<sup>198</sup>. Il a également été montré que c-Rel, qui fait partie des facteurs de transcription de la voie NFκB, induit l'expression d'EZH2 dans les lymphocytes activés et les cellules lymphoïdes malignes<sup>199</sup>.

Les mutations de gènes codant des composants des complexes de remodelage de la chromatine pourraient influencer la pathogénèse de la LLC<sup>186</sup>. Ceux-ci peuvent réguler la réparation de l'ADN, la réplication et la transcription<sup>186</sup>. Des mutations de *ARID1A* (pour AT-Rich Interaction Domain 1A) codant une sous-unité d'un complexe de remodelage de la chromatine, sont retrouvées dans environ 2 % des LLC<sup>200</sup>. Dans d'autres types de cancers, des



mutations perte de fonction ont été retrouvées, laissant supposer qu'il s'agit d'un gène suppresseur de tumeur et d'un régulateur du cycle cellulaire<sup>201,202,203,204</sup>. Le rôle d'ARID1A dans la pathogénèse de la LLC reste à établir<sup>186</sup>. Des mutations de *CHD2* (pour Chromodomain Helicase DNA binding protein 2) ont été rapportées dans environ 5 % des cas de LLC<sup>205,206</sup>. La majorité de celles-ci sont des mutations tronquantes ou touchant des résidus conservés de domaines fonctionnels, laissant supposer un potentiel rôle de suppresseur de tumeur<sup>205</sup>. Elles sont retrouvées principalement dans les cas IGHV mutés<sup>206,205</sup>.

Les mutations touchant des gènes codant des enzymes régulatrices de l'épigénome sont rares dans la LLC. Parmi ces gènes, le plus fréquemment muté (environ 4 % des cas) est *SETD2* (pour SET domain containing 2) qui code une histone méthyl transférase responsable de la triméthylation de H3K36 associée avec des régions activement transcrites<sup>186,207</sup>. Ce gène peut également être délété dans 3 % des cas<sup>208</sup>. Ces délétions sont associées avec les anomalies de *TP53*, la présence d'un caryotype complexe et le chromothripsis<sup>a</sup>. Les anomalies de *SETD2* semblent être mono-alléliques et seraient de mauvais pronostic<sup>208</sup>.

#### *d- Altérations de miARN*

Les miARN sont de courts ARN simple brin non codants qui régulent l'expression de gènes via la répression traductionnelle ou la dégradation de transcrits<sup>211</sup>. Une dérégulation des miARN a été démontrée dans les cancers, et en particuliers les hémopathies. Leur rôle peut être celui de suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes (ou oncomirs), mais aussi de régulateurs des capacités invasives des cellules tumorales<sup>212,213</sup>.

Dès 2002, l'implication des miARN dans la LLC a été décrite<sup>214</sup>. Deux miARN situés en 13q14 sont décrits : miR15 et miR16. La délétion du bras long du chromosome 13 entraîne la perte de ces deux miARN. Ceci a été validé par SNP-array<sup>215</sup>. Une étude rapporte la présence de mutation germinale dans le précurseur primaire mir16-1- miR15a, entraînant une diminution de l'expression de ces miARN, et souvent associée à la délétion de l'autre allèle<sup>216</sup>. Une équipe a montré dans un modèle murin de LLC que des mutations ponctuelles de la région 3' flanquante de miR16-1 entraînent une diminution de l'expression de miR16-1<sup>217</sup>. Un autre groupe a montré que les niveaux d'expression de ces deux miARN sont inversement corrélés à celui de BCL2<sup>218</sup>. Ces miARN régulent également l'expression de BCL2 à un niveau post-transcriptionnel. Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence une homologie entre les

---

<sup>a</sup> Le chromothripsis (du grec, chromos pour chromosome, et thripsis pour briser en éclats) est un phénomène caractérisé par de multiples réarrangements (de quelques dizaines jusqu'à plusieurs centaines) affectant un seul ou un faible nombre de chromosomes, survenu au cours d'un seul événement considéré comme catastrophe cellulaire<sup>209,210</sup>. Cela entraîne une oscillation du nombre de copies autour de 2, et normalement pas plus de 3 niveaux différents<sup>209,210</sup>.





extrémités 5' de ces deux miARN et la séquence de l'ARNm de BCL2. De plus, l'inhibition de BCL2 par miR15 et miR16-1 dans une lignée cellulaire leucémique entraîne l'apoptose<sup>218</sup>. Une autre étude basée sur les profils d'expression de gènes prédits par informatique comme potentiellement cibles de ces deux miARN montre également une régulation de BCL2<sup>219</sup>. Cependant, cela reste controversé. Une équipe ne retrouve une diminution significative d'expression de miR15a et miR16-1 qu'en cas de délétion du bras long du chromosome 13 homozygote, et ne met pas en évidence de relation avec l'expression de BCL2<sup>220</sup>. Il a par ailleurs été démontré que miR-16 entraîne la régulation négative de transcrits de gènes dont l'extinction entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1.

Un autre miARN important dans la LLC est miR29. Il a été décrit comme un miARN suppresseur de tumeur ciblant plusieurs oncogènes dont *TCL1* (pour T-Cell Leukemia/Lymphoma 1)<sup>221,222</sup>. Une expression élevée de *TCL1* est corrélée à un phénotype agressif dans la LLC et avec un statut IGHV non muté<sup>223</sup>. *TCL1* interagirait avec ATM (pour Ataxia Telangiectasia Mutated) et entraînerait une activation de la voie NFκB<sup>224</sup>. miR-181b serait également un régulateur de *TCL1*<sup>221</sup>. Par ailleurs, une équipe a montré qu'une diminution de son expression serait un marqueur de progression de la maladie<sup>225</sup>.

La dérégulation des miARN par modifications épigénétiques est un événement important dans le développement de la LLC<sup>216,226</sup>. La méthylation aberrante permet l'extinction transcriptionnelle de certains miARN<sup>227,228</sup>. Par exemple, miR129-2 est un miARN suppresseur de tumeur fréquemment méthylé dans la LLC<sup>229</sup>. Cette méthylation est associée à une survie réduite. Un autre miARN suppresseur de tumeur, miR9-3 est méthylé fréquemment dans la LLC<sup>230</sup>. Il régulerait normalement négativement la voie NFκB.

