

## Délétion du bras long du chromosome

La délétion du bras long du chromosome 11 (ou del(11q)) entraîne la perte du gène *ATM* (pour Ataxia Telangiectasia Mutated). Ce gène est essentiel pour la régulation du cycle cellulaire en activant P53 et en augmentant la réponse aux dommages de l'ADN<sup>346</sup>. Elle peut également entraîner la perte d'autres gènes situés sur le 11q tels que *BIRC3*. La région minimale de délétion est de 0.68 Mb située en 11q22.3<sup>347</sup>. La fréquence de l'anomalie est de 10 à 17 %<sup>234,346,347</sup>.

Les patients présentant une del(11q) ont en général une LLC plus évoluée et plus agressive, avec une survie diminuée (survie globale de 79 mois contre 111 en cas de caryotype normal) et des adénopathies plus marquées<sup>234</sup>. La survie sans traitement est également diminuée avec une médiane estimée à 22 mois contre 35 mois en cas de caryotype normal<sup>351</sup>.

Une mutation de l'autre allèle d'*ATM* est retrouvée dans 30 à 40 % des cas avec del11q<sup>357,358</sup>. Dans ce cas, la survie des patients est moins bonne. Une étude montre que la survie sans progression après une première chimiothérapie est diminuée en cas de double inactivation d'*ATM* par délétion et mutation, et est comparable à la présence d'une anomalie de *TP53* (délétion ou mutation)<sup>359</sup>.

De plus, une délétion du bras long du chromosome 11 peut entraîner la perte du gène *BIRC3*. Ce gène peut également être muté. La présence d'anomalie de *BIRC3* est rare au diagnostic de LLC et augmente au cours de l'évolution (jusqu'à une fréquence de 24 % chez les patients réfractaires à la fludarabine)<sup>360</sup>.

## d- Trisomie 12

La trisomie 12 est retrouvée à une fréquence de 11 à 16 % au diagnostic dans la LLC<sup>346,234,347</sup>. Cette anomalie est associée à un pronostic intermédiaire avec une survie globale médiane de 114 mois contre 111 en cas de caryotype normal<sup>234,361</sup>. La réponse au traitement est généralement bonne, et la fréquence de cette anomalie n'augmente pas dans les groupes de patients réfractaires à la chimiothérapie<sup>346</sup>.

Les cas de LLC avec trisomie 12 ont souvent une morphologie atypique avec une augmentation du nombre d'aspects prolymphocytaires sur le frottis sanguin, et sont associés à une expression plus forte du FMC7 et de l'immunoglobuline de surface<sup>362,363</sup>.

La trisomie 12 est trouvée à une fréquence plus élevée dans le lymphome lymphocytaire avec un biais d'utilisation d'IGHV3-21<sup>293</sup>.



Cette anomalie est associée aux trisomies 18 et 19 dans 2 à 5 % des cas<sup>346,364</sup>. La présence des trisomies 12 et 19 est associée aux cas de LLC ayant réalisé le switch IgG et avec réarrangement IGHV4-39<sup>365</sup>.

La trisomie 12 est associée à la présence de mutation du gène *NOTCH1* dans environ 20 à 30 % des cas et est fréquemment associée à des formes agressives de LLC, avec une survie diminuée<sup>366,367</sup>. La délétion du bras long du chromosome 14 (del(14q)) est également associée à la trisomie 12 : la présence de ces deux anomalies combinées à une mutation de *NOTCH1* et un statut IGHV non muté (avec biais de représentation d'IGHV1-69) identifie un groupe de mauvais pronostic<sup>368</sup>.

### *e- Délétion du bras long du chromosome 13*

La délétion interstitielle du bras long du chromosome 13 (del(13q)) est l'anomalie la plus fréquente. Elle est retrouvée dans plus de 50 % des cas de LLC. Cette anomalie peut être cryptique, c'est-à-dire non visible au caryotype. Elle peut apparaître après translocation visuellement équilibrée au caryotype mais entraînant en réalité une del(13q) alors visible par d'autres techniques telles que la FISH. Cette anomalie est de bon pronostic lorsqu'elle est isolée. La survie de ces patients montrait dès 2000 une médiane de survie globale de 133 mois contre 111 pour un caryotype normal<sup>234</sup>. La survie sans traitement a été revue sur une large cohorte en 2016 et retrouve une médiane de TFS à 72 mois contre 35 en cas de caryotype normal<sup>351</sup>.

La zone de délétion est située au niveau 13q14, mais la taille est variable<sup>369</sup>. Il a été montré que cette délétion peut emporter différents gènes. D'une manière générale, elle entraîne la perte des gènes *DLEU2/MIR15A/MIR16-1*. Ce locus est considéré comme la région minimale de délétion. La perte de *MIR15A/MIR16-1* entraîne une levée de surexpression de *BCL2* qui a un rôle anti-apoptotique. De plus larges délétions concernent en plus le gène *RB1*. Dans ce cas, la valeur pronostique de la del(13q) est différente, la TFS étant significativement moins importante en cas de délétion concomitante de *RB1*<sup>370,371</sup>. Il a été proposé de classer en différents groupes de del(13q) suivant les points de cassure et les gènes impliqués<sup>371</sup>. Ainsi la del(13q) de type I entraîne la perte du locus *DLEU2/MIR15A/MIR16-1* avec des points de cassures pouvant correspondre à la région minimale de délétion (type Ia) ou plus larges (type Ib), alors que la del(13q) de type II entraîne en plus la perte de *RB1*.

La del(13q) peut être mono-allélique ou bi-allélique, sans que cela change l'impact pronostique. Les del(13q) de type II sont généralement mono-alléliques<sup>371</sup>. En revanche, la quantité de noyaux atteints par la del(13q) a un impact pronostique péjoratif lorsqu'elle est très élevée : avec un seuil fixé à 65,5 % de noyaux atteints par l'anomalie, la TFS à 5 ans est de 79 % quand le pourcentage est inférieur, et seulement de 38 % lorsque plus de 65,5 % des noyaux sont touchés<sup>351</sup>. Une autre étude montre le même impact pronostique péjoratif avec un seuil de noyaux atteints fixé à 80 %<sup>372</sup>.



### *f- Délétion du bras long du chromosome 6*

La délétion du bras long du chromosome 6 (ou del(6q)) est retrouvée dans environ 6 % des cas de LLC<sup>234</sup>. La fréquence varie selon l'évolution de la maladie et serait un marqueur de progression de la maladie<sup>347,373</sup>.

### *g- Gain 2p*

Les anomalies avec gain 2p sont principalement mises en évidence grâce aux nouvelles techniques de cytogénétique moléculaire telles que la CGH-array<sup>374,347</sup>. Les gains 2p entraînent une amplification des gènes *MYCN*, *cREL*, *MSH2* ou *ALK*<sup>374,375</sup>. La région minimale d'amplification se situe en 2p16.1-2p15<sup>376</sup>. La fréquence de cette anomalie varie selon les études de 2 à 8 %<sup>374,347,376,375</sup>.

Les cas de LLC présentant cette anomalie sont associés à la présence d'une del(11q) et au statut IGHV non muté<sup>374,347</sup>. Cette anomalie serait considérée comme un potentiel marqueur de progression<sup>374</sup>.

### *h- Caryotype complexe*

Le caryotype complexe est défini comme la présence d'au moins 3 anomalies chromosomiques<sup>377</sup>. La fréquence du caryotype complexe dans la LLC au diagnostic est de 16 % selon Baliakas *et al.*<sup>378</sup>. Cette fréquence est variable et semble augmenter avec l'évolution de la maladie<sup>377</sup>.

