



UNIVERSITE DJILLALI LIABES - SIDI BEL ABBES
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE

En vue de l'obtention du
Diplôme de **Doctorat en Sciences**
Spécialité : Sciences Biologiques
Option : Biologie de la cellule normale et pathologique (cas des cancers)

Présentée par

M^{me} Amal SENOUCI

Intitulé

Diagnostic et caractérisation cytogénétique des patients atteints de la leucémie lymphoïde chronique « LLC »

Le jury composé de :

Nom & prénom(s)	Grade	Qualité	Etablissement de rattachement
TOU Abdenacer	Professeur	Président	UDL - Sidi Bel Abbés
SAHRAOUI Tewfik	Professeur	Examineur	Université Oran1-Ahmed Ben Bella
SLIMANI Miloud	Professeur	Examineur	Université Dr Moulay-Tahar-- Saida
MOULESSEHOUL Soraya	Professeur	Directrice de thèse	UDL- Sidi Bel Abbés

DEDICACE

Je dédie ce travail

A mon cher père et ma défunte mère.....

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je tiens à vous faire savoir que j'aurais tout aussi bien pu faire une thèse sur le sujet des Remerciements...il y a tant de personnes à qui je voudrais témoigner officiellement toute ma gratitude. Tous ceux qui m'ont accompagnée et soutenue jusqu'ici.

*Je tiens à exprimer mes sincères et profonds remerciements à ma directrice de thèse, **Pr. MOULESSEHOUL Soraya**, qui a su me guider et me faire plonger dans un monde de recherche passionnant, pour ses conseils pertinents, ses orientations et ses critiques constructives tout au long de mon cursus universitaire.*

*Je tiens à remercier madame **DAUDIGNON Agnès**, Docteur en Sciences et praticien hospitalier, pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Qu'elle soit aussi remerciée pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'elle m'a prodiguée, ainsi que l'équipe de cytogénétique du Centre Hospitalier de Valenciennes, CHV, LILLE, FRANCE.*

*Je remercie spécialement **Dr SMOL Thomas** pour son aide très précieuse pour la rédaction de l'article.*

*Je remercie sincèrement **Dr TRICOT S., Dr BAKALA J., Dr QUILICHINI B., Dr PENTHER D. et Dr HERBAUX C.** du CHV de Valenciennes, d'avoir participé dans l'établissement de ce travail.*

*Il y a aussi une personne à qui je dois témoigner toute ma gratitude. Une personne d'une générosité sans égale, qui m'a soutenue et aidée tout au long de la réalisation de ce travail de recherche, bien plus qu'une collègue mais une sœur **Dr SEBAA Amel**, je ne saurais jamais lui dire combien je la remercie.*

J'adresse mes sincères remerciements aux membres de jury qui ont accepté de juger ce travail :

***Pr TOU Abdenacer**, qui malgré ses nombreuses occupations et charges, a accepté de présider ce jury. Qu'il soit assuré de ma respectueuse gratitude.*

*Je tiens à remercier également, **Pr SAHRAOUI et Pr SLIMANI** pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Résumé

La stratification de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) repose principalement sur les marqueurs FISH selon le modèle hiérarchique de Döhner qui inclut les marqueurs FISH à haut risque, FISH intermédiaire ou FISH à faible risque. Récemment, le caryotype complexe (CK) a été démontré comme facteur pronostique négatif indépendant dans la LLC.

Une série de 1012 patients atteints de LLC n'ayant pas été traités, a été étudiée avec FISH et analyse de bandes chromosomiques (CBA) sur le même culot obtenu à partir de cellules cultivées stimulées par oligonucléotide et interleukine « IL-2-CPG DSP30 ».

La combinaison de FISH et de CBA a permis d'affiner les catégories pronostiques avec l'identification de 30% de CK dans le groupe FISH à faible risque et intermédiaire. Cela soulève la question de les transférer dans un groupe à haut risque. Bien que cette série ait confirmé l'importante association négative entre CK et FISH à haut risque ($p = 0,003$), 33% des CK ne présentent pas de suppression *ATM* ou *TP53*. Trois groupes caractérisés par une association significative entre des marqueurs FISH et CBA ont émergés: CK avec perte de *TP53* et monosomie 15, CK avec perte *ATM* et translocation 14q32, et CK sans pertes *ATM* ou *TP53* mais trisomies 12, 18 et 19 ou t (14; 18) (q32; q21).

Nous avons observé qu'en plus de l'analyse FISH, CBA permet la détection de nombreuses anomalies pouvant avoir un impact sur le suivi et le traitement du patient principalement le caryotype complexe.

Mots-clés : Leucémie lymphocytaire chronique, caryotype complexe, marqueurs FISH.

Abstract

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) stratification mainly relies on FISH markers according to Döhner's hierarchical model which includes high-risk FISH markers, intermediate FISH, or low-risk FISH. Recently, complex karyotype (CK) has been demonstrated as an independent negative prognostic factor in CLL.

A series of 1012 untreated CLL patients have been investigated with both FISH and chromosome banding analysis (CBA) on the same pellet obtained from interleukin IL-2- CPG DSP30 oligonucleotides stimulated cultured cells.

Combining both FISH and CBA have led to refine prognostic categories with identification of 30% of CK in low-risk and intermediate FISH group. This raises the issue of switching them to a high risk group. While this series confirmed the significant association between CK and high-risk FISH ($p=0.003$), 33% of CK present no *ATM* or *TP53* deletion. Three groups characterized by significant association between FISH markers and CBA have emerged: CK with *TP53* loss and monosomy 15; CK with *ATM* loss and 14q32 translocation and CK without *ATM* or *TP53* losses but trisomy 12, 18 and 19 or t(14;18)(q32;q21).

We have observed that in addition to FISH analysis, the CBA allows detection of many abnormalities with potential impact on patient follow-up and treatment, mainly complex karyotype.

Key Words:

Chronic lymphocytic leukemia; complex karyotype; FISH markers.

ملخص

يعتمد التقسيم الطبقي لسرطان الدم الليمفاوي المزمن (CLL) أساساً على علامات FISH وفقاً لنموذج الهرمي Döhner الذي يتضمن FISH منخفضة الخطورة، FISH الوسيطة أو FISH عالية الخطورة. في الآونة الأخيرة النمط النووي المعقد (CK) قد ثبت كعامل النذير سلبي مستقل في CLL.

تمت دراسة سلسلة من 1012 مريض يعانون من CLL غير المعالجون مسبقاً و خضعوا لتحليل FISH وتحليل العصابات الكروموسومية (CBA) على نفس الحبيبات التي تم الحصول عليها من الخلايا المستزرعة التي حفزها القونكلويتيد والانترولوكين "IL-2-CPG DSP30"

ساعد الجمع بين FISH و CBA في تحسين فئات النذير مع تحديد 30 % من CK في مجموعة منخفضة المخاطر FISH والمتوسطة FISH هذا يثير مسألة نقلهم إلى مجموعة عالية الخطورة.

على الرغم من أن هذه السلسلة أكدت الارتباط السلبي الهام بين CK و FISH عالية الخطورة ($p=0.003$), 33 % من CK لا يحمل فقدان ATM أو TP53 .

ظهرت ثلاث مجموعات تتميز ارتباط كبير بين علامات FISH و CBA: CK مع فقدان TP53 و 15 , CK : monosomy مع فقدان ATM ونقل 14q32 و CK بدون فقدان ATM و TP53 و لكن التنتلمات 12,18 و 19 أو t(14 ؛ 18) (q32 ؛ q21)

لاحظنا أنه بالإضافة إلى تحليل FISH، CBA، يسمح بالكشف على مراقبة وعلاج المريض وخاصة CK

الكلمات الرئيسية

سرطان الدم الليمفاوي المزمن ، النمط النووي المعقد ، علامات FISH

Liste des abréviations

Ac: **A**nticorps

Ag: **A**ntigens

AHAI: **A**némie **H**émolytique **A**uto-**I**mmun

APRIL: **A**Proliferation **I**nducing **T**NF **L**igand

ATM: **A**taxia **T**elangiectasia **M**utated

BAFF: **B** Cell **A**ctivating **F**actor

BAFF: **B** Cell **A**ctivating **F**actor

BCL: **B**-Cell **L**ymphoma

BCR: **B** Cell **R**eceptor

BTK: **B**ruton **T**yrosine **k**inase

C: **C**yclophosphamide

CD: **C**luster of **D**ifferentiation.

CDK: **C**yclin-**d**ependent **k**inase

CGC: **C**onventional **G**-banding **C**ytogenetics

CK: **C**omplex **k**aryotype

CR: **C**omplement **R**eceptors

Del: deletion

EFS: **E**vent **F**ree **S**urvival

F: **F**ludarabine

Fc : **F**ragment **c**ristallisable

FGF: **F**ibroblast **G**rowth **F**actor

FISH: **H**ybridation **I**n **S**itu en **F**luorescence

G0: **G**ap **0**

HSCT: Hematopoietic Stem Cell Transplantation

HTLV1: Human T-cell Leukemia Virus type 1

Ig: Immunoglobuline

IgVH: Immunoglobulin Heavy-chain variable

IL: InterLeukine

LAL: Leucémie Aîgue Lymphoïde

LDH: Layered Double Hydroxide

LNH-B: Lymphome Non Hodgkinien a cellule B

LPL: Leucémie ProLymphocytoïde

MBL: Monoclonal B-cell Lymphocytosis

MDR: Minimal Deleted Region

MO: Moelle Osseuse

MSC: Mesenchymal Stem Cell

NK: Natural Killer

NLC: Nurse-Like Cells

OS: Overall Survival

P: Pentostatine

PFS: Progression-Free Survival

R: Rituximab

Rh: Rhésus

RNA: Ribo Nucleotidic Acid

Sdf1: Stromal Derived Factor 1

sIg : surface Immunoglobuline

TCR: T-Cell antigen Receptor

TDL: Temps de Dédoublément Lymphocytaire

TP53: Tumor Protein 53

TTFT: Time To First Treatment

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

ZAP 70: Zêta Associated Protein 70

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Compaction de l'ADN dans un chromosome mitotique	7
Figure 2 : Aspect morphologique d'un chromosome métaphasique	9
Figure 3 : Chromosomes métaphasiques à différentes résolutions	12
Figure 4 : Aspects morphologiques des chromosomes en fonction de l'indice centromérique	12
Figure 5 : Caryogramme haploïde en bandes R	13
Figure 6 : Schéma décrivant la formation d'une translocation réciproque	17
Figure 7: Schéma décrivant la formation d'une translocation robertsonienne	18
Figure 8 : Schéma décrivant la formation d'anneau chromosomique	18
Figure 9 : Schéma décrivant la formation d'une duplication	19
Figure 10: Schéma décrivant la formation	19
Figure 11 : Schéma décrivant la formation d'une inversion péricentrique d'une inversion paracentrique	19
Figure 12 : Les anomalies chromosomiques acquises et constitutionnelles	23
Figure 13: Anomalie de nombre homogène	24
Figure 14. Lymphocytes de LLC sur un frottis sanguin.	27
Figure 15 : Frottis sanguin d'une LLC : les lymphocytes forment une population homogène de cellules de taille réduite avec un noyau à chromatine dense et très peu de cytoplasme	34
Figure 16 : LLC mixte à petits et grands lymphocytes	35
Figure 17 : LLC morphologiquement atypique	35
Figure 18 : LLC prolymphocytoïde ou LLC/LPL	35
Figure 19 : Leucémie prolymphocytaire B (dite de Galton)	36
Figure 20 : Délétion 13q14 visible	49
Figure 21 : Délétion 13q14 mono-allélique souvent cryptique	50
Figure 22 : Délétion 13q14 Bi-allélique	51
Figure 23 : Trisomie 12	52
Figure 24 : La délétion 11q	54
Figure 25: La délétion 17p11	56
Figure 26 : Le Gain 2p	57

Figure 27 : Délétion 6q	58
Figure 28 : Principales anomalies génétiques de signification pronostique connue dans la LLC	61
Figure 29 : Délétion 14q	60
Figure 30 : Caryotype en marquage R (46,XY)	69
Figure 31 : Caryotype en marquage G (46,XX)	70
Figure 32 : La multifuorescence	74
Figure 33 : L'hybridation	75
Figure 34 : La microscopie en épifluorescence	77
Figure 35 : Sondes utilisées en cytogénétique moléculaire	81
Figure 36 : Structures des 4 sondes spécifiques de la LLC	84
Figure 37 : La délétion 13q14 vue par CBA et confirmée par FISH	93
Figure 39 : La délétion 11q 22-23 et les délétions 17 p13	94
Figure 40 : (A) Proposition de risque combiné CBA / FISH selon nos données; (B)Combinaison des propositions de risque CBA / FISH avec des données cytogénétiques supplémentaires selon les études publiées.	96
Figure 41 : Evolution des événements chromosomiques péjoratifs selon la catégorie de risque FISH	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des chromosomes humains	11
Tableau 2 : Nomenclature des principales anomalies chromosomiques stables	14
Tableau 3 : Score de Matutes	40
Tableau 4 : Classification de Rai (1975)	40
Tableau 5 : Classification internationale révisée de Binet (1981)	41
Tableau 6: Indications du caryotype et de la FISH dans la LLC	63
Tableau 7 : Données CBA et FISH des 1012 patients	89
Tableau 8 : Résultats FISH and CBA des patients avec caryotype complexe	90

TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

SOMMAIRE

AVANT PROPOS **1**

PARTIE 1

CHAPITRE I : Bases de la cytogénétique **5**

I.1. Introduction historique **5**

I.2. Qu'est ce qu'un chromosome ? **6**

I.3. Morphologie d'un chromosome métaphasique **8**

I.3.1. Les centromères **8**

I.3.2. Les télomères **8**

I.4. Classification et nomenclature **9**

I.5. Description des anomalies **10**

I.6. Interprétation du caryotype **15**

I.6.1. Les anomalies chromosomiques de nombre ou de structure **15**

I.6.1.1. Anomalies numériques autosomiques **15**

I.6.1.2. Anomalies numériques des chromosomes sexuels **16**

I.6.1.3. Anomalies de structure **17**

I.7. Les anomalies équilibrées et déséquilibrées **20**

I.8. Les anomalies constitutionnelles ou en mosaïque	21
I.9. Les anomalies acquises dans les cellules leucémiques ou néoplasiques	21
I.10. Les anomalies chromosomiques sporadiques et systématisées	22
CHAPITRE II : La leucémie lymphoïde chronique « LLC »	25
II.1. Caractéristiques du lymphocyte B de la LLC	26
II.1.1. Morphologie	26
II.1.2. La lymphocytose monoclonale B (MBL)	27
II.1.2.1. Différents types de MBL	28
II.2. Physiopathologie de la LLC	28
II.3. Principaux signes biologiques	29
II.3.1. Hémogramme	29
II.3.1.1. Leucocytes	29
II.3.1.2. Hémoglobine	30
II.3.1.3. Plaquettes	30
II.3.2. Immunophénotype	30
II.3.3. Autres examens biologiques	31
II.3.3.1. Myélogramme et biopsie ostéo-médullaire	31
II.3.3.2. Biopsie ganglionnaire	31
II.3.3.3. Caryotype et cytogénétique moléculaire	32
II.3.3.4. Biologie moléculaire	32
II.3.3.5. Examens biochimiques et immunologiques	33
II.3.4. Autres examens biologiques réalisables selon le contexte	33
II.4. Principaux signes cliniques	33
II.5. Formes morphologiques et cliniques de la LLC	34

II.5.1. Aspect morphologique habituel (80% des cas)	34
II.5.1.1. Hyperlymphocytose monotone à petits lymphocytes matures	34
II.5.2. Variantes morphologiques de la LLC-B (20% des cas)	35
II.5.2.1. LLC mixte à petits et grands lymphocytes	35
II.5.2.2. LLC morphologiquement atypique	35
II.5.2.3. LLC prolymphocytoïde ou LLC/LPL	35
II.5.2.4. Leucémie prolymphocytaire B (dite de Galton)	36
II.6. Diagnostic différentiel	36
II.6.1. Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) à petits lymphoblastes	36
II.6.2. Hyperlymphocytoses réactionnelles (infectieuse)	36
II.6.2.1. Lymphocytoses infectieuses	36
II.6.2.2. Syndromes mononucléosiques	36
II.6.3. La phase de dissémination des LNH à cellules matures	36
II.6.4. Lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés	37
II.6.5. Les diverses lymphoproliférations de type T	38
II.6.5.1. Leucémie prolymphocytaire T	38
II.6.5.2. Syndrome de Sézary (et Mycosis fungoides)	38
II.6.5.3. Lymphocytose à lymphocytes granuleux	38
II.6.5.4. Leucémie/Lymphome T de l'adulte	39
II.7. Facteurs pronostiques de la leucémie lymphoïde chronique et apport des marqueurs biologiques	39
II.7.1. Temps de doublement des lymphocytes	41
II.7.2. b2- microglobuline	42
II.8. Complications	42
II.8.1. Infections	42

II.8.2. Aggravation de l'insuffisance médullaire	42
II.8.3. Complications auto-immunes	42
II.8.4. Evolution d'une LLC classique en leucémie prolymphocytoïde	42
II.8.5. Syndrome de Richter	43
II.9. Traitement	43
II.9.1. Traitement de première ligne	43
II.9.1.1. Patients sans del (17p)	43
II.9.1.2. Patients avec del (17p)	44
II.9.2. Traitement des rechutes	44
II.9.2.1. Première rechute	44
II.9.2.2. Rechutes ultérieures	44
II.9.3. Formes réfractaires	45
II.9.4. Consolidation et entretien	45
II.9.5. Cas particuliers	45
II.9.5.1. Cytopénies auto-immunes	45
II.9.5.2. Syndrome de Richter	46
II.9.5.3. Auto/allogreffe	46

CHAPITRE III : Cytogénétique et prise en charge de la leucémie

lymphoïde chronique	47
III.1. Anomalies cytogénétiques	48
III.1.1. Délétion 13q14	48
III.1.2. Trisomie 12	52
III.1.3. Délétion 11q22-23	53
III.1.4. Délétion 17p13	54

III.1.5. Gain 2p	56
III.1.6. Les délétions/translocations du bras long du chromosome 6	57
III.1.7. Caryotype complexe	58
III.1.8. Translocations chromosomiques	59
III.1.9. Autres anomalies cytogénétiques récurrentes	59
III.1.10. Évolution clonale	62
III.1.11. Les indications de l'analyse cytogénétique dans la LLC	62
III.1.11.1. Caryotype	62
III.1.11.2. FISH	63

PARTIE 2

CHAPITRE I : Matériel et méthodes de détection des anomalies

cytogénétiques de la LLC	64
I.1. Matériel	65
I.1.1. Les patients	65
I.1.2. Analyse cytogénétique conventionnelle	66
I.1.2.1. Etape pré-analytique et échantillonnage	66
I.1.2.2. Etape analytique	67
I.1.2.3. Etablissement du caryotype	70
I.1.3. Cytogénétique moléculaire	71
I.1.3.1. Conditions d'application	72
I.1.3.2. Principe général de l'hybridation fluorescente in situ FISH	72
I.1.3.3. Types de sondes	77
I.1.3.4. Règles d'utilisation des techniques de cytogénétique moléculaire	79

I.1.3.5. Documentation	81
I.1.3.6. Résultats	81
I.1.4. Application de la cytogénétique conventionnelle sur la LLC	82
CHAPITRE II : RESULTATS ET DISCUSSION	85
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	100
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXES	128
ACKNOWLEDGEMENT	129
Cytogenetic landscape in 1012 newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia	130

AVANT-PROPOS

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la forme la plus courante des leucémies dans les pays occidentaux (Kipps *et al.*, 2017). Aujourd'hui, le traitement de la LLC est principalement stratifié selon le statut *TP53* (Fischer *et al.*, 2017). En effet, les patients avec *TP53* supprimé ou muté sont généralement résistants à la chimio-immunothérapie (Hallek *et al.*, 2010). En pratique clinique, les facteurs pronostiques peuvent également inclure les stades avancés, la configuration de la lignée germinale non mutée dans la région variable du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (*IGHV*) et la suppression de 11q22 impliquant une délétion *ATM* identifiée par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ou cytogénétique conventionnelle (Fischer *et al.*, 2017).

Depuis l'utilisation de la classification de Döhner sur la base de l'analyse FISH, les approches cytogénétiques conventionnelles n'ont pas été prises en compte dans les descriptions cytogénétiques de la LLC, mais pour les caryotypes complexes (CK) ont récemment été rapportés pour prédire de mauvais résultats cliniques chez les patients traités avec des traitements standards ou de nouveaux agents, tels que les inhibiteurs de *BCR* ou le *venetoclax*, un inhibiteur sélectif de *BCL2* (Le Bris *et al.*, 2017; Rigolin *et al.*, 2017). Ceci a été récemment confirmé dans une vaste étude rétrospective sur des patients avec cinq anomalies ou plus sur l'analyse des bandes chromosomiques (CBA) (Baliakas *et al.*, 2019). Cette étude a également individualisé la CK avec 3 ou 4 aberrations, qui ont suivi des maladies agressives seulement en présence de l'aberration *TP53*, et CK avec trisomie 12 et / ou trisomie 19, affichant un profil indolent.

Il a également été démontré que les patients atteints de LLC avec des réarrangements déséquilibrés pourraient représenter un sous-ensemble très risqué, avec des caractéristiques cliniques et biologiques distinctes (Rigolin *et al.*, 2018).

La cytogénétique conventionnelle est une technique bien connue à sensibilité variable, principalement en fonction du choix de la stimulation mitogène des cellules leucémiques ce qui augmente les métaphases évaluables chez la plupart des patients (Dicker *et al.*, 2006). De

même, la sensibilité FISH est plus efficace sur les chromosomes en métaphase que sur les noyaux interphasiques dans la LLC.

Le but de la présente étude est donc de caractériser l'une des plus grandes cohortes déjà décrite de 1012 patients atteints de LLC au diagnostic avec une méthodologie cytogénétique sensible et standardisée.

Ainsi que d'inclure les données cytogénétique conventionnelle dans le diagnostic et le pronostic de ces patients.

PARTIE 1

CHAPITRE I :
BASES DE LA CYTOGENETIQUE

Chapitre I : Bases de la cytogénétique

I.1. Introduction historique

C'est en 1956 que Tjio et Levan, déterminent le nombre de 46 chromosomes dans les cellules somatiques humaines, cette découverte confirmée par Ford et Hamerton (1956) est à la base de l'étude systématique du caryotype humain. En 1959, Lejeune *et al.*, dans les comptes-rendus de neuf enfants mongoliens soulignent la présence d'un petit chromosome acrocentrique surnuméraire. Cette découverte marque la naissance de la « cytogénétique clinique ». Depuis cette date, l'importance diagnostique de la cytogénétique n'a cessé de croître. Un effort collectif des cytogénéticiens et des cliniciens pour rechercher dans les anomalies congénitales une éventuelle étiologie chromosomique a fait suite à cette découverte. Rapidement, différentes anomalies de nombre et de structure chromosomiques ont été décrites. Plusieurs nomenclatures ont été proposées, et afin d'éviter une confusion, un Système Standard de Nomenclature des Chromosomes Mitotiques Humains a été proposé par la Conférence de Denver en 1960, 3 ans plus tard, la Conférence de Londres établit une classification de 7 groupes de chromosomes par lettres, de A à G (proposée par Patau en 1960), et c'est en 1966 que la Conférence de Chicago propose un caryogramme en se référant à la taille et à la position du centromère des différents chromosomes. La première technique de marquage est due à Caspersson et ses collègues, qui utilisent la moutarde de quinacrine pour individualiser chaque chromosome par l'apparition de bandes caractéristiques : les bandes Q sur les plantes (Caspersson *et al.*, 1968), exploitées par la suite chez l'homme (Caspersson *et al.*, 1972). D'autres techniques sont rapidement mises au point : bandes G (Seabright, 1971), bandes R (Dutrillaux et Lejeune, 1971), bandes C (Summer *et al.*, 1971), bandes NOR (Howell *et al.*, 1980). La découverte des bandes chromosomiques va améliorer considérablement les potentialités d'analyse et permettre la reconnaissance plus aisée des anomalies chromosomiques (Paris Conférence, 1971 ; Supplément 1975). Toutes ces nomenclatures ont été incluses dans le Système International de Nomenclature de Cytogénétique Humaine (ISCN, 1978). Les techniques de marquage usuels RHG ou GTG permettent de définir 300 à 400 bandes par génome haploïde avec une résolution d'environ 7 à $10 \cdot 10^6$ pb par bande. De nombreuses délétions, duplications et translocations peuvent être détectées à ce niveau de résolution. La technique de « haute résolution » par la synchronisation des chromosomes en phase S, mise au point par Dutrillaux, 1975a ; Yunis, 1976 et publiée par l'ISCN (1981), permet encore d'améliorer la résolution cytogénétique des chromosomes et a

conduit à la description de nouveaux groupes de pathologies chromosomiques : les syndromes de microdélétions et microduplications (Ledbetter, 1992). Plus récemment enfin, d'autres techniques ont fait leur apparition et deviennent de plus en plus utilisées. L'hybridation *in situ* a fait appel d'abord à des sondes radioactives (Pardue et Gall, 1969), puis à des sondes froides fluorescentes dans la technique FISH. Elle est particulièrement utile pour la détection des anomalies chromosomiques submicroscopiques. Elle est très spécifique d'un fragment de chromosome ou d'un gène. Le développement de ces techniques récentes a fait passer la cytogénétique de l'étude des cellules en division (prométaphase, métaphase) à l'étude des cellules pendant l'interphase. Enfin, le séquençage du génome humain et l'arrivée des nouvelles techniques de biologie moléculaire (hybridation génomique comparative (CGH) en particulier sur puces ADN (array) permettront bientôt de détecter de façon automatisée des désordres génomiques d'une taille de l'ordre de 1 million de paires de bases et de connaître directement le contenu en gènes des régions remaniées (Houssin et Verger, 2004). La nouvelle nomenclature ISCN, 2009 fournit des recommandations d'écriture pour les techniques de FISH et de CGH.

I.2. Qu'est ce qu'un chromosome ?

Un chromosome est constitué d'une immense double hélice d'ADN entourée de divers groupes de protéines. Les principales protéines sont les histones H2A, H2B, H3 et H4. Le complexe formé par l'ADN et ces protéines est appelé chromatine. La structure de base de la chromatine rappelle un collier dont l'ADN serait le fil et les nucléosomes les perles. Un nucléosome est une structure grossièrement sphérique constituée de 8 histones (octamère), entourées par 1,75 tour d'ADN. Une neuvième histone est positionnée à l'extérieur. La chromatine forme de larges boucles amarrées à un échafaudage protéique qui constitue l'armature centrale du chromosome. A partir de ce modèle de base, plusieurs configurations de la chromatine sont possibles. La plupart du temps, la structure en collier s'enroule en une structure hélicoïdale, la fibre de 30 nm. Les nucléosomes sont plus au moins serrés l'un contre l'autre au sein de la fibre. Au moment de la division cellulaire, la chromatine est beaucoup plus compacte ; c'est à ce moment que les chromosomes peuvent être visibles en microscope optique (**Figure 1**).

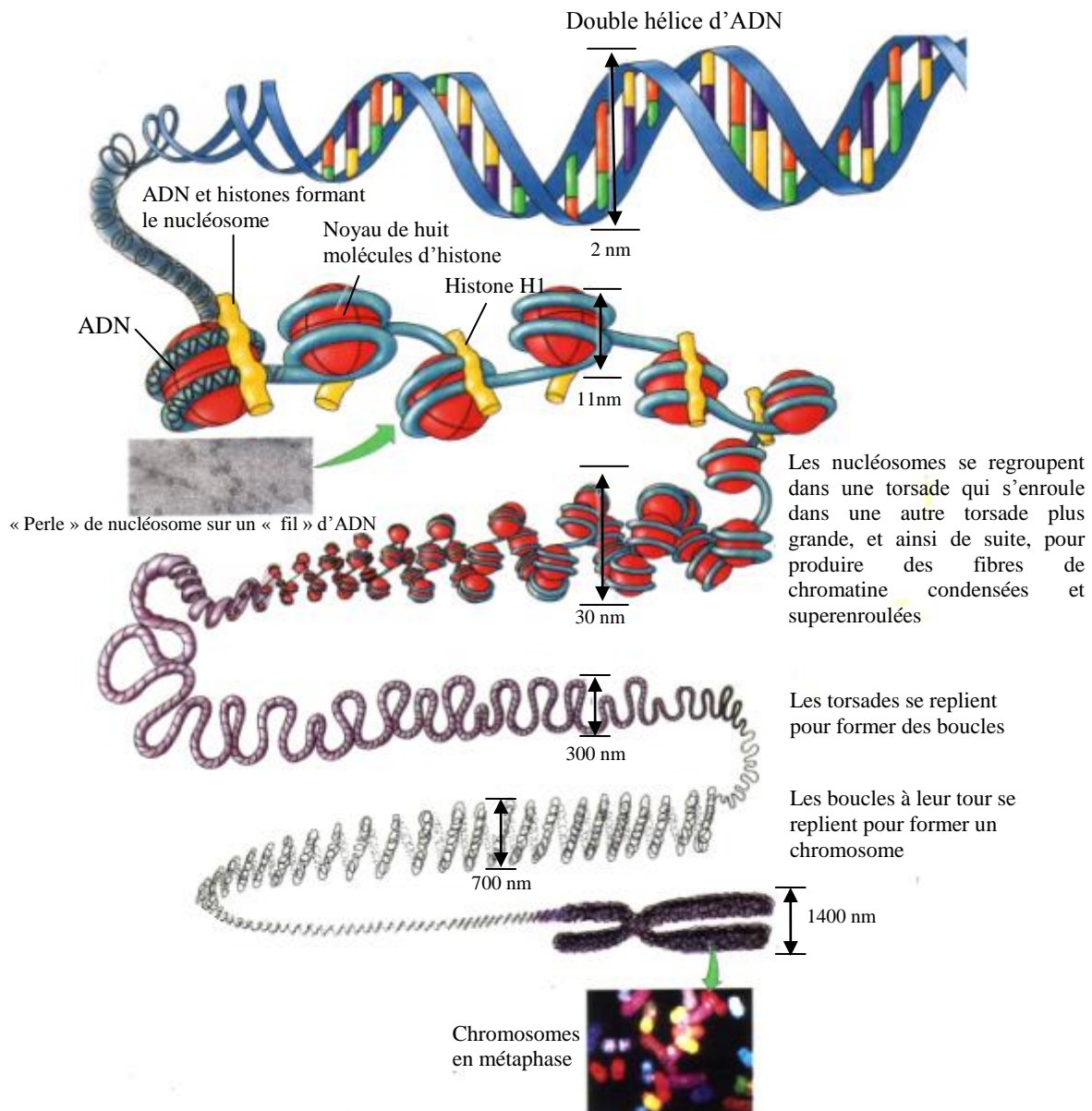


Figure 1 : Compaction de l'ADN dans un chromosome mitotique (Geoffrey, 1997)

I.3. Morphologie d'un chromosome métaphasique

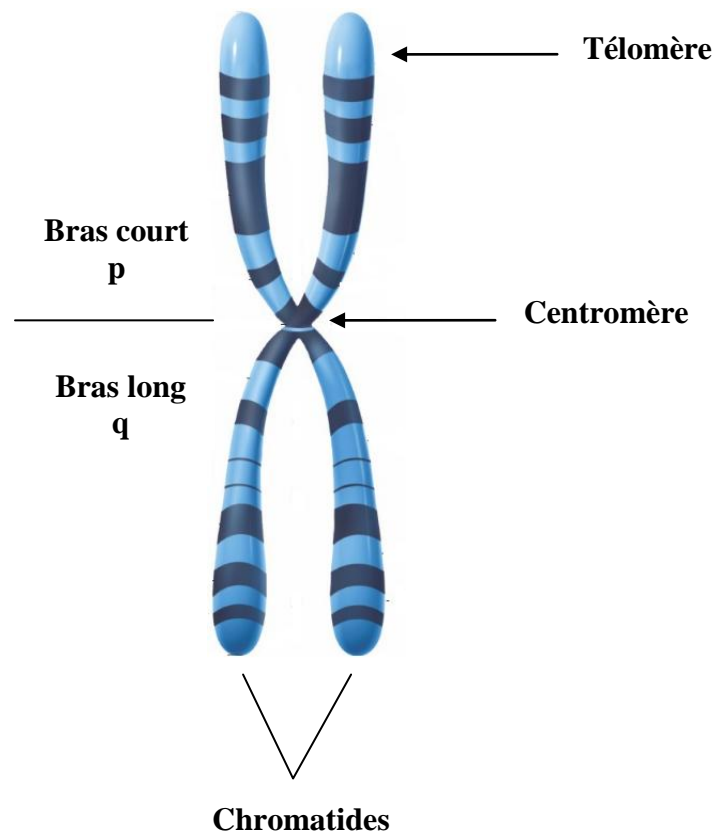
Les chromosomes ne sont pas simplement une forme compacte d'ADN. Ce sont de vraies organelles intracellulaires. Certaines de leurs fonctions dépendent de deux structures spécialisées : les centromères et les télomères.

I.3.1. Les centromères

Pendant la métaphase, le chromosome apparaît morphologiquement en microscope ordinaire sous forme de deux filaments chromatiniens (chromatides), reliés par un centromère (constriction primaire) qui apparaît comme un étranglement (**Figure 2**), et ne se colore pas par les colorants habituels de la chromatine (Robert *et al.*, 1979). C'est la région sur laquelle s'attache les microtubules du fuseau de division (au niveau d'une zone particulière appelée kinétochore) ; c'est la dernière région chromosomique à se scinder en deux au moment de l'anaphase. Sur le plan moléculaire, le centromère est composé de séquences d'ADN répétées en un grand nombre de fois sans rôle de transcription connu.

I.3.2. Les télomères

Les télomères sont les régions spécifiques placées aux 2 extrémités des chromosomes. L'ADN de chaque télomère contient un grand nombre de répétitions de la séquence (TTAGGG), disposées en tandem (orientés dans le même sens). En raison du mécanisme enzymatique par lequel l'ADN se réplique, chaque extrémité de chromosome perd 10 à 20 répétitions à chaque division cellulaire. Si la séquence répétitive télomérique est entièrement perdue, le chromosome devient instable, ce qui conduit à la mort cellulaire. Certaines théories mettent en relation ce mécanisme avec le vieillissement, mais ceci demeure controversé. Les télomères comptent suffisamment de séquences répétées pour permettre aux cellules de se diviser tout au long de la vie d'un individu, mais la séquence télomérique répétée doit être régénérée à chaque génération. Les cellules germinales et les cellules cancéreuses produisent une enzyme particulière, la télomérase, qui est capable de restaurer le nombre initial de séquences télomériques, ce qui contribue à rendre ces cellules immortelles (Read et Donnai, 2009).