Le profil d'expression des miARN dans la LLC a été étudié<sup>231,220</sup>. Plusieurs équipes ont essayé de relier ces profils avec les marqueurs pronostiques connus tels que le statut mutationnel IGHV<sup>216,220</sup>. De plus, l'expression de certains miARN tels que miR21 et miR181b sont des facteurs pronostiques indépendants<sup>232</sup>. Enfin, miR34-a, cible de p53, est significativement sous exprimé en cas d'anomalie de *TP53*, mais son expression est très variable dans les autres cas<sup>233</sup>. Des niveaux bas d'expression de miR34-a sont associés à un temps de doublement de la lymphocytose réduit et une survie sans traitement plus courte.

### *e- Rôle des lncRNAs*

Parmi les lncRNAs potentiellement impliqués dans la LLC, DLEU1 et DLEU2 (pour Deleted in Lymphocytic leukemia 1 et 2) ont été particulièrement étudiés<sup>110</sup>. Ils sont localisés en 13q14.1 et sont délétés dans plus de la moitié des cas de LLC<sup>234</sup>. Dans cette même région sont situés miR15a et miR16-1 dont le rôle a été décrit page 86. Il a été démontré dans des modèles murins que la délétion de l'ensemble du cluster Dleu2/miR15a/miR16-1 entraîne une lymphoprolifération semblable à la LLC et plus agressive qu'en cas de délétion de miR15a/miR16-1 seuls<sup>235</sup>. Il a été observé dans des lignées cellulaires cancéreuses que DLEU2



inhibe la croissance cellulaire et la capacité à former des colonies de façon dépendante de miR15a/miR16-1<sup>236</sup>. DLEU2 régule négativement le niveau d'expression des Cyclines D1 et E1 via miR15a/miR16-1. De plus, des modifications épigénétiques telles que la déméthylation de DLEU1 et de l'isoforme DLEU2/Alt1 est fréquente dans la LLC et entraîne une régulation négative de la transcription de DLEU2 et miR15-a/miR16-1, ainsi que de gènes suppresseurs de tumeurs proches régulant l'activité de NFκB<sup>237</sup>.

Deux lncRNAs intervenant dans la voie p53 sont également impliqués dans la LLC : NEAT1 (pour Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) et lincRNA-p21 (lincRNA pour long intergenic non coding RNA)<sup>238</sup>. Ils sont induits en cas de dommage de l'ADN en présence de p53 fonctionnel. Ainsi, en cas d'anomalie de *TP53* dans la LLC, ces lncRNA seront sous exprimés. Il a également été montré que p53 se lie au promoteur de NEAT1<sup>238</sup>. L'utilisation de nutlin-3, un inhibiteur de MDM2, induit la transcription de NEAT1 et lincRNA-p21 sous la dépendance de p53. NEAT1 régulerait la rétention de certains ARNm, entraînant une répression traductionnelle<sup>239</sup>.

MIAT (pour Myocardial Infarction Associated Transcript) est un lncRNA surexprimé dans les lignées lymphoïdes avec un phénotype B mature, dont la LLC<sup>240</sup>. Cette surexpression est plus marquée dans les formes agressives (formes avec délétion du bras court du chromosome 17 ou du bras long du chromosome 11, ou trisomie 12) que dans les formes indolentes (délétion du bras long du chromosome 13) de LLC. De plus, MIAT produit une boucle de régulation avec OCT4, et ces deux molécules seraient essentielles pour la survie cellulaire<sup>240</sup>. MIAT s'accumule dans le noyau dans des corps nucléaires spécifiques et pourrait affecter l'épissage et exercer une régulation sur l'expression de gènes<sup>241</sup>. MIAT favoriserait la prolifération des cellules B matures malignes<sup>110</sup>.

BM742401 est un lncRNA dont le promoteur est fréquemment méthylé dans la LLC, alors qu'il est déméthylé dans les cellules B normales sanguines<sup>242</sup>. Il s'agirait d'un suppresseur de tumeur et sa méthylation dans la LLC serait corrélée avec un stade clinique avancé (Rai ≥ 2) et une lymphocytose plus élevée. Sa surexpression dans des lignées cellulaires entraîne l'inhibition de la prolifération cellulaire et favorise l'apoptose. Les mécanismes exacts de ses fonctions de suppresseur de tumeur sont encore à préciser.

Quelques études ont été réalisées sur l'expression globale des lncRNA dans la LLC. Une première étude de NGS des ARN met en évidence 127 lncRNA exprimés de façon différente entre des cellules normales et de LLC<sup>243</sup>. Une autre équipe a réalisé le profil d'expression des lncRNA chez 217 patients atteints de LLC en stade Binet A, en comparaison avec 26 sous-populations de cellules B normales sanguines et amygdaliennes<sup>244</sup>. Une signature de 24 lncRNA spécifiquement dérégulés dans la LLC a été mise en évidence. Quelques lncRNA étaient associés à certains groupes pronostiques tels que le statut IGHV non muté, la délétion du bras long du chromosome 11 ou du bras court du chromosome 17 et le statut *NOTCH1* muté). Enfin, l'expression de deux lncRNA (lnc-IRF2-3 et lnc-KIAA1755-4) permettait de différencier trois groupes pronostiques. Le groupe de haut risque présentait une expression élevée concomitante de ces deux lncRNA, tandis que le groupe de bas risque avait des niveaux bas d'expression. Les autres cas étaient classés dans un profil de risque intermédiaire.



Le rôle des lncRNA dans la LLC commence à émerger et de futures études permettront de mieux comprendre leur rôle dans la pathogénèse et probablement de les intégrer dans des scores pronostiques.

## 4- Microenvironnement

Le microenvironnement tissulaire joue un rôle primordial dans la pathogénèse de la LLC. Les événements majeurs de la pathogénèse ont lieu dans les organes lymphoïdes périphériques et la moelle osseuse où un microenvironnement favorable est établi et maintenu par la coévolution de cellules tumorales et normales<sup>245</sup>. Le microenvironnement de la LLC possède les mêmes caractéristiques que les microenvironnements dans le cancer c'est-à-dire de nouveaux vaisseaux (angiogénèse) pour l'apport de nutriments, la production locale de facteurs de croissance et la protection des cellules malignes contre le système immunitaire<sup>245</sup>.