Le caryotype complexe est associé aux délétions 17p et 11q, ce qui peut expliquer en partie le mauvais pronostic retrouvé et l'accumulation d'anomalies cytogénétiques<sup>379,378</sup>. Il est également associé au statut IGHV non muté et à l'expression du CD38<sup>378</sup>. La valeur pronostique du caryotype complexe est encore débattue, mais semble selon plusieurs études avoir un impact pronostique péjoratif en termes de survie sans progression et de survie globale<sup>380,379,378</sup>.



### *i- Translocations*

Les translocations sont rapportées dans environ 20 % des cas de LLC<sup>381</sup>. Ces translocations impliquent principalement les gènes des immunoglobulines, majoritairement *IGH*, et le locus 13q14.

Les translocations impliquant les gènes des immunoglobulines sont relativement rares dans la LLC (4 à 9 %) <sup>377,344</sup>. Les partenaires récurrents sont *CCND1*, *BCL2* et *BCL3*<sup>381</sup>. Dans la majorité des cas, le caryotype présente d'autres anomalies associées. Les pertes 3q et gains 8p semblent être associés aux translocations impliquant les gènes des immunoglobulines. Actuellement entre 30 et 40 loci partenaires sont décrits, mais les gènes impliqués ne sont que rarement identifiés<sup>344</sup>. Ces cas présentent généralement une cytologie atypique avec des aspects lymphoplasmocytaires et une présence de prolymphocytes plus fréquente<sup>344</sup>. Le pronostic associé aux translocations impliquant les gènes de immunoglobulines est généralement péjoratif, excepté lorsque le partenaire est *BCL2* pour lequel le pronostic n'est pas modifié<sup>344</sup>. Ces translocations entraînent généralement une dérégulation du gène partenaire. Une exception est décrite avec la formation d'un transcrite de fusion au cours d'une translocation t(12 ;14)(q23;q32) ayant pour conséquence une anomalie de distribution cellulaire de la sulfotransférase impliquée<sup>382</sup>. Egalement, des translocations impliquant deux gènes d'immunoglobulines ont été rapportés (t(14 ;22)(q32;q11))<sup>344,383</sup>. Le mécanisme pathogénique de ce type de translocation est actuellement inconnu. La dérégulation d'un oncogène à proximité est possible.

Les translocations impliquant le locus 13q14 sont quasiment toujours associées à une délétion du locus au cours de la translocation<sup>381</sup>. Il n'y a pas de partenaire récurrent retrouvé dans ces cas.

### *j- Autres*

Les télomères sont des structures protectrices situées aux extrémités des chromosomes, composés de répétitions riches en G et associées à un complexe protéique appelé « shelterin »<sup>384</sup>. La longueur des télomères chez l'Homme varie de 10 à 15 kb<sup>385</sup>. A chaque division cellulaire, les télomères sont raccourcis avec perte de répétitions télomériques, à cause d'une réplication incomplète. Ceci est à l'origine de la sénescence et des cancers<sup>386</sup>. Des télomères raccourcis non protégés risquent d'être fusionnés par erreur par le système de réparation de l'ADN, entraînant des aneuploïdies ou des réarrangements chromosomiques structuraux<sup>384</sup>. Par conséquent, des anomalies des télomères peuvent entraîner une instabilité chromosomique au cours de la cancérogénèse. Les télomères peuvent être régénérés par la télomérase et sont protégés par la fusion des protéines « shelterin ».



Dans la LLC, des télomères raccourcis sont associés à un mauvais pronostic et une fréquence augmentée d'anomalies cytogénétiques péjoratives telles que la del(17p), la del(11q) ou un caryotype complexe<sup>387,388,389</sup>. Ce serait également associé à la présence de mutations de *SF3B1* et *NOTCH1*<sup>390</sup>. L'identification de télomères courts au diagnostic serait associée à des survies globale et sans traitement diminuées<sup>390</sup>. L'érosion des télomères fait partie de l'évolution naturelle de la LLC et sa rapidité est un marqueur d'agressivité de la maladie<sup>391</sup>. Les patients présentant une anomalie de *TP53* ont une dysfonction importante des télomères<sup>392</sup>. La longueur des télomères est inversement corrélée à l'activité de la télomérase<sup>387,393</sup>. Ainsi, une forte activité de la télomérase est associée à une survie raccourcie dans la LLC.

Un raccourcissement des télomères est associé à un statut IGHV non muté<sup>394,395,396,397</sup>. Les patients IGHV non mutés avec des télomères courts auraient une survie comparable à celles des patients IGHV non mutés<sup>398</sup>.

Des mutations du gène *POT1* (pour Protection Of Telomeres 1), qui code un composant du complexe des protéines shelterin, entraînent des anomalies des télomères et chromosomiques<sup>399</sup>. Ces mutations sont retrouvées chez 3,5 % des patients atteints de LLC, et ont une fréquence augmentée chez les patients IGHV non mutés. Ces mutations ont également été décrites dans des cas de LLC familiales<sup>400</sup>.

### *k- Evolution clonale*

En cytogénétique, l'évolution clonale a été étudiée par FISH principalement et montre l'acquisition de marqueurs de mauvais pronostic tels que la del(17p) et la del(11q) dans 65 % des cas<sup>401</sup>. Certaines anomalies cytogénétiques sont considérées comme initiatrices telles que la del(13q) hétérozygote ou la trisomie 12, tandis que d'autres semblent acquises au cours de l'évolution (del(13q) homozygote et gain 2p par exemple)<sup>344,402</sup>. La chimiothérapie ne semble pas être un facteur entraînant l'apparition de nouveaux clones. L'évolution clonale est associée à une survie globale diminuée, essentiellement en cas d'apparition de marqueurs de haut risque<sup>401</sup>.



## 2- Génétique de la partie variable des chaînes lourdes des immunoglobulines (IGHV)

### *a- Statut mutationnel IGHV*

A partir des années 1990, différentes équipes se sont intéressées au statut mutationnel IGHV. Cette caractéristique permet de mieux comprendre la cellule d'origine dans la LLC, un statut IGHV muté traduisant un passage dans le GC. Le séquençage des régions variables de la chaîne lourde des immunoglobulines peut mettre en évidence des polymorphismes<sup>403</sup>. Aussi, un seuil de 98 % d'homologie a été choisi pour séparer les cas.

Ce seuil de 98 % d'homologie reste débattu. Encore récemment, une publication rapporte que le taux de mutation en tant que variable continue est plus important que le seuil de 98 %<sup>404</sup>.

Les premières études rapportent un statut IGHV muté dans environ 50 % des cas<sup>95,405</sup>.

Le statut IGHV s'est révélé être un marqueur pronostique important. Ainsi, un statut IGHV non muté est associé à une maladie plus agressive et un pronostic péjoratif<sup>406</sup>. A l'inverse, un statut IGHV muté semble prédire une maladie plus indolente. La médiane de survie était de 8-9 ans en cas de statut IGHV non muté contre 24 ans voire non atteinte dans le groupe IGHV muté<sup>406,407</sup>. Une exception concerne le réarrangement IGHV3-21, généralement présentant à un statut muté, mais entraînant une survie semblable à celle du groupe IGHV non muté<sup>408</sup>. La fréquence de la trisomie 12 est également plus élevée dans ce groupe<sup>406,407,409</sup>. Les patients présentant un réarrangement IGHV3-21 ont un CDR3 plus court et expriment généralement une chaîne légère lambda<sup>410</sup>. De plus, l'étude du réarrangement du locus *IGL* montre une utilisation hautement restreinte de Vλ2-14/Jλ3. Ceci soutient l'hypothèse d'une implication de la reconnaissance de l'antigène dans la survenue de la LLC. Cependant, il semblerait que plus le réarrangement IGHV3-21, ce soit l'appartenance à un sous-groupe (ou subset) particulier qui modifie la survie<sup>411</sup>.