**Figure 2 : Aspect morphologique d'un chromosome métaphasique
(Dupont et Rabineau, 2002)**

I.4. Classification et nomenclature

La classification des chromosomes est fondée sur leurs caractères morphologiques (la longueur relative du chromosome : taille, la position du centromère : indice centromérique, la succession de bandes claires ou foncées obtenues par «dénaturation» caractéristique d'un chromosome : répartitions des différentes bandes (Tanzer et Huret, 1992). Leur nomenclature a évolué parallèlement à l'amélioration des techniques et son établissement a fait l'objet de plusieurs réunions internationales de standardisation (Denver Conférence, 1960 ; Paris Conférence, 1971 ; Supplément 1975) (**Tableau 1**). De façon générale, les autosomes sont classés dans un ordre de tailles décroissantes et numérotées de 1 à 22, les gonosomes, ou chromosomes sexuels gardant leur dénomination de **X** et **Y**. Le nombre de bandes par lot haploïde (c'est-à-dire pour 23 chromosomes) permet de définir la résolution de l'analyse cytogénétique (**Figure 3**). Chaque bras chromosomique de part et d'autre du centromère, est

symbolisé par la lettre **p** qui désigne le bras court et la lettre **q** le bras long du chromosome, ceux qui sont égaux pour les chromosomes **métacentriques**, inégaux pour les chromosomes **submétacentriques** et dont se confond le centromère avec l'une des extrémités sont dits **acrocentriques (Figure 4)**. Les bras sont divisés en régions, qui elles même sont subdivisées en bandes numérotées du centromère vers le télomère. La **figure 5** présente les idéogrammes standardisés d'un caryotype en bande G avec une résolution de 550 bandes. Pour obtenir un nombre de bandes supérieur, les cellules doivent être récoltées avant que les chromosomes n'atteignent leur degré maximal de condensation, à la fin de la métaphase. Sur ces chromosomes très étirés, les bandes principales se subdivisent en sous-bandes et sous-sous-bandes, permettant une localisation plus fine. Chaque chiffre correspondant à un niveau de subdivision plus fin, Plus les chromosomes sont étirés, plus ils tendent à se chevaucher lors de l'étalement, rendant l'analyse des images de caryotypes à 1500-2000 bandes très difficile.

I.5. Description des anomalies

La formule chromosomique normale est : **46, XX** chez la femme et **46, XY** chez l'homme. Les signes + et – placés devant un chromosome désignent le gain d'un chromosome (trisomie) ou sa perte (monosomie). Des signes conventionnels désignent les remaniements chromosomiques : t pour translocation, del pour délétion, inv pour inversion...etc. (ISCN, 2009). La nomenclature des anomalies chromosomiques est résumée dans le **Tableau 2**.

Tableau 1 : Classification des chromosomes humains (Theret *et al.*, 1985)

<i>GROUPE</i>	<i>CHROMOSOMES</i>	<i>CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES</i>
<i>A</i>	<i>1-3</i>	grands chromosomes métacentriques facilement individualisables par leur taille et la position du centromère, le chromosome 2 est submétacentrique.
<i>B</i>	<i>4-5</i>	chromosomes submétacentriques difficiles à distinguer les uns des autres.
<i>C</i>	<i>6-12 + X</i>	chromosomes de taille moyenne, à centromère en position submétacentrique difficile à distinguer les uns des autres. L' X ressemble au plus grand chromosome de ce groupe.
<i>D</i>	<i>13-15</i>	chromosomes acrocentriques de taille moyenne et porteurs de satellites.
<i>E</i>	<i>16-18</i>	chromosome métacentrique (le 16) ou submétacentriques (17 et 18) relativement courts.
<i>F</i>	<i>19 et 20</i>	petits chromosomes métacentriques.
<i>G</i>	<i>21 et 22 + Y</i>	petits chromosomes acrocentriques porteurs de satellites pour le 21 et 22 , de bras courts pour l' Y .

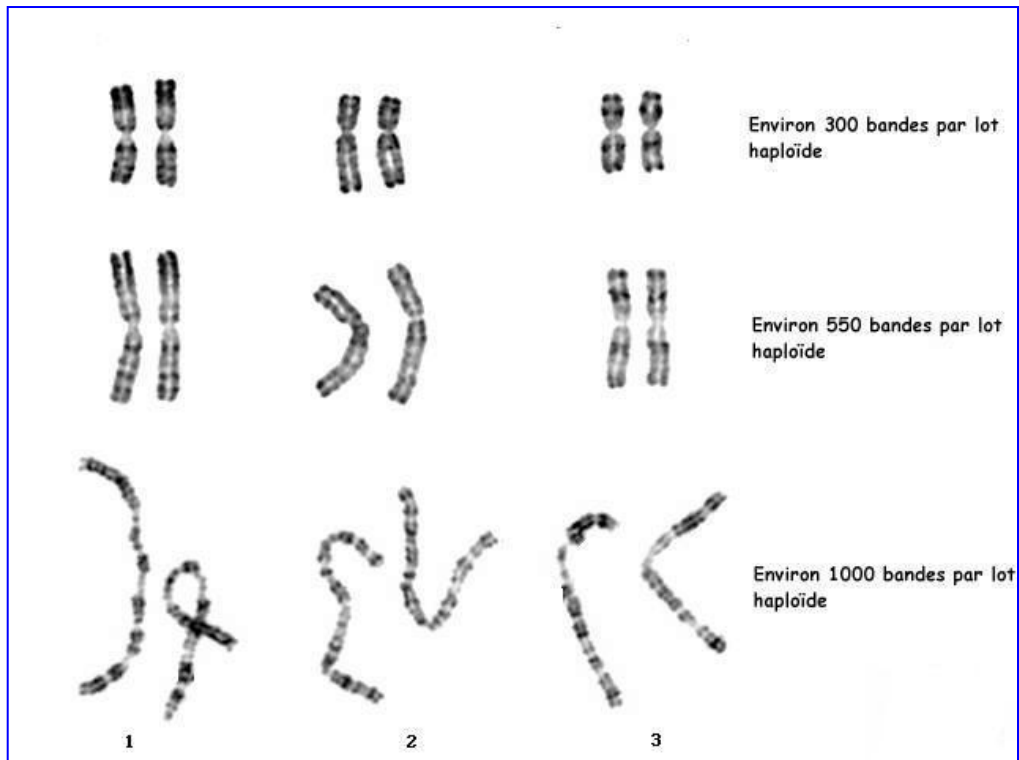


Figure 3 : Chromosomes métaphasiques à différentes résolutions
(Paris Conférence 1971, Supplément 1975)

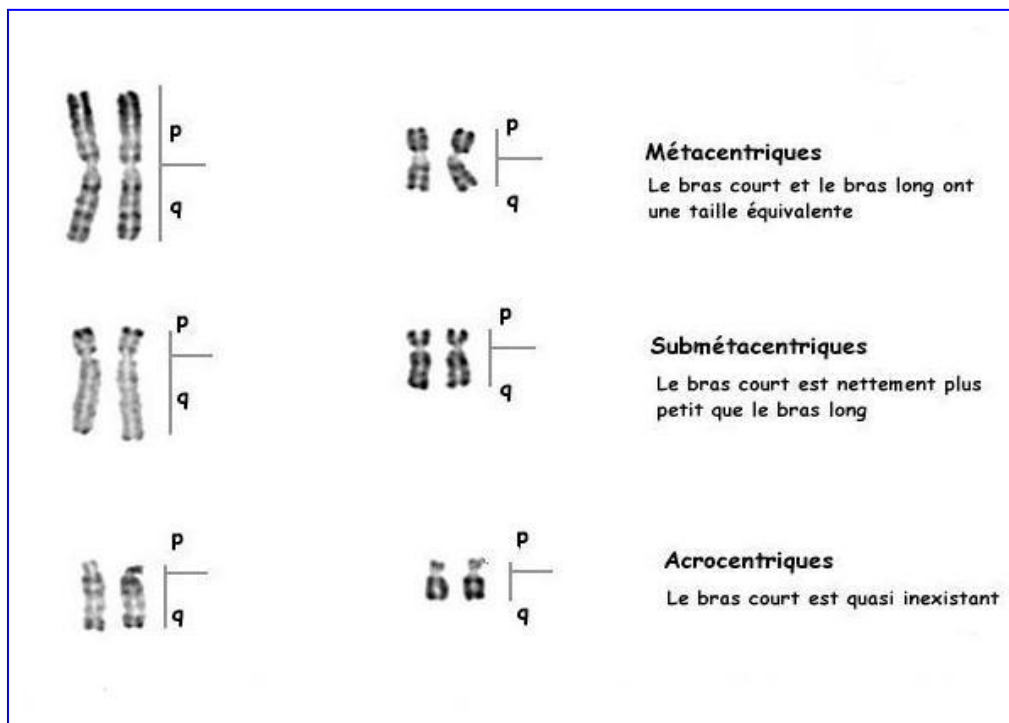


Figure 4 : Aspects morphologiques des chromosomes en fonction de l'indice centromérique (Berkaloff, 1989)



**Figure 5 : Caryogramme haploïde en bandes R
(ISCN, 2009)**

**Tableau 2 : Nomenclature des principales anomalies chromosomiques stables
(ISCN, 2009)**

<i>Anomalie</i>	<i>Définition</i>	<i>Nomenclature</i>	<i>Exemple</i>
de nombre			
trisomie	3 exemplaires d'un chromosome	+	+8
monosomie	1 exemplaire d'un chromosome	-	-5
de structure	échange de segments entre 2 chromosomes	t	t(9;22)(q34;q11)
translocation	perte d'un segment distal	del	del(20)(q11)
délétion	(apparemment terminal) ou non (délétion interstitielle) au sein d'un chromosome		del(5)(q14q32)
isochromosome	perte d'un bras (p ou q) et duplication de l'autre (q ou p)	i	i(17)(q10)
inversion	« rotation » d'un segment dans un chromosome, péricentrique si le centromère est compris, paracentrique si un seul bras est concerné	inv	inv(3)(p13q21) inv(3)(q21q26.2)
insertion	d'un segment à un autre emplacement du génome, sur le même ou sur un autre chromosome.	ins	ins(2)(p13q21q31) ins(5;2)(p14;q22,q32)
anneau	perte du segment distal à chaque bras d'un chrom. et réarrangement de la partie intermédiaire en structure circulaire. Le chromosome impliqué est souvent non reconnaissable.	r	r(7)(p22q36)
duplication	d'un segment d'un chromosome au sein de ce chromosome.	dup	dup(1)(q22q25)
dicentrique	translocation aboutissant à la formation d'un chromosome comprenant 2 centromères (dicentrique) et d'un fragment acentrique (ace) chromosome non reconnaissable parce que hautement remanié ou de qualité insuffisante	dic	dic(13;15)(q22;q24)

marqueur	pour que le remaniement soit identifié. petits éléments acentriques non reconnaissables ; témoin d'amplification génique	mar	+2mar
« fragments minute »	région de coloration homogène, non reconnaissable, insérée au sein d'un chromosome ; témoin d'amplification génique.	min	
homogeneously staining region		hsr	hsr(1)(q31)

I.6. Interprétation du caryotype

I.6.1. Les anomalies chromosomiques de nombre ou de structure

Les anomalies chromosomiques correspondent soit à des anomalies de nombre (ploïdie) soit à des anomalies de structure. Plusieurs anomalies sont responsables de syndromes cliniquement bien identifiés. Les anomalies de structure sont la conséquence de cassures chromosomiques. La structure de certaines régions chromosomiques les prédisposent à se rompre et sont responsables de syndromes cliniques reconnaissables pour un clinicien. La plupart des anomalies structurelles, toutefois, sont des événements uniques. Les cassures surviennent au hasard, et conduisent à des tableaux cliniques non spécifiques.

I.6.1.1. Anomalies numériques autosomiques

Les erreurs de « **plöidie** » définissent les situations où le nombre de n chromosomes est anormal. Les cellules normales sont diploïdes ($2n = 46$ chromosomes). Les gamètes sont haploïdes ($n = 23$). Si deux spermatozoïdes fécondent un ovocyte, le zygote produit sera triploïde ($3n = 69$, XXX, XXY ou XYY). Une triploïdie peut aussi survenir en cas d'échec de la méiose, conduisant ainsi à la fécondation d'un ovocyte diploïde par un spermatozoïde haploïde. Les triploïdes surviennent fréquemment lors de la conception chez l'homme mais les embryons triploïdes ne survivent virtuellement jamais jusqu'au terme. Une tétraploïdie peut survenir lorsqu'une cellule duplique son ADN sans se diviser. Les tétraploïdies et les ploïdies

de degré supérieur (polyploïdie) peuvent s'observer dans quelques cellules isolées d'un individu mais pas dans toutes ses cellules.

Aneuploidie. Contrairement aux situations décrites ci-dessus (euploidie) où toutes les cellules possèdent un ensemble complet de chromosomes, tous les chromosomes ne sont pas représentés le même nombre de fois dans les cellules aneuploïdes : certains manquent ou sont en excès. Les cellules (et les individus qu'elles forment) sont trisomiques ou monosomiques pour ce (s) chromosome (s) excédentaire (s) ou manquant (s). Une tétrasomie ou une nullisomie peuvent aussi survenir. Bien que tous les types de trisomies puissent se rencontrer dans les produits de fausse couche précoce. Seules les trisomies 13, 18 et 21 peuvent arriver à terme. La **trisomie 21** ou syndrome de Down est la seule trisomie autosomique compatible avec une survie à l'âge adulte.

1.6.1.2. Anomalies numériques des chromosomes sexuels

Il est bien moins délétère de posséder un nombre incorrect de gonosomes que d'autosomes. Le chromosome Y ne comporte qu'une cinquantaine de gènes dont aucun n'est indispensable (les femmes vivent très bien sans !). Par contre, le chromosome X porte un millier de gènes, dont de nombreux gènes majeurs. Un sujet sera de sexe masculin s'il porte au moins 1 chromosome Y, quel que soit le nombre de chromosomes X présents. De façon générale, les anomalies des gonosomes ne s'accompagnent pas de retard mental mais les performances intellectuelles sont souvent moindres que celles des apparentés et les difficultés d'apprentissage sont plus fréquemment rencontrées

45, X : Syndrome de Turner. Phénotype féminin. Petite taille, infertilité (ovaires atrophiées, en bandelette) et aménorrhée primaire, retard pubertaire avec caractères sexuels secondaires peu développés, intelligence normale. Les patients peuvent présenter un cou court et palmé (ptérygium colli), des malformations cardiovasculaires et rénales (rein en fer-à-cheval) ou une surdité. NB : la formule 45, X0, parfois utilisée, est incorrecte : il n'y a pas de chromosome 0 !

47,XXY : Syndrome de Klinefelter. Phénotype masculin, insuffisance pubertaire et infertilité (atrophie testiculaire), grande taille, distribution de graisse corporelles de type féminine, gynécomastie (seins anormalement développés pour un homme). La moitié des diagnostics sont posés à l'âge adulte, devant une infertilité.

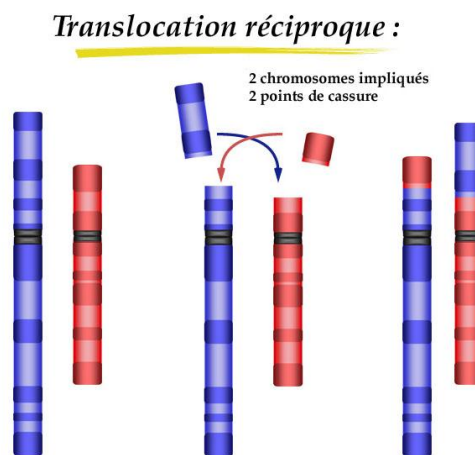
47,XXX : triple X. Souvent non diagnostiquée car le phénotype est féminin et n'évoque pas d'anomalies. Niveau intellectuel inférieur à celui des germains.

47,XYY : double Y. Phénotype masculin, grande taille, musculeux. Souvent non diagnostiqué car le phénotype n'évoque pas d'anomalie. Niveau intellectuel inférieur à celui des germains, avec une augmentation des troubles comportementaux.

I.6.1.3. Anomalies de structure

Celles-ci comprennent:

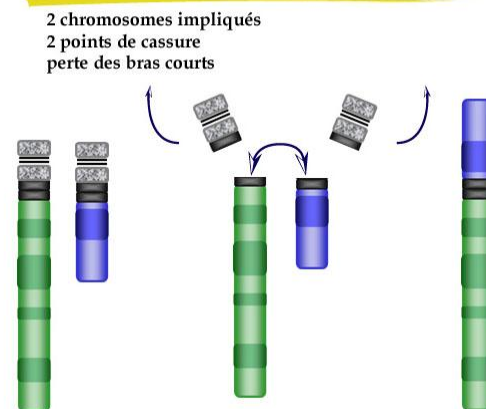
Les translocations réciproques : elles surviennent quand deux chromosomes échangent des segments non homologues (**Figure 6**). La descendance d'un sujet porteur d'une translocation réciproque peut avoir une trisomie pour l'un des segments transloqués et, dans le même temps, une monosomie pour l'autre segment.



**Figure 6 : Schéma décrivant la formation d'une translocation réciproque
(Dupont et Rabineau, 2002)**

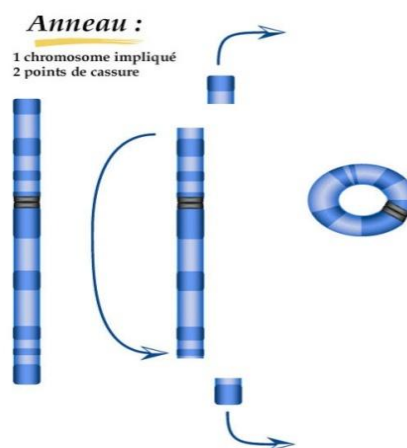
Les translocations robertsoniennes: elles impliquent une translocation entre 2 chromosomes acrocentriques. Les cassures surviennent dans la partie proximale des bras courts, au-dessus du centromère (**Figure 7**). Une personne porteuse d'une translocation robertsonienne a un risque d'avoir un enfant présentant une trisomie ou une monosomie complète pour l'un des chromosomes acrocentriques. Quelqu'un ayant une translocation robertsonienne impliquant le chromosome 21 a un risque d'avoir un enfant atteint de trisomie 21. 3 à 4% des trisomies 21 résultent d'une telle translocation. Sur le plan phénotypique, ces enfants ne sont pas différents de ceux qui ont une trisomie 21 libre homogène mais le risque de récurrence pour le parent porteur est bien plus élevé.

Translocation robertsonienne :



**Figure 7: Schéma décrivant la formation d'une translocation robertsonienne
(Dupont et Rabineau, 2002)**

Les délétions peuvent être interstitielles ou terminales. Un chromosome devant avoir un télomère au bout de chaque bras, toute délétion terminale stable doit reconstituer son télomère. Les chromosomes en anneau (**Figure 8**) sont une forme particulière de délétion. Les délétions ont en général des effets phénotypiques sévères. Les grandes délétions sont souvent létales.



**Figure 8 : Schéma décrivant la formation d'anneau chromosomique
(Dupont et Rabineau, 2002)**

Les duplications consistent en la présence d'une fraction chromosomique supplémentaire (**Figure 9**), ces chromosomes possèdent deux fois une même région. On dit de ces chromosomes qu'ils portent une **duplication en tandem**, le segment dupliqué vient se placer immédiatement après la région chromosomique normale et dans le même sens.

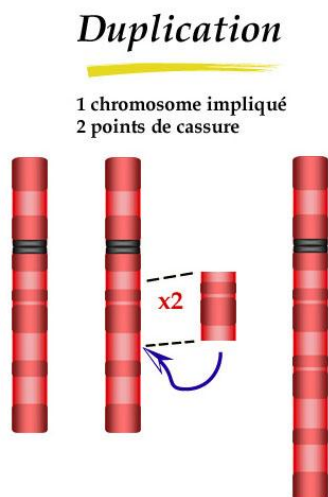


Figure 9 : Schéma décrivant la formation d'une duplication
(Dupont et Rabineau, 2002)

Les inversions peuvent avoir une taille variable. Si elles impliquent le centromère (inversion péricentrique) (**Figure 10**), elles modifient en général la silhouette du chromosome ; si elles n'impliquent pas le centromère (inversion paracentrique) (**Figure 11**), elles peuvent être très difficiles à distinguer sur le caryotype.

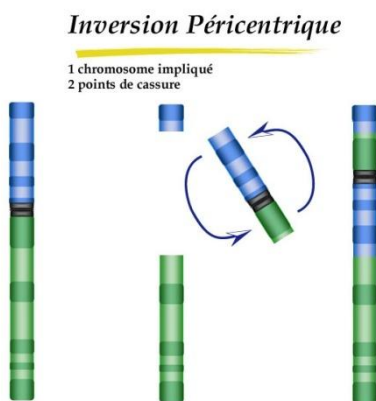


Figure 10: Schéma décrivant la formation d'une inversion péricentrique
(Dupont et Rabineau, 2002)

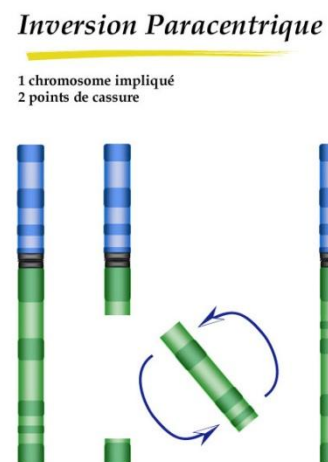


Figure 11 : Schéma décrivant la formation d'une inversion paracentrique
(Dupont et Rabineau, 2002)

I.7. Les anomalies équilibrées et déséquilibrées

Une anomalie chromosomique est équilibrée quand il n'y a ni perte ni excès de matériel génétique. L'ADN est simplement réparti de façon anormale entre les chromosomes. Pour autant que chaque chromosome compte un seul centromère et deux télomères, une anomalie équilibrée n'interfère pas avec la mitose. Un embryon porteur d'une anomalie équilibrée peut donc se développer normalement. On considère que les translocations robertsoniennes sont équilibrées même si les chromosomes acrocentriques ont perdu leur bras courts, car cette délétion ne s'accompagne d'aucun phénotype, les bras des deux autres chromosomes acrocentriques compensant totalement les deux bras manquants. Si un excès ou un défaut de matériel génétique est pathogène et entraîne des conséquences phénotypiques, cette anomalie est dite déséquilibrée. Les découvertes récentes ont conduit à nuancer la notion ancienne selon laquelle la quantité normale d'ADN chez un humain est fixée précisément. Certains segments d'ADN peuvent être absents ou dupliqués chez des sujets normaux : c'est ce qu'on appelle les polymorphismes de nombre de copies (en anglais : *Copy Number Variation* ou CNV). On ne peut parler d'anomalies déséquilibrées pour décrire ces variants. Les anomalies équilibrées perturbent le bon déroulement de la méiose de deux façons différentes :

Les chromosomes transloqués dérivant de plusieurs chromosomes. Durant la prophase de la méiose I, ces chromosomes forment des trivalents ou des tétravalents (au lieu de bivalents constitué par l'association de deux homologues) qui peuvent ségréger de façon incorrecte à l'anaphase.

Les chromosomes comportant une inversion s'apparient avec leur homologue en formant des boucles. En cas de crossing over dans la boucle, les chromosomes recombinants sont anormaux.

Théoriquement, les anomalies équilibrées ne devraient pas affecter le phénotype. Il ya néanmoins des exceptions :

Certains points de cassures peuvent interrompre un gène et abolir son expression. Ceci peut, ou non, avoir un effet sur le phénotype.

Parfois, la cassure sépare un gène des éléments qui contrôlent son expression, situés à distance sur le même brin d'ADN. Ceci peut conduire à la perte d'expression de ce gène.

Occasionnellement, la translocation aboutit à la formation d'un gène chimère constitué d'un fragment d'un gène situé au point de cassure sur un chromosome, et d'un segment d'un autre gène situé au point de cassure sur l'autre chromosome. Ces gènes chimères jouent un rôle important dans la survenue des certains cancers. Enfin les translocations équilibrées entre le chromosome X et un autosome posent un problème spécifique en raison de l'inactivation du chromosome X.

I.8. Les anomalies constitutionnelles ou en mosaïque

Les anomalies chromosomiques peuvent être :

- Constitutionnelles (présentes dans chaque cellule)
- En mosaïque (présentes dans certaines cellules)

Si la non disjonction se produit au cours d'un des premiers clivages du zygote (évènement post-zygotique), l'enfant peut avoir deux ou plusieurs lignées cellulaires avec des nombres de chromosomes différents. Une **mosaïque** chromosomique compte au moins deux lignées cellulaires de caryotypes différents, dérivées d'un seul zygote (Dutrillaux, 1975b). On ne peut jamais exclure formellement la présence d'une mosaïque devant un caryotype normal, car on ne peut analyser toutes les cellules d'une personne.

les anomalies **constitutionnelles** existent chez l'embryon avant la fécondation (**Figure 12**), dans l'un des gamètes, ou peu après, dans une des cellules du zygote dès la naissance (Huret *et al.*, 2001), elles sont congénitales et transmises d'une façon héréditaire et sont mises en évidence dans les lymphocytes T circulants, les fibroblastes et toutes les cellules somatiques.

I.9. Les anomalies acquises dans les cellules leucémiques ou néoplasiques

Les anomalies peuvent dans certains cas, avec le développement d'anomalies chromosomiques surajoutées, favoriser l'apparition de néoplasies (leucémie en particulier) ; elles sont dans ce cas **acquises**; présentes dans les cellules tumorales et absentes dans les tissus qui ne sont pas impliqués dans le phénotype malin. Certaines anomalies ne se rencontrent qu'à l'état de mosaïque parce que, présentes à l'état constitutionnel, elles sont létales. C'est le cas par exemple de la trisomie 8, qui ne se rencontre jamais à l'état homogène.

Si la non disjonction a lieu au cours de la gamétogenèse et si le gamète ayant un nombre hétéroploïde de chromosomes est fécondé et commence à se développer, toutes les cellules de

l'embryon auront le même nombre de chromosomes (la même anomalie), appelé anomalie **homogène (Figure 13)**.

Exemple 1 : une anomalie constitutionnelle survenue chez un gamète parental (ex : +**21**) se retrouvera chez toutes les cellules de l'enfant descendant (ex : **trisomie 21 homogène**).

Exemple 2 : une anomalie acquise survenue lors d'une leucémie peut être présente sur toutes les cellules sanguines étudiées chez cet individu (si les cellules sanguines normales sont suffisamment inhibées pour que l'on en retrouve aucune en mitose (ex : **t (9 ; 22)** dans la leucémie myéloïde chronique (**LMC**) (Huret *et al.*, 2001).

I.10. Les anomalies chromosomiques sporadiques et systématisées

Les anomalies chromosomiques peuvent avoir un caractère ;

- **Sporadique** : qui se rencontre dans une seule cellule ou dans plusieurs mais alors différentes l'une de l'autre. Ce sont des anomalies chromosomiques **non clonales**.
- **Systématisé** : la même anomalie est retrouvée dans plusieurs cellules dérivant d'une même cellule mère que l'on peut considérer comme un ancêtre commun, elles sont dites **clonales**.

On considère qu'une anomalie chromosomique est clonale si elle est retrouvée :

- Dans 3 cellules ou plus pour les pertes d'un même chromosome.
- Dans 2 cellules ou plus pour les acquisitions d'un même chromosome et pour les anomalies de structure.
- Pour le clone normal, la présence d'une cellule normale suffit (Thomas *et al.*, 1992).

Fragment minute : correspond à des amplifications (plus de 4 copies par génome haploïde) qui se font par la multiplication de chromosomes acentriques (sans centromères) minuscules doubles appelés « **double minute** » (**dm**) dont le nombre varie considérablement d'une cellule à l'autre. Les amplifications peuvent aussi prendre la forme d'**HSR (homogeneously staining region)**, régions de coloration homogène faites de duplications de la séquence amplifiée mais intégrées en bloc dans un ou des chromosomes anormaux, rencontrés lors des processus malins, en particulier en cas de tumeur solide (Balmain, 2001; Huret *et al.*, 2001).

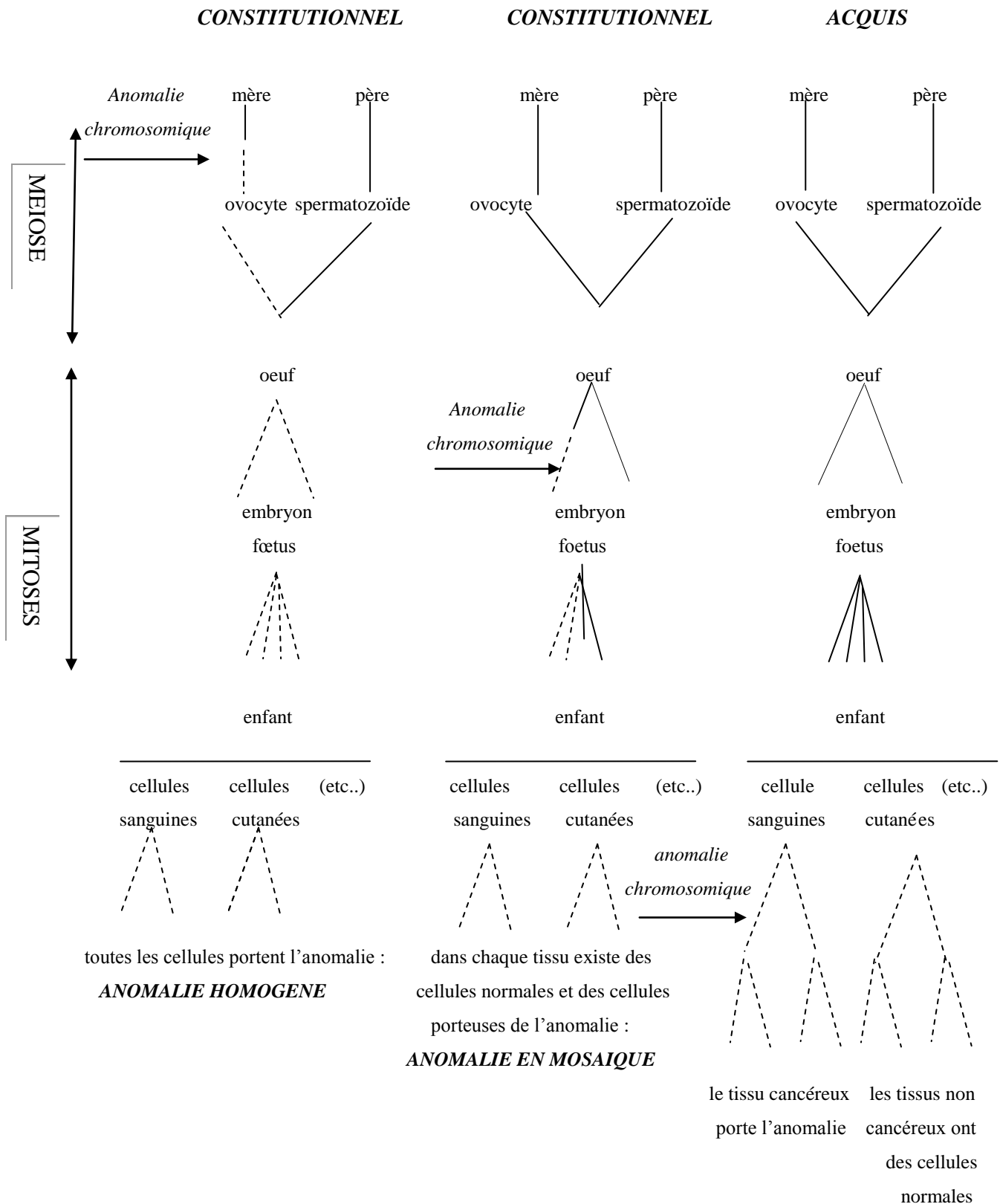


Figure 12 : Les anomalies chromosomiques acquises et constitutionnelles (Huret et al., 2001)

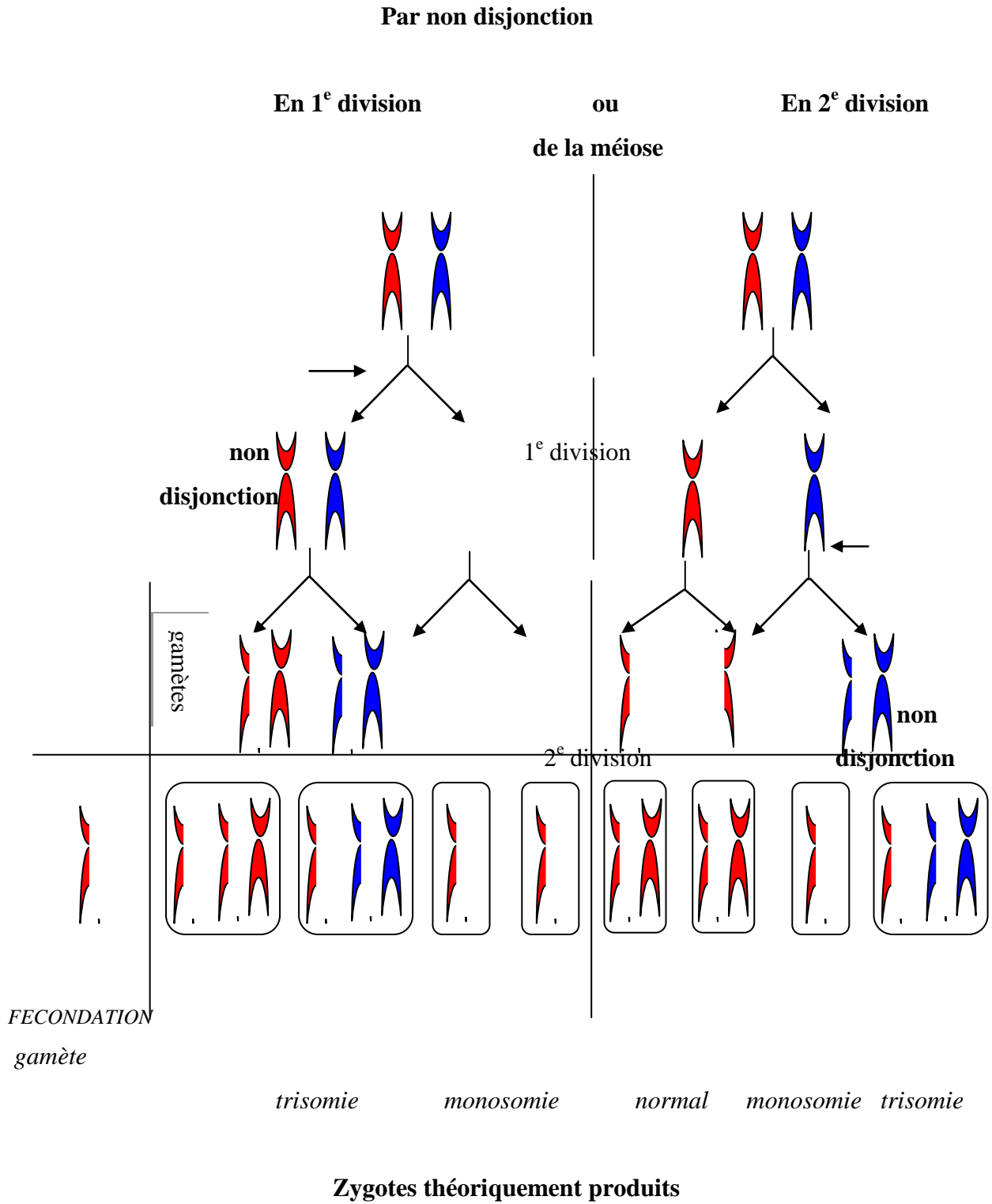


Figure 13: Anomalie de nombre homogène (Huret *et al.*, 2001)

CHAPITRE II :

LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE

CHRONIQUE « LLC »

CHAPITRE II : LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE « LLC »

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte (Thomas et al., 2017). C'est une maladie clonale lymphoproliférative des lymphocytes B dans laquelle les lymphocytes s'accumulent dans le sang, la moelle osseuse et souvent dans les nœuds lymphatiques et la rate (nombre absolu de lymphocytes $>5 \text{ g/l}$) (Aurran-Schleinitz et al., 2008). La LLC B est devenue une maladie raisonnablement prévisible dans son évolution, malgré son polymorphisme, grâce au regroupement en stades des symptômes présents au moment du diagnostic. Les stades ont été corrélés rétrospectivement à la survie des malades (Binet, 1987 ; Rai, 1975), les symptômes associent à des degrés divers les éléments du syndrome tumoral, de l'insuffisance médullaire et de l'état de dysimmunité. La LLC B est caractérisée par la présence de lymphocyte B ayant un cytoplasme peu abondant, avec un noyau dense, sans nucléole identifiable phénotypiquement par l'expression de CD9, CD20, CD5, CD23 et d'immunoglobuline (Ig) de surface restreintes à l'expression d'une seule chaîne légère Kappa ou lambda. Typiquement, l'expression de CD20 et des Ig de surface est faible (Score de Matutes ≥ 4) (Cheson et al., 1996). Deux examens sont donc nécessaires et suffisants au diagnostic : une numération sanguine avec cytologie et un phénotype lymphocytaire sanguin (Binet et al., 2006).