Alors que la majorité des cellules de LLC sanguines ne se divisent pas, elles prolifèrent au niveau des tissus. Cette prolifération a lieu au niveau de centres de prolifération ou pseudo-follicules<sup>246</sup>. Les cellules sont alors en contact étroit avec des cellules accessoires telles que les lymphocytes T, des cellules stromales d'origine mésenchymateuse, et des cellules «nurse-like» dérivant des monocytes<sup>163,247,248,249</sup>. Des études d'expression génique montrent que les cellules de LLC issues des ganglions ont une expression plus forte de E2F et MYC par rapport aux cellules sanguines<sup>250</sup>. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les cellules de LLC ont une activation de la signalisation du BCR et des récepteurs de la famille du TNF (pour Tumor Necrosis Factor). Les cellules produites dans les tissus et échappant à l'apoptose s'accumulent et pourraient passer dans le sang, puis ré-entrer dans les tissus pour continuer à proliférer<sup>245</sup>.

### a- Les acteurs du microenvironnement

#### i- Les cellules « nurse-like »

Il s'agit de cellules dérivées des monocytes. Ces cellules ont été décrites initialement *in vitro*<sup>251</sup>. Les monocytes cultivés avec des cellules de LLC se différenciaient spontanément en cellules «nurse-like» qui pouvaient promouvoir la survie et la prolifération des cellules de LLC<sup>252</sup>. Elles ont été identifiées *in vivo* dans les ganglions et la moelle osseuse de patients atteints de LLC, et elles sont corrélées à la viabilité des lymphocytes leucémiques<sup>251,253</sup>. Une étude montre que l'activation des voies RAGE (pour Receptor for Advanced Glycation End-product) et du TLR9 par la libération d'HMGB1 (pour High Mobility Group Box 1) par les cellules de LLC entraîne la différenciation en cellules «nurse-like»<sup>254</sup>. Les cellules «nurse-like» expriment fortement les gènes correspondant aux molécules d'adhésion et interagissent avec les cellules de la LLC via des chimiokines et des cytokines dont BAFF (pour B-cell Activating



Factor) et APRIL (pour A Proliferation-Inducing Ligand)<sup>255</sup>. Elles sécrètent également du CD14 soluble sous l'action des cellules de la LLC, ce qui favorise la survie de ces dernières<sup>256</sup>. *In vitro*, cela entraîne une augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que BCL2<sup>257</sup>.

## ii- Les cellules stromales mésenchymateuses

Elles sont considérées comme la partie nourricière pour les progéniteurs hématopoïétiques normaux<sup>251</sup>. Dans la moelle osseuse, elles contribuent à l'architecture médullaire. Elles sont retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires des patients atteints de LLC<sup>248</sup>. Elles sécrètent de façon constitutive des chimiokines permettant le recrutement des cellules de LLC<sup>251</sup>. De plus, par contact direct, elles induisent *in vitro* une sur-régulation de facteurs (dont ZAP70 et le CD38) qui favorisent la survie et la prolifération des lymphocytes de LLC<sup>258</sup>. Elles augmentent également la synthèse de glutathion et la glycolyse, entraînant la survie et une résistance au traitement<sup>259</sup>. Au niveau de la moelle, les cellules stromales favorisent la survie via ROR1 (pour Receptor tyrosine kinase like Orphan Receptor 1)<sup>260</sup>. Il s'agit d'un récepteur à domaine tyrosine kinase dont l'expression est fortement augmentée dans la LLC<sup>169</sup>. Son expression est faible dans le sang normal<sup>261</sup>. ROR1 serait impliqué dans la survie cellulaire<sup>262</sup>.

## iii- Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont en contact étroit avec les lymphocytes de la LLC<sup>251</sup>. Ils fournissent des signaux de régulation dans la niche tissulaire<sup>263</sup>. Il a été mis en évidence une activation chronique et un épuisement, avec en particulier l'expression de marqueurs d'épuisement tels que CD244, CD160 et PD1, entraînant des défauts de cytotoxicité, de formation de la synapse immunologique avec les cellules présentatrices d'antigène, et de migration<sup>264</sup>.

## iv- Les lymphocytes NK

Les cellules NK du microenvironnement de la LLC ont une capacité réduite à lyser les cellules de LLC avec un défaut en granules cytoplasmiques<sup>251</sup>. Elles sont également déficientes dans la polymérisation de l'actine et la formation de la synapse immunologique<sup>251</sup>. Les cellules de la LLC pourraient également inhiber les cellules NK par contact direct. Il a été montré que les patients atteints de LLC ont une hyperexpression plasmatique de la molécule HLA-G (HLA pour Human Leukocyte Antigen), ce qui induit l'apoptose des cellules NK et perturbe leur pouvoir cytotoxique<sup>265</sup>.



## v- Les cellules suppressives d'origine myéloïde ou MDSC pour Myeloid-Derived Suppressor Cells

Les MDSC jouent un rôle dans les défauts mis en évidence dans les lymphocytes T et NK du microenvironnement de la LLC<sup>251</sup>. Elles ont un phénotype myéloïde aberrant (CD14b+ et HLA-DR-). Les MDSC sont augmentées chez les patients atteints de LLC non traités. Elles suppriment les fonctions T dans le microenvironnement et induisent des lymphocytes T régulateurs.

## vi- Les cellules endothéliales et les cellules folliculaires

Ces cellules sont essentielles pour le « homing » et la rétention des cellules de LLC dans les tissus<sup>251</sup>. L'adhésion aux cellules endothéliales induit la survie, l'activation et la résistance au traitement des cellules de LLC<sup>251</sup>. Cette interaction se ferait via des intégrines. Le contact avec les cellules folliculaires dendritiques passerait par le CD44 (récepteur membranaire de l'acide hyaluronique) exprimé sur les cellules de LLC, ainsi que via l'acide hyaluronique<sup>251</sup>. Le CD44 interagit avec d'autres protéines de surface et cytoplasmiques exprimées par les cellules de LLC telles que le CD38 et ZAP70. L'inhibition du CD44 par un anticorps monoclonal entraîne une activité cytotoxique directe pour les cellules de LLC, tout en ayant peu d'effet sur les cellules B normales<sup>266</sup>. Ainsi, le CD44 pourrait être une cible thérapeutique. Le CD27 est également impliqué dans l'interaction avec le stroma. Son expression est corrélée avec l'expression de ZAP70 et est augmentée lors de la liaison du BCR<sup>251</sup>.