Par ailleurs, l'étude de la séquence IGHV dans différents clones ne montre généralement pas de différence notable<sup>406</sup>. De plus, l'étude au cours du temps chez un même patient ne montre pas de modification de la séquence IGHV. Ceci indique l'absence d'acquisition de mutations « ongoing » dans la LLC. Une exception est décrite dans un sous-groupe de cas dans lequel a été mise en évidence avec une grande diversité intraclonale, en faveur d'une interaction active continue avec l'antigène<sup>412</sup>.

L'expression du CD38 a été étudiée en parallèle du statut mutationnel IGHV : les patients IGHV non muté sont généralement CD38+<sup>407</sup>.



## *b- Réarrangements IGHV et définition de sous-groupes ou*

### *« subset »*

L'étude des réarrangements VDJ montre que 10 gènes VH sont utilisés par plus de la moitié des patients atteints de LLC, en particulier IGHV1-69, IGHV3-23 et IGHV4-34 sont les plus fréquents (environ 12 % chacun), suivis de IGHV1-02, IGHV3-30.3 et IGHV3-07<sup>406</sup>. Les fréquences d'utilisation de ces gènes peuvent correspondre pour certains à la fréquence d'utilisation observée dans des cellules B normales (IGHV3-23 et IGHV3-30.3 par exemple), tandis que d'autres sont surreprésentés dans la LLC tels qu'IGHV1-69. Concernant les gènes JH, la majorité des cas de LLC réarrange avec JH4 (plus de 40 % des cas) ou JH6 (plus de 35 %) <sup>406</sup>. Ceci est comparable au profil observé dans des cellules B normales. Concernant le DH réarrangé, le plus fréquent est DH3-3, et aucune association avec des VH ou JH n'a été mise en évidence<sup>406</sup>.

Il existe des profils de réarrangements VDJ différents suivant le statut mutationnel IGHV, certains réarrangements étant associés à un statut mutationnel donné. C'est le cas par exemple d'IGHV1-69 qui est généralement associé à un statut non muté<sup>413</sup>.

L'étude de réarrangements V(D)J des chaînes lourdes et légères chez les patients atteints de LLC montre l'expression d'une immunoglobuline identique dans environ 1 % des cas<sup>413</sup>.

Des études aux Etats-Unis et en Europe sur les profils d'utilisation des gènes des immunoglobulines ont été réalisées<sup>414,96,415</sup>. Elles révèlent des groupes de cas de LLC portant des BCR hautement similaires entre les patients : on parle de BCR stéréotypés. Les critères actuels pour parler de BCR stéréotypés sont un réarrangement VDJ de la chaîne lourde des immunoglobulines présentant un gène *IGHV* du même clan (I, II ou III), et des séquences du CDR3 de taille identique avec certains acides aminés conservés à des positions exactes<sup>416,417</sup>. De plus, la séquence en acides aminés doit être identique à au moins 50 %, et avec des propriétés physicochimiques semblables à plus de 70 %. Le clan I regroupe les VH1, VH5 et VH7, le clan II les VH2, VH4 et VH6 et le clan III comprend les VH3<sup>416</sup>. Le fait de retrouver de tels groupes ou « subsets » chez des sujets géographiquement éloignés et non apparentés soutient le rôle d'une sélection par l'antigène. Ainsi, il a été proposé que les cas avec BCR stéréotypés dériveraient de progéniteurs sélectionnés par l'antigène tandis que les autres cas, dits « hétérogènes » auraient pour origine des cellules B conventionnelles<sup>418</sup>.

L'identification de BCR stéréotypés a permis d'identifier différents subsets. Une large étude menée en 2012, incluant 7596 cas de LLC, définit 19 subsets dits majeurs pour lesquels au moins 20 séquences sont retrouvées<sup>417</sup>. Ces subsets majeurs regroupent 41 % des cas stéréotypés et 12 % de l'ensemble de la cohorte examinée. D'une manière générale, environ un tiers des cas expriment un BCR stéréotypé<sup>417</sup>. Une étude en cours avec l'analyse des séquences d'environ 21 000 cas révèle des proportions similaires<sup>419</sup>. La distinction de subsets sur la base de la séquence du CDR3 permet aussi de séparer les cas de LLC avec des caractéristiques clinico-biologiques comparables<sup>415,420</sup>. Par exemple, le subset 4 est



caractérisé par un âge au diagnostic diminué et une évolution indolente, tandis que le subset 8 regroupe des patients à risque de transformation vers un syndrome de Richter (Tableau 2)<sup>420,421</sup>.

	Subset 1	Subset 2	Subset 4	Subset 8
Fréquence dans la LLC	2,4 %	2,8 %	1 %	0,5 %
Réarrangements IGHV	IGHV1/5/7 IGHD6-19 IGHJ4	IGHV3-21 IGHD non identifié IGHJ6	IGHV4-34 IGHD5-18 IGHJ6	IGHV4-39 IGHD6-13 IGHJ5
Statut mutationnel IGHV	IGHV non muté	IGHV muté et non muté	- IGHV muté - SHM « ongoing »	IGHV non muté
Caractéristiques génétiques	Mutations récurrentes de <i>NFKBIE</i>	- Del(11q) - Mutations fréquentes de <i>SF3B1</i> - Mutations peu fréquentes de <i>TP53</i>	Peu d'anomalies génétiques	- Mutations de NOTCH1 - Trisomie 12
Evolution (survie sans traitement)	Très agressive (1,9 ans)	Très agressive (1,6 ans)	Très indolente (11 ans)	Très agressive (1,5 ans) Transformation en Richter

**Tableau 2 : Caractéristiques principales des principaux subset dans la LLC, adapté d'après Stamatopoulos *et al.*<sup>419</sup>.**

Les subsets définissent des groupes pronostiques distincts. Ainsi, le subset 2, qui représente 2,8 % des LLC, comprend des cas à statut IGHV muté ou non muté, avec une fréquence élevée de del(11q), de mutations de *SF3B1* et peu d'anomalies de *TP53*, et est associé à une maladie agressive (survie sans traitement de 1 à 6 ans)<sup>419</sup>. A l'inverse, le subset 8, représentant 1 % des LLC, est associé à un statut IGHV muté, peu d'anomalies génétiques, et une maladie indolente (survie sans traitement de 11 ans)<sup>419</sup>.





### 3- Mutations récurrentes hors *IGHV*

#### a- *TP53*

Le gène *TP53* peut être altéré soit par délétion, soit par mutation inactivatrice. Les mutations de *TP53* sont retrouvées chez 90 % des cas avec del(17p)<sup>353</sup>. A l'inverse, environ 60 à 70 % des patients ayant une mutation de *TP53* ont également une del(17p). Environ 5 % des cas de LLC non traitée sans del(17p) ont une mutation de *TP53*<sup>348,353</sup>.