II.1. Caractéristiques du lymphocyte B de la LLC

II.1.1. Morphologie

L'hyperlymphocytose est morphologiquement homogène sur le frottis avec le plus souvent présence de petits lymphocytes matures avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (**Figure 14A**). Le noyau est arrondi sans encoche avec une chromatine mature sans nucléole. Le cytoplasme est réduit et peu basophile. La présence de cellules lysées et réduites à une « ombre nucléaire » ou ombre de Gümprecht. Parfois les cellules sont de plus grandes tailles avec un rapport nucléo-plasmique inférieur (**Figure 14B**). Correspondant à un artefact survenant lors de la réalisation des frottis de sang, est très fréquente (Dearden et al., 2012).

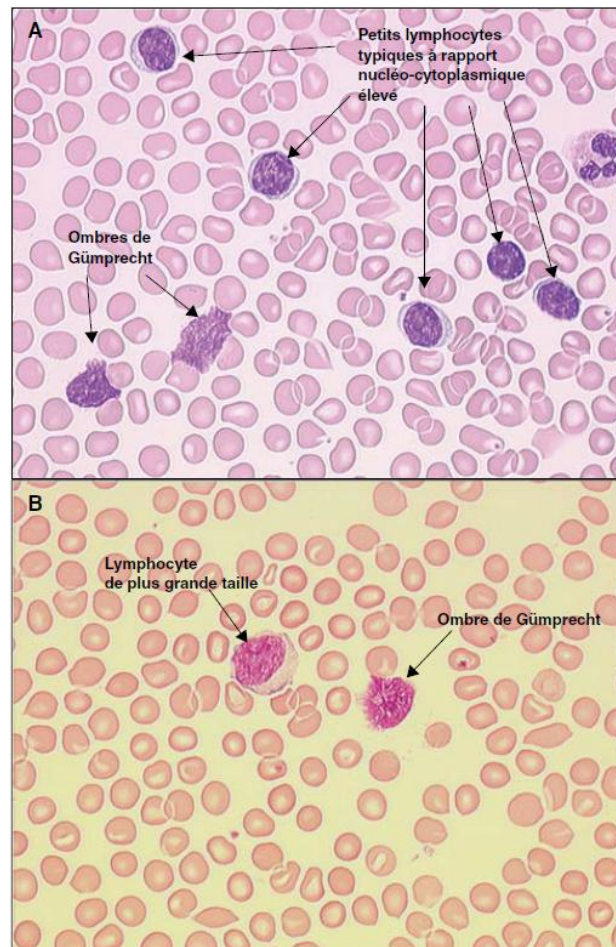


Figure 14. Lymphocytes de LLC sur un frottis sanguin.

A : petits lymphocytes typiques de la LLC et présence d'ombres de Gümprecht ;
B : lymphocytes de LLC avec un rapport nucléo-cytoplasmique plus faible.

II.1.2. La lymphocytose monoclonale B (MBL)

De faibles taux de lymphocytes B monoclonaux circulants ont pu être détectés en cytométrie de flux chez des individus sains.

Cette lymphocytose monoclonale (MBL) concerne 2 à 3% des populations étudiées. Sa prévalence augmente avec l'âge (>5% après 60 ans) et dans les formes familiales de LLC (13 à 18%). Des critères diagnostiques de MBL ont récemment fait l'objet d'une définition consensuelle internationale (Marti et al., 2005).

L'observation clinique et l'analyse biologique des MBL contribueront à la compréhension des mécanismes physiologiques de la LLC (Aurran-Schleinitz et al., 2005).

La MBL se définit par quatre critères

- La mise en évidence d'une population B clonale,
- La présence d'un phénotype caractéristique de LLC (CD5+, CD23+),
- Un nombre absolu de cellule B inférieur à 5g/l,
- Aucun autre signe de maladie auto immune ou de désordre lymphoprolifératif (absence d'organomégalie, de signe clinique d'évolutivité ou de maladie auto immune) (Troussard et al., 2011).

II.1.2.1. Différents types de MBL

Certains patients ont une MBL avec un phénotype de type LLC atypique (CD5+,CD23) , d'autres ont un phénotype LLB (CD 5+, CD 23+), le nombre absolu des cellules lymphoïde sanguines avec ce phénotype est habituellement bas $<1,900 \times 10^9 /l$, 40% des patients ont moins de $0,50 \times 10^9 /l$, 45% entre 0,050 et $0,500 \times 10^9 /l$, 15% des patients entre 0,500 et $1,9 \times 10^9 /l$ (Troussard et al., 2011).

II.2. Physiopathologie de la LLC

Une phase préalable de lymphocytose B monoclonale (Monoclonal B lymphocytosis; MBL) est vraisemblable pour la majorité des patients.

Des facteurs génétiques sont en cause car une histoire familiale de LLC est retrouvée chez 8-10% des patients (2 fois plus que pour les cancers du côlon ou du sein)

Les facteurs prédisposants sont mal connus mais une infection préalable est mise en avant (Dighiero et al., 2005).

- Un événement primaire a sans doute eu lieu lors de la différenciation de la cellule souche hématopoïétique en cellule lymphoïde B, a sensibilisé quelques lymphocytes B qui, lors d'une expansion des lymphocytes B en présence d'Ag particuliers (auto-Ag ou xéno-Ag) a provoqué la sélection clonale de quelques uns de ces lymphocytes B (= phase de MBL); des événements oncogéniques complémentaires ont provoqué l'expansion de cette MBL (Dighiero et al., 2005).

- L'expansion clonale de lymphocytes CD5+ CD23+ serait secondaire à l'activation lymphoïde et non à l'expansion d'un clone de lymphocytes B CD5+ de la zone manteau du ganglion. Le lymphocyte de LLC est une cellule B mémoire : dans la moitié des cas le

mécanisme de maturation serait T indépendant (non centro germinatif; expliquant que les gènes IGVH soient non mutés), et dans l'autre moitié des cas le mécanisme de maturation serait T helper dépendant (dans le centre germinatif; gènes IGVH mutés). Ainsi, que les lymphocytes de LLC soient mutés ou non au niveau des gènes IgVH, une exposition préalable à un Ag est mise en avant pour diverses raisons (immunophénotype lymphocytaire en faveur d'une activation lymphocytaire, certains gènes IgVH sont préférentiellement utilisés, 15% des patients ont une modification du BCR qui suggère un contact avec un Ag) (Foon et al., 2010).

- Une minorité des lymphocytes (< 1%) est en phase de prolifération (pour amplifier le clone tumoral) mais la majorité des lymphocytes a une vie longue et est en phase G0. Des altérations d'expression quantitative et/ou qualitative de protéines des voies apoptotiques ont été retrouvées (hypométhylation de l'ADN avec hyperexpression de BCL2, anomalies d'expression de TP53) (Foon et al., 2010).

- **Le microenvironnement** de la MO (cellules mésenchymateuses stromales (ou MSC) des niches vasculaires) et du ganglion (cellules nurse-like monocytoïdes CD14+ (NLC), cellules folliculaires dendritiques et cellules T) module la prolifération [Les NLC sécrètent BAFF (B cell activating factor) et APRIL (inducteur de prolifération); le CD154 (CD40L) présent sur les Ly T4 stimule les lymphocytes qui portent le CD40; les Ly de LLC sécrètent diverses cytokines angiogéniques (VEGF, FGF) qui favorisent la formation de vaisseaux irrigant les agrégats lymphoïdes tumoraux dans la MO], la survie [sécrétion de chimiokines dont notamment le Stromal Derived Factor 1 (sdf1) par les MSC et NLC], et la résistance aux drogues des lymphocytes (Foon et al., 2010).

II.3. Principaux signes biologiques

II.3.1. Hémogramme

II.3.1.1. Leucocytes

Hyperleucocytose (jusqu'à > 200 G/L), avec hyperlymphocytose : le nombre minimal de lymphocytes nécessaire pour évoquer une LLC est de 5 G/L. (selon les recommandations internationales 2008 : > 5 G/L de lymphocytes B) (Hallek et al., 2008).

La lymphocytose doit être chronique, stable ou augmentant au-delà de 3 mois.

Sur frottis sanguin : hyperlymphocytose morphologiquement monotone, accompagnée ou non d'un nombre élevé de cellules éclatées.

Neutrophiles : nombre normal (rares neutropénies, surtout par hypersplénisme, parfois par infiltration médullaire lymphocytaire massive ou de nature immune) (Hallek et al., 2008).

Remarques

Toute hyperlymphocytose de l'adulte > 5 G/L, chronique (pas de retour à la normale après 4-6 semaines) correspond dans ½ cas à un syndrome lymphoprolifératif chronique (LLC ou LNH bas grade disséminé).

La lymphocytose B monoclonale correspond à une situation asymptomatique (notamment sans adénopathie), pour laquelle il existe une lymphocytose chronique modérée (jusqu'à 8-9 G/L) avec un nombre absolu de lymphocytes B monotypiques < 5 G/L (Hallek et al., 2008).

II.3.1.2. Hémoglobine

- Diminuée dans 1/3 des cas au diagnostic.
- Plusieurs seuils ont chacun une valeur pronostique : < N, < 12 et < 10 g/dL.
- L'anémie a 3 origines possibles :
 - AHAI chez 5% des pts (mais test de Coombs positif chez 10 – 15 % des patients).
 - Séquestration splénique (si splénomégalie volumineuse)
 - plus rarement : érythroblastopénie (MO envahie de lymphocytes ; exceptionnelle érythroblastopénie immune = 1% des patients auront cette complication) (Hallek et al., 2008).

II.3.1.3. Plaquettes

- Nombre normal chez 80% des patients.
- Un nombre < 100 G/L est péjoratif.
- Trois origines possibles : immune (= 1% des patients auront cette complication), hypersplénisme, défaut de production (comme pour l'anémie) (Hallek et al., 2008).

II.3.2. Immunophénotype

Il est déterminé sur les lymphocytes sanguins par cytométrie en flux.

La LLC est de phénotype B :

- Les antigènes pan B sont positifs (CD19, CD20, CD22),

- Les CD5 et CD 23 sont positifs,
- Faible expression des antigènes CD20, CD22 et CD 79b,
- monotypie membranaires Kappa ou Lambda avec faible expression (intensité d'expression 10 à 100 fois moindre que celle du lymphocyte B normal).

Le système de score du Royal Marsden Hospital (score de Matutes) (Tableau 3) attribue un score à chacun des 5 marqueurs (Jain et al., 2015). Une LLC doit avoir un score total de 5 ou 4. Seulement 5 % des LLC ont un score de 3.

Des scores inférieurs à 3 excluent une LLC (correspondent à des LNH-B leucémisés). Une alternative pour le diagnostic cytométrique : raisonnement à partir de la positivité du CD5 : la LLC et le LNH zone manteau sont tous deux à cellules CD5 +, les autres LNH disséminés sont CD5- ; on affine ensuite la démarche avec les antigènes complémentaires (Jain et al., 2015).

Expression d'autres antigènes : nombreux, mais deux sont à connaître :

- **CD 38** : positivité dans 50% des cas (= mauvais pronostic)
- **ZAP 70** : positivité chez 40-50% des patients (= facteur de mauvais pronostic).
[zêta associated protein 70 = protéine intracytoplasmique retrouvée normalement dans les lymphocytes T et NK] (Jain, 2015).

Divers autres antigènes sont recherchés pour le diagnostic différentiel

Remarque

Dans la LLC le nombre de lymphocytes T (T4 et T8) est augmenté, parfois jusqu'à 4 fois la normale (mais ces Lymphocytes T ne peuvent pas former de liaisons normales avec les lymphocytes B de LLC) (Jain et al., 2015).

II.3.3. Autres examens biologiques

II.3.3.1. Myélogramme et biopsie ostéo-médullaire (Letestu et al., 2010)

Le myélogramme n'est pas utile pour le diagnostic de la LLC, mais il peut être prescrit pour préciser l'origine d'une cytopénie (au diagnostic ou en cours d'évolution)

II.3.3.2. Biopsie ganglionnaire

Ponction et biopsie ganglionnaires ne sont habituellement pas pratiquées. La biopsie montrerait une disparition de l'architecture, l'oblitération des sinus et une infiltration diffuse

de lymphocytes. On réalise une biopsie quand on suspecte une évolution en syndrome de Richter (Letestu et al., 2010).

II.3.3.3. Caryotype et cytogénétique moléculaire

Le caryotype est déterminé par l'étude cytogénétique conventionnelle, en ajoutant des facteurs stimulant la croissance dans les milieux de culture : anomalies chez > 90% des patients ; un caryotype complexe est de pronostic péjoratif (Jain et al., 2015).

Plusieurs types de translocations sont observables, les translocations t(11;14) et t(14 ;18) ne sont retrouvées que dans < 2% des cas.

La technique de fluorescence in situ après hybridation (FISH), simple à réaliser, recherche quatre anomalies principales (Jain et al., 2015)

* **Délétion 13q14** (65 % des patients) : associée à un bon pronostic (souvent stade A de Binet). Les gènes d'intérêt sont vraisemblablement de gènes codant pour des micro RNA;

* **Trisomie 12** (15-20% des patients) : pas ou peu de caractère pronostique. Associée à une LLC morphologiquement atypique dans 50% des cas ;

* **Délétion 11q23** (10% des patients) : la délétion fait perdre le gène ATM. Patients plus jeunes avec forte masse tumorale. Son caractère pronostique varie selon la nature du traitement envisagé ;

* **Délétion 17p** (7% des patients) : associée à la perte du gène suppresseur de tumeur p53. Retrouvée dans < 6% des cas au diagnostic, elle est plus fréquente dans les LLC de mauvais pronostic, agressive ou évoluée. Sa mise en évidence nécessite de proposer des protocoles thérapeutiques spécifiques (dans > 80% des cas : délétion de TP53 sur un allèle et mutation inactivatrice sur l'autre allèle).

II.3.3.4. Biologie moléculaire

Statut mutationnel de la partie variable des gènes des chaînes d'Ig VH (Jain et al., 2015):

- structure germinale dans 50% des cas (mauvais pronostic ; survie globale 6 – 7 ans)
- remaniements somatiques dans l'autre moitié des cas (bon pronostic ; survie globale > 10 ans)

Remarque : la technique est lourde et nécessite un séquençage d'ADN, inapplicable à la pratique quotidienne.

Autres : hyperexpression constante de bcl2 (protooncogène à action antiapoptotique) mais sans t(14 ;18) ; absence de remaniement de bcl1 ou d'hyperexpression de la cycline D1.

II.3.3.5. Examens biochimiques et immunologiques

Nombreux; deux sont nécessaires dès le diagnostic :

Electrophorèse des protéines : hypogammaglobulinémie chez 10% des patients au diagnostic (>50% après 10 ans) (Letestu et al., 2010).

- pic d'Ig monoclonale dans 10% des cas : IgM dans la majorité des cas (taux <5g/L) ; a parfois les caractéristiques d'une cryoglobuline.
- protéinurie de Bence Jones dans 30% des cas (faible concentration).

Test de Coombs direct + dans 10-15% des cas (mais AHAI dans 5%) : de type IgG ou IgG + C'est avec Ac chauds dirigés contre les Ag du système Rh, ou de type complément : agglutinine froide de type IgM (Letestu et al., 2010).

II.3.4. Autres examens biologiques réalisables selon le contexte (Letestu et al., 2010)

- Bêta-2 microglobuline sérique : parfois augmentée (reflet de la masse tumorale)
- LDH : parfois augmentée (reflet de la masse tumorale, mais une augmentation peut signifier une AHAI ou une évolution en syndrome de Richter).
- Bilan d'hémolyse : indispensable chez tout patient anémique ou si nombre de réticulocytes > 150 G/L.
- Thymidine kinase sérique : enzyme intervenant dans la réparation de l'ADN. Rarement dosée, un taux élevé est signe de forte masse tumorale et de maladie évoluée.
- CD23 soluble : ↑ = mauvais pronostic.
- Uricémie augmentée (témoin du turne over d'une grande masse de cellules anormales).

II.4. Principaux signes cliniques

Découverte fortuite dans > 50% des cas : par un hémogramme systématique qui montre une lymphocytose chronique isolée (Letestu et al., 2010).

Découverte d'un syndrome tumoral :

- adénopathies : peuvent être multiples, bilatérales et symétriques, superficielles, fermes, indolores, mobiles, non inflammatoires.

- splénomégalie : présente dans 50 à 75% des cas (rarement isolée). (l'hépatomégalie est plus rare).

Plus rarement : devant des complications infectieuses [mais surtout observées au cours de l'évolution (zona, pneumopathie)], ou les conséquences des cytopénies (anémie, thrombopénie).

Dans la majorité des cas, hémogramme et immunophénotype suffisent au diagnostic de la LLC.

II.5. Formes morphologiques et cliniques de la LLC

II.5.1. Aspect morphologique habituel (> 80% des cas)

II.5.1.1. Hyperlymphocytose monotone à petits lymphocytes matures

Avec rapport N/C >0,9, noyau arrondi sans encoche, chromatine mature sans nucléole, cytoplasme réduit bleuté et dépourvu de granulations.

Nombreuses cellules éclatées et réduites à une "ombre nucléaire" (ombre de Gumprecht, correspondant à l'éclatement des lymphocytes lors de la réalisation des frottis de sang).

Un nombre de cellules éclatées > 20 % est proposé comme facteur pronostique (Furman et al., 2010).

Remarque : on peut observer jusqu'à 3% de cellules d'allure blastique, appelées paraimmunoblastes (terme utilisé par les anatomopathologistes)

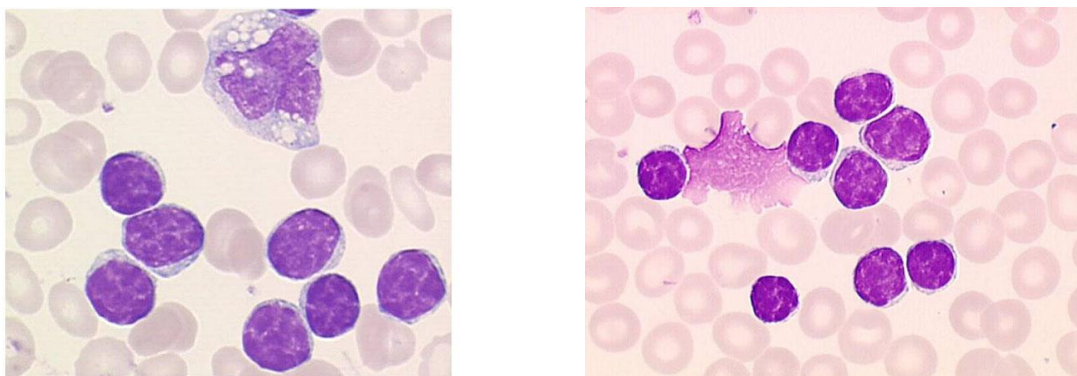


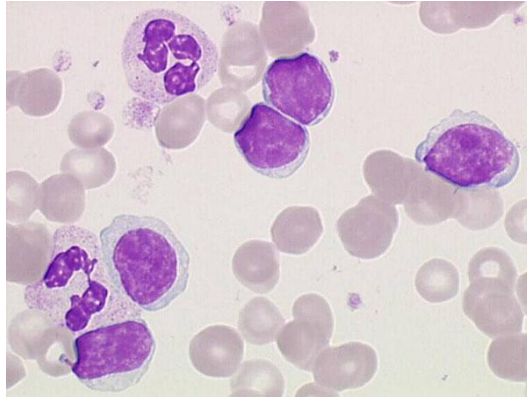
Figure 15 : Frottis sanguin d'une LLC : les lymphocytes forment une population homogène de cellules de taille réduite avec un noyau à chromatine dense et très peu de cytoplasme (coloration MGG)

II.5.2. Variantes morphologiques de la LLC-B (20% des cas)

Dans la LLC classique on peut observer une petite hétérogénéité morphologique. Quand elle dépasse certaines limites on définit (Furman et al., 2010):

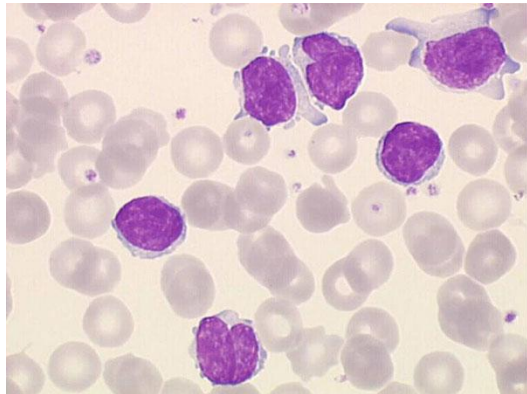
II.5.2.1. LLC mixte à petits et grands lymphocytes (Figure 16): au moins 15% de lymphocytes avec cytoplasme abondant

(son identification est sans importance pronostique)



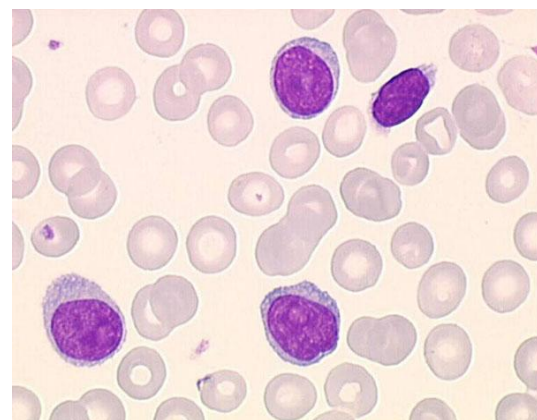
II.5.2.2. LLC morphologiquement atypique (Figure 17): mélange de lymphocytes à grand cytoplasme et de lymphocytes avec noyau au contour irrégulier (quelques uns en forme de cœur);

Association fréquente avec trisomie 12.



II.5.2.3. LLC prolymphocytoïde ou LLC/LPL (Figure 18): 10 - 55% des lymphocytes sont des prolymphocytes = taille un peu plus grande qu'un lymphocyte, cytoplasme clair plus ou moins abondant, noyau à chromatine mature mais présentant un nucléole net.

(très rare au diagnostic ; correspond à certaines LLC évoluées)



II.5.2.4. Leucémie prolymphocytaire B (dite de Galton) (Figure 19)

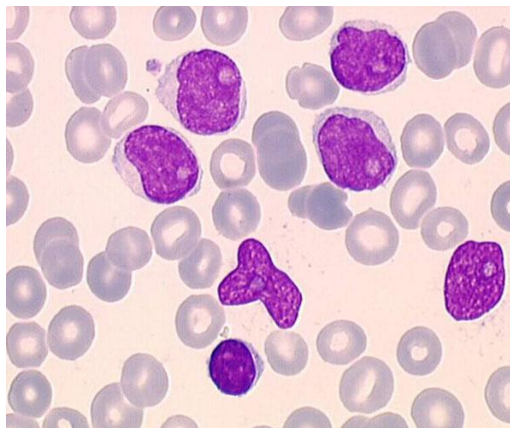
Maladie très rare qui atteint le sujet > 65 ans

Altération marquée de l'état général et volumineuse splénomégalie souvent isolée.

Forte hyperleucocytose (> 100 G/L)

avec > 55% de prolymphocytes

Anémie et thrombopénie marquées; score de Matutes faible (2, 1, ou 0 : voir Tableau 1); Pronostic péjoratif



II.6. Diagnostic différentiel :

II.6.1. Leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) à petits lymphoblastes :

Problème essentiellement cytologique : la morphologie est habituellement bien différente (chromatine moins dense, contour nucléaire irrégulier), et souvent anémie et thrombopénie (Furman et al., 2010).

Remarques :

- La LLC n'existe pas chez l'enfant.
- La LAL est rare : 1000 cas / an en France, dont les $\frac{3}{4}$ chez l'enfant.

II.6.2. Hyperlymphocytoses réactionnelles (infectieuses) (Furman et al., 2010)

II.6.2.1. Lymphocytoses infectieuses (coqueluche ; maladie de Carl Smith), mais ce sont essentiellement des maladies de la petite enfance.

II.6.2.2. Syndromes mononucléosiques : souvent sujet jeune, origine virale, contexte infectieux, lymphocytose transitoire avec présence de grands lymphocytes hyperbasophiles (population lymphoïde hétérogène)

II.6.3. La phase de dissémination des LNH à cellules matures (Furman et al., 2010)

Plusieurs lymphomes peuvent présenter une dissémination sanguine au diagnostic :

- Soit la présentation clinique est celle d'un lymphome, et l'hémogramme retrouve une dissémination sanguine,

- Soit une « hyperlymphocytose » est découverte à l'hémogramme, qui présente des particularités morphologiques et/ou un immunophénotype évoquant une dissémination lymphomateuse B ou T : le diagnostic est réorienté vers celui du lymphome en cause.

II.6.4. Lymphocytose polyclonale à lymphocytes binucléés : (Furman et al., 2010)

Situation rare, surtout observée chez la femme jeune (< 40 ans) et fumeuse (rares cas observés chez les hommes ou femmes non fumeuses).

Cliniquement : parfois adénopathies de volume modéré (< 2 cm), splénomégalie modérée dans 50% des cas, pas d'hépatomégalie.

- Hémogramme : lymphocytose : 5 – 15 G/L le plus souvent, avec un % variable de lymphocytes binucléés (1 – 10 %) = cellules à 2 noyaux reliés souvent entre eux par un pont chromatinien (chromatine mature, nucléole petit et rare) [quelques lymphocytes binucléés s'observent aussi dans les suites d'exposition aux radiations ionisantes et dans quelques LNH ou SLP – B].

Anémie modérée dans 1/3 des cas, pas de thrombopénie ;

- Immunophénotype : polyclonalité K/L. CD19+, CD20+, CD22+, FMC7 +/-, CD5 négatif.

Il s'agirait de cellules mémoires : CD 27+, IgM+ IgD +, ou IgD +.

- Biochimie : augmentation polyclonale des IgM, sans anomalie des autres Ig.

Analyse moléculaire. Isochromosome 3q dans 77 % des cas, condensation prématurée des chromosomes dans 50 % des cas (les 2 dans 40 % des cas). Diverses autres anomalies (dont +3). Le + i(3q) s'observe dans certains cancers.

Pas d'usage préférentiel d'un répertoire des gènes VH.

- * Evolution. Stabilité dans le temps (suivi sur plus de 20 ans). L'arrêt du tabac fait régresser la lymphocytose et normalise les IgM sériques. Pas d'évolution vers un LNH (2 cas de LNH dans une grande série, mais pas de lien affirmé entre les 2 anomalies).

II.6.5. Les diverses lymphoproliférations de type T (Furman et al., 2010)

Immunophénotype T : expression des Ag CD3, CD2, CD7, CD5, CD4 ou CD8, TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$

II.6.5.1. Leucémie prolymphocytaire T

Ce terme regroupe à la fois la LLC – T et la leucémie prolymphocytaire T. Maladie rare de l'adulte (< 5% des LLC), cliniquement indolente dans quelques cas, souvent agressive avec syndrome tumoral important.

Anémie et thrombopénie fréquentes.

Hyperlymphocytose souvent > 50 G/L, avec 3 aspects morphologiques :

- proche de la leucémie prolymphocytaire B (noyau arrondi et nucléolé) (50% des cas)
- ou avec noyau très irrégulier et nucléolé (30% des cas)
- ou aspect superposable à celui de la LLC banale (20% des cas)

Immunophénotype :

- pas de marqueurs B ; Expression des antigènes T : CD2, CD3, CD7, CD4 ou CD8.

II.6.5.2. Syndrome de Sézary (et Mycosis fungoïdes)

Signes cutanés (érythrodermie) ; hyperlymphocytose absente (Mycosis, Sézary) ou modérée (Sézary).

Les cellules anormales ont un noyau à chromatine claire et 1 à 3 encoches (aspect cérébriforme). Phénotype CD4+ CD8-.

II.6.5.3. Lymphocytose à lymphocytes granuleux

Souvent asymptomatique. Neutropénie fréquemment associée.

Excès (N < 0.5 G/L) de grands lymphocytes contenant des granulations cytoplasmiques.

Phénotype CD8+ ou NK.

II.6.5.4. Leucémie/Lymphome T de l'adulte

Maladie associée au virus HTLV1 (rétrovirus humain de type C). S'observe en Asie (Japon) et dans les Caraïbes. Maladie grave, peu accessible au traitement.

Les cellules anormales ont un noyau lobé, d'aspect « en méduse ».

II.7. Facteurs pronostiques de la leucémie lymphoïde chronique et apport des marqueurs biologiques

Le score de Matutes est basé sur la détermination de cinq marqueurs : CD5, CD23, CD79b ou CD22, FMC7 et immunoglobuline membranaire (**Tableau 3**) (Matutes et al., 1994). Un score de 4 ou 5 est en faveur du diagnostic de LLC. Des scores inférieurs ou égaux à 3 orientent vers un lymphome non hodgkinien leucémisé de type B.

Une fois le diagnostic posé, il faut déterminer la pertinence d'un traitement. Deux classifications clinicobiologiques sont actuellement utilisées permettant de codifier les indications thérapeutiques. La première classification, la classification de Rai établie en 1975, divise la LLC en cinq stades (**Tableau 4**) (Rai, 1975).

La classification de Rai a été révisée en 1981 pour donner la classification de Binet qui répartit les patients en trois stades : bon pronostic, pronostic intermédiaire et mauvais pronostic (**Tableau 5**) (Binet, 1977). Au diagnostic, la majorité des patients est à un stade A de Binet.

Seuls les patients de stade A de la classification de Binet ou de stade 0 de la classification de Rai ne seront pas traités immédiatement mais bénéficieront d'une surveillance rapprochée pour évaluer l'évolution de la maladie.

Dans la plupart des cas, il s'agit d'une maladie indolente d'évolution lente et progressive. Toutefois, il existe une hétérogénéité dans l'évolution, et un certain nombre de patients vont avoir une évolution fatale plus rapide. Ceci souligne l'intérêt de posséder des marqueurs prédictifs, au diagnostic, du potentiel évolutif de la LLC (Shanafelt et al., 2004).

Tableau 3 : Score de Matute (Matutes et al., 1994)

Antigène	Attribuer 1 point si	Attribuer 0 point si
CD 5	Positif	Négatif
CD 23	Positif	Négatif
CD 22/CD79b	Faiblement exprimé ou négatif	Fortement exprimé
FMC 7	Négatif	Positif
Ig de surface monotypique	Faiblement exprimée	Fortement exprimée

Tableau 4 : Classification de Rai (1975) (Rai et al., 1975).

Stade	Définition	Survie médiane (mois)
Stade 0	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L)	> 150
Stade I	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + adénopathies	100
Stade II	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) avec ou sans adénopathies + hépatomégalie ou splénomégalie	70
Stade III	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + anémie (Hb < 10 g/dL) +/- stade I et II	19
Stade IV	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + thrombopénie (< 100 G/L) +/- stade I, II ou III	17

Tableau 5 : Classification internationale révisée de Binet (1981) (Binet, 1977).