### *b- L'activation des voies de signalisation du BCR*

Les interactions entre les cellules de la LLC et du microenvironnement dépendent d'un BCR fonctionnel, permettant l'interaction avec l'antigène, et l'activation des voies de signalisation en aval<sup>245</sup>.

Les signalisations-réponses du BCR sont hétérogènes dans la LLC<sup>267</sup>. D'un côté, il existe des cas de LLC qui semblent non répondeurs à la stimulation de l'IgM de surface. Ceci est plus fréquent parmi les cas de LLC IGHV muté et est associé à une maladie indolente<sup>268</sup>. Cependant, parmi les cas répondeurs, il existe une hétérogénéité de la réponse *in vitro*<sup>267</sup>. Il semble que les niveaux d'expression de l'IgM de surface soient le principal déterminant de ces différences de réponses<sup>267</sup>. En général, l'immunoglobuline de surface est faiblement exprimée dans la LLC, mais avec des niveaux variables<sup>267</sup>. Cela pourrait être dû à une stimulation répétée par l'antigène ou une sous-modulation du récepteur. Une forte sous-modulation semble contribuer à la perte des signalisations-réponses de l'IgM, en particulier dans les cas IGHV



mutés<sup>268</sup>. La perte de la capacité de signalisation dans la LLC est associée avec une activation constitutive de ERK et du facteur nucléaire des cellules T activées, ce qui est en faveur du fait qu'une stimulation continue par l'antigène *in vivo* conduit à l'anergie<sup>269</sup>. Une sous-modulation moins importante, caractéristique plus fréquente dans les LLC IGHV non mutées, entraîne un maintien de la capacité de signalisation, se traduisant par une activation partielle des voies en aval et mimant les caractéristiques des cellules B anergiques murines<sup>267</sup>. Ce maintien plus fort de la capacité de signalisation dans les LLC IGHV non mutées pourrait être important pour le comportement de la tumeur<sup>267</sup>.

Des hétérogénéités dans la signalisation-réponse existent au sein du clone malin et pourraient être le reflet de temps différents de la stimulation par l'antigène parmi les cellules sanguines recirculantes<sup>267</sup>. Enfin, l'activation de différents isotypes d'immunoglobuline de surface pourrait également entraîner des réponses variables<sup>267</sup>. L'activation de l'IgM de surface entraîne *in vitro* soit l'absence de réponse, soit une activation relativement persistante de ERK1/2, tandis que l'activation de l'IgD entraîne une réponse transitoire dans quasiment toutes les cellules de LLC<sup>267,270</sup>. L'activation persistante de ERK1/2 est critique pour la ré-entrée dans le cycle cellulaire, ce qui pourrait expliquer pourquoi la signalisation induite par l'IgD ne semble pas influencer le comportement de la maladie<sup>267</sup>. La différence de comportement entre l'IgM et l'IgD de surface pourrait être due à leurs niveaux d'expression relatifs ou à des différences dans l'association de cofacteurs de signalisation<sup>267</sup>. Les cas de LLC ayant effectué la commutation de classe isotypique sont relativement rares et ont donc été moins étudiés.

Bien que la modulation de l'IgM de surface joue un rôle important dans la détermination de la signalisation-réponse, d'autres facteurs doivent également intervenir<sup>267</sup>. La capacité de signalisation du BCR est corrélée avec l'expression de ZAP70 et la surexpression de ZAP70 augmente cette signalisation<sup>271,272</sup>. ZAP70 pourrait augmenter indirectement l'activation de SYK et/ou séquestrer des inhibiteurs de SYK<sup>273</sup>. ZAP70 pourrait également moduler d'autres voies de signalisation dont celles contribuant à la migration cellulaire<sup>267</sup>. L'expression du CD38 est corrélée à la capacité de signalisation de l'IgM<sup>274</sup>. Le CD38 s'associe à l'IgM dans les cellules de LLC, mais sa capacité à moduler directement les signalisations-réponses n'est pas clairement identifiée<sup>267,275</sup>. L'interaction CD38-CD31 semble contribuer aux voies impliquées dans la migration et le homing, et augmente la survie via l'induction de BCL2 et BCL-xL<sup>267,276,277</sup>.

De nombreux autres facteurs sont exprimés de façon différente dans la LLC et peuvent dans certains cas moduler directement la capacité de signalisation de l'IgM<sup>267</sup>. Cependant, la perte de capacité de la signalisation-réponse est associée à l'absence de phosphorylation induite par SYK, ce qui est un événement précoce dans la formation du signalosome<sup>267,270</sup>. Il semble donc qu'une étape régulatrice clé doit exister au niveau ou à proximité du récepteur<sup>267</sup>. Les réponses des lymphocytes de LLC *in vivo* sont potentiellement dépendantes des caractéristiques des cellules elles-mêmes et de l'antigène qui interagit (soluble versus lié au tissu/macromolécule), ainsi que de la présence potentielle de cellules supports<sup>267</sup>.



### *c- Le rôle des Toll-like receptors*

Les Toll like receptors ou TLR sont des récepteurs de surface faisant partie du système immunitaire inné. Ils sont capables de se lier à des antigènes microbiens de structure conservée et d'activer ensuite les réponses immunitaires innées<sup>163</sup>. Différents TLR sont exprimés dans la LLC, dont le TLR7 et le TLR9, et leur stimulation peut induire l'expression membranaire de marqueurs d'activation tels que CD25 et CD86<sup>278</sup>.

La voie de signalisation des TLR dans le microenvironnement ganglionnaire pourrait contribuer à l'activation de NFκB, l'expression de molécules co-stimulatrices et la régulation de la survie des cellules de LLC<sup>279</sup>. Il a été démontré que la stimulation des TLR peut diminuer la sensibilité des cellules à la fludarabine *in vitro* lorsqu'elles sont porteuses d'anomalies de mauvais pronostic telles qu'un statut IGHV non muté<sup>280</sup>. De plus, la perte de TIR8 (pour Toll Interleukine-1 Receptor 8) favorise la progression de la LLC dans un modèle murin<sup>281</sup>. Cela suggère que la coopération entre BCR et TLR et/ou leur régulation pourraient impacter l'évolution du clone malin<sup>245</sup>.