Les anomalies de *TP53* sont associées à un mauvais pronostic, avec une survie diminuée et une résistance aux chimiothérapies à base d'analogues de purines tels que la Fludarabine<sup>348,422</sup>. Dans ce contexte, il est important de rechercher la présence de délétion ou de mutation avant l'instauration de toute chimiothérapie, dans la mesure où un traitement conventionnel par Fludarabine risque d'entraîner la sélection du clone porteur d'anomalie de *TP53*<sup>423,424,425,353</sup>. Dans certains cas, la présence de mutation de *TP53* est sous-clonale et peut ne pas être détectée par séquençage type Sanger par manque de sensibilité<sup>353</sup>. De plus, les mutations de ce gène sont réparties sur l'ensemble du gène, rendant difficile son séquençage par technique Sanger en routine pour tous les patients atteints de LLC. Le développement du NGS a permis de résoudre ces difficultés en permettant de diminuer le seuil de sensibilité et d'étudier un plus grand nombre de cibles en même temps. Il est actuellement recommandé de rechercher les mutations de *TP53* par NGS avec une profondeur suffisante (au moins 100 reads sur l'ensemble du gène)<sup>353</sup>. Certains variants introniques proches des exons (+2 ou -2) pouvant toucher les sites d'épissage sont considérés comme pathogéniques<sup>353</sup>. De plus, des mutations synonymes peuvent tout de même avoir des conséquences sur l'épissage et leur signification doit être vérifiée sur les bases de données (en particulier IARC TP53 et TP53 website)<sup>426,427</sup>. En effet, ce type d'anomalie a été décrit dans certaines familles atteintes de Li-Fraumeni<sup>428,353</sup>.

#### b- *ATM*

Le gène *ATM* est situé en 11q22.3. Il est de grande taille (plus de 146 kb) et comprend 69 exons dont 62 codants. Il s'agit d'un suppresseur de tumeur dont la fonction est de contrôler l'intégrité de la réparation de l'ADN et de réguler la progression dans le cycle cellulaire. *ATM* est la principale protéine activatrice de p53 en réponse aux cassures double brin de l'ADN. Il a été démontré dans la LLC que la réponse transcriptionnelle aux cassures double brin est entièrement dépendante d'*ATM* et seulement une partie de cette activité est transférée à la voie p53, aboutissant à un signal pro-apoptotique<sup>429</sup>. Etant donnée la taille du gène et l'absence de mutation récurrente dans la LLC, son séquençage n'était pas accessible par technique conventionnelle type Sanger. L'apparition du NGS permet dorénavant d'avoir des données mutationnelles chez un grand nombre de patients concernant ce gène.



Les mutations d'*ATM* sont retrouvées chez 10 à 16 % des patients atteints de LLC<sup>430,431,432,425</sup>.

Comme pour la délétion, la présence de mutation d'*ATM* est de mauvais pronostic avec une survie globale et sans traitement raccourcies<sup>432,425</sup>. Les mutations d'*ATM* sont associées à un statut IGHV non muté<sup>432,425</sup>.

Comme pour *TP53*, ce gène peut être délété et/ou muté. La présence de mutation d'*ATM* en cas de del(11q) est retrouvée dans 30 à 40 % des cas<sup>357,358,430,431</sup>. Les patients présentant une atteinte biallélique d'*ATM* (mutation et délétion ou double mutation) perdent la fonctionnalité d'*ATM*, tandis qu'une atteinte monoallélique permet une fonction conservée de la protéine<sup>432,357</sup>. Il a été montré que les cas avec inactivation biallélique d'*ATM* sont réfractaires *in vitro* aux chimiothérapies cytotoxiques<sup>357</sup>. Les mutations d'*ATM* peuvent survenir au cours de l'évolution en cas de del(11q) préexistante<sup>357</sup>. Il a été démontré que la présence de mutation germinale hétérozygote d'*ATM* est plus fréquente en cas de del(11q), ce qui suggère un rôle dans la progression de la maladie mais pas dans son initiation<sup>433</sup>. L'inactivation biallélique est de plus mauvais pronostic avec une survie sans progression inférieure (7,4 mois en cas de del(11q) et mutation, contre 17,1 mois en cas de del(11q) seule et 30,8 mois pour mutation isolée)<sup>359</sup>. La survie globale est alors significativement diminuée et est comparable à celle des patients présentant une délétion de *TP53*<sup>434</sup>.

Différents types de mutations sont susceptibles d'avoir des impacts différents. Dans l'Ataxie-Télangiectasie, maladie génétique autosomale récessive dans laquelle *ATM* est muté, une hétérogénéité clinique est retrouvée et pourrait être attribuable aux différents types de mutations rencontrées<sup>430</sup>. En effet, les mutations tronquantes sont associées à un phénotype d'Ataxie-télangiectasie complet, tandis que les mutations faux-sens ou affectant les sites d'épissage entraînent une expression clinique plus modérée, avec une expression et une fonction conservées d'*ATM*<sup>435,436</sup>. Il est encore actuellement parfois difficile de connaître l'impact d'une mutation d'*ATM* étant donnée la variété de mutations rencontrées, certaines pouvant être germinales ou somatiques, avec un impact différent sur la fonctionnalité de la protéine. Certaines mutations germinales peuvent correspondre à des SNP ou au contraire avoir un impact et les données restent vagues. Leur interprétation biologique reste difficile. Ainsi, des tests *in vitro* ont été mis au point pour essayer d'étudier l'impact des mutations sur la fonction d'*ATM*. Par exemple, plusieurs équipes utilisent des méthodes basées sur le suivi de l'accumulation de p53 et p21 après exposition des cellules à des radiations ionisantes<sup>357,437,438</sup>. D'autres tests reposent sur l'utilisation d'étoposide et de nutlin-3a afin de mettre en évidence des défauts dans les voies ATM et TP53<sup>439</sup>. Le traitement des cellules par Doxorubicine ou Fludarabine avec suivi de l'expression de p21 a été proposé<sup>430</sup>. Enfin, une technique basée sur la mesure de l'expression de gènes sous la dépendance d'*ATM* ou TP53 par RT-MLPA (pour Reverse Transcription- Multiplex Ligation dependent Probe Amplification), après traitement par radiations ionisantes, a été proposée<sup>440</sup>. Ainsi, l'avènement du NGS, l'accumulation de données cliniques et l'utilisation de ces tests fonctionnels permettront à l'avenir de mieux connaître et interpréter ces mutations.



### c- *NOTCH1*

*NOTCH1* (situé en 9q34.3) code un facteur de transcription activé par ligand régulant différentes voies de signalisation impliquées dans la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques en cellules T immatures et de lymphocytes B matures en cellules productrices d'anticorps<sup>441,442</sup>.

Des mutations activatrices de *NOTCH1* sont retrouvées dans environ 10 % des cas de LLC au diagnostic et jusqu'à 15-20 % chez les patients évolutifs ou en rechute<sup>443</sup>. Dans les cas de Richter, la fréquence augmente jusqu'à 30 %<sup>443,444</sup>. Les patients mutés pour *NOTCH1* présentent plus fréquemment des caractéristiques biologiques péjoratives telles qu'un statut IGHV non muté, des anomalies de *TP53* et une trisomie 12<sup>443,445,366,367,446</sup>.

La principale mutation retrouvée est une délétion de 2 nucléotides (délétion CT : c.7541\_7542delCT, p.P2514Rfs, NM\_017617)<sup>444</sup>. Elle représente environ 77 % des mutations de *NOTCH1*<sup>163</sup>. Il s'agit de mutations activatrices entraînant la génération d'un codon stop prématuré et la formation d'une protéine NOTCH1 sans le domaine C terminal, contenant un domaine PEST (une séquence riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine). Cela entraîne l'accumulation d'une isoforme protéique active<sup>444</sup>. Il a été montré que NOTCH1 est constitutivement exprimée dans la LLC, mais la présence de ce type de mutation génère une isoforme protéique plus stable et active<sup>447</sup>.