Stade	Définition	Survie Médiane
Stade A bon pronostic	Lymphocytose, moins de 3 aires ganglionnaires atteintes, Hb > 10 g/dL et plaquettes > 100 G/L	Comparable à la population du même âge
Stade B pronostic intermédiaire	Lymphocytose, plus de 3 aires ganglionnaires atteintes, Hb > 10 g/dL et plaquettes > 100 G/L	7 ans
Stade C mauvais pronostic	Lymphocytose, Hb < 10 g/dL et/ou plaquettes < 100 G/L, quel que soit le nombre d'aires ganglionnaires atteintes	2 ans

II.7.1. Temps de doublement des lymphocytes

Le temps de doublement des lymphocytes (TDL) est calculé en déterminant le nombre de mois nécessaires pour que le nombre absolu de lymphocytes double. Plusieurs études montrent que les patients ayant un TDL inférieur ou égal à 12 mois ont une médiane de survie plus courte, et donc un mauvais pronostic, par rapport aux patients ayant un TDL de plus de 12 mois. Le TDL inférieur à 12 mois caractérise donc les maladies évolutives mais à condition que la première valeur de lymphocytes prise en compte soit supérieure à 15 G/L. Une étude rapporte que les patients de stade A ou B, avec un TDL de moins de 12 mois, ont une médiane de survie plus courte que les patients avec un TDL de plus de 12 mois (48 mois *versus* 66 mois) (Montserrat et al., 1986).

Bien que d'autres études montrent l'utilité du TDL pour les patients de stade clinico-biologique peu élevé (Molica et al., 1987), ce marqueur biologique manque de pertinence. En effet, le TDL s'obtient rétrospectivement et son évolution dans le temps peut être variable. La lymphocytose pouvant évoluer par paliers successifs, la prise de décisions thérapeutiques basées sur ce seul paramètre risque de retarder le traitement chez des patients avec une maladie agressive.

II.7.2. b2- microglobuline

La b2-microglobuline est une petite globuline, produite par toutes les cellules nucléées de l'organisme. Elle est surtout retrouvée liée à la membrane de nombreuses cellules nucléées où elle est associée aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I dont elle constitue la chaîne légère. Toutefois, les trois sites majeurs de sa synthèse sont les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B et les cellules tumorales, lorsqu'elles sont présentes. La b2-microglobuline synthétisée par les lymphocytes est libérée dans le milieu extracellulaire, représentant ainsi un marqueur sérique corrélé à l'importance de la tumeur et au stade de la maladie chez les patients atteints de LLC.

D'après plusieurs études rétrospectives, la b2-microglobuline est le meilleur marqueur de survie à 5 ans, en particulier chez les patients de stade I ou II de la classification de Rai (Keating et al., 1995). Mais une étude prospective ne retrouve pas que la b2-microglobuline seule soit un marqueur significatif de la survie (Molica et al., 1999). En conséquence, bien que la b2-microglobuline ait une importance dans le pronostic de la LLC, des études supplémentaires sont nécessaires pour démontrer l'indépendance de ce marqueur vis-à-vis du stade clinico-biologique et du TDL ainsi que pour définir son rôle dans l'exploration des patients à un stade précoce.

II.8. Complications: (Jain et al., 2015)

II.8.1. Infections : bactériennes, virales, opportunistes (candidose, aspergillose, pneumocystose).

Elles sont liées au déficit immunitaire, et/ou la neutropénie (parfois induites par le traitement). Il s'agit de la première cause de mortalité.

II.8.2. Aggravation de l'insuffisance médullaire: anémie, thrombopénie, neutropénie avec conséquences hémorragiques et infectieuses ;

II.8.3. Complications auto-immunes: accentuation d'une anémie ou d'une thrombopénie auto-immunes.

II.8.4. Evolution d'une LLC classique en leucémie prolymphocytoïde: augmentation du nombre de prolymphocytes (> 15%). la maladie devient plus agressive.

II.8.5. Syndrome de Richter: correspond à la survenue d'un lymphome de haut grade (5% des pts), avec une médiane de survenue = 3 ans (2-8 ans) après le diagnostic initial de la LLC (celle-ci est souvent peu active ou bien stabilisée).

Habituellement : altération rapide de l'état général, avec augmentation de taille d'abord d'une adénopathie, puis un syndrome polyganglionnaire rapidement progressif.

Le lien moléculaire entre le clone lymphocytaire et le clone lymphomateux n'est pas constant (pas de lien = meilleur pronostic).

- Pronostic péjoratif (survie souvent < 1 an)
- Le risque de LA secondaire et un nombre plus élevé de tumeurs solides ont été rapportés avec certains anciens traitements (chlorambucil).

II.9. Traitement

L'inclusion dans un protocole d'étude prospectif est recommandée chaque fois que cela est possible. En absence d'inclusion dans un essai clinique, les recommandations sont les suivantes :

II.9.1. Traitement de première ligne

II.9.1.1. Patients sans del (17p)

Chez le patient sans comorbidité associée, le traitement vise à obtenir une réponse maximale qui est par ailleurs corrélée à la durée de la réponse. Le traitement repose sur l'association FCR (Hallek et al., 2008) pendant six cycles mensuels, à fludarabine (F) et le cyclophosphamide (C).

Chez les patients avec présence de comorbidités sévères et chez les patients âgés, le traitement cherche à obtenir la meilleure qualité de vie possible, elle-même dépendante de la qualité de réponse obtenue par le traitement (Catovsky et al., 2007). La décision thérapeutique peut s'appuyer sur une évaluation oncogériatrique. Les études randomisées montrent la supériorité de l'association fludarabine (F) cyclophosphamide (C) par rapport à la fludarabine ou au chloraminophène en monothérapie (Catovsky et al., 2007) et l'absence de supériorité de la fludarabine en monothérapie par rapport au chloraminophène. L'intérêt de l'association rituximab et fludarabine a été démontré dans un essai historique (Byrd et al., 2003). L'association rituximab et chloraminophène est en cours d'évaluation.

Il est donc recommandé, chez les sujets âgés, de privilégier l'association fludarabine cyclophosphamide (FC) ou fludarabine-cyclophosphamide-rituximab (FCR) en adaptant les doses à la fonction rénale et/ou en diminuant le nombre de cycles.

Des schémas dérivés à base de pentostatine (P), cyclophosphamide (C) et Rituximab (R) (PCR) peuvent aussi être discutés (Kay et al., 2007).

En raison d'une absence de réponse durable et de qualité, le chloraminophène ne sera proposé qu'aux patients ne pouvant tolérer les traitements mentionnés ci-dessus.

II.9.1.2. Patients avec del (17p)

En raison d'un faible taux de réponse et d'une réponse de courte durée après traitement comprenant de la fludarabine et des agents alkylants, le traitement par alemtuzumab (Campath) est recommandé (Lozanski et al., 2004). Il sera utilisé seul ou associé aux corticoïdes à forte dose (dexaméthasone), notamment en cas de forte masse tumorale ganglionnaire. Chez le sujet jeune, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est à envisager rapidement.

II.9.2. Traitement des rechutes

La mise en route d'une nouvelle ligne thérapeutique repose sur les mêmes critères que ceux utilisés en première ligne. Le choix du traitement dépend de plusieurs paramètres : l'âge du patient, l'existence d'une del (17p) qu'il faut identifier par un nouvel examen cytogénétique par FISH, la nature du ou des traitements précédents et la durée de la dernière réponse.

II.9.2.1. Première rechute

En cas de rechute tardive, les traitements utilisés en première intention de type FCR peuvent être utilisés à nouveau sauf en cas d'apparition d'une del(17p). Si le rituximab n'a pas été antérieurement utilisé, il est recommandé de le rajouter.

II.9.2.2. Rechutes ultérieures

Il faut envisager l'utilisation de nouveaux agents comme la bendamustine (Kath et al., 2001). D'autres agents sont aussi en cours d'évaluation : lenalidomide (Ferrajoli et al.,

2008), flavopiridol (Byrd et al., 2007), autres anticorps monoclonaux (ofatumumab, lumiliximab). L'autogreffe ou l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques sont à discuter chez les sujets les plus jeunes.

II.9.3. Formes réfractaires

En cas de maladie réfractaire (échec primaire ou rémission < 6 mois) ou de progression précoce (< 12 mois) après traitement par F ou FC ou < 24 mois après traitement par FCR, il est raisonnable de proposer soit l'alemtuzumab (+/- corticoïdes) soit une association incluant de la cytosine arabinoïde (Aracytine) haute dose et des sels de platine. Le choix du sel de platine dépendra de sa toxicité et du choix thérapeutique ultérieur (Tsimberidou et al., 2008). Une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est indiquée chez les patients jeunes qui sont répondeurs. En l'absence de donneurs ou en cas de contre indication à l'allogreffe, une autogreffe est à envisager.

II.9.4. Consolidation et entretien

En l'absence d'études randomisées permettant de retenir l'indication d'un traitement d'entretien quel qu'il soit, ces traitements ne sont pas à envisager dans l'immédiat en dehors d'un essai thérapeutique.

II.9.5. Cas particuliers

II.9.5.1. Cytopénies auto-immunes

- Anémie Hémolytique Auto Immune (AHAI)

Survenant au cours de l'évolution d'une LLC, elle doit être traitée avec des corticoïdes en première intention. En cas d'échec de la corticothérapie et/ou d'indication de traitement de la LLC, un traitement par rituximab (R) et/ou cyclophosphamide, R-mini CHOP ou alemtuzumab est envisageable. La survenue d'une hémolyse contre indique définitivement l'utilisation de la fludarabine en monothérapie. Son association avec du cyclophosphamide et du rituximab reste possible. L'AHAI apparaissant au cours d'un traitement incluant la fludarabine impose l'arrêt de la fludarabine.

- **Thrombopénie périphérique (PTI)**

En cas de thrombopénie, la réalisation d'un myélogramme est nécessaire. Le traitement proposé est celui d'un PTI s'il s'agit d'une thrombopénie périphérique. Il n'est pas nécessaire de traiter la LLC si elle est asymptomatique. Si la LLC doit être traitée, la fludarabine en monothérapie ne doit pas être utilisée.

- **Erythroblastopénie**

En cas d'érythroblastopénie, il faut rechercher une infection à parvovirus par PCR dans la moelle osseuse car son existence implique un traitement par immunoglobulines polyvalentes. Dans les autres cas, le traitement par corticoïdes est utilisé et en cas d'inefficacité un traitement par ciclosporine doit être envisagé.

II.9.5.2. Syndrome de Richter

Son traitement est celui d'un lymphome non-hodgkinien de haut grade.

II.9.5.3. Auto/allogreffe

- **Autogreffe**

Elle n'a pas d'indication en première intention. Elle est à discuter chez des patients en rechute ou réfractaires non éligibles pour une allogreffe, sous réserve d'une sensibilité au traitement de rattrapage.

- **Allogreffe**

Dans tous les cas de figure, la réduction tumorale doit être maximale avant greffe et les conditionnements atténués sont recommandés (Dreger et al.; 2007).

Les indications sont :

- L'absence de réponse ou la rechute précoce (dans les 12 mois) suivant un traitement par les analogues des purines,
- Une rechute dans les 24 mois après l'obtention d'une réponse par l'association FCR
- Une rechute après autogreffe
- Une LLC évolutive avec del 17p, après un traitement par alemtuzumab.

CHAPITRE III : CYTOGENETIQUE

ET PRISE EN CHARGE DE LA

LEUCEMIE LYMPHOÏDE

CHRONIQUE

CHAPITRE III : Cytogénétique et prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte. Elle est caractérisée par une prolifération/accumulation monoclonale de lymphocytes B matures exprimant les marqueurs CD5+/CD19+ dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes. Il s'agit d'une maladie classiquement indolente sur de nombreuses années, avec cependant une grande variabilité d'évolution. Une transformation en lymphome B à grandes cellules survient chez environ 5 % des malades (syndrome de Richter).

Depuis les années 1970, de nombreuses anomalies chromosomiques ont été mises en évidence par différentes techniques (caryotype, hybridation *in situ* fluorescente (FISH), hybridation génomique comparative (CGH) sur chromosomes puis sur puces (CGH-array), *single nucleotide polymorphism* (SNP)-array) (Robert et al., 1978 ; Edelmann et al., 2012). Ces techniques permettent de trouver des anomalies dans plus de 80 % des LLC. En 2000, Döhner *et al.* proposent un modèle hiérarchique pronostique dépendant des anomalies identifiées par FISH (délétion 17p, délétion 11q, trisomie 12, délétion 13q), la délétion 13q (si isolée) étant associée au meilleur pronostic, la délétion 17p au plus mauvais (Döhner et al., 2000). Depuis l'apport des nouvelles techniques de séquençage à haut débit, des mutations récurrentes, géniques et dans des séquences non codantes, ont été décrites dans la LLC, et ce modèle, même s'il reste à ce jour le modèle pronostique génomique le plus accepté et le plus validé, pourrait évoluer dans les années à venir (Puente et al., 2011 ; Damm et al., 2014).

III.1. Anomalies cytogénétiques

III.1.1. Délétion 13q14

La délétion de la région 13q14, trouvée dans plus de 50 % des cas de LLC, est l'anomalie cytogénétique la plus fréquente et historiquement associée à un meilleur pronostic quand elle est isolée (Döhner et al., 2000). Cette délétion est le plus souvent hétérozygote. Elle peut être homozygote, et il peut aussi exister un mélange de cellules homo- et hétérozygotes. Il existe une région commune délétée d'environ 550 kb suggérant un rôle prépondérant dans la pathogénie de la LLC.

Grâce à des hybrides somatiques obtenus à partir de cellules de LLC avec anomalies du chromosome 13, une région minimale de délétion de 29 kb contenant le supposé gène suppresseur de tumeur *DLEU2* (*deleted in lymphocytic leukemia*) a été identifiée. Le gène *DLEU2* a été largement étudié et n'est pas considéré à ce jour comme gène suppresseur de tumeur dans la LLC. Un groupe de 2 miRNAs (MIR15A et MIR16-1) sont localisés à l'intérieur de la région minimale délétée et sont dérégulés dans 70 % des cas de LLC. Ces micro-RNAs favorisent l'apoptose, en régulant de façon négative le gène *BCL2* (Calinet al., 2002 ; Klein et al., 2010). Le bon pronostic associé à la « délétion 13q isolée » doit cependant être nuancé pour les grandes délétions incluant le gène *RBI* qui seraient associées à des LLC cliniquement plus agressives (**Figure 20**) (Ouilette et al., 2011).

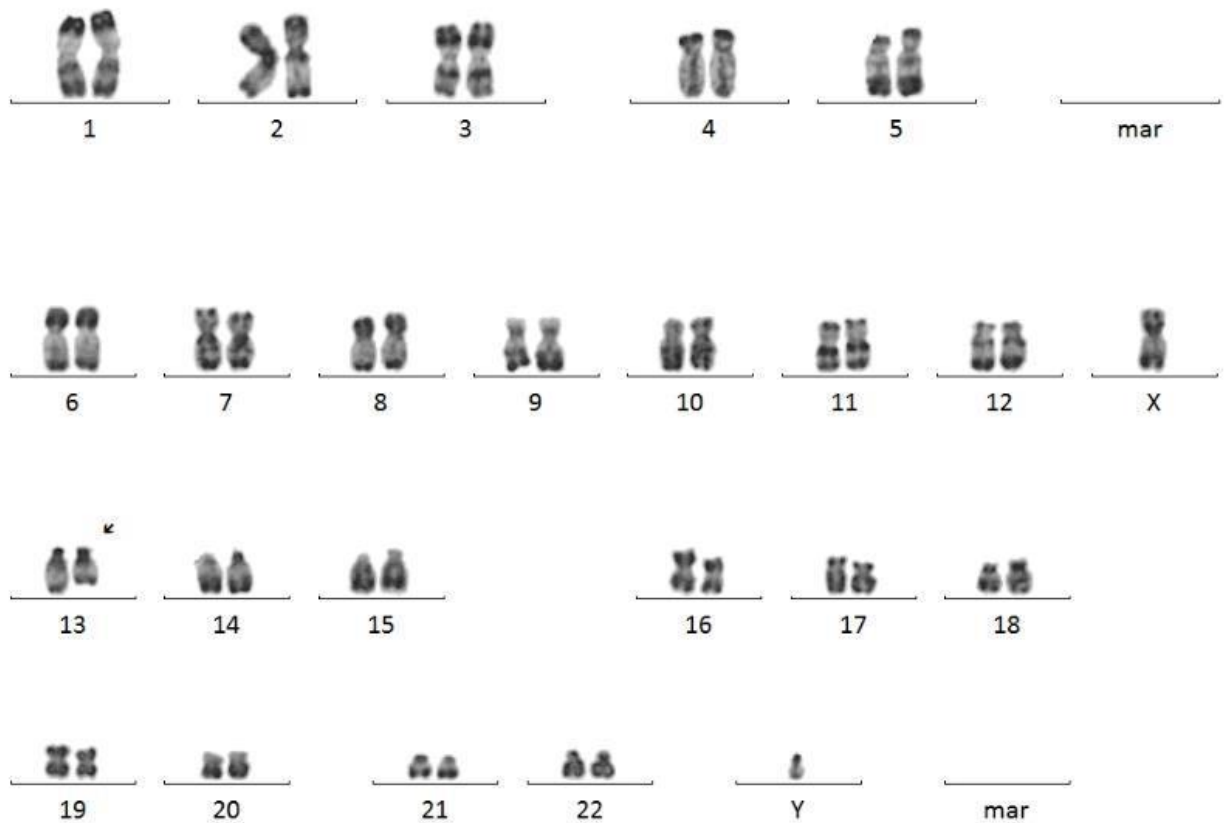


Figure 20 Délétion 13q14 visible (Ouilette et al., 2011)

Contrairement à d'autres anomalies récurrentes de la LLC, la présence de pertes bialléliques en 13q a été décrite dans près de 30% des patients atteints de LLC avec la délétion 13q (**Figure 22**) (Reddy et al., 2006). Les del 13q bialléliques sont caractéristiquement petites et n'impliquent pas le gène *RBI* (Ouillette et al., 2008) néanmoins, leur impact clinique a été controversé.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse qu'elles résultaient d'une évolution des pertes monoalléliques et représentent donc une plus grande anomalie agressive (**Figure 21**) (Van Dyke et al., 2010 ; Dal Bo et al., 2011 ; Dewald et al., 2003 ; Chena et al., 2008; Orlandi et al., 2013). Cependant, d'autres auteurs n'ont pas trouvé de différences significatives dans les caractéristiques de base et les résultats cliniques chez les patients atteints de LLC avec des délétions 13q monoalléliques ou bialléliques (Van Dyke et al., 2010 ; Garg et al., 2012 ; Puiggros et al., 2013) . Il est à noter que la région 13q14 peut être inactivée par d'autres mécanismes. Ainsi, il est possible de supposer que l'effet potentiel des pertes 13q bialléliques sur le pronostic peut être masqué soit par la taille de la région délétère ou l'inactivation de l'allèle restant par d'autres mécanismes.

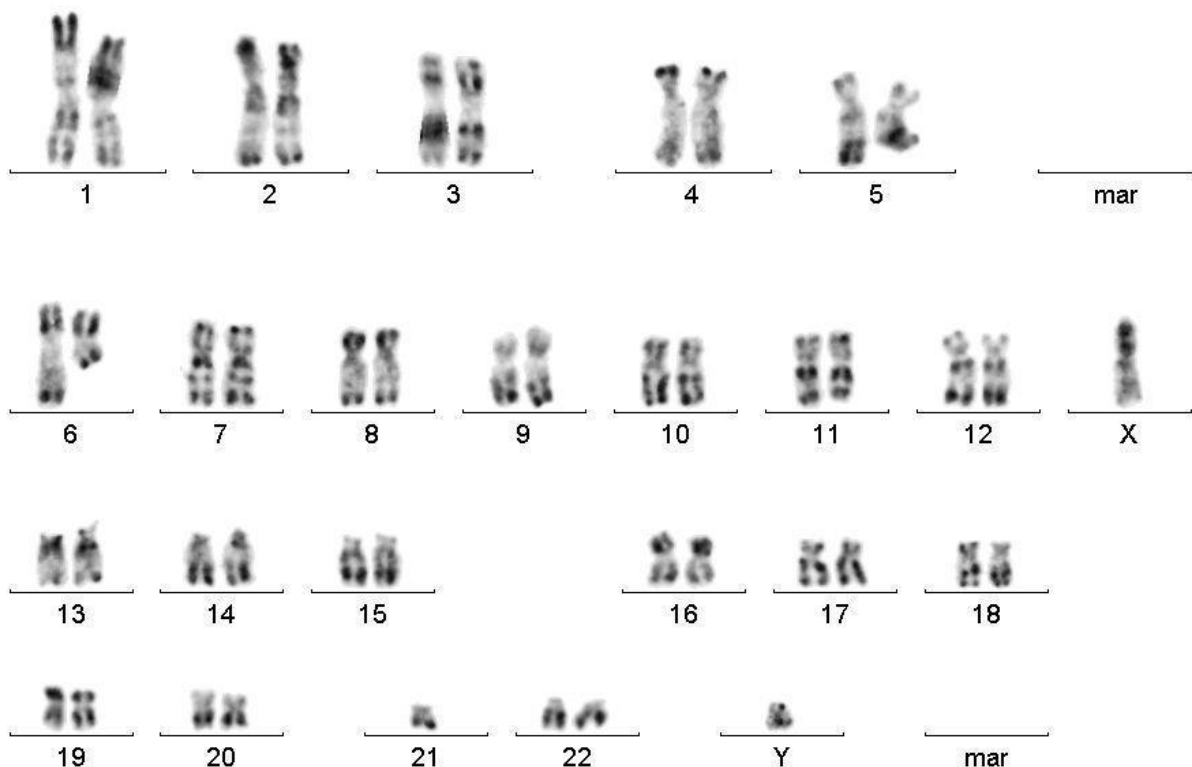
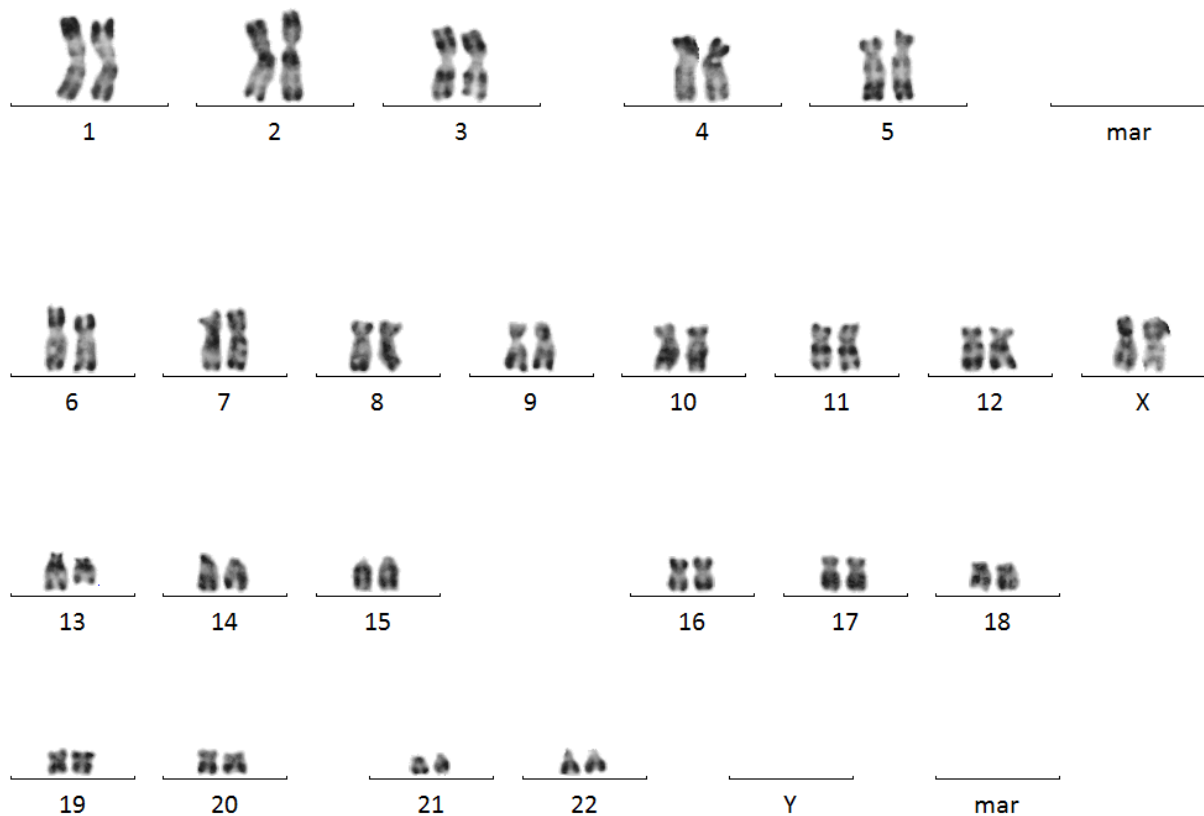


Figure 21 : Délétion 13q14 mono-allélique souvent cryptique (Van Dyke et al., 2010)



**Figure 22 : Délétion 13q14 Bi-allélique
(Van Dyke et al., 2010)**

En ce qui concerne la taille du clone anormal détecté par FISH, il a été décrit que les patients avec un plus haut pourcentage de noyaux altérés ont un TTFT et une OS significativement plus courts. Le point de coupure optimal qui définit un plus mauvais pronostic de la del 13q diffère entre les études publiées (Hernández et al., 2009; Van Dyke et al., 2010; Dal Bo et al., 2011 ; Orlandi et al., 2013 ; Puiggros et al., 2013). En effet, bien que le seuil décrit ait varié de 65,5% à 90%, le pourcentage de suppression de 13q avait une valeur prédictive en tant que variable continue (Van Dyke et al., 2010 ; Orlandi et al., 2013). Ainsi, les patients présentant une délétion isolée de 13q peuvent être stratifiés en fonction du pourcentage de cellules altérées par FISH.

III.1.2. Trisomie 12

La trisomie 12 est observée dans 11 à 25 % des cas (Juliusson et al., 1990 ; Dohner et al., 2000 ; Letestu et al., 2010 ; Sutton et al., 2011). La trisomie 12 est considérée comme un marqueur de risque intermédiaire dans le modèle pronostique hiérarchique initialement proposée par Döhner et al. La trisomie 12 est associée à d'autres anomalies chromosomiques dans plus de la moitié des cas, comme les trisomies 18 et 19, la délétion 14q, les translocations t(14;18), t(14;19), t(8;14) (**Figure 23**) (Haferlach et al., 2007 ; Ibbotson et al., 2012 ; Reindl et al., 2010). La trisomie 12 est considérée par certaines équipes comme une anomalie clonale précoce, la LLC pouvant évoluer secondairement avec l'apparition d'anomalies chromosomiques secondaires ou de mutations touchant en particulier les gènes *NOTCH1*, *TP53*, et *FBXW7* (Landau et al., 2013).

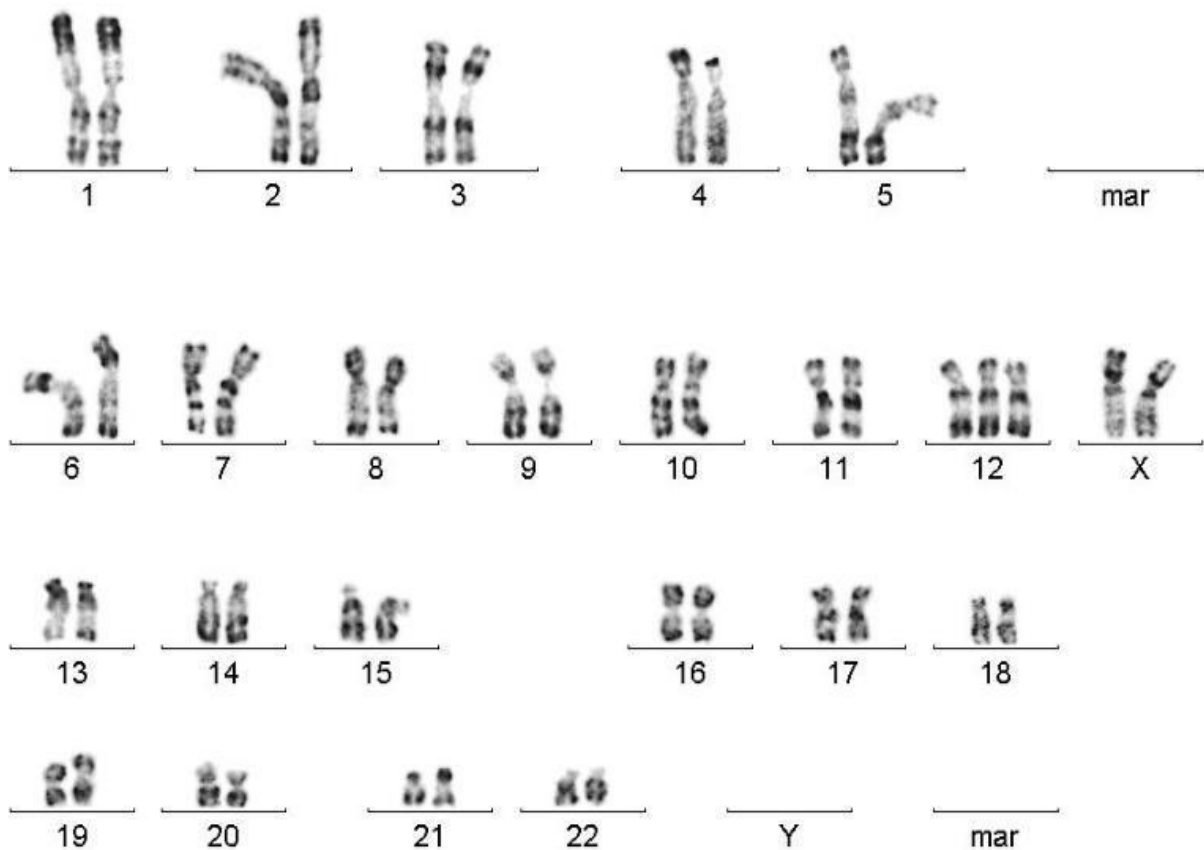


Figure 23 : Trisomie 12 (Letestu et al., 2010)

III.1.3. Délétion 11q22-23

La délétion du bras long du chromosome 11 (**Figure 24**), de taille assez hétérogène, est retrouvée chez 6 à 20% des patients, selon les études (Dohner et al., 2000 ; Letestu et al., 2010). Elle est associée cliniquement à une lymphadénopathie importante, ainsi qu'à des facteurs de mauvais pronostic comme le statut non muté des gènes *IGHV* (Dohner et al., 1997). Depuis la mise en place de la tri- thérapie par rituximab-fludarabine-endoxan, les patients avec délétion 11q ont une survie sans progression plus courte, mais n'auraient plus une survie globale diminuée (Stilgenbauer et al., 2014).

La délétion 11q peut être primitive ou secondaire dans l'évolution de la maladie, mais semble être plus souvent sous-clonale (Landau et al., 2013 ; Landau et al., 2015). La région critique en 11q22.3- q23.1 contient le gène *ATM* (*ataxia-telangiectasa mutated*), codant pour une protéine qui agit en amont de p53 dans l'identification et la réparation de dommages de l'ADN. Des mutations de l'autre copie du gène *ATM* sont retrouvées chez environ 30 % des patients et semblent avoir un impact sur la survie et la survie sans progression des patients traités par une chimiothérapie type fludarabine/endoxan (Stankovic et al., 1999 ; Rose-Zerilli et al., 2014). La délétion 11q peut aussi impliquer le gène *BIRC3*, localisé en 11q22.2, à environ 6 000 kb (**Figure 28**). Le gène *BIRC3* est également muté dans de rares cas de LLC au diagnostic (environ 5 %). L'inactivation de *BIRC3* serait associée à une résistance accrue aux chimiothérapies et est mutuellement exclusive de la délétion *TP53* (Rossi et al., 2013). Ces données restent cependant à confirmer.

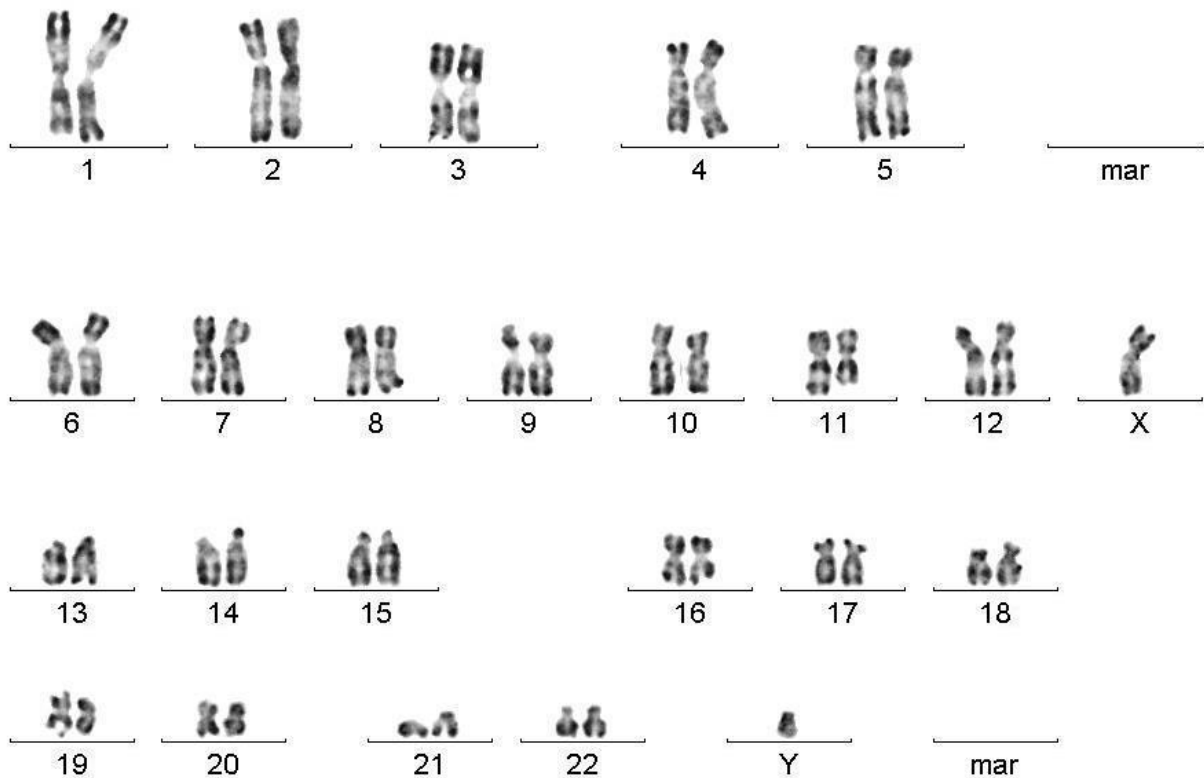


Figure 24 : la délétion 11q (Stilgenbauer et al., 2014)

III.1.4. Délétion 17p13

La délétion du bras court du chromosome 17 [del17p/17p-] (**Figure 25**) est identifiée chez moins de 10 % des patients au diagnostic (Shanafelt et al., 2006 ; Tam et al., 2009). En revanche, elle est retrouvée chez 30 à 50 % des patients réfractaires aux traitements (notamment ceux comportant des analogues des purines), ce qui en fait l'anomalie la plus fréquemment acquise après traitement. Cette notion de résistance aux traitements s'explique par le fait qu'en réponse au stress cellulaire dû à la chimiothérapie, la cellule active sa voie p53. Si cette voie est fonctionnelle, le programme de mort cellulaire par apoptose conduira à l'élimination de la cellule. On comprend dès lors que toute cellule dépourvue d'une voie p53 normale va s'affranchir de ce processus apoptotique. Elle pourra même, du fait du traitement, accumuler des anomalies supplémentaires. Et donc, le traitement aura donc l'effet inverse de celui escompté et conduira à la sélection clonale d'une population cellulaire dépourvue des mécanismes apoptotiques (Tam et al., 2009).