### *d- Les chimiokines*

Les récepteurs de chimiokines et les molécules d'adhésion exprimées par les cellules de LLC sont critiques pour le « homing » et leur rétention dans les tissus<sup>282</sup>. Notamment, le contact avec les cellules stromales accessoires présentes dans le microenvironnement fournissent aux cellules de LLC des signaux de survie<sup>283,284</sup>. Les cellules « nurse-like » dans le ganglion et les cellules stromales médullaires attirent les cellules de LLC via les récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR5 qui sont fortement exprimés dans la LLC. Certaines chimiokines telles que CCL3, CCL4, CCL22 et l'interleukine 8 sont sécrétées par les cellules de LLC et peuvent recruter des lymphocytes T et d'autres cellules accessoires pour promouvoir la survie<sup>245</sup>. La régulation de CXCR4 par CXCL12 induit le trafic continu des cellules entre le stroma et le sang. L'expression de CXCR4 peut être utilisée comme marqueur pour identifier les cellules qui ont récemment quitté ou qui vont retourner dans le stroma<sup>285</sup>.

Les cellules de LLC ZAP70+ migrent plus rapidement sous l'effet de chimiokines *in vitro*<sup>286</sup>.



## *e- Le cytosquelette*

La protéine HS1 (pour Hematopoietic lineage cell-specific protein 1) est un régulateur du remodelage du cytosquelette, contrôlant le trafic et le homing des lymphocytes<sup>287</sup>. Elle influence l'invasion tissulaire et l'infiltration dans la LLC. HS1 est un régulateur de l'actine au niveau de la synapse immunologique des cellules T, et elle influence dans les cellules NK et les cellules dendritiques différentes fonctions telles que la lyse de cellules cibles, l'adhésion cellulaire, le chimiotactisme et l'assemblage de l'actine au niveau de la synapse lytique<sup>288</sup>. Ceci suggère l'importance de l'organisation du cytosquelette dans le trafic et le « homing » des cellules de la LLC.

## **E- Clinique**

### **1- Présentation clinique classique**

Les caractéristiques cliniques sont très variables (présentation, évolution...). La plupart des patients sont asymptomatiques, mais certains patients présentent une asthénie, une anémie hémolytique auto-immune, des infections, une splénomégalie, une hépatomégalie, des adénopathies. Un petit pic monoclonal peut être retrouvé<sup>134</sup>.

En général, la moelle est infiltrée, ainsi que les ganglions, le foie et la rate. D'autres sites extraganglionnaires peuvent parfois être impliqués<sup>1</sup>. La peau est le principal organe non lymphoïde pouvant être infiltré, mais cela représente moins de 5 % des cas<sup>2</sup>. Une atteinte gastro-intestinale ou méningée est extrêmement rare<sup>2</sup>.

Dans environ 25 % des cas, le diagnostic de LLC a lieu à la suite de la découverte fortuite d'une hyperlymphocytose sur un bilan biologique de routine<sup>2,134</sup>. Parfois, ce sont l'apparition d'adénopathies persistantes ou des signes cliniques en lien avec des cytopénies auto-immunes qui amènent le patient à consulter.

L'évolution clinique de la LLC est très hétérogène. Environ un tiers des patients ont une survie prolongée, supérieure à 20 ans, ne nécessitant aucun traitement et décèderont de causes sans rapport avec la LLC. Dans un tiers des cas, les patients vont présenter une maladie agressive et nécessiter immédiatement un traitement. Enfin, les autres vont connaître une phase initiale indolente suivie d'une progression de la maladie<sup>289</sup>.

Dans 3 à 10 % des cas, la LLC peut transformer en lymphome agressif (le syndrome de Richter)<sup>290</sup>. Le pronostic est alors sombre.





Parfois, la LLC peut évoluer vers une leucémie prolymphocytaire, associée à une évolution péjorative. Cette entité est principalement définie sur le plan cytologique avec la présence de plus de 55 % de formes prolymphocytaires<sup>1</sup>.

## 2- Les variants

### *a- Le lymphome lymphocytaire*

Le lymphome lymphocytaire est considéré comme étant la même entité que la LLC selon la classification OMS<sup>1,291</sup>. Dans ce cas, le clone lymphocytaire est localisé au niveau des ganglions ou de la rate, la phase leucémique étant inférieure à 5 G/L. Peu d'études s'intéressent actuellement aux différences entre ces 2 entités. Une équipe a évalué différents paramètres selon la lymphocytose sanguine et retrouve des différences concernant les caractéristiques génétiques (anomalies cytogénétiques moins fréquentes et statut muté des gènes de la chaîne lourde des immunoglobulines dans le lymphome lymphocytaire) et immunophénotypiques (positivité du CD38 plus fréquente que dans la LLC)<sup>292</sup>. La survie et le taux de réponse au traitement n'était pas significativement différents suivant la lymphocytose. Une autre équipe rapporte des différences cytogénétiques avec une fréquence plus élevée de trisomie 12 dans le lymphome lymphocytaire, et diminuée de délétion du bras long du chromosome 13<sup>293</sup>. Plus récemment, une étude portant sur 890 cas de LLC et lymphome lymphocytaire (dont 113 cas de lymphome lymphocytaire) confirme la fréquence plus élevée de trisomie 12 et de la positivité du CD38, mais rapporte un statut non muté des gènes de la chaîne lourde des immunoglobuline plus fréquent<sup>294</sup>. Des mutations de *NOTCH1* sont retrouvées dans de nombreux cas. Le lymphome lymphocytaire peut évoluer vers une LLC. La survie globale est moins bonne que dans la LLC, avec un taux de transformation plus élevé<sup>294</sup>.

### *b- La lymphocytose B monoclonale*

La lymphocytose B monoclonale (ou MBL pour Monoclonal B-cell Lymphocytosis) correspond à la mise en évidence d'un clone lymphocytaire B sanguin représentant moins de 5 G/L (critère nécessaire pour le diagnostic de LLC) et en l'absence d'adénopathie ou de signe clinique (critères pour parler de lymphome lymphocytaire). La notion d'adénopathie est basée sur la palpation d'adénopathie avec un seuil de 1,5 cm, plutôt que sur l'imagerie<sup>295</sup>.

L'apparition de cette nouvelle entité en 2008 ainsi que la modification du seuil pour parler de LLC impliquent une reclassification de certains patients dans les études datant d'avant ces critères.