La présence de mutation de *NOTCH1* au diagnostic est un marqueur indépendant de mauvais pronostic<sup>443</sup>. Les patients mutés ont stade clinique plus avancé au diagnostic et une survie globale plus courte<sup>444,445</sup>. La survie sans traitement est également raccourcie<sup>446</sup>. Le risque de transformation en Richter est significativement supérieur<sup>444,445</sup>.

### d- *SF3B1*

*SF3B1* (pour Splicing Factor 3B subunit 1) est un gène situé en 2q33.1 et code une protéine importante dans la machinerie de l'épissage. Il s'agit de mutations faux-sens ou de délétion n'entraînant pas de modification du cadre de lecture<sup>448</sup>. La principale mutation récurrente retrouvée touche le codon 700 (mutation K700E)<sup>449</sup>. Le fait que ces mutations soient localisées dans un domaine spécifique (domaines HEAT) suggère un rôle fonctionnel spécifique<sup>449</sup>. Etant donné que SF3B1 est un régulateur de l'épissage de gènes impliqués dans la progression dans le cycle cellulaire et l'apoptose, il est probable que ces mutations jouent un rôle dans la prolifération et/ou la survie cellulaire<sup>163</sup>.



Des mutations de *SF3B1* sont retrouvées chez environ 10 % des cas de LLC au diagnostic et 17 % en cas de maladie progressive<sup>163,449,448,206</sup>. Elles semblent être acquises au cours de l'évolution de la maladie<sup>424,450</sup>. La proportion de sous-clones porteurs de ce type de mutation augmente avec le temps, indépendamment de l'administration de chimiothérapies<sup>450</sup>.

Ces mutations sont associées à la délétion du bras long du chromosome 11 et sont mutuellement exclusives des mutations de *TP53*<sup>449,448,449</sup>. Elles sont plus fréquemment associées à un statut IGHV non muté<sup>449,450,446</sup>.

Les mutations de *SF3B1* sont associées à un pronostic péjoratif. Les patients mutés ont une maladie plus agressive et une survie globale diminuée<sup>206</sup>. La survie sans traitement est significativement réduite<sup>449</sup>.

### *e- BIRC3*

*BIRC3* est un gène situé en 11q22.2, à 6 Mb d'*ATM*, et code une protéine membre de la famille IAP, capable d'inhiber l'apoptose en se liant à TRAF1 et TRAF2 (pour Tumor necrosis factor receptor-associated factors 1 et 2). *BIRC3* peut réguler la voie NFκB. Elle active la voie de signalisation NFκB canonique, ce qui peut promouvoir la croissance et la survie des cellules de LLC, et inhibe la voie de signalisation NFκB non canonique<sup>163</sup>. Il a été démontré que les cellules de LLC porteuses de mutation de *BIRC3* présentent une activation constitutive de NFκB et sont moins sensibles à la chimiothérapie<sup>360</sup>.

Les mutations retrouvées seraient inactivatrices et entraîneraient la génération de transcrits aberrants présentant des codons stop prématurés, responsables de l'élimination ou de troncature du domaine RING C-terminal<sup>360</sup>.

Ce gène peut également être altéré par délétion. Généralement, les anomalies de *BIRC3* sont monoalléliques<sup>360</sup>. L'inactivation bi-allélique a été retrouvée dans 7,5 % des cas avec délétion du bras long du chromosome 11<sup>451</sup>. Dans ce cas, la survie sans traitement est significativement diminuée.

Les mutations de *BIRC3* sont peu fréquentes au diagnostic de la LLC, et la fréquence augmente chez les patients réfractaires à la chimiothérapie par Fludarabine<sup>360</sup>.

Une anomalie de *BIRC3* (soit mutation, soit délétion) est mutuellement exclusive d'une anomalie de *TP53*<sup>360</sup>. Elle est associée à la délétion du bras long du chromosome 11 (avec ou sans délétion de *BIRC3*) et un statut IGHV non muté<sup>446</sup>.

La présence d'anomalie de *BIRC3* est associée à un pronostic péjoratif indépendamment des autres marqueurs pronostiques tels que les anomalies de *TP53*<sup>360</sup>. La survie globale est réduite<sup>360</sup>.



## *f- Autres mutations*

Les études de séquençage d'exome ont permis de mettre en évidence de nombreuses mutations récurrentes dans la LLC à des fréquences plus faibles (inférieures à 10 %)<sup>444</sup>.

Des mutations de *MYD88* (pour Myeloid Differentiation primary reponse 88), gène situé en 3p22.2, ont été mises en évidence dans 3 à 10 % des cas de LLC<sup>444,449</sup>. Il s'agit le plus souvent d'une mutation ponctuelle récurrente (p.L265P). Cette mutation est également décrite dans différents types de lymphomes<sup>452</sup>. En particulier, elle est retrouvée de façon récurrente dans la maladie de Waldenström<sup>453,454</sup>. La protéine MYD88 participe aux voies de signalisation de l'interleukine-1 et des TLR. au cours de la réponse immune<sup>455</sup>. Il s'agirait de mutations activatrices<sup>452</sup>. Bien qu'initialement décrite dans des lymphomes sécrétant une immunoglobuline monoclonale d'isotype IgM, cette mutation n'est pas associée à la présence d'un pic dans la LLC<sup>456,457</sup>. Les patients atteints de LLC porteurs de cette mutations sont plus jeunes, souvent âgés de moins de 50 ans<sup>444,458</sup>. Cette mutation est associée à un statut IGHV muté<sup>444,458</sup>. Il a été décrit un association avec un caryotype complexe<sup>459</sup>. Certains auteurs rapportent une maladie cliniquement plus avancée au diagnostic en cas de mutation, sans différence significative sur la progression ou la survie<sup>444,456,459</sup>. De plus, parmi les cas de LLC IGHV muté, la présence de mutation MYD88 serait associée à une survie sans traitement raccourcie<sup>456</sup>. D'autres rapportent une survie globale comparable à celle de la population générale<sup>458</sup>. L'impact de cette mutation sur la survie reste controversé<sup>460</sup>.

Le gène *DDX3X* (pour DEAD-box helicase 3 X-linked), situé en Xq11, est muté chez environ 10 % des cas de LLC non traitées avec maladie progressive<sup>461</sup>. Il code une hélicase impliquée dans différentes étapes de modification des ARN dont la transcription, l'initiation de la traduction, l'épissage et l'export des ARNm. Ces mutations sont plus fréquentes en cas de statut IGHV non muté. Elles sont de type tronquante avec des mutations non-sens ou des insertions-délétions entraînant un décalage du cadre de lecture. Elles entraînent une perte d'expression de la protéine. Ces mutations sont plus fréquentes chez les patients en rechute après traitement (jusqu'à 17 %)<sup>461</sup>. Elles sont associées à une survie sans progression raccourcie<sup>462</sup>.

Des mutations inactivatrices de *NFKBIE* (pour NFκB Inhibitor Epsilon), situé en 6p21 ont été décrites comme récurrentes dans la LLC. La principale mutation retrouvée est une délétion de 4 pb<sup>463</sup>. Ces mutations sont susceptibles d'entraîner la formation d'une protéine tronquée et entraîneraient une activation de la voie NFκB<sup>464</sup>. Elles sont retrouvées à une fréquence d'environ 7 %, avec une augmentation dans les cas de stade avancé<sup>463,465,466</sup>. Elles sont associées à un pronostic péjoratif<sup>463</sup>.



*MED12* (pour Mediator complex subunit 12), situé en Xq13.1, a récemment été identifié comme muté dans la LLC à une fréquence d'environ 7 %<sup>467</sup>. Ces mutations sont mutuellement exclusives avec celles de *NOTCH1*. De plus, l'expression de *NOTCH1* est augmentée en cas de mutation de *MED12*. Ces mutations sont associées à un statut IGHV non muté.