Plusieurs études ont démontré l'influence de la date d'apparition de la del17p sur la survie globale. En effet, détectée *de novo* au moment du diagnostic, la survie globale est de 4 à 5 ans. En revanche, elle passe à 12 voire 18 mois si l'anomalie est identifiée lors du suivi, comme anomalie additionnelle. Par ailleurs, certaines études ont montré que la survie sans progression et la survie globale des patients 17p- sont inversement proportionnelles à la taille du clone 17p-, déterminée par les techniques classiques de FISH ciblée (Tam et al., 2009 ; Delgado et al., 2012).

Les mutations du gène *TP53* sont identifiées sur l'autre copie du gène chez environ 90 % des patients avec del17p (Zenz et al., 2008 ; Zens et al., 2010). Au diagnostic, 5 % des patients présentent une mutation détectée par technique classique de séquençage (Sanger) sans délétion. En rechute, l'étude de populations réfractaires ou résistantes au traitement par fludarabine montre un taux de mutations de *TP53* de 13 à 39 % et 25-30 % des patients avec mutation *TP53* ne présentent pas de délétion de l'autre allèle. En 2015, Baliakas *et al.* ont décrit différents types de mutations de *TP53* ayant des conséquences fonctionnelles et un impact pronostique différents. Ils ont également montré une augmentation du taux de mutations avec le temps (Baliakas et al., 2015).

Les nouvelles techniques de séquençage à haut débit et en grande profondeur (*ultra deep NGS*) ont montré l'existence de petits clones porteurs de mutations de *TP53*, qui sont retrouvés chez moins de 10 % des patients non traités. Même petits, ces clones présentent la même valeur pronostique péjorative que ceux identifiés par des techniques plus classiques de séquençage (Landau et al., 2013 ; Rossi et al., 2014). En effet, ces sous clones représentent la population cellulaire majoritaire lors de l'échappement thérapeutique ou de la rechute chez la majorité des patients. Cependant, pour une faible proportion des patients analysés rétrospectivement, le clone muté pour *TP53* ne s'est pas développé, ce qui suggère la coopération de plusieurs gènes dans la survenue de la résistance au traitement (Guieze et al., 2015 ; Malcikova et al., 2015).



Figure 25: La délétion 17p11
(Shanafelt et al., 2006)

III.1.5. Gain 2p

Le gain de tout ou partie du bras court du chromosome 2 (**Figure 26**) est présent dans 5 à 28 % selon les séries et le stade de la maladie (Schwaenen et al., 2004; Edelmann et al., 2012; Chapiro et al., 2010). Deux régions minimales de gain ont été décrites, l'une impliquant le gène *MYCN*, l'autre impliquant les gènes *REL*, *BCL11A* et *XPO1*. Le gain 2p est associé à des facteurs de mauvais pronostic (**Figure 28**), comme la délétion 11q et le statut non muté des gènes *IGHV* (Chapiro et al., 2010).

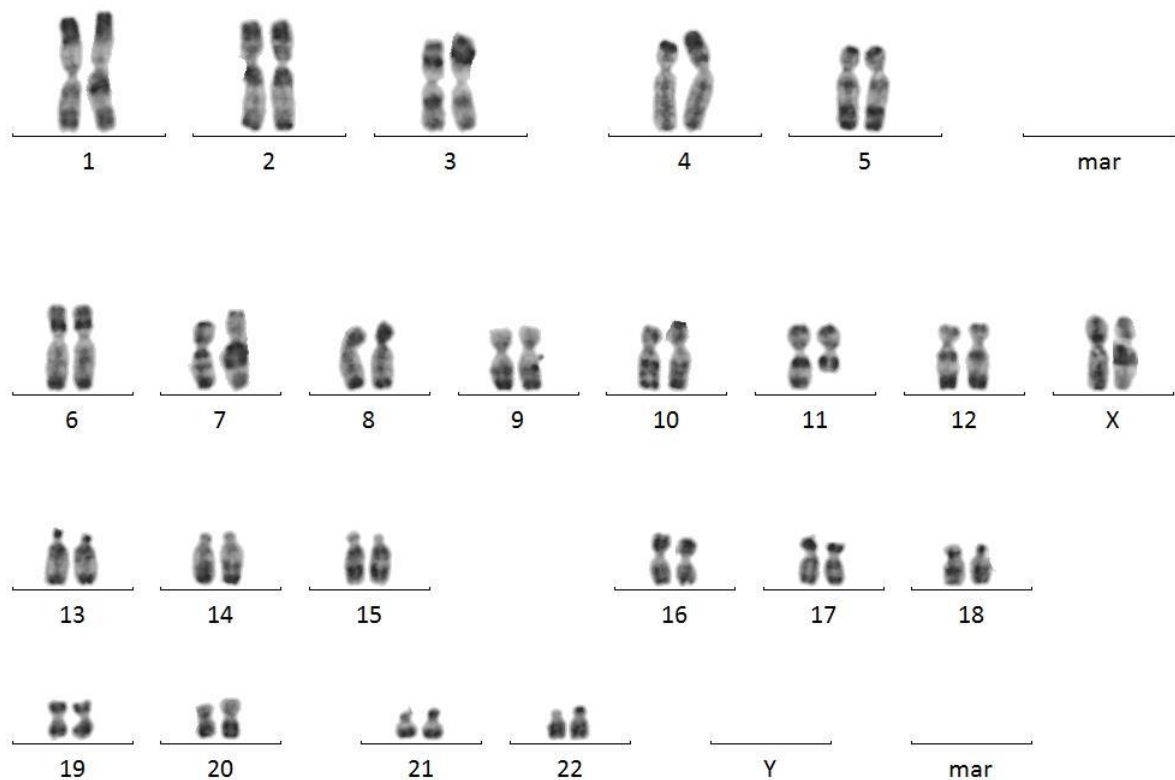


Figure 26 : Le Gain 2p
(Chapiro et al., 2010)

III.1.6. Les délétions/translocations du bras long du chromosome 6

Les délétions 6q (**Figure 27**) comptent parmi les anomalies secondaires les plus fréquentes dans les pathologies lymphoïdes chroniques. Leur incidence dans la LLC est évaluée à 6 % sur les données obtenues par cytogénétique conventionnelle (Julusson et al., 1990).

Ces études distinguent deux points chauds de cassures, 6q15 et 6q23. Parallèlement, deux régions chaudes de délétion ont été cartographiées dans les lymphomes, 6q21–23 et 6q25–27, avec une incidence particulièrement élevée des délétions 6q21–23 dans les lymphomes lymphocytiques, la contrepartie tumorale des LLC (Julusson et al., 1990 ; Harris et al., 1999). Les études FISH ne retrouvent pas une incidence très différente : 7 % (21/285) avec une sonde 6q21 (Dohner et al., 2000 ; Stilgenbauer et al., 1999).

Les délétions 6q21 sont beaucoup plus fréquentes que les délétions 6q27 et tous les cas avec del6q27 montrent aussi une délétion 6q21.

Une zone minimale de délétion de 3 cM a été établie dans la région 6q21 (Zhang et al., 2000). Plusieurs gènes candidats ont été identifiés : aucun ne semble jouer un rôle majeur dans la genèse des LLC (Zhang et al., 2000).

Sur le plan pronostique, les anomalies 6q bien qu'associées à une lymphocytose plus élevée et des adénopathies plus nombreuses, ne confèrent pas un désavantage en terme de survie globale ou de survie sans événement (Dohner et al., 2000 ; Juliusson et al., 1990 ; Stilgenbauer et al., 1999). De plus, là encore, les anomalies 6q peuvent apparaître au cours de l'évolution de la maladie soulignant ainsi leur caractère secondaire (Finn et al., 1998).

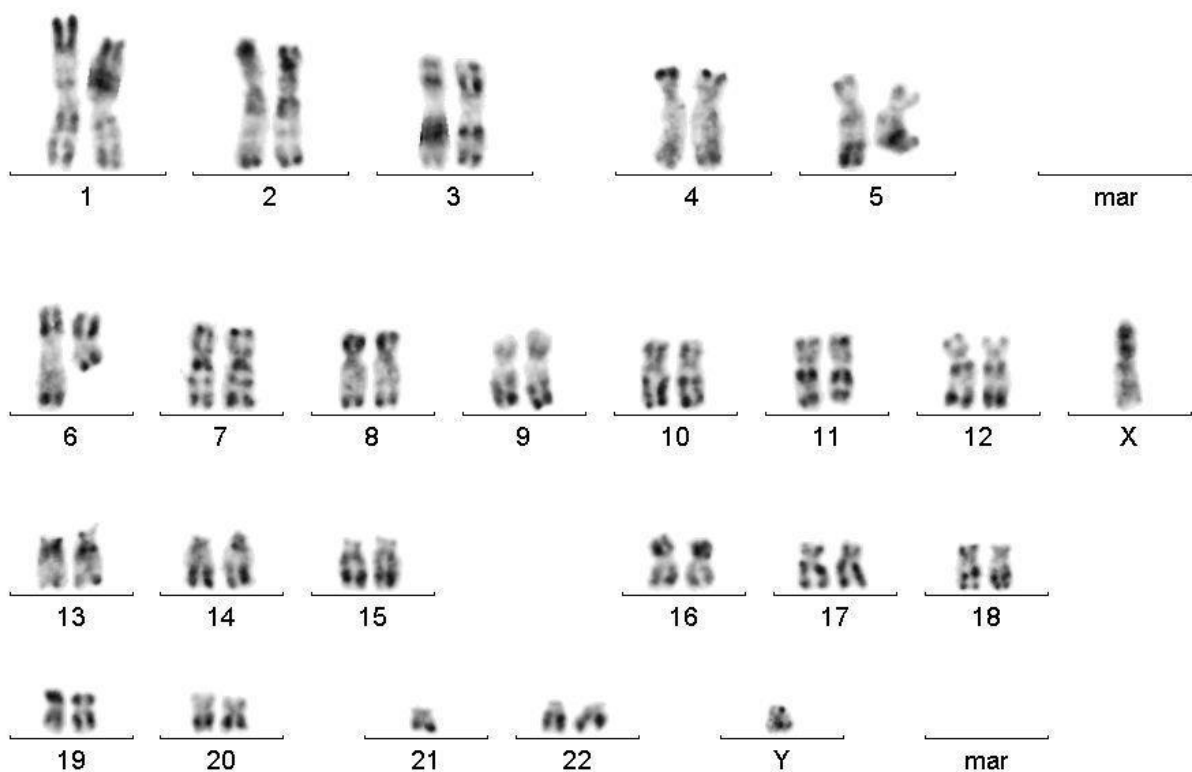


Figure 27 : Déléation 6q
(pas de gène candidat à ce jour ; pas de valeur pronostique associée)
(Baliakas et al., 2014)

III.1.7. Caryotype complexe

Les caryotypes complexes (3 anomalies chromosomiques) sont détectés chez près de 16 % des patients, la fréquence variant très probablement selon le stade de la maladie (Juliusson et al., 1990 ; Haferlach et al., 2007 ; Sutton et al., 2011). Plusieurs études ont montré que les patients avec un caryotype normal avaient une meilleure survie que les patients avec un caryotype anormal, et que la complexité du caryotype était associée à une survie diminuée

(Mayret al., 2006 ; Baliakas et al., 2014).

Bien qu'une association significative entre caryotypes complexes et délétions 17p ou 11q ait été décrite (Ouillette et al., 2010), Jaglowski et al. ont montré que la complexité caryotypique conserve sa valeur prédictive dans la survie sans progression et la survie globale (Jaglowski et al., 2012).

III.1.8. Translocations chromosomiques

Les translocations réciproques ont été détectées dans 20 % des cas dans l'étude de Haferlach *et al.* (Haferlach et al., 2007). Parmi celles-ci, les translocations impliquant les locus des gènes IG (chaînes lourdes (*IGH*) et légères (*IGK*, *IGL*)), ainsi que la bande 13q14 étaient les plus fréquentes. Contrairement aux lymphomes, les translocations impliquant les locus *IG* sont rares dans la LLC (4-9 %), et le pronostic est différent selon le partenaire impliqué. La t(14;19)(q32;q13) – *IGH/BCL3* - est associée à un pronostic défavorable (**Figure 28**), alors que l'évolution des LLC avec t(14;18)(q32;q21) - *IGH-BCL2* - (ou variantes) ne semble pas être différente des LLC classiques (Put et al., 2009 ; Nguyen-Khac et al., 2016). Les translocations impliquant *MYC*, avec un partenaire IG ou non, sont présentes dans moins de 1 % des LLC et sont associées à une évolution péjorative (Put et al., 2012).

III.1.9. Autres anomalies cytogénétiques récurrentes

La délétion 6q est observée dans environ 5 % des cas, sans gène candidat identifié à ce jour (Döhner et al., 2000). La délétion 14q 5 (**Figure 29**) est une anomalie récurrente mais rare (< 5 % des cas), et est associée à des facteurs de mauvais pronostic comme le statut non muté des *IGHV*, et à la trisomie 12 et les mutations *NOTCH1*. Dans environ 50 % des cas est retrouvée la même délétion del(14)(q24.1q32.33), le gène *ZFP36LI* pouvant être impliqué en 14q24 (Cosson, 2014 ; Reindl, 2010) . La duplication 8q24 impliquant le locus du gène *MYC* est également rapportée dans la LLC (**Figure 28**). La délétion 15q15 impliquant le gène *MGA* est observée dans environ 4 % des cas (Edelmann et al., 2012).

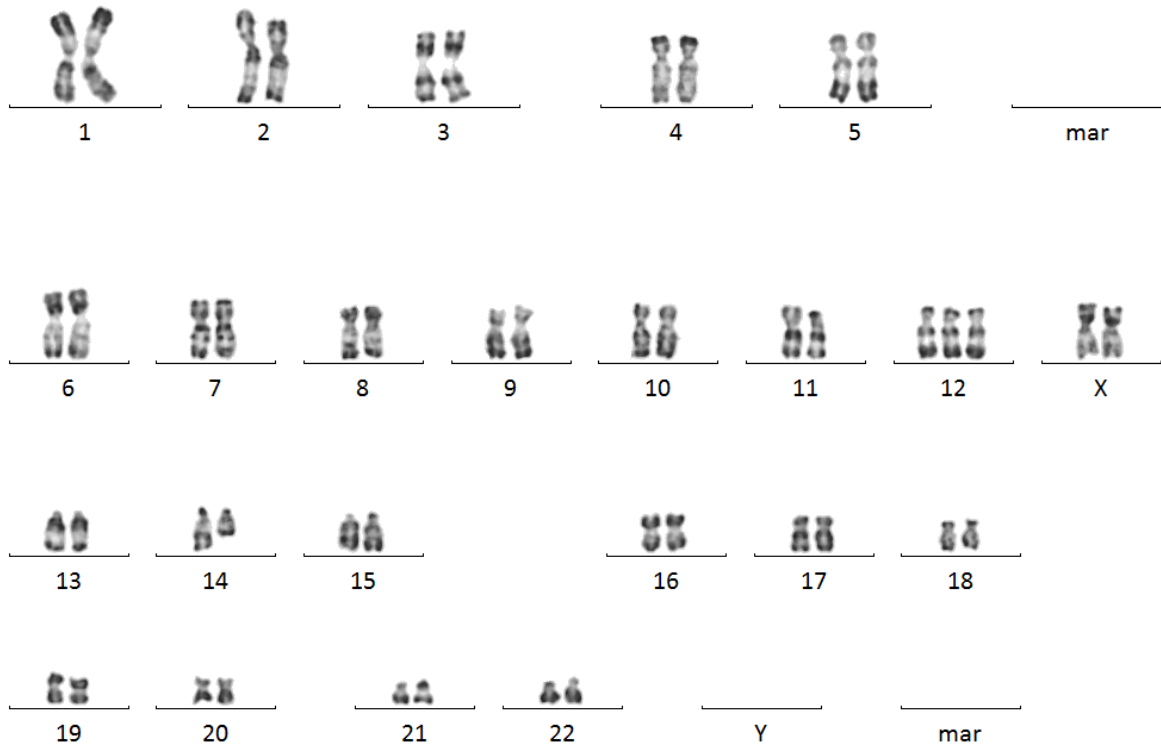


Figure 29 : Délétion 14q
(Baliakas et al., 2014)

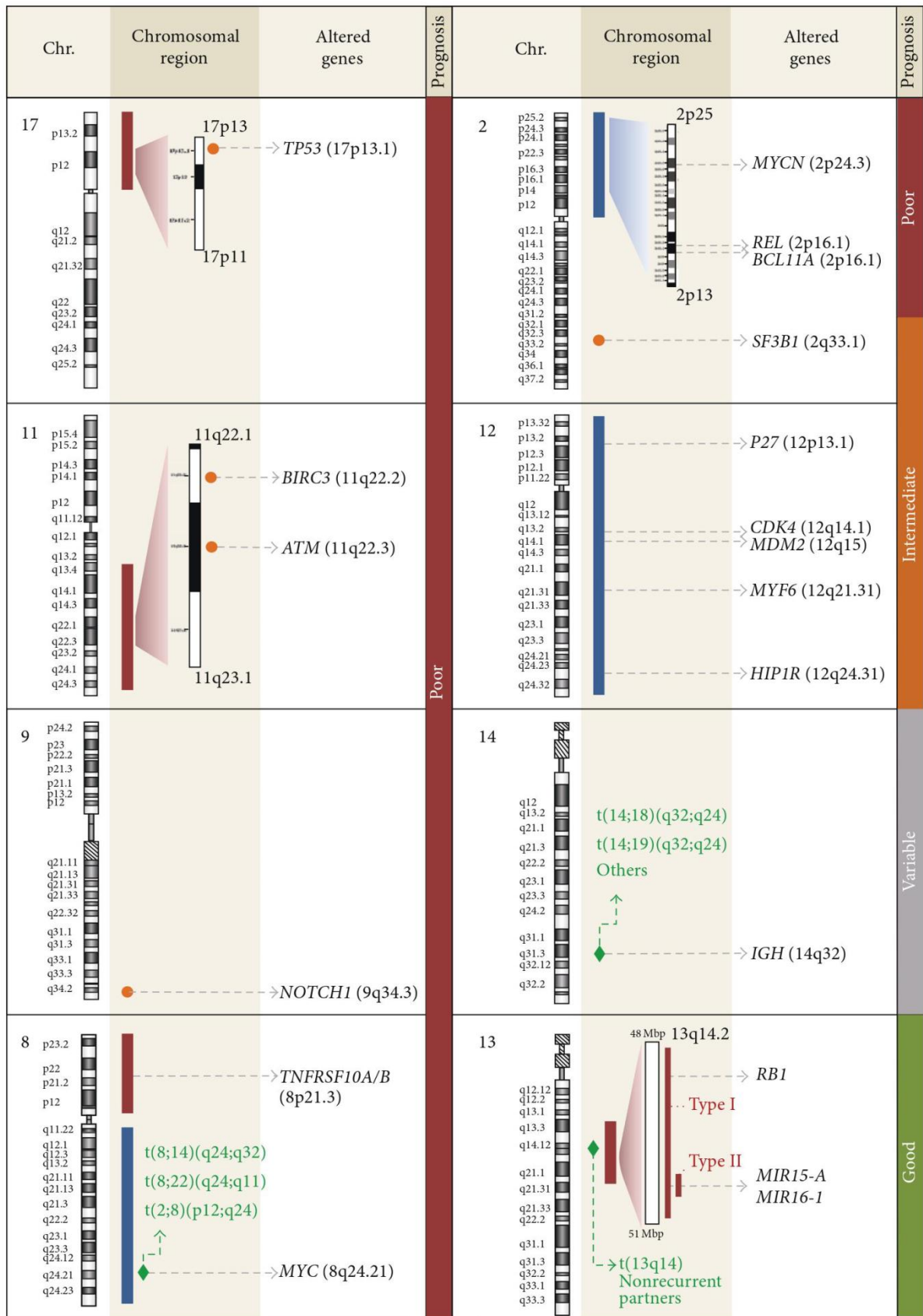


Figure 28: Principales anomalies génétiques de signification pronostique connue dans la LLC. Les anomalies génétiques sont regroupées par chromosomes (Chr.). Dans la section de la région chromosomique, les pertes et les gains sont représentés en barres rouge et bleue, respectivement; les points de rupture pour les translocations sont représentés par des diamants verts; les loci où sont localisés les gènes mutés de manière récurrente sont représentés par des cercles orange

(Anna Puiggros et al., 2014)

III.1.10. Évolution clonale

L'évolution clonale est un point clé dans le développement et la rechute de la LLC. L'étude de séquençage whole-exome de Landau et al. a identifié deux types d'anomalies driver (c'est-à-dire non passagères, récurrentes et jouant un rôle dans le processus de transformation ; définition actuelle, qui peut changer) dans les LLC : celles qui apparaissent comme événements précoces et essentiellement clonales (les délétions 13q hétérozygotes, la trisomie 12, les mutations MYD88 et NOTCH1), tandis que d'autres apparaissent plus tard au cours de l'évolution, comme événements secondaires, et principalement sous-clonales (les mutations TP53, ATM et SF3B1, les délétions 13q homo-zygotes, le gain 2p) (Landau et al., 2013 ; Landau et al., 2015).

III.1.11. Les indications de l'analyse cytogénétique dans la LLC (Tableau 6)

III.1.11.1. Caryotype

Le regain d'intérêt du caryotype dans la LLC date de l'introduction dans les cultures de mitogènes type CD40 ligand ou CpG-oligodéoxynucléotides, plus ou moins associés à des interleukines (IL-2 et IL-4), permettant de stimuler les cellules tumorales de la LLC et de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques, qui sont retrouvées dans 80 à 90 % des cas (Mayr et al., 2006 ; Dicker et al., 2006).

Lorsque le diagnostic de LLC est établi, le caryotype seul (sans FISH) ne s'envisage plus car il peut être pris malgré tout en défaut du fait de l'existence d'anomalies cryptiques et de clones minoritaires que la sensibilité du caryotype ne permet pas de retrouver. L'intérêt du caryotype est donc d'apporter des informations supplémentaires à la FISH, plus particulièrement sur l'existence d'un caryotype complexe et la présence de translocations qui ont une valeur pronostique, ou sur l'existence d'autres anomalies cytogénétiques non recherchées par les sondes FISH classiques. Rigolin et al. ont rapporté que les LLC avec un caryotype anormal, sans anomalie détectée par les 4 sondes FISH, aurait un plus mauvais pronostic (Rigolin et al., 2012). Il est par ailleurs un outil complémentaire à la FISH dans le suivi des LLC afin d'étudier leur évolution clonale. Cependant ces données ne modifient pas l'attitude thérapeutique à l'heure actuelle. Le caryotype est donc recommandé dans la LLC s'il y a une intention de traitement ou lors du suivi de la maladie. En revanche, lors d'un diagnostic incertain, le caryotype est alors indispensable (score de Matutes inférieur ou égal à 3).

III.1.11.2. FISH

Selon les recommandations européennes, l'anomalie obligatoire à rechercher avant tout traitement est la délétion 17p (sonde TP53), ainsi que la mutation du gène *TP53* (Pospisilova et al., 2012). Les patients avec délétion 11q rechutant plus précocement, il est également recommandé de rechercher la délétion 11q (sonde ATM) (Stilgenbauer et al., 2014).

Diagnostic	Indispensable/ obligatoire	Recommandé	Optionnel/ protocole
Caryotype		X	X
FISH	del(17)(p13)(<i>TP53</i>)	del(11)(q22)(<i>ATM</i>)	Gain 2p (2p16(<i>REL</i>), 2p24(<i>MYCN</i>)...)
			del(6)(q21)
			Gain/translocation 8q24(<i>MYC</i>)
			del(11)(q22)(<i>BIRC3</i>)
			tri12
			del(13)(q14) (D13S319)
			translocation <i>IG</i>
Avant traitement (1^{re} ligne ou rechute)	Indispensable/ obligatoire	Recommandé	Optionnel/ protocole
Caryotype		X	X
FISH	del(17)(p13)(<i>TP53</i>)	del(11)(q22)(<i>ATM</i>)	Gain 2p (2p16(<i>REL</i>),2p24(<i>MYCN</i>)..)
			del(6)(q21)
			Gain/translocation 8q24(<i>MYC</i>)
			del(11)(q22)(<i>BIRC3</i>)
			tri12
			del(13)(q14) (D13S319)
			translocation <i>IG</i> *

Tableau 6: Indications du caryotype et de la FISH dans la LLC

(Nguyen-Khac et al., 2016)

Caryotype : réalisé sur le sang périphérique, stimulation CpG-ODN +IL2, temps de culture recommandé : 72 h. En cas d'échec, le tenter à nouveau. Si la LLC est atypique (Score de Matutes = 3), le caryotype devient alors obligatoire au diagnostic.

**IG* : gènes des immunoglobulines : 14q32 (*IGH*), 2p12 (*IGK*), 22q11 (*IGL*).

PARTIE 2

CHAPITRE I :

MATERIEL ET METHODES DE

DETECTION DES ANOMALIES

CYTOGENETIQUES DE LA LLC

Chapitre I : Matériel et méthodes de détection des anomalies cytogénétiques de la LLC

La cytogénétique a pour objet l'étude de la structure et du fonctionnement normal et pathologique des chromosomes (condensation, recombinaison, réparation, ségrégation, transmission) et de la chromatine (organisation et rôle dans la régulation de l'expression des gènes) (A.C.L.F. 2014). La cytogénétique médicale a pour but de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques (techniques de bandes, techniques de cytogénétique moléculaire) ou de biologie moléculaire afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Ces anomalies peuvent être de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques).

La cytogénétique conventionnelle met en œuvre des techniques de culture cellulaire et microscopiques (techniques de bandes) qui permettent l'établissement du caryotype.

La cytogénétique moléculaire est un domaine de la cytogénétique développant des techniques, basées sur les homologies de séquence d'ADN, permettant l'identification spécifique de tout ou partie d'un ou de plusieurs chromosomes (A.C.L.F. 2014).

I.1. Matériel

I.1.1. Les patients

Entre 2009 et 2016, 1012 échantillons de sang périphérique ou moelle osseuse de 1012 patients atteints de LLC nouvellement diagnostiqués ont été recueillis.

Ils ont tous donné leur consentement éclairé conformément aux instructions locales du comité de révision de la Constitution. Les patients ont été impliqués conformément aux critères de diagnostic pour la LLC selon OMS 2008 : Prolifération des lymphocytes CD5 +/- CD19 + et scores Matutes 4-5. Tous les patients inclus ont été étudiés par cytogénétique conventionnelle CBA et hybridation in situ fluorescente (FISH).

I.1.2. Analyse cytogénétique conventionnelle

L'analyse des bandes chromosomiques a été évaluée sur le sang périphérique (n = 911, 90%) ou sur la moelle osseuse (n = 101, 10%). Tous les échantillons, sang et de la moelle osseuse, ont été cultivés pendant 72 heures avec de l'interleukine IL-2 (PerproTech) et Oligonucléotides CPG DSP30 (TIB Molbiol) conformément aux procédures standard. Les analyses de caryotypes réalisées ont été effectuées en utilisant les bandes GTG et RHG. Pas moins de 20 métaphases étaient caryotypées et les aberrations chromosomiques détectées conformément au Système international de cytogénétique humaine 2016.

Un clone a été défini soit par 2 cellules avec le même chromosome additif conventionnel ou structurellement réarrangé ou par 3 cellules avec la même perte de chromosome. Un caryotype complexe « CK » a été défini par la présence de trois ou plusieurs anomalies chromosomiques dans un seul clone.

Les clones multiples liés (Multiple Related Clones « MRC ») ont été définis par au moins deux lignées cellulaires apparentées sur caryotype au stade du diagnostic. Tous les caryotypes ont été examinés par des cytogénéticiens experts.

I.1.2.1. Etape pré-analytique et échantillonnage

Le caryotype de la LLC peut se faire sur plusieurs types de prélèvements:

- Prélèvement médullaire
- Prélèvement sanguin

Ces échantillons doivent être prélevés selon un protocole de prélèvement et d'envoi des caryotypes hématologiques et selon des précautions de sécurité (A.C.L.F. 2014).

Conservation de l'échantillon avant préparation

L'échantillon se conserve à température ambiante, au-delà de 24h, mettre l'échantillon à +2°C, +8°C.

Préparation de l'échantillon

Effectuer la numération avec les quantités suivantes selon le type de l'échantillon :

- Moelle et sang : prélever stérilement un aliquote d'environ 150 μ l.
- Ganglion : dilacérer à l'aide de scalpels stériles le fragment dans une boîte de pétri stérile, sous hotte à flux laminaire. Prélever environ 150 μ l de la suspension cellulaire obtenue. (A.C.L.F. 2014)

I.1.2.2. Etape analytique

Mise en culture et arrêt mitotique

En ce qui concerne la LLC, les cellules du prélèvement sont mises en culture entre 48 h et 72 h avec une chute de prolifération à 96 h dans un flacon contenant 10 ml de milieu de culture en additionnant l'oligodéoxynucléotides CpG (DSP30) (qui va stimuler le récepteur TLR9 des cellules B de la LLC ce qui va conduire à l'activation du lymphocyte B induisant l'augmentation du nombre de récepteur à IL2), plus ou moins associés à des interleukines (IL-2 et IL-4), permettant de stimuler les cellules tumorales de la LLC et de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques, qui sont retrouvées dans 80 à 90 % des cas (Mayr *et al.*, 2006 ; Dicker *et al.*, 2006). L'arrêt mitotique se fait en effectuant un « pulse » (20 μ l de colchicine pour 10 ml de milieu de culture), 1h avant la sortie de culture. (A.C.L.F. 2014)

Sortie de culture et banding chromosomique

- **Traitement par choc hypotonique**

Les cellules subissent un gonflement et une dispersion des chromosomes à l'intérieur de la membrane cytoplasmique par pression osmotique grâce à des solutions hypotoniques salines diluées de KCL 75 mM (A.C.L.F. 2014).

- **Fixation**

Afin de conserver la morphologie des chromosomes constitués d'ADN et de protéine, les cellules subissent une préfixation et des fixations grâce à un fixateur constitué d'un mélange d'acide acétique et de méthanol (1Vol / 3Vol) (A.C.L.F. 2014)

- **Étalement**

L'étalement a une très grande importance pour la qualité des plaques métaphasique et des bandes chromosomiques. Deux techniques d'étalement peuvent être réalisées dans notre laboratoire selon les conditions atmosphérique, l'étalement sur papier humide et l'étalement à la vapeur, qui se fait en présence de bain marie, car une humidité trop haute ou trop basse peut être à l'origine d'étalement de qualité insuffisante ou de la présence de cytoplasme sur les mitoses. Les conditions optimales sont d'un taux d'humidité de 40-45% et une température de 20°C (A.C.L.F. 2014).

- **Marquage chromosomique « Banding »**

Chaque laboratoire doit être capable de réaliser les techniques de base en cytogénétique : marquage en bandes R, G, Q (ou DA-DAPI), C, et coloration NORs. Pour chaque examen, au moins un système de marquage en bandes (bandes R ou bandes G) est obligatoire pour le classement des caryotypes, avec un niveau de résolution adapté aux indications. L'activité de cytogénétique hématologique requiert la maîtrise de marquage en bande R et/ou G (A.C.L.F. 2014).

Les techniques de marquage chromosomique permettent donc de révéler différentes structures ou bandes sur les chromosomes, ceci dit, il existe de nombreux protocoles qui sont classés en fonction de 2 paramètres (le colorant et la technique utilisée), les plus communes au niveau de différents laboratoires sont :

Le marquage R: Type RHG « R-bands by Heating using Giemsa » (Figure 30)

La technique de dénaturation nécessite une température relativement stable proche de +87°C. Le temps d'incubation est inversement proportionnel à la température utilisée et une variation devrait entraîner une augmentation ou une diminution du temps d'incubation. On utilise une base correspondant à 15 min à 86,6°± 0,2°C.