La classification OMS 2016 différencie les MBL « low count » dans lesquelles la lymphocytose clonale est inférieure à 0,5 G/L, des MBL « high count » dans lesquelles le clone est compris entre 0,5 et 5 G/L<sup>291</sup>. Les cas de MBL « low count » ont des caractéristiques différentes de la LLC et ont un faible risque de progression.

On distingue également les MBL type LLC dont les caractéristiques immunophénotypiques sont celles de la LLC (CD5+, CD23+), des MBL non LLC (CD5-) et des MBL atypiques (CD5+, CD23- ou CD20fort)<sup>296,297</sup>.

Les sujets présentant une MBL « low count », bien que persistante dans la majorité des cas, ont un risque très faible d'évoluer vers une LLC<sup>298</sup>. De plus, l'espérance de vie est similaire à celle de la population générale<sup>295</sup>.

Actuellement les MBL « high count » sont supposées être un stade précurseur de la LLC au cours duquel des anomalies génétiques sont acquises selon un processus multi-étapes<sup>295</sup>. De nombreuses études montrent un risque de progression vers la LLC ou un lymphome lymphocytaire estimé entre 1 et 2 % par an<sup>295,299,300,301</sup>. La survie globale de ces sujets ne semble pas différente de celle de la population générale<sup>302</sup>. Cependant, certains marqueurs pronostiques utilisés dans la LLC pourraient permettre de mieux stratifier ces patients. Les sujets porteurs de MBL « high count » ont un risque infectieux plus important<sup>303</sup>.

La fréquence des MBL chez des sujets de plus de 40 ans est estimée à environ 5 %<sup>295,304,305,301</sup>. La fréquence augmente avec l'âge : elle est de 0,2 à 0,3 % chez des sujets de moins de 40 ans, de 3,5 à 6,7 % entre 40 et 60 ans et de 5 à 9 % chez les plus de 60 ans. L'utilisation de techniques plus sensibles entraîne l'augmentation de ces fréquences (plus de 20 % chez les sujets de plus de 60 ans et jusqu'à 75 % chez les plus de 90 ans)<sup>304</sup>.

### 3- Les complications

#### *a- Le syndrome de Richter*

Le syndrome de Richter est défini par l'apparition d'un lymphome agressif chez des patients atteints de LLC ou de lymphome lymphocytaire<sup>306</sup>. Deux variants pathologiques sont distingués : un variant type DLBCL et un variant type lymphome de Hodgkin<sup>1</sup>.

Le variant type DLBCL est caractérisé histologiquement par des plages de grandes cellules B, soit des centroblastes (60 à 80 % des cas), soit des immunoblastes (20 à 40 %). Il faut différencier la LLC agressive : dans ce cas, les cellules de LLC sont de taille augmentée avec un index prolifératif plus important. Cependant, il n'existe pas de critère précis selon la classification OMS entre ces deux formes. La distinction repose alors sur l'interprétation et l'expertise de l'anatomopathologiste<sup>306</sup>.



D'un point de vue immunophénotypique, les cellules du syndrome de Richter variant DLBCL sont généralement CD20+ et ne sont que peu fréquemment CD5+ (seulement environ 30 % des cas)<sup>306,307</sup>. L'expression du CD23 n'est positive que dans environ 15 % des cas. L'immunophénotype correspond à des cellules post-GC (IRF4 positif) dans 90 à 95 % des cas. Les 5 à 10 % restants ont un phénotype type GC (CD10+)<sup>306,307</sup>. On retrouve une expression de MYC dans 30 à 40 % des cas, corrélée avec la présence d'une translocation impliquant MYC en cytogénétique<sup>308</sup>. Les cellules expriment BCL2, mais des lésions génétiques de ce gène (translocations ou mutations somatiques) ne sont que rarement mises en évidence. Une expression de PD-1 (pour Programmed cell Death 1) est retrouvée dans plus de 80 % des cas, alors qu'elle est rare dans la LLC et les DLBCL de novo<sup>306</sup>. La grande majorité sont EBV-négatifs. Enfin, dans environ 80 % des cas, l'analyse des gènes des immunoglobulines montre une clonalité en rapport avec celle de la LLC initiale, ce qui est en faveur d'une réelle transformation<sup>306,307,309</sup>. Dans les autres cas, cela révèle une autre origine de clonalité.

Au niveau de la physiopathologie, le syndrome de Richter variant DLBCL ne présente pas les mêmes caractéristiques génétiques que les DLBCL *de novo* comme par exemple l'inactivation des gènes de l'acétyltransférase *CREBBP/EP300* et de *B2M*. Les altérations génétiques retrouvées dans ces cas de Richter sont des anomalies des gènes *TP53*, *NOTCH1*, *MYC* et *CDKN2A*<sup>306,309,310</sup>. Les mutations de *TP53* apparaissent dans environ 60 à 80 % des cas et sont généralement acquises au moment de la transformation<sup>309</sup>.

Le pronostic du syndrome de Richter variant DLBCL est généralement péjoratif. Il est généralement meilleur en cas de DLBCL non relié génétiquement à la LLC initiale avec une survie médiane d'environ 5 ans, tandis qu'elle est de 8 à 16 mois en cas de réelle transformation<sup>306</sup>.

Dans le cas du variant type lymphome de Hodgkin, le diagnostic nécessite la présence de cellules de Reed-Sternberg de phénotype CD30+, CD15+, CD20-, avec un fond cellulaire de petits lymphocytes T, de cellules épithélioïdes, de polynucléaires éosinophiles et de plasmocytes<sup>311</sup>. La plupart de ces cas sont EBV-positifs et présentent un réarrangement des immunoglobulines différent de celui de la LLC de départ, suggérant l'apparition d'un lymphome *de novo* chez des patients atteints de LLC, en relation avec l'EBV<sup>309</sup>.

Le variant type lymphome de Hodgkin est rare. L'incidence à 5 et 10 ans est estimée à 0,25 et 0,5 % respectivement<sup>312</sup>. La survie globale médiane est de 4 ans<sup>306</sup>.



## *b- Cancers secondaires*

Il a été démontré que les patients atteints de LLC ont un risque accru de développer des cancers secondaires. Ceci peut être expliqué par l'atteinte immunologique rencontrée dans la LLC, mais aussi par les chimiothérapies reçues par le patient, une prédisposition génétique aux cancers ou encore un biais dû au suivi clinico-biologique en lien avec la LLC<sup>313,314</sup>. Ceci est particulièrement marqué pour la survenue de cancers de la peau non-mélanomes, représentant environ un tiers des cancers secondaires, avec un risque 3,66 fois plus important comparé à la population générale<sup>314-316</sup>. Une équipe s'est intéressée au profil cytogénétique des patients atteints de LLC développant un cancer secondaire<sup>317</sup>. Ils retrouvent un caryotype associant plus de 2 anomalies et une délétion du bras long du chromosome 13 comme facteurs de risque de développer un cancer secondaire en cas de LLC.