Le gène *EGR2* (pour Early Growth Factor 2), situé en 10q21, a été retrouvé muté dans différentes études<sup>465,468</sup>. Ces mutations sont retrouvées dans environ 4 % des cas de LLC<sup>468</sup>. Leur fréquence augmente dans les cas de LLC de stade avancé<sup>465</sup>. Elles sont associées à un âge au diagnostic plus faible et à une survie sans traitement et une survie globale raccourcies<sup>465,468</sup>. Elles entraînent un pronostic défavorable comparable à celui conféré par les altérations de *TP53*<sup>468</sup>. Elles ont été retrouvées dans des précurseurs B de patients atteints de LLC, ce qui suggère un rôle initiateur de ces mutations<sup>465</sup>. Elles sont associées à un statut IGHV non muté, des altérations d'*ATM*, de *TP53* et *NOTCH1*<sup>468</sup>.

Le gène *XPO1* (pour Exportin 1 gene), situé en 2p15, a également été retrouvé muté dans la LLC. Il code une protéine impliquée dans l'export nucléaire de protéines et d'ARNm. Les mutations retrouvées touchent un codon particulier (p.E571) et sont situées dans une région hautement conservée, ce qui suggère que ces mutations ont un impact sur l'activité de la protéine<sup>444</sup>. Elles sont retrouvées dans 1 à 5 % des cas de LLC<sup>444,366,469</sup>. Elles sont associées à un statut IGHV non muté<sup>444,366</sup>. Elles sont également associées aux mutations de *NOTCH1*, *SF3B1* et *TP53*<sup>444,470</sup>. Il ne semble pas y avoir d'impact sur la survie des patients<sup>470</sup>. Les mutations de ce gène sont intéressantes dans la mesure où il existe un inhibiteur d'*XPO1* (le selinexor) qui pourraient être utilisables en thérapeutique chez ces patients.

Le gène *BRAF* est un proto-oncogène fréquemment muté dans les mélanomes et certains cancers de la thyroïde. Il est également quasiment constamment muté dans la leucémie à tricholeucocytes, un type de LNH-B<sup>471</sup>. Des mutations activatrices ont également été décrites dans la LLC. La principale mutation retrouvée est la V600E au niveau de l'exon 15. Quelques autres mutations sont rapportées dans l'exon 11. Ces mutations entraînent la perte de la conformation inactive de la protéine, ce qui entraîne une activation de la voie des MAPK (pour Mitogen Activated Protein Kinases)<sup>472</sup>. La fréquence de ces mutations est d'environ 3-4 % dans la LLC<sup>473,465</sup>. Elles seraient retrouvées à une fréquence plus élevée dans les syndrome de Richter et pourraient constituer une cible thérapeutique avec l'utilisation des inhibiteurs de *BRAF*<sup>V600E</sup>, déjà utilisés dans le traitement du mélanome et de la leucémie à tricholeucocytes réfractaire<sup>474</sup>.



Le gène *FBXW7*, situé en 4q31, code une ubiquitine ligase et est un suppresseur de tumeur. Ces mutations entraîneraient une activation de la voie Notch<sup>475</sup>. Il a été retrouvé muté dans 3-4 % des cas de LLC<sup>449,459</sup>. Ces mutations sont associées à la trisomie 12<sup>449</sup>. Elles sont mutuellement exclusives des mutations de *NOTCH1*<sup>449,476,469</sup>. Elles sont retrouvées de façon clonale et ne semblent pas sélectionnées par la chimiothérapie<sup>477</sup>. De plus, elles ont été identifiées au niveau de progéniteurs hématopoïétiques dans la LLC, suggérant un rôle initiateur<sup>478</sup>. Elles seraient associées à un risque de progression plus élevé<sup>479</sup>.

Le gène *POT1*, situé en 7q31, intervient dans la protection des télomères. Des mutations de ce gène ont été retrouvées chez 3,5 à 5 % des patients atteints de LLC<sup>399,480</sup>. Elles sont associées à la présence d'anomalies télomériques et chromosomiques, ce qui suggère son rôle dans l'acquisition d'événements oncogéniques<sup>399</sup>. De plus, il s'agit d'une anomalie clonale avant traitement, ce qui indique un rôle précoce dans l'initiation de la maladie<sup>477</sup>. Une étude montre un impact pronostique péjoratif des mutations de *POT1*<sup>481</sup>. Certaines de ces mutations ont été rapportées dans les formes familiales de LLC<sup>400</sup>.

*SAMHD1*, situé en 20q11, a été retrouvé muté de façon récurrente dans la LLC<sup>482</sup>. Ces mutations sont retrouvées à une fréquence faible (inférieure à 5 %)<sup>482,483</sup>. Leur fréquence augmente dans les cas de LLC réfractaires<sup>482</sup>. *SAMHD1* régulerait la prolifération cellulaire et la survie et serait impliqué dans des interactions protéiques spécifiques en réponse aux dommages de l'ADN<sup>482</sup>. Il s'agirait d'un gène suppresseur de tumeur<sup>483</sup>. Ces mutations seraient un événement fondateur dans la LLC<sup>484,424</sup>.

*RPS15* (pour Ribosomal Protein S15) est un gène situé en 19p13 et code une protéine membre de la sous-unité ribosomale 40S. Les mutations retrouvées dans la LLC sont de type faux-sens et sont restreintes à une région de 7 acides aminés conservée au cours de l'évolution<sup>466</sup>. Elles entraîneraient un défaut de régulation de p53<sup>466</sup>. La fréquence de ces mutations est d'environ 4-5 % dans la LLC avec un enrichissement dans les formes agressives et réfractaires (jusqu'à presque 20 %)<sup>402,466</sup>. Un tiers des cas mutés pour *RPS15* présente également des anomalies de *TP53*<sup>466</sup>. L'impact pronostique des mutations de *RPS15* reste à définir avec certains auteurs ne mettant pas en évidence d'impact pronostique indépendant, tandis que d'autres retrouvent une survie sans progression raccourcie<sup>466,402</sup>.

Des mutations de *KLHL6* (pour Kelch-like family member 6) ont été identifiées. Ce gène est situé en 3q27 et code une protéine impliquée dans la formation du centre germinatif au cours de la maturation lymphocytaire B<sup>485</sup>. Les mutations retrouvées sont situées à proximité du site de début de transcription<sup>444</sup>. Ceci pourrait indiquer un rôle de l'hypermutation somatique



dans l'apparition de ces mutations. De plus, elles sont associées avec un statut IGHV muté<sup>444</sup>. Ces mutations sont retrouvées dans moins de 1 % des cas de LLC et leur impact clinique n'est pas connu<sup>480</sup>.

D'autres gènes sont également décrits comme mutés de façon récurrente dans la LLC avec de faibles fréquences (inférieures à 5 %). L'impact clinique et leur utilisation en pratique restera à définir au cours de prochaines études.

### *g- Evolution clonale*

Chaque cellule cancéreuse d'un individu est caractérisée par une combinaison d'événements mutationnels comprenant des mutations initiatrices (ou « driver »), des mutations accompagnatrices (ou « passagers »), ainsi que d'éventuels variants héréditaires prédisposants<sup>484</sup>. Les cellules cancéreuses se propagent et se diversifient au cours de la croissance tumorale sous l'effet de facteurs intrinsèques (microenvironnement tumoral) ou extrinsèques (chimiothérapie par exemple). Cela aboutit à une population hétérogène de sous-clones différents aux niveaux génétique et phénotypique, reliés selon un lignage hiérarchique<sup>484</sup>. La population tumorale évolue selon une sélection Darwinienne<sup>484</sup>.