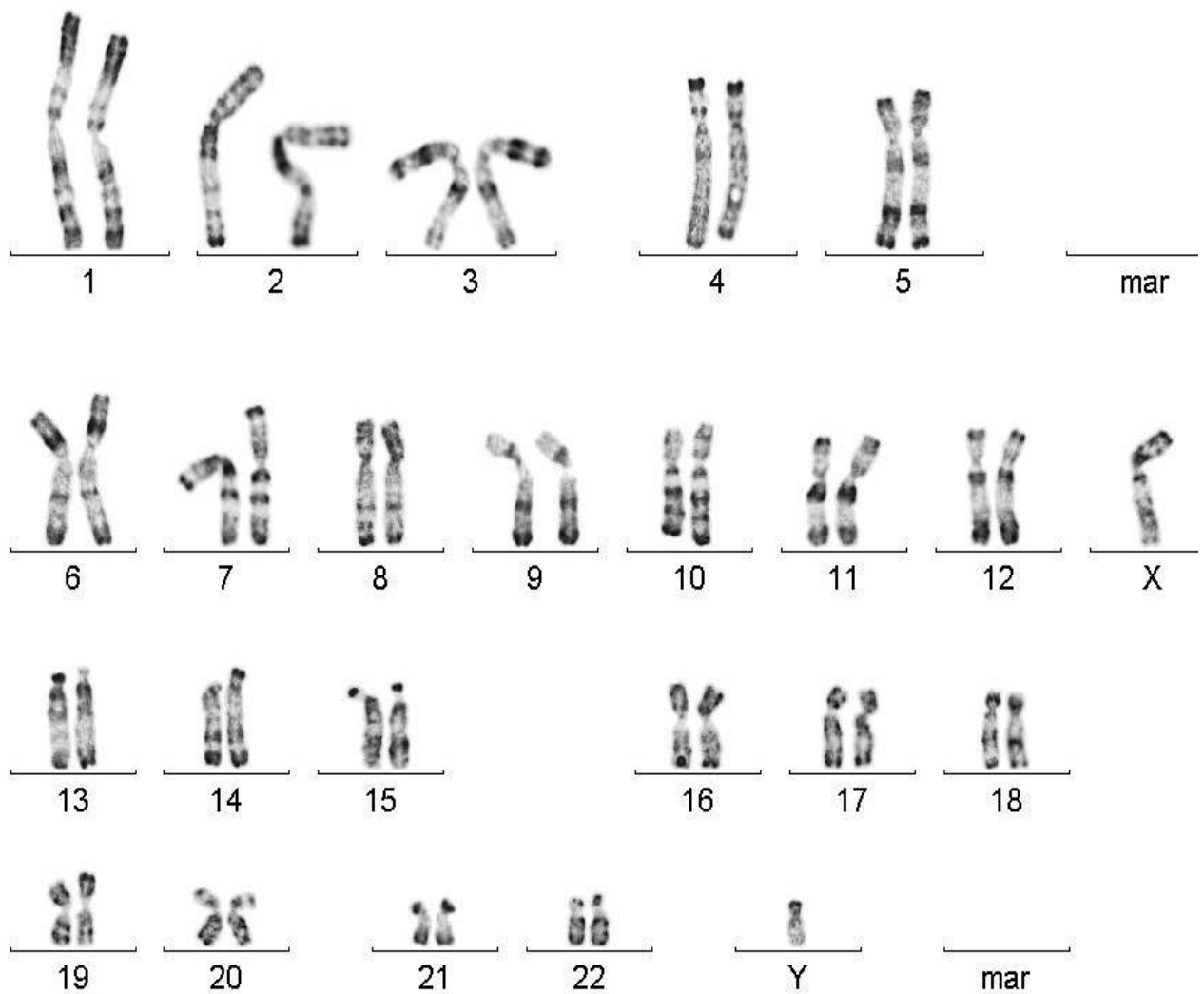
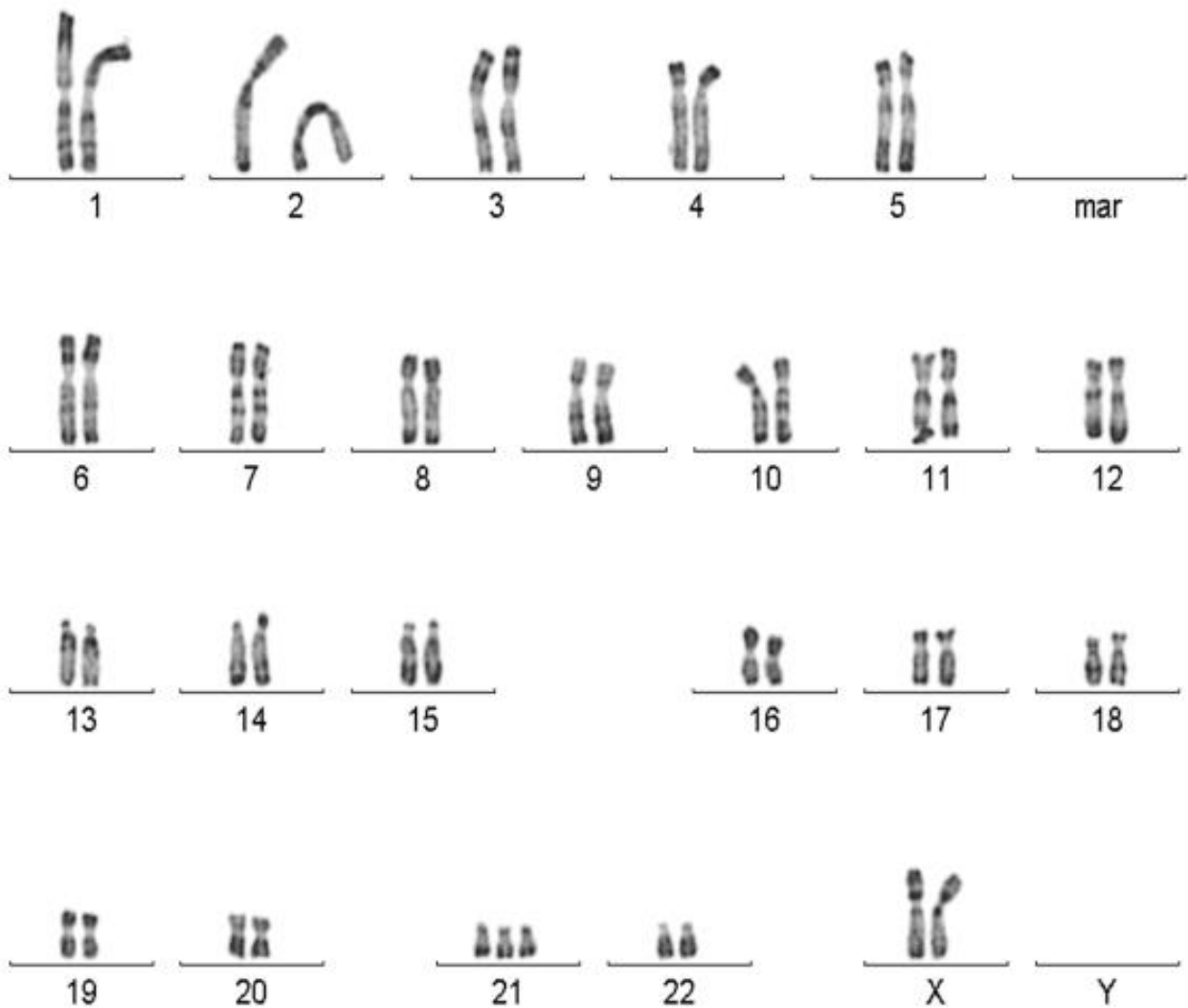


Figure 30 : Caryotype en marquage R (46,XY)
(A.C.L.F. 2014)

Le marquage G: Type GTG «G-bands Trypsine using Giemsa» (Figure 31)

Cette technique passe par un vieillissement des lames en les incubant après étalement dans un four sec à environ 100°C pendant 30 min, et la dénaturation se fait grâce à la digestion des protéines chromosomique par la trypsine utilisée comme enzyme.



**Figure 31 : Caryotype en marquage G (46,XX)
(A.C.L.F. 2014)**

I.1.2.3. Etablissement du caryotype

L'établissement du caryotype consiste en l'identification et le classement des chromosomes de plusieurs métaphases (environ 20)

La lecture des lames se fait comme suite :

- Rechercher les métaphases en balayant les lames à objectif X16 ou X20 à immersion en contraste de phase.
- Capturer les métaphases à l'objectif X100 à immersion en contraste de phase.
- Ajuster les contrastes (noir, blanc et gris) des métaphases capturées sur l'analyseur d'image.
- Lorsque la lecture est terminée, dégraisser les lames dans de l'Histoclear.
- Les métaphases sont caryotypées grâce au logiciel de l'analyseur d'image.

I.1.3. Cytogénétique moléculaire

Tout laboratoire de cytogénétique doit être équipé de matériels pour la cytogénétique moléculaire ou avoir un correspondant susceptible de pratiquer ces techniques en cas de nécessité (A.C.L.F. 2014).

La toute première technique de cytogénétique moléculaire s'appelle l'hybridation *in situ* fluorescente. Elle repose sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de la molécule d'ADN. Dans certaines conditions de température, de pH ou de salinité, les deux brins d'une molécule d'ADN peuvent se séparer (phénomène appelé dénaturation) puis se réassocier de façon spécifique (étape appelée la renaturation).

En 1981, l'équipe de David Ward intègre par voie chimique un nucléotide (du dUTP) couplé à de la biotine dans un fragment d'ADN (cette opération s'appelle le « marquage ») qui est alors appelé « sonde ». Dénaturée, puis hybridée sur des préparations chromosomiques, elles aussi préalablement dénaturées, la sonde est révélée par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, le FITC. Grâce à un microscope qui émet un faisceau lumineux excitant le FITC, David Ward visualisa directement sur des chromosomes la localisation de la sonde. Ainsi naquit l'hybridation *in situ* fluorescente, permettant l'observation de loci sur des métaphases ou des noyaux, d'où le terme *in situ* (à la différence du *Southern blot* qui est l'hybridation d'une sonde sur de l'ADN fixe sur une membrane de nylon) (Langer et al. ; 1981) L'utilisation de plusieurs fluorochromes et de filtres microscopiques idoines ainsi que le développement de système de numérisation des signaux fluorescents ont permis d'hybrider plusieurs sondes de façon concomitante. Grâce à ces progrès, il est possible aujourd'hui d'étudier de façon simultanée plus de 20 loci sur des chromosomes.

I.1.3.1. Conditions d'application

En règle, la cytogénétique moléculaire est une technique complémentaire du caryotype, et ne doit être utilisée que comme telle, sauf indications particulières (A.C.L.F. 2014).

I.1.3.2. Principe général de l'hybridation fluorescente in situ FISH

Le marquage est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un fragment d'ADN. Au début des années 80, on utilisait des nucléotides, le plus souvent le d'UTP, couple aux haptènes que sont la digoxigénine et la biotine. Les sondes étaient alors révélées grâce à des anticorps antidigoxigénine ou de la streptavidine (substance se fixant spécifiquement sur la biotine) couples à des fluorochromes. Aujourd'hui, les fluorochromes sont directement fixés sur les nucléotides. Différents procédés sont utilisés pour incorporer un fluorochrome dans un fragment d'ADN. Les plus connues sont le *Random-priming* et la *Nick-translation*. (Romana et al., 2011)

Les fluorochromes

Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées (accumulation d'énergie) par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation (λ_{exc}) et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission (λ_{em}). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission (Romana et al., 2011).

Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310nm – 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.
- le FITC (Fluorescein isothiocyanate) (λ_{exc} 495nm – λ_{em} 519nm) fluoresce dans le vert
- La Cyanine 3 (Cy3) (λ_{exc} 495nm – λ_{em} 519nm) fluoresce dans l'orange
- Le Texas red (λ_{exc} 589nm – λ_{em} 615nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5 (λ_{exc} 650nm – λ_{em} 670nm) fluoresce dans le rouge

- La Cyanine 5.5 (λ_{exc} 675nm – λ_{em} 694nm) fluoresce dans le rouge

La multifuorescence

La FISH offre la possibilité d'étudier plusieurs loci simultanément lors d'une seule hybridation. Il suffit pour cela d'hybrider des sondes marquées avec des fluorochromes différents dont les spectres d'excitation et d'émission ne se chevauchent pas.

Il est également possible de marquer une sonde avec plusieurs fluorochromes. On obtient alors une sonde dont la fluorescence est complexe, composée des longueurs d'émission des différents fluorochromes. Le signal de ce type de sonde ne peut être analysé qu'après numérisation. En utilisant 5 fluorochromes (avec lesquels 31 combinaisons sont possibles), il est possible de construire 23 sondes de peinture, chacune spécifique d'une paire chromosomique donnée, ouvrant la voie au caryotype en multifuorescence (**Figure 37a**). Par le même procédé, on peut obtenir des sondes spécifiques de chaque extrémité subtélomérique ou de chaque centromère (**Figure 37b et 37c**) (Romana et al., 2011).

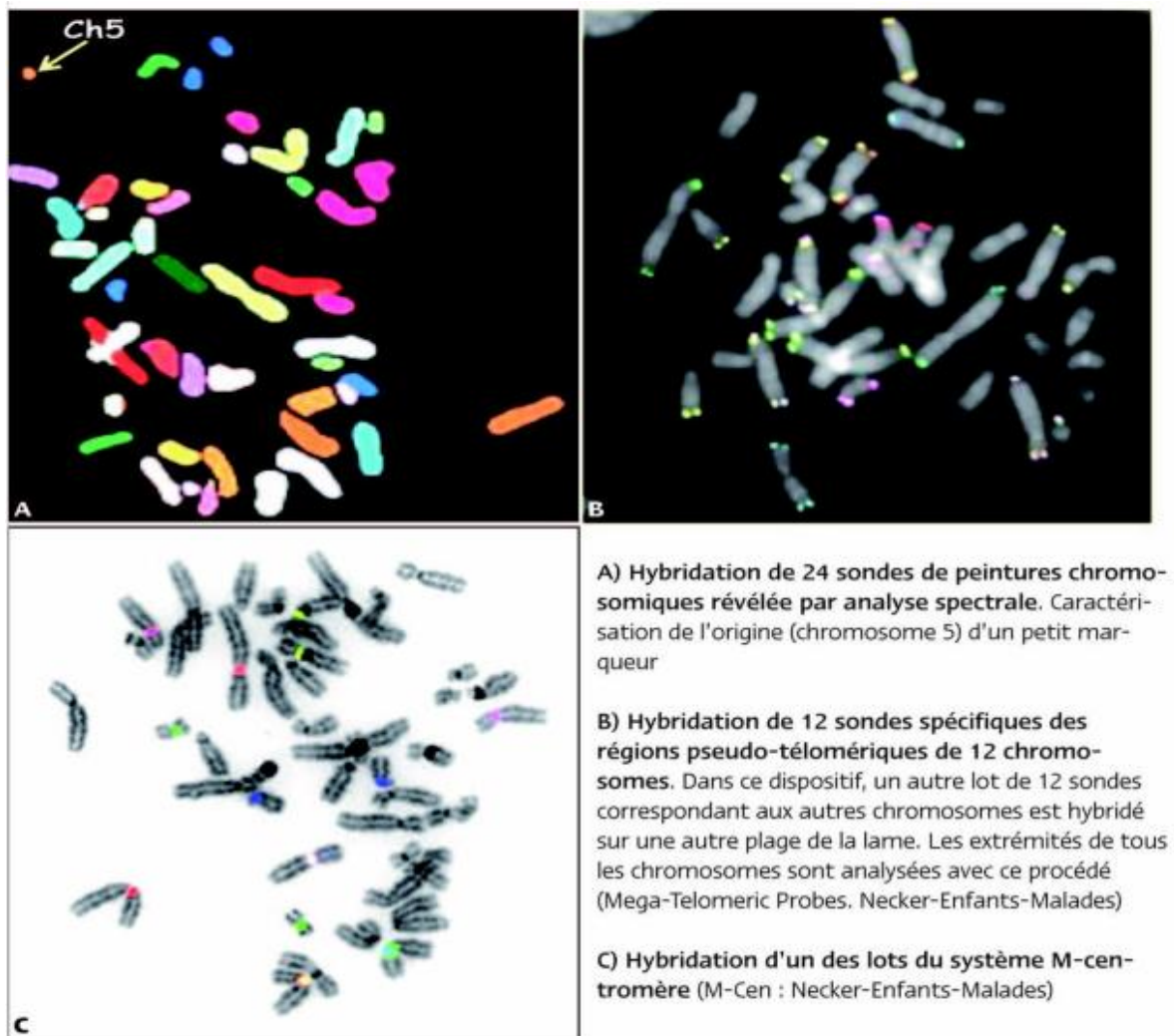


Figure 37 : La multifluorescence

(Romana et al., 2011)

L'hybridation (Figure 38)

C'est l'opération qui consiste à mettre en présence la sonde dénaturée généralement par la chaleur et l'ADN des chromosomes et des noyaux également dénaturés. Son efficacité dépend du temps d'hybridation et de la concentration de la sonde. Le temps d'hybridation varie de 5 minutes pour des sondes centromériques, à 24 ou 48 heures pour les sondes plus complexes comme les sondes de peinture.

Dans la grande majorité des cas, l'hybridation est dite « compétitive ». En effet, l'ADN est composé de 40% de séquences répétées et de 65% de séquences uniques, ce qui correspond à la composition des sondes (à l'exception des sondes centromériques et télomériques).

Après marquage, ces séquences répétées vont s'hybrider sur leurs cibles génomiques engendrant des signaux aspécifiques. Pour les éviter, Lengoer et al. en 1986 ont eu l'idée d'ajouter à l'ADN de la sonde un excès d'ADN non marqué riche en séquences répétées (appelé aujourd'hui ADN Cot1). Ainsi cet ADN s'hybride non seulement sur les séquences répétées de la sonde mais aussi sur celles des cibles génomiques. Cette méthode appelée hybridation « compétitive » permet d'éviter les signaux aspécifiques (Landegent et al., 1987).

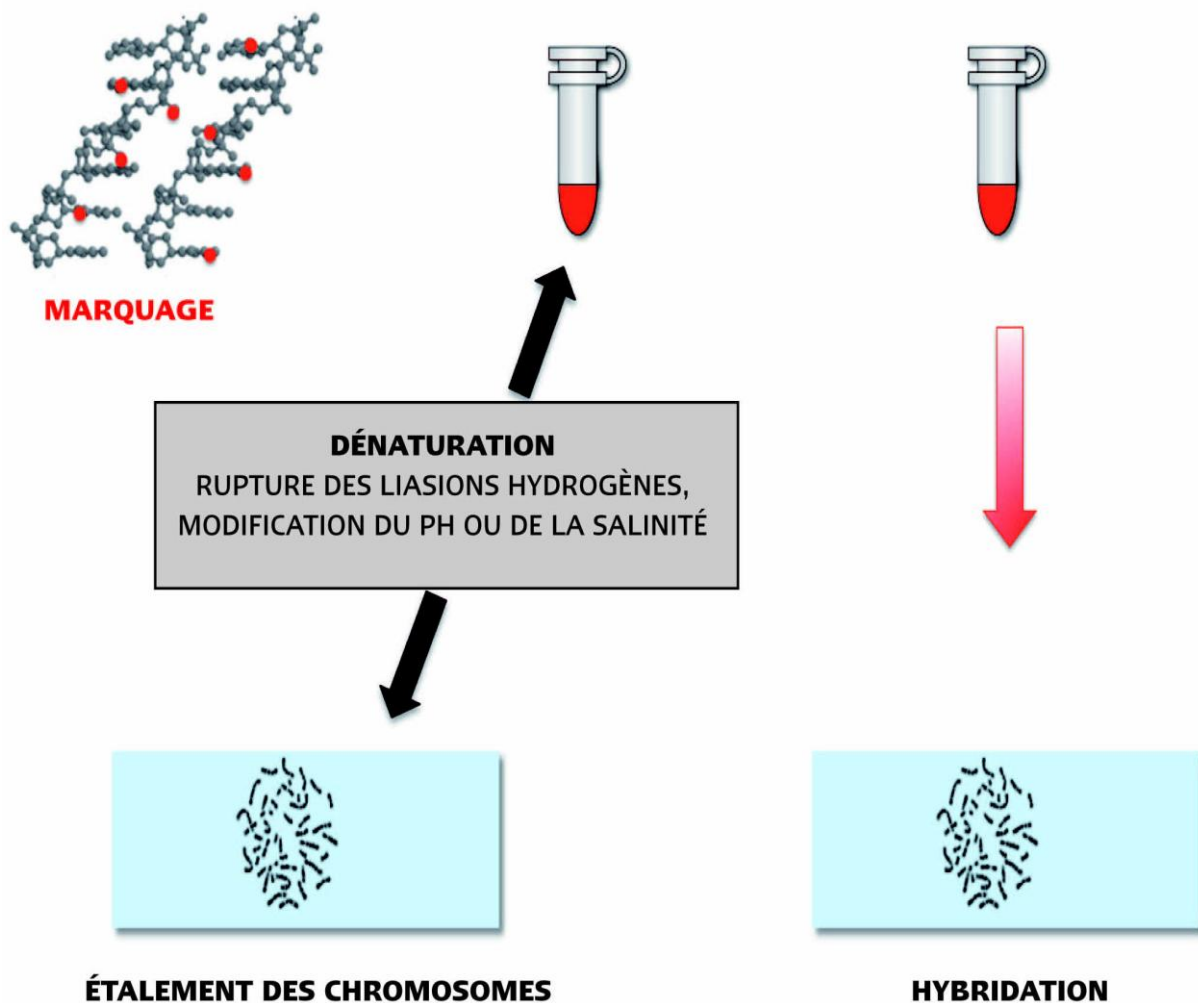


Figure 38 : L'hybridation

(Romana et al., 2011)

La microscopie en épifluorescence

Principe général

La figure 39 illustre la microscopie en épifluorescence. Un rayon lumineux de lumière blanche (contenant l'ensemble des longueurs d'onde de l'ultra violet aux infrarouges) est génère par des lampes a mercure (donnant des pics d'intensité dans les longueurs d'onde du visible) ou a Xenon (pics d'intensité homogène pour toutes les longueurs d'onde).

Cette lumière est transmise au niveau d'un dispositif contenant deux filtres et un miroir dichroïque. Le premier filtre sélectionne une longueur d'onde d'excitation (correspondant au fluorochrome intègre dans la sonde d'intérêt) qui est ensuite réfléchi par le miroir dichroïque sur la lame hybridée. Une fois le fluorochrome excite, il émet une longueur d'onde d'émission, d'intensité plus faible, qui peut alors passer a travers le miroir dichroïque pour arriver ensuite au filtre d'émission de façon a éliminer des longueurs d'onde parasites. Cette longueur d'onde d'émission est par la suite transmise aux oculaires du microscope pour être observée par l'œil de l'observateur ou au niveau d'une camera qui numérise ce signal. En changeant de filtres, on peut alors étudier de cette façon plusieurs sondes marquées par des fluorochromes différents (Romana et al., 2011).

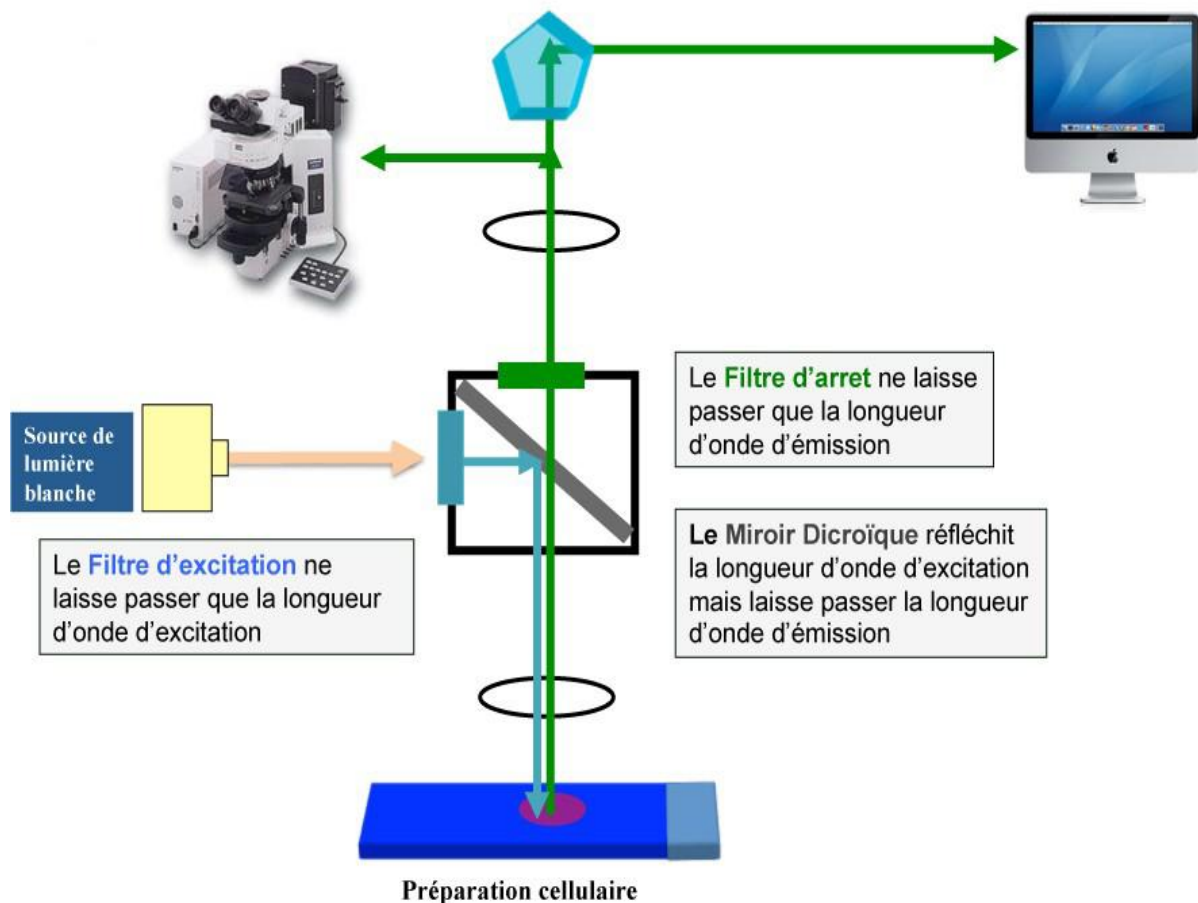


Figure 39 : La microscopie en épifluorescence
(Romana et al., 2011)

I.1.3.3. Types de sondes

Les sondes utilisées pour l'hybridation *in situ* identifient soit des séquences répétées (bras long de l'Y, sondes alphas centromériques spécifiques ou non, sondes télomériques non spécifiques), soit des séquences uniques (sondes de locus ou régionales), ou encore un mélange de séquences uniques s'hybridant sur la totalité ou une partie d'un chromosome (sondes de peinture globale ou partielle). Certaines sondes sont commercialisées par des industriels, d'autres sont fabriquées par les laboratoires.

Pour les sondes préparées au laboratoire :

La sonde sera préparée en x quantité et se verra attribuer un numéro de lot unique (dont le format est à déterminer par le laboratoire).

Le tube devra mentionner au minimum le nom de la sonde, le numéro de lot, et une date de fabrication.

La date de péremption des sondes est définie par le laboratoire en se basant sur son expérience. Pour les laboratoires qui débutent une activité de fabrication de sonde, il est recommandé d'utiliser une durée de péremption courte (un an par exemple) qui sera par la suite augmentée en fonction de l'expérience acquise (A.C.L.F. 2014).

Avant son utilisation en diagnostic, la sonde devra avoir été validée sur le plan technique.

Validation des sondes

• Pour les sondes commercialisées

La vérification de la sensibilité et de la spécificité est réalisée par contrôle de l'hybridation sur le chromosome homologue et/ou par l'analyse de l'hybridation d'une sonde témoin du chromosome testé (A.C.L.F. 2014).

• Pour les sondes non commercialisées

Pour chaque nouvelle sonde réalisée au laboratoire, il est recommandé d'hybrider la sonde sur une préparation cytogénétique pour :

- S'assurer d'un signal d'hybridation correct permettant une interprétation des signaux d'hybridation obtenus (intensité suffisante pour différencier le signal de la sonde du bruit de fond sans ambiguïté).
- Vérifier la localisation de la sonde sur des métaphases ; la spécificité sera déterminée par toute technique permettant d'identifier le chromosome d'intérêt (bandes, co- hybridation avec une autre sonde spécifique permettant d'identifier le chromosome, et hybridation sur une métaphase connue portant une anomalie de ce chromosome)
- Noter la présence d'une éventuelle co-hybridation
- Evaluer la reproductibilité d'hybridation de la sonde en comptant au moins 20 métaphases et 100 noyaux pour une utilisation en interphase.
- Une sonde donnant un signal d'hybridation correct, hybridant dans 100 % des métaphases et au moins 95 % des noyaux, bien localisée pourra être utilisée en diagnostic.

- La présence d'une co-hybridation rend la sonde inutilisable en interphase, mais n'empêchera pas son utilisation sur métaphases demandant une interprétation plus rigoureuse.
- Pour chaque nouveau lot d'une sonde déjà réalisée préalablement et contrôlée dans le laboratoire, un contrôle plus sommaire sur 10 mitoses pourra être réalisé pour vérifier la qualité du signal d'hybridation et la localisation cytogénétique. La preuve de la vérification devra être conservée (A.C.L.F. 2014).

Utilisation des sondes

Modalité de lecture

Une fiche de lecture reportant les conditions d'analyse et la qualité du signal doit être rédigée et conservée (soit dans le dossier du patient, soit sur un support facilement récupérable). Une double lecture des lames au microscope est recommandée en cas de difficulté d'interprétation (A.C.L.F. 2014).

Conditions d'interprétation du signal

Le résultat pourra être rendu si lors de l'analyse FISH, le signal d'hybridation sur le chromosome témoin (non censé être remanié) ou les deux chromosomes (en l'absence du remaniement recherché, par exemple suspicion de microdélétion 22q11.2) est correctement localisé et d'une intensité permettant de différencier le signal de la sonde du bruit de fond sur au moins 10 mitoses.

Pour les sondes couplées à une sonde témoin, l'hybridation de cette sonde témoin sur les deux chromosomes entérinera la validité de la sonde utilisée (A.C.L.F. 2014).

I.1.3.4. Règles d'utilisation des techniques de cytogénétique moléculaire

• Les peintures chromosomiques

Elles doivent être utilisées en cas d'anomalie de structure pour rechercher le nombre de partenaires impliqués dans le remaniement. L'utilisation de sondes loci spécifiques complémentaires peut s'avérer nécessaire à l'interprétation. **(Figure 40)**

Il est à noter que l'examen d'un petit nombre de cellules (au moins cinq) est généralement suffisant dans ce cas pour apporter l'information recherchée.

- **Les sondes “ séquence unique ” (Figure 40)**

Elles permettent d'étudier un locus spécifique, et sont utilisées en fonction, soit en fonction d'indications cliniques ou d'indications cytogénétiques.

Au moins 10 mitoses, et si possible 20, doivent être analysées. En cas de recherche de duplication, compléter l'étude par l'analyse d'au moins 25 noyaux.

- **La FISH interphasique**

Elle est utilisée pour la mise en évidence d'aneuploïdies, homogènes ou en mosaïque, ou d'anomalies de structure, à l'aide de sondes centromériques ou régionales. La co-hybridation d'une sonde témoin dans les mêmes conditions opératoires peut être utile. Le nombre des noyaux à examiner dépend de l'indication et de la sonde utilisée. Elle peut être complémentaire à l'analyse cytogénétique en cas de recherche d'anomalies des chromosomes sexuels.

L'interprétation se fait sur 100 noyaux si possible, le nombre total doit être adapté à l'indication.

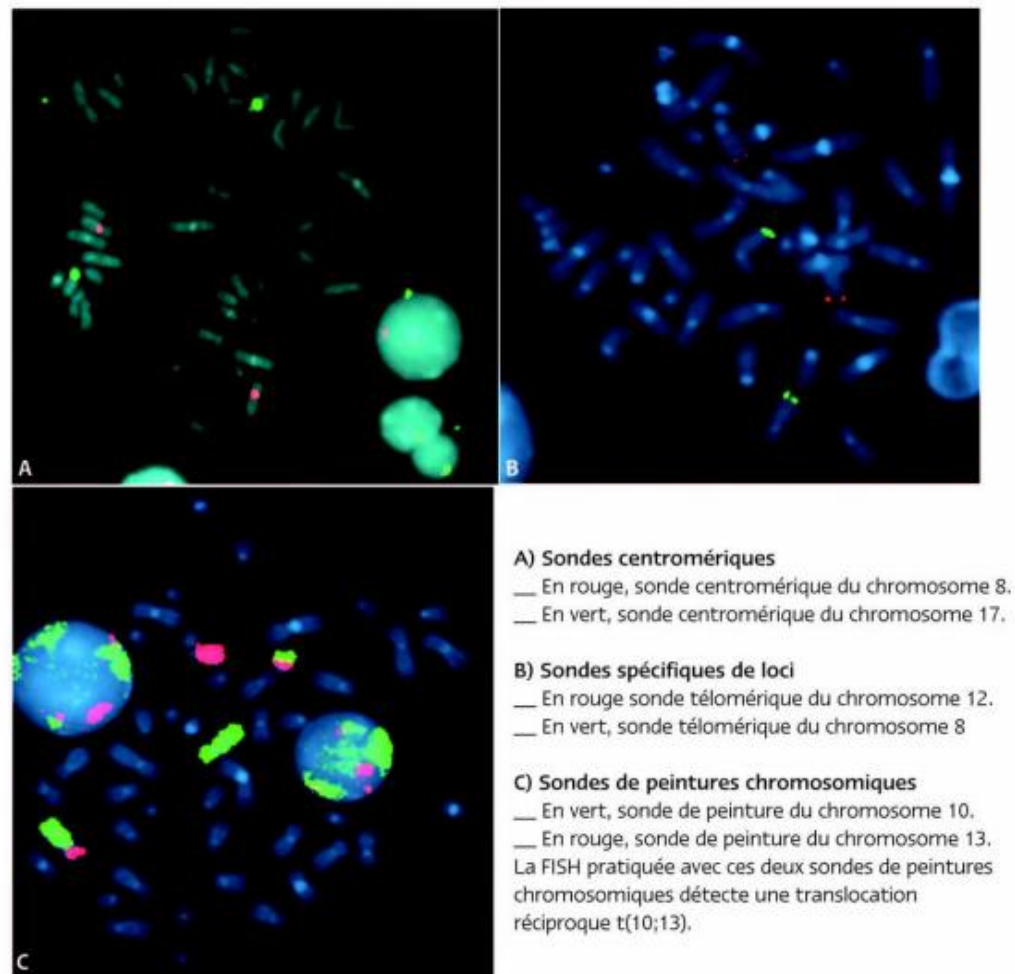


Figure 40 : Sondes utilisées en cytogénétique moléculaire

(Romana et al., 2011)

I.1.3.5. Documentation

Comme pour le caryotype, des images représentatives des résultats obtenus par FISH doivent être conservées (un minimum de 2 à 5 métaphases ou noyaux par sonde utilisée). En cytogénétique hématologique, ce nombre peut être réduit.

I.1.3.6. Résultats

Si une technique d'hybridation *in situ* fluorescente a été réalisée avant l'analyse chromosomique, le résultat de cette technique devra mentionner qu'il s'agit d'une analyse partielle ne renseignant que sur les loci des sondes utilisées et que sera réalisé ultérieurement le caryotype.