## *c- Complications immunologiques*

Des complications auto-immunes peuvent survenir au cours de la maladie. L'incidence est estimée entre 4 et 10 %<sup>318,319,320</sup>. L'anémie hémolytique auto-immune est la plus fréquente, suivie par la thrombopénie. L'érythroblastopénie et la neutropénie auto-immune sont plus rares avec une incidence inférieure à 1 %<sup>318</sup>. Dans ces deux derniers cas, on observe une destruction auto-immune des précurseurs granuleux et rouge respectivement au niveau de la moelle osseuse. Certains traitements de la LLC peuvent entraîner des cytopénies auto-immunes. Ainsi, la monochimiothérapie à base d'analogues de purine telle que la Fludarabine peut entraîner une anémie hémolytique auto-immune<sup>321,322</sup>. Les patients ayant déjà reçu plusieurs lignes de traitement sont plus à risque de développer ce type de complication. Le mécanisme est mal connu. Cela pourrait être lié à un déséquilibre sanguin du ratio TH17/Treg<sup>318</sup>. L'alentuzumab a été rapporté comme pouvant entraîner une thrombopénie auto-immune<sup>323</sup>. Les traitements à base de Bendamustine sont également associés à une fréquence augmentée de cytopénies auto-immunes, en particulier l'érythroblastopénie<sup>318</sup>. Plusieurs études montrent une survie globale moins bonne en cas de cytopénie auto-immune<sup>318,324,325</sup>. Cependant, cela reste controversé avec certaines études ne mettant pas en évidence de différence significative<sup>320,326</sup>.

Une des principales complications de la LLC est la survenue d'un déficit immunitaire, entraînant un risque infectieux. En particulier, l'hypogammaglobulinémie est le déficit immunitaire le plus fréquent dans la LLC<sup>318,327</sup>. Des anomalies des lymphocytes T, NK, monocytes et polynucléaires neutrophiles peuvent également contribuer au déficit immunitaire<sup>318,328,329,330</sup>.



## F- Diagnostic

### 1- Numération-Formule sanguine

La numération-formule sanguine (NFS) met en évidence une hyperlymphocytose. Sur le frottis, on observe des petits lymphocytes monomorphes matures, sans atypie. Ces lymphocytes sont généralement de petite taille, avec un rapport nucléocytoplasmique élevé, un noyau généralement régulier et une chromatine mottée (Figure 31). Il peut exister quelques atypies avec présence d'encoques ou encore quelques formes prolymphocytaires ou de rares para-immunoblastes. La présence d'ombres de Gümprecht est assez typique dans la LLC<sup>124</sup>. Il s'agit alors de lymphocytes lysés au moment de l'étalement sur lame et cela traduit une fragilité cellulaire. Elles ne sont pas spécifiques de la LLC. La présence d'ombres de Gümprecht peut entraîner une sous-estimation de la lymphocytose lors d'une formule manuelle. Le pourcentage d'ombres de Gümprecht a été proposé comme marqueur pronostique<sup>331,332,333</sup>.

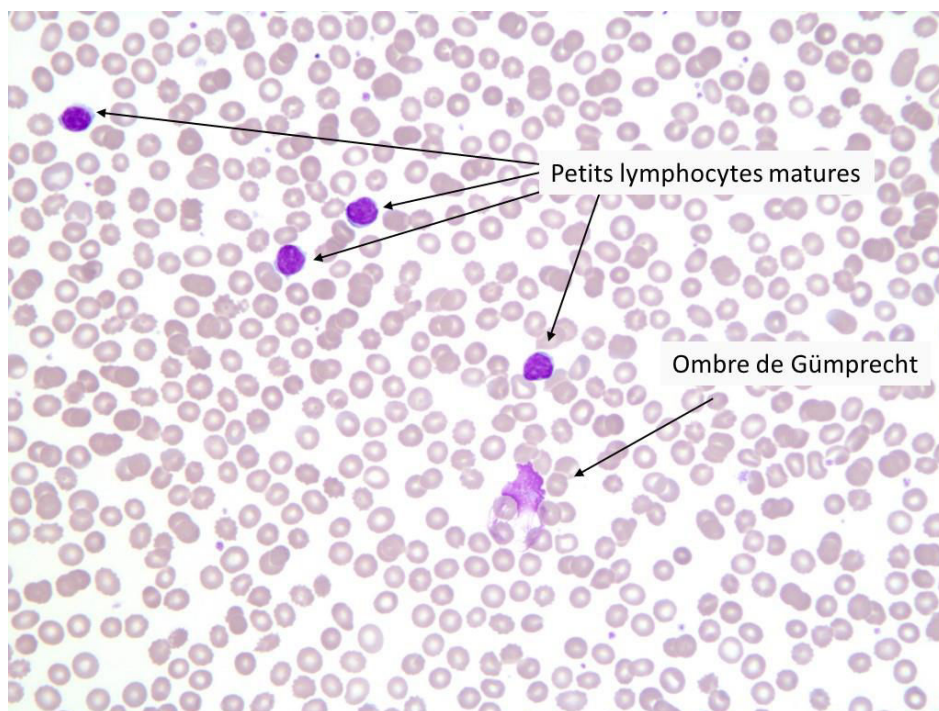


Figure 31 : Image de frottis sanguin coloré au MGG dans un cas de LLC.



## 2- Cytométrie en flux

La cytométrie en flux retrouve une expansion de lymphocytes B et permet d'établir le score de Matutes-Moreau selon le Tableau 1 : 5 points sont attribués en fonction de la positivité ou négativité de certains marqueurs. On parle de LLC en cas de score de Matutes-Moreau  $\geq 4$ <sup>1,334,335</sup>.