Les premières données permettant d'évoquer l'évolution clonale dans la LLC sont issues des études cytogénétiques par FISH et SNP-array, avec notamment la mise en évidence de l'acquisition sous-clonale d'une del(13q) au niveau du second allèle<sup>215,486</sup>.

Le NGS et les approches de séquençage du génome entier permettent de visualiser l'architecture sous clonale impliquée dans l'évolution de la LLC<sup>163</sup>. Ces techniques permettent de détecter environ 2000 mutations par échantillon issu de patients atteints de LLC<sup>487</sup>. En utilisant les fréquences alléliques, il est possible de hiérarchiser l'apparition des différentes mutations.

Une étude en 2012 a ainsi séquençé des échantillons de 3 patients à différents moments au cours de la maladie (au diagnostic, après traitement et au cours de rechutes, ainsi qu'un prélèvement buccal)<sup>484</sup>. Les mutations détectées dans toutes les cellules et dans tous les échantillons étaient considérées comme des événements fondateurs, tandis que les autres mutations étaient considérées comme secondaires. Cette approche a permis de mettre en évidence l'évolution des mutations et des anomalies du nombre de copies géniques. Ainsi, 2 patients ont développé des anomalies cytogénétiques au cours du temps, tandis qu'un autre est resté stable. Les profils mutationnels variaient au cours du temps. Au moins une mutation initiatrice possible était détectable pour chaque patient, et dans chaque cas, une mutation fondatrice différente a été mise en évidence (*SF3B1*, *SAMHD1* et *MED12*)<sup>484</sup>. L'évolution des sous-clones était différente suivant les cas. Chez un premier patient, un premier sous-clone a





émergé après une première ligne de chimiothérapie, puis persiste à la suite d'un second traitement anti-leucémique, avec la coexistence d'un autre sous-clone prépondérant, ce dernier devenant majoritaire par la suite. Chez un autre patient, l'évolution sous-clonale était relativement stable tant que la maladie était aussi cliniquement stable. Puis au moment de la progression, un sous-clone a émergé. Enfin, le dernier patient présentait les mêmes sous-clones de façon stable tout au long de sa maladie. Au total, des sous-clones étaient mis en évidence au diagnostic dans tous les cas. Leur évolution peut varier et de nouveaux sous-clones peuvent apparaître après traitement. L'intérêt clinique de l'évaluation systématique de l'architecture sous-clonale au cours de l'évolution de la maladie reste à définir.

Une autre équipe a analysé des échantillons successifs chez 12 patients<sup>488</sup>. Ils rapportent la compétition entre 2 clones ou plus au cours de l'évolution chez 70 % des patients, tandis que pour les autres, la dynamique clonale reste stable. Ils ont également mis en évidence pour deux patients l'acquisition d'anomalies génétiques comparables au cours du temps, ce qu'ils appellent l'évolution clonale convergente.

L'identification de sous clones chez les patients atteints de LLC est désormais possible grâce au NGS et a un intérêt clinique, en particulier pour *TP53* : il a été montré qu'une mutation de *TP53* dans un sous clone minoritaire au départ entraîne le même pronostic péjoratif qu'en cas de clone majoritaire<sup>489</sup>. De plus, après traitement, ces clones mutés *TP53* émergent et deviennent majoritaires.

Il apparaît donc important d'identifier dès le diagnostic des mutations sous-clonales d'intérêt afin d'apprécier l'évolution de la maladie.

## 4- Marqueurs sériques

### *α- Béta-2-microglobuline*

La bêta-2-microglobuline est une protéine extracellulaire faisant partie du CMH de classe I<sup>490</sup>. Elle est utilisée comme marqueur de l'activité de différentes maladies telles que certains cancers, des affections auto-immunes ou les infections<sup>490</sup>. Cette protéine est présente en faible quantité dans le sérum chez l'homme et sa concentration augmente notamment en cas d'infection (en particulier les infections virales par l'EBV ou le CMV)<sup>490</sup>. Dès les années 1980, il a été montré que la bêta-2-microglobuline est augmentée dans la leucémie lymphoïde chronique de façon corrélée avec la quantité de cellules tumorales et leur renouvellement<sup>491,490,492</sup>. En particulier, il a été démontré une corrélation entre l'augmentation de la bêta-2-microglobuline et le stade clinique Binet, ainsi que l'infiltration tumorale<sup>492</sup>. Il s'agit également d'un marqueur pronostique au sein du groupe de stade Binet A<sup>493</sup>. La bêta-2-microglobuline permet de prédire les survies sans progression et sans traitement<sup>494,495</sup>.



Cependant, sa concentration sérique dépend largement de la fonction rénale des patients<sup>496</sup>. En effet, elle est filtrée à 95 % par le glomérule rénal et réabsorbée à 99,9 % par le tubule proximal où elle est catabolisée<sup>496</sup>. Ainsi, sa concentration augmente considérablement en cas d'insuffisance rénale. Ainsi, il a été proposé d'ajuster le taux de béta-2-microglobuline en fonction du taux de filtration glomérulaire pour avoir un meilleur reflet de l'augmentation due à la masse tumorale<sup>496</sup>.

Malgré l'apparition de nouveaux marqueurs moléculaires, la béta-2-microglobuline reste un marqueur pronostique utilisé en pratique courante dans la LLC et intégré dans des scores cliniques récents tels que le CLL-IPI<sup>497</sup>.

### *b- Lactate déshydrogénase*

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme impliquée dans la glycolyse. Elle permet la conversion du pyruvate en lactate. Il existe cinq isoenzymes correspondant à des tétramères constitués de 2 types de sous-unités : H (pour Heart) et M (pour Muscle)<sup>498</sup>. Les différentes isoformes sont exprimées préférentiellement dans différents tissus. Les LDH3 (H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>) et LDH4 (HM<sub>3</sub>), représentant normalement environ 20 et 8 % respectivement de l'ensemble des LDH circulantes, sont préférentiellement produites par les lymphocytes et sont augmentées dans les lymphopathies. Ces isoformes ne sont pas dosées séparément et c'est donc le dosage global des LDH qui est utilisé.

Il a été montré que le taux de LDH est un marqueur prédictif de la survie sans traitement dans la LLC<sup>499</sup>. Il s'agit d'un marqueur de mauvais pronostic associé à un risque de développement de syndrome de Richter<sup>346</sup>.

### *c- Electrophorèse des protéines sériques*

L'électrophorèse des protéines sériques permet d'étudier les différentes fractions des protéines dans le sérum et de mettre en évidence des anomalies quantitatives et qualitatives. En particulier, dans la LLC, la recherche d'hypogammaglobulinémie ou la présence d'une fraction anormale d'immunoglobuline appelée pic monoclonal est recherchée. La suspicion de pic monoclonal est ensuite étudiée par immunofixation afin de déterminer la clonalité (chaîne lourde et légère) impliquée. La recherche de chaînes légères libres peut également être réalisée car il s'agit d'une technique plus sensible dans la détection d'un composant monoclonal.

Une anomalie est mise en évidence dans environ un tiers des cas de LLC, avec une hypogammaglobunémie chez environ 25 % des patients et un pic monoclonal dans environ 11



% des cas<sup>327,500</sup>. L'utilisation de la quantification des chaînes légères libres permet d'augmenter le pourcentage de patients présentant une fraction monoclonale jusqu'à 42 %<sup>501</sup>. Un ratio anormal est retrouvé plus fréquemment au cours de l'évolution qu'au diagnostic ou avant traitement (39 versus 29 % respectivement)<sup>502</sup>.