Si une technique d'hybridation *in situ* fluorescente a été réalisée en complément de l'étude cytogénétique conventionnelle, la conclusion de l'étude sera incluse dans le résultat cytogénétique ou éventuellement pourra faire l'objet d'un résultat complémentaire (A.C.L.F. 2014).

I.1.4. Application de la cytogénétique conventionnelle sur la LLC

Lorsque le diagnostic de LLC est établi, le caryotype seul (sans FISH) ne s'envisage plus car il peut être pris malgré tout en défaut du fait de l'existence d'anomalies cryptiques et de clones minoritaires que la sensibilité du caryotype ne permet pas de retrouver. L'intérêt du caryotype est donc d'apporter des informations supplémentaires à la FISH, plus particulièrement sur l'existence d'un caryotype complexe et la présence de translocations qui ont une valeur pronostique, ou sur l'existence d'autres anomalies cytogénétiques non recherchées par les sondes FISH classiques.

Rigolin *et al.* ont rapporté que les LLC avec un caryotype anormal, sans anomalie détectée par les 4 sondes FISH, aurait un plus mauvais pronostic (Rigolin *et al.*, 2012). Il est par ailleurs un outil complémentaire à la FISH dans le suivi des LLC afin d'étudier leur évolution clonale. Cependant ces données ne modifient pas l'attitude thérapeutique à l'heure actuelle.

Le caryotype est donc recommandé dans la LLC s'il y a une intention de traitement ou lors du suivi de la maladie. En revanche, lors d'un diagnostic incertain, le caryotype est alors indispensable (score de Matutes inférieur ou égal à 3).

Selon les recommandations européennes, l'anomalie obligatoire à rechercher avant tout traitement est la délétion 17p (sonde *TP53*), ainsi que la mutation du gène *TP53* (Pospisilova *et al.*, 2012). Il est également recommandé de rechercher la délétion 11q (sonde ATM) car les patients présentant cette délétion rechutent plus précocement) (Stilgenbauer *et al.*, 2014).

Il est à noter que les quatre marqueurs cytogénétiques classiquement étudiés sont, la délétion 13q14, la trisomie 12, la délétion ATM et la délétion du gène *TP53* (**Figure 41**)

Les analyses FISH ont été effectuées sur les noyaux interphasiques et les métaphases des cellules en culture, conformément aux instructions du fabricant. Le panneau FISH de routine comprenait une sonde XL *TP53 / ATM* (MetaSystems) et sonde XL *DLEU / LAMP / 12cen* (MetaSystems).

Pour chaque sonde, 200 noyaux en interphase et un maximum de 40 métaphases ont été évaluées. La clonalité à un faible niveau de FISH interphasique peut être en outre validée sur au moins 2 métaphases portant le signal (s) anormal (s) attendue sur l'hybridation FISH. La coupure pour chaque sonde individuelle a été déterminée à partir d'une analyse d'échantillons négatifs et calculé comme la moyenne + 3 écart type.

Pour le Mélange XL *DLEU* / *LAMP* / 12cen, seuil de perte monoallélique 13q14, perte biallélique 13q14, ou la trisomie 12 était de 2,9%, 0,5% et 7%, respectivement. Pour le Mélange XL *TP53* / *ATM*, le seuil de coupure pour les pertes *ATM* monoalléliques ou *TP53*: 3% et 4,7%, respectivement. Les aberrations chromosomiques de FISH ont été catégorisées conformément au modèle hiérarchique de Döhner. Aberrations haut risque FISH (HR-FISH) pour pertes *ATM* et *TP53*, Aberrations intermédiaires FISH (inter - FISH) pour trisomie 12 ou absence de FISH anormal-et aberration à faible risque de FISH (LR-FISH) pour les délétions 13q14 isolés

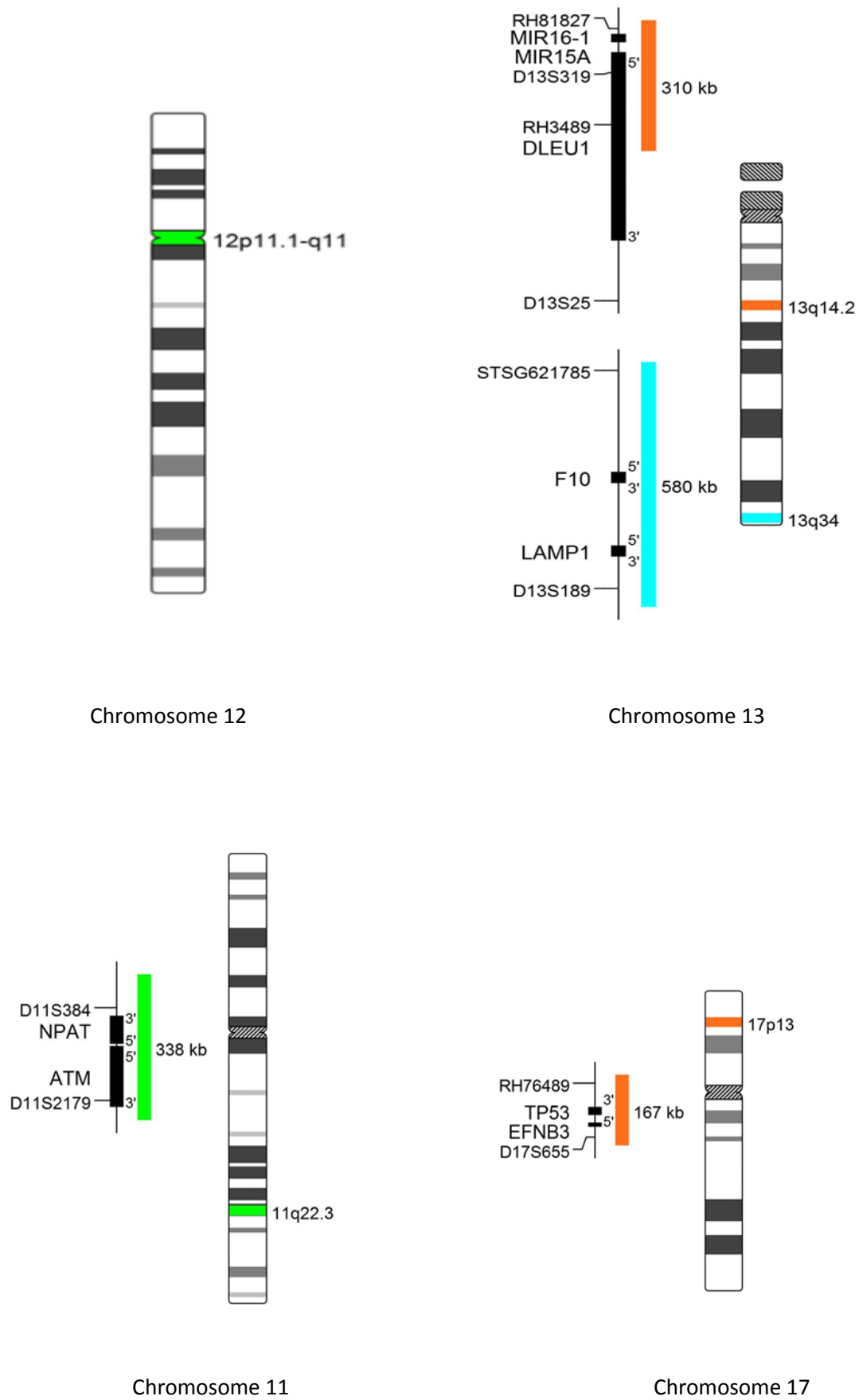


Figure 41 : Structures des 4 sondes spécifiques de la LLC (Stilgenbauer et al., 2014)

CHAPITRE II:
RESULTATS ET DISCUSSION

RÉSULTATS

Mille douze patients, soit 61% (n = 613 hommes) et 39% (n = 399 femmes), âge médian au moment du diagnostic est de 72 (35-95 ans), ont été enregistré. Selon le modèle hiérarchique de Döhner, la distribution des patients était de 40% pour LR-FISH (n= 405), 39% pour Inter-FISH (n = 383) et 22% pour HR-FISH (n = 224; **Tableau 7 « 1A »**). En CBA, les caryotypes anormaux ont été trouvés dans 65% des cas (n = 660) et CK (caryotype complexe) était observés dans 19% des patients (n = 194). Le nombre médian d'anomalies par CK était de 4 (entre 3-12), 39% avec 3 anomalies (n = 77), 18% avec 4 anomalies (n = 34) et 43% avec plus de 4 anomalies (n = 83). Les anomalies de l'analyse chromosomique en bandes ont été éliminées voir **Tableau 7 « 1B »**. Chaque groupe pronostique FISH a été confronté aux résultats correspondants de la CBA. Dans le groupe LR-FISH, des délétions isolées de 13q14 ont été confirmées par CBA dans 270 des 405 cas détectés par FISH et signalés soit comme suppression cryptique dans un caryotype normal dans 48% des cas (195 patients) ou associés à une délétion 13q détectable par CBA (75 patients). Pour les patients restants (n = 134), la CBA a montré des anomalies chromosomiques avec apparition de CK dans 28 cas. En tenant compte de la CBA, 32% des cas de LR-FISH ne devraient pas être considéré comme délétion isolée 13q14 (n = 135) et 7% ont présenté un CK (n = 28) et devrait donc être exclu de la catégorie faible risque. Il est à noter qu'un groupe de patients a présenté la délétion 13q14 bi-allélique (n = 80). Ce sous - groupe n'est pas isolé dans la hiérarchie de Döhner mais la perte du second allèle 13q14 peut être considérée comme une évolution sous-clonale puisque la plupart des patients ont présenté à la fois des délétions mono et bialléliques. Le profil CBA de ce groupe est comparable à ceux de la perte monoallélique 13q14.

Le groupe Inter-FISH (39% des patients) comprenait 225 patients avec FISH normale et 158 avec trisomie 12. FISH normale était associée à une CBA anormale dans 75 des 225 patients (33%) et le caryotype anormal a été retrouvé dans 98% des patients avec la trisomie 12 en FISH. CK a été identifié dans 11 et 35 cas, respectivement représentant 12% de l'ensemble du groupe Inter-FISH (n = 46). Enfin, autant pour le groupe LR - FISH que pour le groupe inter-FISH assigné (n = 788), 9,5% des cas ont été associés avec CK (n = 74) et constituait un changement possible du groupe de risque pronostic HR-FISH représenté par la perte en *ATM* (n = 138) et / ou la perte en *TP53* (n = 92) ont été identifiés chez 22% des patients et associés dans 98% des cas avec un caryotype anormal.

CK a été identifié dans 44% (n = 61) et 70% (n= 64) des cas de pertes *ATM* et *TP53*, respectivement, avec une occurrence significative plus élevée dans le groupe de pertes *TP53* ($p=0,0002$).

L'analyse chromosomique des bandes a démontré que les mécanismes chromosomiques conduisant à la perte de *TP53* sont principalement dus aux réarrangements déséquilibrés du chromosome 17 (n= 67) ou translocation déséquilibrée impliquant le chromosome 17p (n = 37), l'addition du chromosome 17p (n = 16), iso-chromosome 17q (n = 7) et anneau du chromosome 17 (n = 4). Une délétion interstitielle de 17p a été détectée dans 18% des cas (n = 15), et 4 cas supplémentaires avec suppression délétère de *TP53* (4%). Inversement, les pertes en *ATM* ont été principalement retrouvées sous forme de délétion interstitielle non cryptique avec des points de cassure allant de 11q13 à 11q24 (91% des cas, n=126). Les derniers cas restants étaient associés à soit une translocation à locus 11q22 (n = 3), ou add (11) (q22) (n = 2), ou délétion cryptique 11q22.3 (n = 3). Une évolution sous-clonale interphasique non détecté par CBA a été observé dans 4 autres cas. Il est à noter que les réaménagements de la CBA à 11q22 et 17p13 n'a pas toujours été associé à une perte en *ATM* ou en *TP53*, comme observé dans 4 patients avec suppression 11q sans suppression *ATM* et 1 patient avec add (17p) et préservation du *TP53*. Avec la contribution de CBA, 16,5% des patients de cette série classés par FISH devraient être reclassés à une catégorie de risque plus élevée (n = 167) selon la récente proposition de classification pronostique affinée (Guidice et al., 2018).

En nous concentrant sur le caryotype complexe CK, nous avons montré une forte association entre CK et *HR - FISH*, mais un tiers des patients ont présenté un CK sans détection de suppression possible de l'*ATM* ou de la *TP53* (74 patients sur 224). Ainsi, nous avons défini quatre catégories distinctes au sein du groupe CK (**Tableau 8**):

- 74) ;
 - CK sans suppression *TP53* ou suppression *ATM* (CK + / pas de HR-FISH, n =
 - de CK et suppression *TP53* (CK + / perte *TP53*, n = 59),
 - de CK et suppression *ATM* (CK + / perte *ATM*, n = 56), et
 - CK avec à la fois *des pertes ATM* et *TP53* (n = 5; **Tableau 8**).

Une association significative d'anomalies chromosomiques pourrait être décrite pour chaque groupe.

- CK + / perte de *TP53* était significativement associé à la monosomie 15 (22%, $p < 0,001$).

- de CK + / perte *ATM* était significativement associée à translocation 14q32 (14%, $p = 0,012$) à l'exception du t (14; 18) (q32; q21) et n'a jamais été associé à la délétion 14q32 ($p = 0,042$).

- CK + / Aucun HR-FISH a été associé à une trisomie 12 (45%, $p < 0,001$), t (14; 18) (q32; q21) (7%, $P = 0,018$) et les trisomies 18 et 19 (15% et 12%, respectivement, $P < 0,001$).

Trisomie 18 / trisomie 19 et t (14; 18) (q32; q21) n'ont jamais été observés ensemble, mais la plupart des cas ont partagé l'association de la trisomie 12.

De plus, les réarrangements déséquilibrés étaient significativement observés en CK (80% de CK contre 19% de non-CK, $p < 0,001$). Dans ce cas les réarrangements déséquilibrés étaient plus élevés que le nombre augmentait d'anomalies décrites, avec un maximum atteint de plus de 4 anomalies ($P < 10^{-5}$; **Figure 41**). En effet, les cas de réarrangements déséquilibrés ont suivi une évolution ascendante de CK sans HR - FISH à CK avec perte en *ATM* et *TP53* et les deux (72%, 79%, 92% et 100%, respectivement, $P = 0,016$; **Figure 41**). Enfin, parmi les sous-groupes CK entiers, le groupe de CK + / pertes *TP53* affiche le pire profil CBA avec plus de cas, de plus de 4 anomalies et réarrangements déséquilibrés attendus.

Tableau 7 : Données CBA et FISH des 1012 patients.

		Döhner's FISH risk categories						
		LR-FISH			Inter-FISH		HR-FISH	
		Single mono and/or biallelic 13q14 loss	Single monoallelic 13q14 loss	Biallelic 13q14 loss	Normal FISH	Trisomy 12	ATM loss	TP53 loss
Total population	1012	405	325	80	225	158	138	92
1A: CBA synthetic characteristic								
CBA normal	352/1012	195/405 (48%)	154/325 (48%)	41/80 (51%)	150/225 (67%)	3/158 (2%)	3/138 (2%)	1/92 (1%)
CBA with abnormalities	660/1012	209/405 (52%)	170/325 (52%)	39/80 (49%)	75/225 (33%)	155/158 (98%)	135/138 (98%)	91/92 (99%)
CBA with complexity	194/1012 (19%)	28/405 (7%)	24/325 (7%)	4/80 (5%)	11/225 (5%)	35/158 (22%)	61/138 (44%)	64/92 (70%)
CBA with complexity > 3	118/1012 (12%)	13/405 (3%)	12/325 (4%)	1/80 (1%)	8/225 (4%)	17/158 (11%)	34/138 (25%)	49/92 (53%)
CBA with complexity > 4	84/1012 (8%)	11/405 (3%)	11/325 (3%)	0/80 (0%)	7/225 (3%)	9/158 (6%)	21/138 (15%)	39/92 (42%)
CBA with CE	224/1012 (22%)	49/405 (12%)	43/325 (13%)	6/80 (8%)	12/225 (5%)	37/158 (23%)	74/138 (54%)	56/92 (61%)
1B: Chromosome abnormality								
Trisomy 12/12q	186/1012 (18%)	0/405 (0%)	0/325 (0%)	0/80 (0%)	1/225 (0%)	154/158 (97%)	13/138 (9%)	19/92 (21%)
11q22 deletion/t(11q22)	148/1012	2/405 (0%)	1/325 (0%)	1/80 (1%)	3/225 (1%)	2/158 (1%)	130/138 (94%)	6/92 (7%)
17/17p monosomy	86/1012 (8%)	1/405 (0%)	1/325 (0%)	0/80 (0%)	0/225 (0%)	0/158 (0%)	5/138 (4%)	85/92 (92%)
6q deletion	71/1012 (7%)	21/405 (5%)	19/325 (6%)	2/80 (3%)	15/225 (7%)	9/158 (6%)	15/138 (11%)	11/92 (12%)
8p deletion	39/1012 (4%)	7/405 (2%)	6/325 (2%)	1/80 (1%)	4/225 (2%)	4/158 (3%)	11/138 (8%)	13/92 (14%)
7q deletion	28/1012 (3%)	11/405 (3%)	10/325 (3%)	1/80 (1%)	4/225 (2%)	3/158 (2%)	4/138 (3%)	6/92 (7%)
t(14;18) and variants	27/1012 (3%)	12/405 (3%)	11/325 (3%)	1/80 (1%)	7/225 (3%)	8/158 (5%)	0/138 (0%)	0/92 (0%)
14q23 deletion	26/1012 (3%)	5/405 (1%)	5/325 (2%)	0/80 (0%)	10/225 (4%)	6/158 (4%)	0/138 (0%)	5/92 (5%)
Trisomy 18	21/1012 (2%)	5/405 (1%)	4/325 (1%)	1/80 (1%)	2/225 (1%)	13/158 (8%)	1/138 (1%)	0/92 (0%)
Monosomy 15	19/1012 (2%)	2/405 (0%)	2/325 (1%)	0/80 (0%)	1/225 (0%)	1/158 (1%)	2/138 (1%)	14/92 (15%)
Others 14q32 translocations	17/1012 (2%)	4/405 (1%)	3/325 (1%)	1/80 (1%)	1/225 (0%)	3/158 (2%)	8/138 (6%)	1/92 (1%)
Monosomy X	16/1012 (2%)	4/405 (1%)	3/325 (1%)	1/80 (1%)	4/225 (2%)	1/158 (1%)	1/138 (1%)	6/92 (7%)
Y loss	16/1012 (2%)	5/405 (1%)	4/325 (1%)	1/80 (1%)	0/225 (0%)	4/158 (3%)	3/138 (2%)	4/92 (4%)
Trisomy 19	15/1012 (1%)	1/405 (0%)	1/325 (0%)	0/80 (0%)	0/225 (0%)	13/158 (8%)	1/138 (1%)	0/92 (0%)
Trisomy 3/3q	10/1012 (1%)	2/405 (0%)	2/325 (1%)	0/80 (0%)	2/225 (1%)	3/158 (2%)	1/138 (1%)	3/92 (3%)
8q24 translocation	10/1012 (1%)	3/405 (1%)	3/325 (1%)	0/80 (0%)	1/225 (0%)	0/158 (0%)	2/138 (1%)	4/92 (4%)
10q deletion	9/1012 (1%)	2/405 (0%)	2/325 (1%)	0/80 (0%)	4/225 (2%)	2/158 (1%)	1/138 (1%)	0/92 (0%)

Tableau 8 : Résultats FISH and CBA des patients avec caryotype complexe

		No HR-FISH	HR-FISH ATM	HR-FISH TP53	HR-FISH ATM&TP53	Statistical significances
Total	194	74	56	59	5	
Age > 65 y	139	54/74 (73%)	39/56 (70%)	41/59 (69%)	5/5 (nr)	NS
M/F sex ratio	1.8	2	1.7	1.8	1.5	NS
CK \geq 5	84	27/74 (36%)	18/56 (32%)	36/59 (61%)	3/5 (nr)	$P = .003$
MRC	129	48/74 (65%)	38/56 (68%)	39/59 (66%)	4/5 (nr)	NS
CC	92	36/74 (49%)	24/56 (43%)	30/59 (51%)	2/5 (nr)	NS
Unbalanced rearrangement	156	53/74 (72%)	44/56 (79%)	54/59 (92%)	5/5 (nr)	$P = .016$
13q deletion/t(13q14)	164	71/74 (96%)	48/56 (86%)	53/59 (90%)	2/5 (nr)	NS
17p deletion	61	1/74 (1%)	0/56 (0%)	55/59 (93%)	5/5 (nr)	NS
11q deletion/t(11q22)	51	4/74 (5%)	41/56 (73%)	1/59 (2%)	5/5 (nr)	NS
Trisomy 12	49	33/74 (45%)	4/56 (7%)	11/59 (19%)	1/5 (nr)	$P < .001$
6q deletion	40	18/74 (24%)	11/56 (20%)	10/59 (17%)	1/5 (nr)	NS
8p deletion	31	10/74 (14%)	9/56 (16%)	11/59 (19%)	1/5 (nr)	NS
7q deletion	21	11/74 (15%)	4/56 (7%)	6/59 (10%)	0/5 (nr)	NS
Monosomy 15	19	4/74 (5%)	1/56 (2%)	13/59 (22%)	1/5 (nr)	$P < .001$
14q23 deletion	12	8/74 (11%)	0/56 (0%)	4/59 (7%)	0/5 (nr)	$P = .043$
Others 14q32	12	3/74 (4%)	8/56 (14%)	1/59 (2%)	0/5 (nr)	$P = .012$
Trisomy 18	11	11/74 (15%)	0/56 (0%)	0/59 (0%)	0/5 (nr)	$P < .001$
Trisomy 19	9	9/74 (12%)	0/56 (0%)	0/59 (0%)	0/5 (nr)	$P < .001$
t(14;18)(q32;q21) and variants	5	5/74 (7%)	0/56 (0%)	0/59 (0%)	0/5 (nr)	$P = .018$

Abbreviations: CC, clonal complexity; CK, complex karyotype; F, female; M, male; MRC, multiple related clones; nr, non-relevant; NS, non-significative.

Discussion

De nombreuses études ont montré que la présence, le nombre et le type d'aberrations chromosomiques représentent un facteur indépendant du pronostic dans la leucémie lymphoïde chronique à cellule B (LLC B). Par conséquent, une analyse cytogénétique est effectuée systématiquement dans cette maladie. Cependant, les lymphocytes de la LLC ont un faible indice mitotique, ne générant que 40% à 50% de caryotypes anormaux. Le taux de détection peut être augmenté à 80% par analyse FISH en interphase. Etant donné que certaines aberrations, c'est-à-dire celles impliquant les régions classique (13q, 12, 11q, 17p et 6q), peuvent échapper à la détection par FISH, il y a un grand intérêt pour des méthodes de culture améliorées avec un oligonucléotide immunostimulateur (CpG) (Put et al., 2009).

La stratification cytogénétique de la LLC reposait souvent sur la détection par FISH de quatre marqueurs cytogénétiques (délétion 13q14, trisomie 12, délétions *ATM* et *TP53*) sur cellules interphasiques, empêchant la détection de toutes les autres anomalies et d'étudier l'évolution sous-clonale (Giudice et al., 2018; Put et al., 2009).

Dans cette étude, 1012 patients atteints de LLC n'ayant pas été traités, ont été étudiés à la fois par CBA et FISH effectuées sur le même culot cellulaire obtenu à partir de la stimulation par IL2-DSP30 des lymphocytes B.

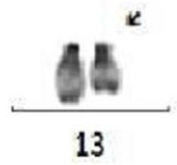
Des caryotypes anormaux ont été obtenu chez 65% des sujets, ainsi, 78% étaient positifs par la technique FISH pour au moins un marqueur. Les comparaisons de données ont montré que la CBA avait conduit à réaffecter 16% des patients à un groupe à risque plus élevé que la stratification FISH utilisée seule. En tenant compte de la CBA, dans le groupe LR-FISH, 28% des cas pourraient être reclassés dans la catégorie de risque intermédiaire INTER-FISH (n = 90) et 7% dans la catégorie de risque défavorable HIGH-FISH (n = 24). L'observation de chromosomes supplémentaires et des anomalies dans la catégorie LR FISH avaient déjà été constatées (Struski et al., 2009 ; Dubuc et al., 2016).

En effet, un à deux des anomalies chromosomiques supplémentaires auraient été suffisantes pour modifier le délai de premier traitement TTFT et même la survie globale OS indépendamment si le nombre d'anomalies est exclusivement supérieur à 3 (Puiggros et al., 2014).

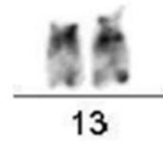
En conséquence, certains auteurs ont proposé une nouvelle catégorie de risques très faibles défini par la perte isolée 13q14 mono-allélique (**Figure 37**) avec une CBA normale, y compris les données moléculaires qui ne contiennent aucune mutation de *TP53*, *NOTCH1* ou *SBFB3*. (Rigolin et al., 2012).

Les anomalies supplémentaires, autrement non identifiées par FISH, n'ont pas de corrélation avec d'autres facteurs pronostiques médiocres, notamment CD38 ou positivité ZAP70 et statut mutationnel *IGHV*. Pourtant, ces caryotypes anormaux étaient fortement corrélés à des étapes avancées de la LLC et l'exigences de traitement, ainsi avec le pire pronostic en termes de TTFT et OS plus courts (Rigolin et al., 2012). Malgré la grande hétérogénéité des anomalies détectées, plusieurs études ont démontré que le nombre des anomalies constatées par la CBA peut être corrélé aux résultats cliniques des patients atteints de LLC (Baliakas et al., 2014 ; Van den Neste et al., 2007; Woyach et al., 2012).

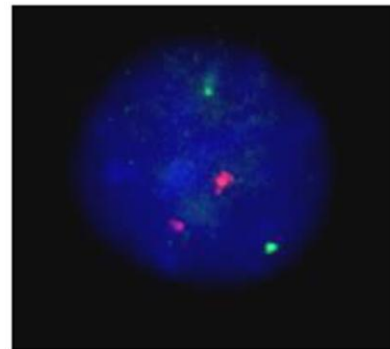
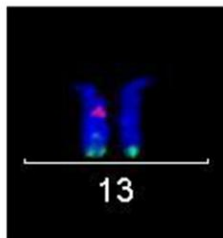
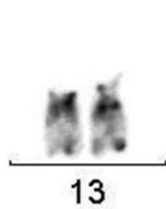
En outre, la FISH a permis de détecter la plupart des suppressions 13q14 puisque 47% d'entre elles sont cryptées (**Figure 37**). En revanche, les pertes cryptiques d'*ATM* ou de *TP53* sont rares. Cependant, la perte de *TP53* consécutive au réarrangement chromosomique en CBA 17p ou 11q22 doit être confirmé par FISH (**Figure 38**) (**Figure 39**) car, dans certains cas, les lieux d'intérêt sont conservés. Dans l'ensemble, la combinaison des données CBA et FISH peuvent affiner la stratification pronostique de la LLC et les deux techniques sont complémentaires.



Délétion 13q14 visible par CBA
(40 à 60%des LLC)

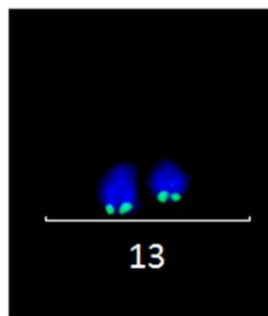


Délétion 13q14 souvent cryptique en
CBA a confirmer par FISH



Délétion 13q14 mono-allélique confirmée par FISH

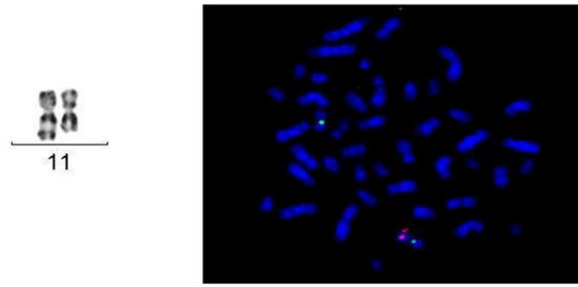
Sondes : 13q14 (D13S25-D13S272)/13qter



Délétion 13q14 bi-allélique confirmée par FISH

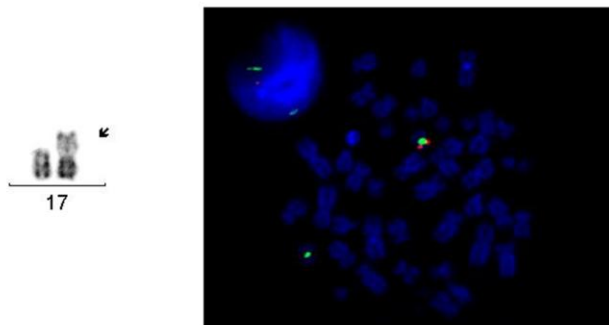
Sondes : 13q14 (D13S25-D13S272)/13qter

Figure 32 : la délétion 13q14 vue par CBA et confirmée par FISH



Sonde : **ATM/CEP11** (6 à 20% des LLC)

Figure 38 : Déletion 11q22-23 détectée par CBA et confirmée par FISH



Délétion 17p13 [TP53] confirmée par FISH
Sonde : **P53/CEP17**



Les anomalies 17p observées dans les LLC s'accompagnent de délétion TP53 dans 95% des cas (pas 100%).

Figure 39 : la délétion 11q22-23 et les délétions 17p13

La détection de la CK a récemment été qualifiée de marqueur indépendant à risque élevé dans la LLC (Le Bris et al., 2017; Herling et al., 2016). Dans notre étude CK a été détectée chez 29% des patients. Les caryotypes complexes ont été trouvés dans toutes les catégories FISH et leur occurrence a augmenté avec la stratification du risque FISH, de 7% dans LR-FISH, 32% dans groupe de risque inter-FISH à 56% avec risque HR-FISH. Sans surprise, nous avons confirmé que CK est statistiquement corrélée à HR-FISH, et il n'y avait aucune différence en pourcentage de CK trouvée dans les deux groupes de pertes *ATM* et *TP53*. Mais CK est significativement plus souvent associé à plus de 4 anomalies dans le groupe de pertes de *TP53* par rapport au groupe de pertes *ATM* (61% vs 32%, $p = 0,0027$). Cela a confirmé que cette perte de *TP53* est concomitante d'une instabilité génétique élevée. Néanmoins, CK a aggravé les résultats dans toutes les catégories FISH (**Figure 40**) et s'est avéré être un marqueur prédictif d'une réponse médiocre et une SG courte avec chimio-immunothérapie (Le Bris et al., 2017) et agents plus récents comme ibrutinib, indépendamment de la perturbation de *TP53* (Thompson et al., 2015).

Cependant, CK est resté un groupe hétérogène (Puiggros et al., 2017). Dans notre série, nous pourrions définir 4 groupes en fonction de leur statut FISH. Environ un tiers de CK affiche la perte de *TP53*, un tiers de perte en *ATM* et le dernier tiers sans HR-FISH. Les pertes cumulatives *TP53* et *ATM* ont été anecdotique (5 cas sur 194).

risk group according to CBA			risk group according to FISH abnormalities				
			Combined CBA and FISH risk	1del13q14 (405 pts)	Trisomy12 (383 pts)	ATM loss (138 pts)	TP53 loss (92 pts)
normal CBA	Normal CBA		48%	40%	2%	1%	
	abnormal CBA	non complex CBA <3	single del13q	19%	48%	54%	30%
			Others*	26%			
		Complex CBA >=3	7%	12%	44%	69%	

risk group according to CBA			risk group according to FISH abnormalities				
			Combined CBA and FISH risk	1del13q14	trisomy12	ATM loss	TP53 loss
normal CBA	Normal CBA		low-risk	int-risk	high-risk	high-risk	
	abnormal CBA	non complex CBA <3 *	single del13q	low-risk		high-risk	high-risk
			trisomy 12,18,19		low-risk		
			Others	int-risk	int-risk		
			t(8;14)(q24;q32) amp2p(NMYC)	high-risk	high-risk		
		complex CBA >=3	3<=CK<5	high-risk	high-risk	high-risk	very high-risk
	CK>=5	very high-risk	very high-risk	very high-risk	very high-risk		

Figure 40 : (A) Proposition de risque combiné CBA / FISH selon nos données;

(B) Combinaison des propositions de risque CBA / FISH avec des données cytogénétiques supplémentaires selon les études publiées.

(*) Certaines anomalies peuvent affiner le pronostic c'est-à-dire les trisomies combinées 12,18 et 19 comme bon facteur de risque,

t (8; 14) (q24; q32), amp2p (NMYC) comme facteur de risque inférieur.

Code de couleur de risque:

Faible risque en vert; inter-risque en bleu; à haut risque en orange; risque très élevé en rouge.

Chaque groupe comportait une association chromosomique spécifique. À noter, trisomie 12, t (14; 18) (q32; q21) et trisomie variante ou cumulative 12, 18 et 19 sont spécifiquement observées chez CK sans anomalies indésirables de FISH. Ceci est cohérent avec les données précédentes montrant que les LLC avec t (14; 18) sont associées à d'autres marqueurs pronostiques favorables tels que IGVH muté, aucune suppression ATM indiquant une maladie beaucoup moins agressive (Nguyen-Khac et al., 2011). Inversement, la LLC avec multiples trisomies, à savoir les trisomies 12, 18 et 19, représentaient une catégorie distincte avec augmentation de la manifestation auto-immune, augmentation du taux de mutation de l'IGVH et un faible taux de mutations (Baliakas et al., 2016; Roos-Weil et al., 2018) et une évolution clinique particulièrement bénigne (Puiggros et al., 2017; Baliakas et al., 2016; Luquet et al., 2008). Ceci suggère que la complexité cytogénétique définie uniquement par l'aberration numérique ne doit pas automatiquement être considérée comme un marqueur pronostique défavorable de la LLC.

Les critères de définition de CK dans la LLC devraient être révisés comme cela a été fait pour les autres maladies hématologiques dans lesquelles l'hyperdiploïdie est considérée comme un défaut chromosomique ponctuel: SMD / AML, ALL et Myélome Multiple, CK hyperdiploïde à trisomies multiples (avec peu ou pas de défaut structurel non récurrent) sont néanmoins considérés comme de bons marqueurs pronostics (Luquet et al., 2008; Smadja et al., 2001). Par opposition, les pertes de chromosomes sont généralement considérées comme changements secondaires associés à la maladie évolutive dans la majorité des pathologies hématologiques.