Marqueur	0 point	1 point
<b>CD5</b>	-	+
<b>CD23</b>	-	+
<b>FMC7</b>	+	-
<b>CD22/CD79b</b>	+	- ou faible
<b>Chaîne légère monotypique</b>	Intensité normale ou forte	Intensité faible

Tableau 1 : Calcul du score de Matutes-Moreau

L'expression du CD20 est généralement positive faible. Les cellules de LLC expriment également le CD200, ce qui permet d'identifier certains cas de LLC avec expression aberrante de quelques marqueurs, et de les distinguer par exemple d'un lymphome du manteau dans lequel ce marqueur est négatif<sup>336</sup>.

## 3- Autres

Un test de Coombs direct peut être réalisé : ce test permet de mettre en évidence la présence d'anticorps fixés sur les hématies. Le résultat peut être positif en l'absence d'anémie hémolytique auto-immune, mais dans ce cas, le risque d'en développer une est plus important<sup>134</sup>.

Le myélogramme n'est pas indispensable au diagnostic. En effet la moelle est souvent infiltrée et n'apporte pas d'élément au diagnostic. En revanche, en cas de cytopénies non expliquées, il peut être réalisé afin d'en déterminer la cause (envahissement, autre hémopathie type syndrome myélodysplasique concomitant ou origine périphérique par exemple).



## G- Facteurs pronostiques

### 1- Cytogénétique

#### *a- Introduction*

L'impact pronostique de l'analyse cytogénétique dans la LLC a été étudié dès la fin des années 1980<sup>337,338,339</sup>. La réalisation du caryotype a connu de grandes avancées au cours de cette période. En effet, les cellules de la LLC ont un faible index mitotique rendant leur culture difficile. Jusqu'aux premiers ajouts de mitogènes en 1978 dans les conditions de cultures, très peu d'anomalies chromosomiques pouvaient être identifiées chez les patients atteints de LLC<sup>337</sup>. A partir des années 1980, des mitogènes tels que le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), le lipopolysaccharide (LPS), ou encore le pokeweed mitogen (PKW), TPA+interleukine 2 (IL-2) ont été utilisés, permettant de détecter des anomalies chez 40 à 60 % des patients<sup>340</sup>. Au cours des années 1990, l'utilisation de l'Hybridation de Fluorescence *in situ* (ou FISH pour Fluorescence *in situ* Hybridation) interphasique a permis d'étudier les principales anomalies mises en évidence dans la LLC telles que la trisomie 12<sup>234</sup>. Dans les années 2000, de nouveaux progrès ont permis d'augmenter encore le nombre de patients chez lesquels une anomalie peut être détectée à partir de la réalisation d'un caryotype conventionnel. Ainsi, avec l'ajout de mitogènes tels que le CD40 ligand (CD40L) ou par des CpG-oligodéoxynucléotides (CpG-ODN), en association ou non avec des interleukines (IL-4 et IL-2 respectivement) permet d'identifier des anomalies chez 80 à 90 % des cas de LLC<sup>340,341,342,343</sup>.

Des anomalies chromosomiques peuvent être mises en évidence dans la LLC. Quatre principales anomalies sont retrouvées. Il s'agit de la délétion du bras court du chromosome 17 (ou del(17p)), la délétion du bras long du chromosome 11 (del(11q)), la trisomie 12 ou la délétion du bras long du chromosome 13 (del(13q)). On peut retrouver au moins une de ces anomalies chez environ 80 % des patients<sup>134,234</sup>. D'autres anomalies chromosomiques peuvent être retrouvées : délétion du bras long du chromosome 6 (del(6q)), gain 2p par exemple. La majorité des anomalies retrouvées sont des déséquilibres génétiques. On peut cependant retrouver des translocations impliquant les gènes des immunoglobulines avec une fréquence variable selon les études<sup>344</sup> et les autres anomalies équilibrées sont très rares. Une évolution clonale avec hétérogénéité intraclonale n'est pas rare. Enfin, dans certains cas, le caryotype est complexe (c'est-à-dire comportant au moins 3 anomalies).



## *b- Délétion de TP53*

La délétion du bras court du chromosome 17 (del(17p)) entraîne la perte du gène *TP53* qui est un gène suppresseur de tumeur. L'intégrité de ce gène est prépondérante pour maintenir la stabilité du génome<sup>345</sup>. La fréquence de cette anomalie est de 3 à 7 % au diagnostic<sup>234,346,347</sup> et augmente avec l'évolution de la maladie, en particulier après traitement<sup>348,349</sup>.

Cette délétion peut concerner l'ensemble du bras court du chromosome 17 ou être cryptique, avec une région minimale de délétion correspondant au locus 17p13.1<sup>347</sup>. Quelle que soit la présentation au caryotype, une FISH du locus *TP53* doit être réalisée.

Il s'agit d'une anomalie de mauvais pronostic avec une survie globale médiane de 32 mois contre 111 mois en cas de caryotype normal<sup>234</sup>.

La proportion de noyaux atteints par l'anomalie a un impact pronostique. Un cut-off à 25 % avait été proposé par l'équipe de Tam *et al.* en 2009 et montrait une survie globale significativement meilleure chez les patients présentant l'anomalie dans moins de 25 % des noyaux<sup>350</sup>. De même, une autre équipe montre un impact pronostique péjoratif sur la survie sans traitement (ou TFS) d'un nombre de noyaux délétés supérieur à 20 %<sup>351</sup>.

La del(17p) est fréquemment associée à un caryotype complexe<sup>346,348,352</sup>.

Dans plus de 80 % des cas (jusqu'à 90 %), la del(17p) est associée une mutation du gène *TP53*<sup>346,348,353</sup>. Seulement 4 à 5 % des LLC sans del(17p) présentent une mutation monoallélique de *TP53*<sup>348,352,353</sup>.

La délétion de *TP53* est importante car elle est prédictive de la réponse au traitement par analogues puriques tels que la Fludarabine. En effet, la délétion 17p entraîne une résistance à ce type de chimiothérapie<sup>354,348</sup>. La survie après allogreffe de cellules souches hématopoïétique est également diminuée (survie globale à 3 ans de 25 % contre 59 % en l'absence de del(17p), et survie sans progression à 3 ans de 18 % contre 63 % lorsque l'anomalie n'est pas détectée)<sup>355</sup>. Sa présence ne constitue pas un critère de traitement mais devrait conduire à un suivi rapproché des patients. En général, la recherche de del17p n'est pas systématiquement réalisée chez les patients au diagnostic mais doit être étudiée au moment où un traitement est envisagé et à la rechute<sup>356</sup>.