La présence d'un composant monoclonal est un facteur pronostique péjoratif dans plusieurs études<sup>457,501,502,503,504</sup>. En particulier, la présence d'un pic d'isotype IgM a été rapportée comme de plus mauvais pronostic<sup>504,457</sup>.

L'impact pronostique de l'hypogammaglobulinémie est plus controversé<sup>505</sup>. Certaines études rapportent un risque augmenté d'infections, en particulier en cas de déficit en sous-classes d'IgG<sup>506</sup>. D'autres ne retrouvent pas d'association entre hypogammaglobulinémie et survenue d'infection<sup>507</sup>. De plus, l'impact concernant la survie n'est pas clairement tranché<sup>505</sup>. Certaines études ne retrouvent pas d'impact péjoratif en analyse multivariée<sup>327,508</sup>. D'autres décrivent une survie globale raccourcie<sup>509</sup>. Enfin, un impact péjoratif sur la survie sans traitement a été démontré<sup>457</sup>.

Actuellement, l'électrophorèse des protéines sériques est réalisée au diagnostic et au cours de l'évolution de la LLC afin de détecter essentiellement une hypogammaglobulinémie, qui pourra être prise en charge par l'administration d'immunoglobulines polyvalentes lorsqu'elle est significative.

### *d- CD23 soluble*

Le CD23 est le récepteur de faible affinité de l'IgE<sup>510</sup>. Il est exprimé à la surface des cellules de LLC. Il a également été retrouvé sous forme soluble dans le sérum de patients atteints de LLC, à des niveaux corrélés avec l'expression de l'antigène de surface, la lymphocytose, la masse tumorale et le stade clinique<sup>511,512</sup>. Son augmentation est également corrélée au temps de doublement de la lymphocytose et permet de suivre la progression de la maladie<sup>513</sup>. Sa détermination au diagnostic chez les patients de stade Binet A permet de prédire les cas à risque de progression<sup>510,514</sup>. Il s'agirait d'un marqueur pronostique associé à une survie globale raccourcie<sup>515,510</sup>. Son temps de doublement permet de distinguer les patients ayant une forme indolente ou agressive<sup>516</sup>. Il s'agit également d'un marqueur pronostique en terme de survie sans traitement<sup>517</sup>.

Une étude récente a démontré que les taux de CD23 soluble élevés sont un marqueur prédictif d'évolution vers une LLC chez les patients présentant une lymphocytose B monoclonale<sup>518</sup>.

Actuellement, ce marqueur n'est pas utilisé en routine. Il est mesuré classiquement par technique ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Une équipe a mis au point une méthode de dosage par cytométrie en flux utilisant des billes (cytometry bead array)<sup>519</sup>. Cette



technique est parfaitement corrélée à l'ELISA et permettrait une meilleure accessibilité au dosage de ce marqueur.

### *e- Thymidine kinase*

La thymidine kinase est une enzyme catalysant la phosphorylation de la désoxythymidine en thymidine monophosphate, un précurseur essentiel pour la synthèse de l'ADN<sup>520</sup>.

La thymidine kinase sérique est un marqueur permettant de prédire la survie sans progression et la survie globale<sup>494,521</sup>. Il s'agit d'un marqueur prédictif de la réponse au traitement par Fludarabine<sup>521</sup>. Ce marqueur permet de séparer en deux groupes pronostiques les patients en stade Binet A et de forme clinique non indolente<sup>522</sup>. Il a été proposé comme marqueur prédictif du statut mutationnel IGHV<sup>523,524</sup>. Ainsi, des taux élevés sont associés à un statut IGHV non muté et la présence d'anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic<sup>525,524</sup>. Enfin, une étude montre que le taux de thymidine kinase sérique diminue significativement avec l'âge et propose d'interpréter ce marqueur de façon ajustée à l'âge dans la mesure où les patients atteints de LLC sont généralement âgés<sup>526</sup>.

## 5- Marqueurs immunophénotypiques

### *a- CD38*

Le CD38 est une glycoprotéine transmembranaire. Son expression par les cellules de LLC est un marqueur de mauvais pronostic, indicateur d'activation et de prolifération<sup>407,527,528</sup>. Le seuil de positivité utilisé varie entre 20 et 30 % de cellules exprimant ce marqueur. L'expression du CD38 est associée à la présence d'adénopathies, un taux d'hémoglobine plus faible, une hépatomégalie et un taux de bêta-2-microglobuline élevé<sup>527</sup>. Il avait alors été proposé d'utiliser ce marqueur en routine pour détecter les patients de mauvais pronostic<sup>407,527</sup>. En particulier, il avait été étudié à la fin des années 1990 comme alternative à l'étude du statut mutationnel IGHV, alors difficile à réaliser en routine de laboratoire<sup>407</sup>. Cependant, il a été montré une discordance entre ces deux marqueurs dans environ 30 % des cas<sup>529</sup>. De plus, l'expression du CD38 peut varier au cours de l'évolution de la maladie dans environ 25 % des cas<sup>529</sup>. Il s'agit d'un marqueur pronostique indépendant.



## *b- ZAP70*

ZAP70 (pour  $\zeta$ -Associated Protein) est une tyrosine kinase normalement exprimée dans les lymphocytes T et NK<sup>346,530</sup>. Elle est exprimée dans les lymphocytes B normaux et malins à différents stades de maturation<sup>531</sup>. Il a été démontré qu'elle joue un rôle dans la voie de signalisation du BCR<sup>532,533</sup>. Elle est recrutée au niveau du complexe de signalisation du BCR sous l'effet de la liaison à l'antigène, d'une façon similaire à SYK. SYK et ZAP70 ont des structures homologues.

Dans la LLC, une forte expression de ZAP70 a été mise en évidence par étude de profils d'expression génique en cas de statut IGHV non muté par rapport au statut muté<sup>170</sup>. L'utilisation de l'expression de ce gène mesurée par RT-PCR (pour Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) a donc été proposée comme alternative à l'étude du statut mutationnel IGHV, alors peu répandue et difficile à réaliser dans les laboratoires. Ceci a été confirmé par différentes équipes, avec une mesure proposée par cytométrie en flux<sup>534,535</sup>. Le seuil de positivité retenu dans les différentes études varie entre 10 et 20 %<sup>534,535</sup>. Cependant, des cas discordants existent suivant le type de réarrangement IGHV et certains autres marqueurs pronostiques tels que les anomalies cytogénétiques<sup>346</sup>. La mesure par cytométrie en flux nécessite une fixation des cellules et une perméabilisation, et des problèmes de standardisation ont été relevés, rendant difficile son utilisation en pratique courante<sup>346,536,537</sup>.

L'impact péjoratif de la positivité de ZAP70 a été démontré sur les survies globale, sans traitement et sans progression<sup>534,538</sup>.

## *c- CD49d*

Le CD49d est une molécule de surface dont l'expression induit la prolifération des cellules de LLC sous l'effet du microenvironnement<sup>539</sup>. Le seuil de positivité est généralement fixé à 30 %<sup>540,541,539</sup>. Son expression est associée aux formes progressives de LLC, et à une survie globale et sans traitement raccourcie<sup>540,542</sup>. Elle est également associée à l'expression du CD38 et de ZAP70<sup>540,542,541</sup>. Une étude en 2014 retrouve le CD49d comme étant le marqueur immunophénotypique le plus fort pour prédire la survie globale<sup>539</sup>. Ce marqueur pourrait constituer une cible thérapeutique<sup>542</sup>.