Ici nous avons démontré le lien significatif entre la catégorie de risque apparemment plus élevée de la LLC, à savoir CK / la perte TP53, avec la monosomie 15. En outre, ce dernier groupe a présenté un pourcentage plus élevé de réarrangements non équilibrés et de cas avec plus de 4 anomalies, reflétant l'instabilité chromosomique majeure dans ce groupe.

De même, les 4 groupes observés semblaient représenter une accumulation continue de marqueurs défavorables, comme représenté à **la figure 41**. Cependant, les événements cytogénétiques défavorables à savoir : les caryotypes complexes, réarrangements non équilibrés ou réarrangements de locus spécifiques, représentent principalement des événements connexes. Puis notifiant une représentation plus élevée de réarrangements non équilibrés dans CK +, le groupe de pertes TP53 est presque un pléonasme car la plupart

des pertes de TP53 proviennent de réarrangements déséquilibrés. Dans ces conditions, les seuls critères chromosomiques valables restent les complexités du caryotype dont la définition doit être clairement réévaluée en CK faible (avec 3 à 4 anomalies) et une CK élevée (> 4 anomalies), comme cela a été récemment démontré (Baliakas et al., 2019). D'autres données ont montré que les cas de CK avaient une OS comparable à celle des patients présentant une perte de TP53 (quel que soit le résultat de la CBA), et les patients cumulant la perte de CK et de TP53 avaient la survie globale la plus faible (Puiggros et al., 2017). Ici, nous pourrions définir deux sous-groupes supplémentaires de patients CK, CK-sans HR-FISH et CK avec perte en ATM, ce qui représentait 67% des cas de CK qui reste cliniquement à investiguer.

Notre étude caractérise l'une des plus grandes cohortes de patients atteints de LLC au moment du diagnostic avec une méthodologie cytogénétique sensible et uniforme. Notez que nous avons pu observer qu'en plus de l'analyse FISH, la CBA permet de détecter de nombreuses anomalies avec un impact potentiel sur le suivi et le traitement du patient, principalement le CK (**Figure 40B**). Cependant, CK restent un groupe hétérogène pouvant être divisé en au moins 3 catégories, dont 2 concernant la majorité des patients sans délétion de TP53. L'impact clinique de ces CK des sous-groupes doivent encore être étudiés dans cette cohorte, de même que l'influence des autres anomalies moléculaires telles que le statut mutationnel de NOTCH1, SBF1, BIRC3 et TP53.

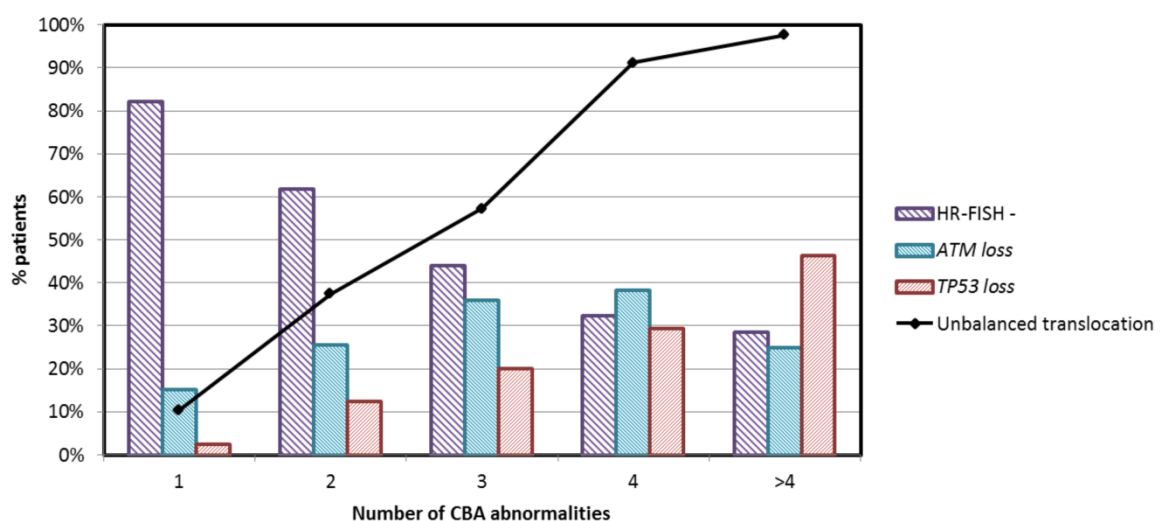


Figure 41: Evolution des événements chromosomiques péjoratifs selon la catégorie de risque FISH

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Conclusion et Perspectives

La leucémie lymphocytaire chronique (LLC) est une maladie fondamentalement hétérogène (Chiorazzi *et al.*, 2005; Grever *et al.*, 2007; Zenz *et al.*, 2010). Les facteurs pronostiques défavorables incluent : le stade (Binet *et al.*, 1981), la positivité CD38, la configuration non mutée de la région variable du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline *IGHV* (Damle *et al.*, 1999), le positivité ZAP70 (Wiestner *et al.*, 2003), les aberrations du caryotype (Juliussen *et al.*, 1990; Cuneo *et al.*, 2004; Cavazzini *et al.*, 2008) et des mutations de plusieurs gènes, dont *TP53*, *NOTCH1* et *SF3B1* (Rossi *et al.*, 2013).

La stimulation *in vitro* avec l'oligonucléotide CpG DSP30 plus l'interleukine-2 (DSP30 / IL2) améliore la prolifération de cellules LLC, donnant lieu à une évaluation des métaphases chez la plupart des patients (Dicker *et al.*, 2006).

Par cette méthode, les aberrations caryotypiques sont détectées dans 80% des LLC, avec certains cas ayant des aberrations impliquant des régions non couvertes par le panel classique à 4 sondes d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH) (Döhner *et al.*, 2000).

Il a été démontré que chez les patients atteints de LLC, le caryotypage conventionnel avec stimulation DSP30 / IL2 est une méthode efficace pour la détection des aberrations caryotypiques dans environ un tiers des patients atteints de LLC avec FISH «normale» sur un panel conventionnel à 4 sondes et que le caryotype anormal est en corrélation avec le délai plus court avant le premier traitement (TTFT) et avec une survie globale plus courte (Rigolin *et al.*, 2012).

La valeur des données cytogénétiques classiques dans le pronostic des patients atteints de LLC était également récemment confirmée par une étude montrant que la complexité caryotypique avait un pronostic indépendant sur le TTFT (Baliakas *et al.*, 2014).

Dans notre étude, 4 groupes de CK ont été définis en fonction de leur statut FISH. Environ un tiers de la perte de *TP53* affichée par CK, un tiers de perte en *ATM* et le

dernier tiers sans HR-FISH. Les pertes cumulatives *TP53* et *ATM* ont été négligeables. Chaque groupe comportait une association chromosomique spécifique.

Les critères de définition de CK dans la LLC devraient être révisés comme cela a été fait pour les autres maladies hématologiques dans lesquelles l'hyperdiploïdie est considérée comme un défaut chromosomique ponctuel: SMD / AML, ALL et Myélome Multiple, CK hyperdiploïde à trisomies multiples (avec peu ou pas de défaut structurel non récurrent) sont néanmoins considérés comme de bons marqueurs pronostics (Luquet *et al.*, 2008 ; Smadja *et al.*, 2001). Par opposition, les pertes de chromosome sont généralement considérées comme des changements secondaires associés à une maladie évolutive dans la majorité des pathologies hématologiques. Ici nous avons démontré le lien significatif entre la catégorie de risque apparemment plus élevée de LLC, à savoir CK / la perte de *TP53*, avec la monosomie 15. En outre, ce dernier groupe a présenté le pourcentage le plus élevé de réarrangements non équilibrés et de cas avec plus de 4 anomalies, reflétant l'instabilité chromosomique majeure dans ce groupe.

Nous avons aussi pu définir deux sous-groupes supplémentaires de patients avec CK, CK-sans HR-FISH et CK avec perte en *ATM*, ce qui représentait 67% des cas de CK qui reste cliniquement à enquêter. Il est important de noter que, compte tenu de la résolution (~ 5-10 Mb) des technologies conventionnelles de caryotypage, cette approche est à elle seule un moyen inadéquat d'évaluer le diagnostic de la CLL. De même, nos résultats suggèrent que FISH seul, quel que soit le degré de complexité le panel FISH peut être considérablement amélioré par l'ajout du caryotypage. Compte tenu la détection croissante des anomalies chromosomiques dans les tumeurs malignes hématologiques, et la signification clinique des mutations récurrentes de la LLC (Rossi *et al.*, 2013 ; Rossi *et al.*, 2014), les approches de diagnostic utilisées pour évaluer les aberrations génomiques dans cette maladie seront sans aucun doute changées. En attendant, il reste toutefois important de maximiser notre compréhension des aberrations génomiques qui contribuent à la pathogenèse de la LLC.

Les paramètres mis au point lors du diagnostic décrits dans notre travail combinent la sensibilité de FISH au caryotypage conventionnel, pour: (1) clarifier les modèles d'hybridation FISH anormale, (2) identifier des caryotypes complexes, et (3) permettre la

détection de l'évolution, qui, pris ensemble, peuvent améliorer le rendement diagnostique et l'utilité clinique des tests cytogénétiques dans la LLC.

En conclusion, notre étude caractérise l'une des plus grandes cohortes de patients atteints de LLC au moment du diagnostic avec une méthodologie cytogénétique sensible et uniforme. Notez que nous avons pu observer qu'en plus de l'analyse FISH, la CBA permet de détecter de nombreuses anomalies avec impact potentiel sur le suivi et le traitement du patient, principalement le CK. Cependant, le CK restent un groupe hétérogène pouvant être divisé en au moins 3 catégories, dont 2 concernant la majorité des patients sans délétion de *TP53*.

L'impact clinique de ces CK des sous-groupes doit encore être étudié dans cette cohorte, de même que l'influence des autres anomalies moléculaires telles que le statut mutationnel de *NOTCH1*, *SBF1*, *BIRC3* et *TP53*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.C.L.F. Guides de bonnes pratiques en Cytogénétique. Association des cytogénéticiens de langue française (ACLF). Version 3 mars 2014. <http://www.eaclf.org>.

Asslaber D., Pinçon J. D., Seyfried I. et al. “microRNA-34a expression correlates with MDM2 SNP309 polymorphism and treatment-free survival in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2010; vol. 115, no. 21, pp. 4191–4197.

Athanasiadou A., Stamatopoulos K., Tsoimpanakou A. et al., “Clinical, immunophenotypic, and molecular profiling of tri-somy 12 in chronic lymphocytic leukemia and comparison with other karyotypic subgroups defined by cytogenetic analysis”. *Cancer, Genetics and Cytogenetics* 2006; vol. 168, no. 2, pp. 109–119.

Aurran-Schleinitz T., Arnoulet C., Ivanov V., Coso D., Rey J., Schiano J.-M., Stoppa A.-M., Bouabdallah R., Gastaut J.-A. Prise en charge actuelle de la leucémie lymphoïde chronique. *Elsevier Masson SAS* 2008; 29: 424-435.

Aurran-Schleinitz T., Telford W., Perfetto S., Caporaso N., Wilson W., Stetler-Stevenson M.-A. & al. Identification of a new monoclonal b-cell subset in unaffected first-degree relatives in familial chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:2339-41.

Balatti V., Bottoni A., Palamarchuk A. et al. “NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12”. *Blood* 2012; vol. 119, no. 2, pp. 329–331.

Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, Rossi D, Minga E, Villamor N, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015; 29 : 329-36.

Baliakas P., Iskas M., Gardiner A. et al., “Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data”. *The American Journal of Hematology* 2014; vol. 89, no. 3, pp. 249–255.

Baliakas P., Jeromin S., Iskas M., Puiggros A., Plevova K., Nguyen-Khac F., Davis Z., Rigolin G.M., Visentin A., Xochelli A., Delgado J., Baran-Marszak F., Stalika E., Abrisqueta P., Durechova K., Papaioannou G., Eclache V., Dimou M., Iliakis T., Collado R., Doubek M., Calasanz M.J., Ruiz-Xiville N., Moreno C., Jarosova M., Leeksma A.C., Panayiotidis P., Podgornik H., Cymbalista F., Anagnostopoulos A., Trentin L., Stavroyianni N., Davi F., Ghia P., Kater A.P., Cuneo A., Pospisilova S., Espinet B., Athanasiadou A., Oscier D., Haferlach C., Stamatopoulos K.; on behalf of ERIC, the European Research Initiative on CLL. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood* 2019; 133(11):1205-1216.

Baliakas P., Mattsson M., Stamatopoulos K., Rosenquist R. Prognostic indices in chronic lymphocytic leukaemia: where do we stand how do we proceed?. *J. Intern. Med* 2016; 279(4):347–357.

Baliakas P., Puiggros A., Xochelli A., Sutton L.A., Nguyen-Khac F., Gardiner A., Plevova K., Minga E., Hadzidimitriou A., Walewska R., McCarthy H., Ortega M., Collado R., González T., Granada I, Luño E., Kotašková J., Moysiadis T., Davis Z., Stavroyianni N., Anagnostopoulos A., Strefford J.C., Pospisilova S., Davi F., Athanasiadou A., Rosenquist R., Oscier D., Espinet B., Stamatopoulos K. Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. *Haematologica* 2016; 101(7):e299-302.

Ben-Bassat H., Polliak A., Rosenbaum J.M. & al..Fluidity of membrane lipids and lateral mobility of Con A receptor in the cell surface of normal lymphocytes and lymphocytes from patients with CLL. *Cancers Res* 1977; 37:1307.

Binet J.L, French Cooperative Group on CLL. Prognostic and therapeutical advances in CLL manadgement. *Seminars in Hematology* 1987; XXIV: 275.

Binet J.L., Auquier A., Dighiero G., Chastang C., Piguët H., Goasguen J., Vaugier G., Potron G., Colona P., Oberling F., Thomas M., Tchernia G., Jacquillat C., Boivin P., Lesty C., Duault M.T., Monconduit M., Belabbes S., Gremy F.. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48:198–206.

Binet J.L., Caligaris-Cappio F., Catovsky D., Cheson B., Davis T., Dighiero G. & al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107:859-61.

Binet J.L., Lepoprier M., Dighiero G. & al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer* 1977; 40:855-64.

Byrd John C , Bercedis L Peterson, Vicki A Morrison, Kathleen Park, Robert Jacobson, Eva Hoke, James W Vardiman, Kanti Rai, Charles A Schiffer, Richard A Larson, Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood* 2003; Jan 1;101(1):6-14.

Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M. et al., “Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; vol. 99, no. 24, pp. 15524–15529.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, *et al.*, Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 2002; 99 : 15524-9.

Catovsky D., Richards S., Matutes E. et al., “Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial”. *The Lancet* 2007; vol. 370, no. 9583, pp. 230–239.

Cavazzini, J. A. Hernandez, A. Gozzetti et al., “Chromosome 14q32 translocations involving the immunoglobulin heavy chain locus in chronic lymphocytic leukaemia identify a disease subset with poor prognosis”. *The British Journal of Haematology* 2008; vol. 142, no. 4, pp. 529–537.

Cerrutti A., Zan H., Kim E.C., Shah S., Schttner E.J., Schaffer A. & al. Ongoing in vivo immunoglobulin class switch DNA recombinaison in chronic lymphocytic leukemia B cell. *J Immunol* 2002; 169: 6594-603.

Chapiro E, Leporrier N, Radford-Weiss I, Bastard C, Mossafa H, Leroux D, *et al.* Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL) at advanced stages. *Leukemia Res* 2010; 34 : 63-8.

Chen L., Widhopf G., Huynh L. & al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 4609-14.

Chena C., Avalos J. S., Bezares R. F. et al., “Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cyto-genetic, FISH and Clinical Studies,” *The European Journal of Haematology* 2008; vol. 81, no. 2, pp. 94–99,.

Cheng S., Ma J., Guo A. et al. “BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity”. *Leukemia* 2014; vol. 28, no. 3, pp. 649–657.

Cheson B.D., Bennett J.-M., Grever M., Kay N., Keating M.-J., O’Brien S. & al. National cancer institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 4990-7.

Chiorazzi N., Rai K.R., Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804-15.

Cohen H.J., Gilberstein B. Human lymphocytic S. Ig capping. *J Clin Invest* 1975; 55:84.
Volonsky J.E., Easton T.G., Reich E. Merocyanine 540 as a fluorescent probe of membranes: selective staining of leukemic and immature hemopoietic cells. *Cell* 1978; 13:487.

Cosson A, Chapiro E, Belhouachi N, Cung HA, Keren B, Damm F, *et al.* 14q deletions are associated with trisomy 12, NOTCH1 mutations and unmutated IGHV genes in chronic lymphocytic leukemia and small lymphocytic lymphoma. *Gene Chromosomes Cancer* 2014; 53 : 657-66.

Crespo M., Bosch F., Villamor N. & al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348:1764-75.

Cuneo A., Rigolin G.M., Bigoni R., De Angeli C., Veronese A., Cavazzini F., Bardi A., Roberti M.G., Tammiso E., Agostini P., Ciccone M., Della Porta M., Tieghi A., Cavazzini L., Negrini M., Castoldi G. Chronic lymphocytic leukemia with 6q shows distinct hematological features and intermediate prognosis. *Leukemia* 2004;18:476–483.

Dal Bo M., Rossi F. M., Rossi D. et al., “13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia”. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2011; vol. 50, no. 8, pp. 633–643.

Damle R.N., Ghiotto F., Valetto A., Albesiano E., Fais F., Yan X.J. & al. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; 99; 4087-93.

Damle R.N., Wasil T., Fais F., Ghiotto F., Valetto A., Allen S.L. & al. Ig v gene mutation status and cd38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94:1840-7.

Damm F, Mylonas E, Cosson A, Yoshida K, Della Valle V, Mouly E, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discover* 2014; 4 : 1088-101.

Davis M. S., Letai A., Brown J. R. “Overcoming stroma-mediated treatment resistance in chronic lymphocytic leukemia through BCL-2 inhibition”. *Leukemia & Lymphoma* 2013; vol. 54, no. 8, pp. 1823–1825.

Dearden C. - B- and T-cell prolymphocytic leukemia: antibody approaches. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2012; 645-651.

Del Poeta G., Maurillo L. Venditti A. & al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 2633-9.

Delgado J., Espinet B., Oliveira A. C. et al., “Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results”. *The British Journal of Haematology* 2012; vol. 157, no. 1, pp. 67–74.

Dewald G. W., Brockman S. R., Paternoster S. F. et al., “Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia”. *The British Journal of Haematology* 2003; vol. 121, no. 2, pp. 287–295.

Di Raimondo F., Giustolisi R., Lerner S. & al. Retrospective study of the prognostic role of serum thymidine kinase level in CLL patients with active disease treated with fludarabine. *Ann Oncol* 2001; 12:621-5.

Dicker, S. Schnittger, T. Haferlach, W. Kern, and C. Schoch, “Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression”. *Blood* 2006; vol. 108, no. 9, pp. 3152–3160.

Dighiero G. CLL: biology and prognosis. *ASH educational program* 2005; 278.

Dighiero G., Karsenti E., Follezou J.Y. & al. Visualisation of tubulin in lymphocytes. *Blood* 1978; 51:1031.

Dighiero G., Vaugier G., Charron D. & al. Variations in lymphocyte counts four hours after administration of hydrocortisone in patients with CLL. *Blood* 1977; 49:719.

Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood* 1997; 89 : 2516-22.

Döhner H., Fischer K., Bentz M. et al., “p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias”. *Blood* 1995; vol. 85, no. 6, pp. 1580–1589.

Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A. et al., “Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia,” *The New England Journal of Medicine* 2000; vol. 343, no. 26, pp. 1910–1916.

Dubuc A.M., Davids M.S., Pulluqi M., Pulluqi O., Hoang K., Hernandez-Sánchez J.M., Schlich C., Hernández-Rivas J.M., Brown J.R., Dal Cin P. FISHing in the dark: How the combination of FISH and conventional karyotyping improves the diagnostic yield in CpG-stimulated chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Hematol* 2016;91(10):978–983.

During J., Naschar M., Schmucker U. & al. CD38 expression is an important prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 30-5.

During J., Nuckel H., Cremer M., & al. ZAP expression is a prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2003; 17 :2426-34.

Edelmann J, Holzmann K, Miller F, Winkler D, Buhler A, Zenz T, *et al.* High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 2012; 120 : 4783-94.

Fabris S., Mosca L., Todoerti K. et al. “Molecular and transcriptional characterization of 17p loss in B-cell chronic lymphocytic leukemia”. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2008; vol. 47, no. 9, pp. 781–793.

Fais F., Ghiotto F., Hashimoto S. & al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102:1515-25.

Falisi E., Novella E., Visco C. et al., “B-cell receptor configuration and mutational analysis of patients with chronic lymphocytic leukaemia and trisomy 12 reveal recurrent molecular abnormalities”. *Hematological Oncology* 2014; vol. 32, no. 1, pp. 22– 30.

Finn WG, Kay NE, Kroft SH, Church S, Peterson LC. Secondary abnormalities of chromosome 6q in B-cell Chronic lymphocytic leukemia: a sequential study of karyotype instability in 51 patients. *Am J Hematol* 1998; 59:223-9

Foon K.A., Hallaek M.J. *Leukemia* 2010; 24:500-511.

Furman R.R., Prognostic factors and stratification in CLL. *ASH Education Program* 2010; 77-81.

Gardiner A. C., Corcoran M. M., and Oscier D. G., “Cytogenetic, fluorescence in situ hybridisation, and clinical evaluation of translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukaemia”. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1997; vol. 20, no. 1, pp. 73–81.

Garg R., Wierda W., Ferrajoli A. et al. “The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer* 2012; vol. 118, no. 14, pp. 3531–3537.

Geoffrey M. cooper. *DeBoeck* 1997 ; une approche moléculaire ; 2-7445-0056-9.

Gerard Lozanski, Nyla A Heerema, Ian W Flinn, Lisa Smith, Jennifer Harbison, Jennifer Webb, Mollie Moran, Margaret Lucas, Thomas Lin, Marcy L Hackbarth, John H Proffitt, David Lucas, Michael R Grever, John C Byrd. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions May. *Blood* 2004; 1; 103(9):3278-81.

Giudice I.D., Rigolin G.M., Raponi S., Cafforio L., Ilari C., Wang J., Bordyuh M., Piciocchi A., Marinelli M., nanni M., Tavolaro S., Filetti M., Bardi A., Tammiso E., Volta E., Negrini M., Saccenti E., Mauro F.R., Rossi D., Gaidano G., Guarini A., Rabadan R., Cuneo A., Foà R. Refined karyotype-based prognostic stratification of chronic lymphocytic leukemia with a low- and very-low-risk genetic profile. *Leukemia* 2018; 32(2):543–546.

Goldman A.S., Schmalstieg F.C., Hanis N.S. & al. Mobile blood lymphocytes in B and T lymphocyte disorders. *Clin. Immunol Immunopathol* 1977; 8:461.

Gonzalez D., Martinez P., Wade R. et al., “Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial”. *Journal of Clinical Oncology* 2011; vol. 29, no. 16, pp. 2223–2229.

Grever M. R., Lucas D. M., Dewald G. W. et al., “Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting out-come in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997”. *Journal of Clinical Oncology* 2007; vol. 25, no. 7, pp. 799–804.

Guieze R, Robbe P, Clifford R, de Guibert S, Pereira B, Timbs A, *et al.* Presence of multiple recurrent mutations confers poor trial outcome of relapsed/refractory CLL. *Blood* 2015; 126 : 2110-7.

Gunn S. R., Hibbard M. K., Ismail S. H. *et al.* “Atypical 11q deletions identified by array CGH may be missed by FISH panels for prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia”. *Leukemia* 2009; vol. 23, no. 5, pp. 1011–1017.

Gunnarsson R., Mansouri L., Isaksson A. *et al.* “Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia”. *Haematologica* 2011; vol. 96, no. 8, pp. 1161– 1169.

Haferlach C., Dicker F., Schnittger S., Kern W., and Haferlach T., “Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, inter-phase FISH, IgVH status and immunophenotyping”. *Leukemia* 2007; vol. 21, no. 12, pp. 2442–2451.

Hallek M. & al. Guidelines for the diagnosis and treatment of CLL: a report from the international workshop on CLL updating the national cancer institute – working group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111:5446-56.

Hallek M., Fischer K., Fingerle-Rowson G. *et al.*, “Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial”. *The Lancet* 2010; vol. 376, no. 9747, pp. 1164–1174.

Hallek M., Langenmayer I., Nerl C. & al. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmoldering chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 93:1732-7.

Hallek M., Wanders L., Ostwald M. & al. Serum beta (2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996; 22 :439-47.

Halper J.P., Fu S.M., Gottlieb A.B. & al. Poor mixed lymphocyte reaction stimulatory capacity of leukemic B cell of CLL. *J Clin Invest* 1979; 64:1141.

Hamblin T.J., Davis Z., Gardiner A., Oscier D.G., Stevenson F.K. Unmutated Ig v(h) gene are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.

Hamblin T.J., Orchard J.A., Ibboston R.E. & al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99 1023-9.

Herling C.D., Klaumünzer M., Rocha C.K., Altmüller J., Thiele H., Bahlo J., Kluth S., Crispatzu G., Herling M., Schiller J., Engelke A., Tausch E., Döhner H., Fischer K., Goede V., Nürnberg P., Reinhardt H.C., Stilgenbauer S., Hallek M., Kreuzer K.A. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood* 2016; 128(3):395–404.

Hernandez J. A., Rodriguez A. E., Gonzalez M. et al., “A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with Bcell chronic lymphoid leukemia”. *Haematologica* 2009; vol. 94, no. 3, pp. 364–371.

Hruba M., Dvorak P., Weberova L., Subrt I. “Independent coexistence of clones with 13q14 deletion at reciprocal translocation breakpoint and 13q14 interstitial deletion in chronic lymphocytic leukemia”. *Leukemia & Lymphoma* 2012; vol. 53, no. 10, pp2054–2062.

Huber C., Dworzak E., Fink U. & al.. Receptor sites for aggregated gammaglobulin and lymphocytes in lymphoproliferative diseases. *Br J Haematol* 1974; 27:643.

Huh Y. O., Lin K. I.C., Vega F.et al. “MYC translocation in chronic lymphocytic leukaemia is associated with increased prolymphocytes and a poor prognosis”. *The British Journal of Haematology* 2008; vol. 142, no. 1, pp. 36–44.

Ibbotson R., Athanasiadou A., Sutton L.A. et al. “Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant”. *Leukemia* 2012; vol. 26, no. 1, pp. 170–172.

Ibrahim S., Keating M., Do K.A. & al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98:181-6.

Jagłowski S. M., Ruppert A. S., Heerema N. A. et al. “Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia,” *The British Journal of Haematology* 2012; vol. 159, no. 1, pp. 82–87.

Jain N. and O’Brien S., “Chronic lymphocytic leukemia with deletion 17p: emerging treatment options”. *Oncology* 2012; vol. 26, no. 11, pp. 1067–1070.

Jain N., O’Brien S. Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood* 2015; 126(4):463-470.

Jarvis S.C., Snyderman R., Cohen H.J. Human lymphocyte mobility. *Blood* 1976; 48:717.

Juliusson G., Oscier D. G., Fitchett M. et al., “Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities”. *The New England Journal of Medicine* 1990; vol. 323, no. 11, pp. 720–724.

Kallander C.F., Simonsson B. Hagberg H., Gronowitz J.-S. Serum deoxythymidine kinase gives prognostic information in chronic leukemia. *Cancer* 1984; 54:2450-5.

Keating M., Lerner S., Kantarjian H., Freireich E., O’Brien S. The serum B2-microglobulin level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 1995; 86:606a.

Kernfeld S. Decreased PHA receptor sites in CLL. *Biochem Biophys Acta* 1969; 192:542.

Kienle D. L., Korz C., Hosch B. et al., “Evidence for distinct pathomechanisms in genetic subgroups of chronic lymphocytic leukemia revealed by quantitative expression analysis of cell cycle, activation, and apoptosis-associated genes”. *Journal of Clinical Oncology* 2005; vol. 23, no. 16, pp. 3780–3792.

Kini A.R., Kay N.E., Peterson L.C., Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2000; 14:1414-8.

Klein U., Lia M., Crespo M. et al. “The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer Cell* 2010; vol. 17, no. 1, pp. 28–40.

Klein U., Tu Y., Stolovitzky G.-A., Mattioli M., Cattoretti G., Husson H. & al. Gene expression profiling of b cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory b cell. *J Exp Med* 2001; 194:1625-38.

Konikova E. and Kusenda J., “Altered expression of p53 and MDM2 proteins in hematological malignancies”. *Neoplasma* 2003, vol. 50, no. 1, pp. 31–40.

Krober A., Bloehdorn J., Hafner S. et al., “Additional genetic high-risk features such as 11q deletion, 17p deletion, and V3-21 usage characterize discordance of ZAP-70 and VH mutation status in chronic lymphocytic leukemia”. *Journal of Clinical Oncology* 2006; vol. 24, no. 6, pp. 969–975.

Lamantia K., Conklyn M., Quagliata F. & al. Lymphocyte 5' nucleotidase : absence of detectable protein in CLL. *Blood* 1977; 50:683.

Landau D. A., Carter S. L., Stojanov P. et al., “Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia”. *Cell* 2013; vol. 152, no. 4, pp. 714–726.

Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, Stewart C, Reiter JG, Bahlo J, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature* 2015; 526 : 525-30.

Landegent JE, Jansen in de Wal N et al. : Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet.* 1987 Dec; 77(4):366-70.

Le Bris Y., Struski S., Guièze R., Rouvellat C., Prade N., Troussard X., Tournilhac O., Béné M.C., Delabesse E., Ysebaert L. Major prognostic value of complex karyotype in addition to TP53 and IGHV mutational status in first-line chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol* 2017; 35(4):664–670.

Letestu R. & al. Prognosis of Binet stage A CLL patients: the strength of routine parameters. *Blood* 2010; 116:4588-90.

Lopez C., Baumann T., Costa D. et al., “A new genetic abnormality leading to TP53 gene deletion in chronic lymphocytic leukaemia”. *The British Journal of Haematology* 2012; vol. 156, no. 5, pp612–618.

Lopez C., Delgado J., Costa D. et al., “Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations”. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2012; vol. 51, no. 9, pp. 881–889.

Luquet I., Lai J.L., Barin C., Baranger L., Bilhou-nabera C., Lippert E., Gervais C., Talmant P., Cornillet-Lefebvre P., Perot C., nadal N., Mozziconacci M.J., Lafage-Pochitaloff M., Eclache V., Mugneret F., Lefebvre C., Herens C., Speleman F., Poirel H., Tigaud I., Cabrol C., Rousselot P., Daliphard S., Imbert M., Garand R., Geneviève F., Berger R., Terre C. Francophone de Cytogenetique Hematologique. Hyperdiploid karyotypes in acute myeloid leukemia define a novel entity: a study of 38 patients from the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique (GFCH). *Leukemia* 2008; 22(1):132–137.

Magnac C., Porcher R., Davi F. & al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CELL. *Leukemia* 2003; 17:133-7.

Malcikova J, Stano-Kozubik K, Tichy B, Kantorova B, Pavlova S, Tom N, *et al.* Detailed analysis of therapy-driven clonal evolution of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015; 29 : 877-85.

Malek S. N. “The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia”. *Oncogene* 2013; vol. 32, no. 23, pp. 2805–2817.

Marasca R., Maffei R., Martinelli S. et al. “Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone”. *Hematological Oncology* 2013; vol. 31, no. 2, pp. 348–355.

Marti G.E., Rawstron A.C., Ghia P., Hillmen P., Houlston R.S., Kay N. & al. Diagnostic criteria for monoclonal b-cell lymphocytosis. *Br J Haematol* 2005; 130:325-32.

Matutes E., Oscier D., Garcia-Marco J. et al., “Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients”. *The British Journal of Haematology* 1996; vol. 92, no. 2, pp. 382–388.

Matutes E., Owusu-Ankomah K., Morilla R., & al. The immunological profile of B- cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia* 1994; 8:1640-5

Mayr C., Speicher M. R., Kofler D. M. et al., “Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2006; vol. 107, no. 2, pp. 742–751.

Mertens D., Wolf S., Tschuch C. et al., “Allelic silencing at the tumor-suppressor locus 13q14.3 suggests an epigenetic tumor-suppressor mechanism”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; vol. 103, no. 20, pp. 7741–7746.

Messmer B.T., Albesiano E., Efremov D.G., Ghiotto F., Allen S.L., Kolitz J. & al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2004; 200:519-25.

Michael J Keating, Susan O'Brien & Alessandra Ferrajoli .. Alemtuzumab: a novel monoclonal antibody. *Expert Opinion on Biological Therapy* 2001; 1059-1065

Molica S., Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60:2712-6.

Molica S., Levato D., Cascavilla N., Levato L., Musto P., Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999 ;62:117-22.

Molica S., Levato D., Dell'Olio M. & al. Cellular expression and serum circulating levels of CD23 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Implications for prognosis. *Blood* 1996; 81:428-33.

Molica S., Vitelli G., Levato D., Gandolfo G.M., Liso V., Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1999; 107:605-10.

Montserrat E., Sanchez-Bisono J., Vinolas N., Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analyse of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62:567-75.

Mosca L., Fabris S., Lionetti M. et al., "Integrative genomics analyses reveal molecularly distinct subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 13q14 deletion," *Clinical Cancer Research* 2010; vol. 16, no. 23, pp. 5641–5653.

Nguyen-Khac F, Borie C, Evelyne Callet-Bauchu, Eclache V , Struski S , Place de la cytogénétique dans la prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique : actualisation du Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin* 2016 ; 74 (5) : 561-7

Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C, Grelier A, Luquet I, Radford-Weiss I, *et al.* Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res* 2011; 1 : 13-21.

Novogradsky A., Biniaminov M., Rainot B. & al.. Binding of Con A to rat, normal human and CLL lymphocytes. *Blood* 1972; 40:311.

Oppezzo P., Vasconcelos Y., Settegrana C. & al. The LPL/ADAMs29 expression ratio is a novel prognostic indicator in CLL. *Blood* 2005; 106:650-7

Orlandi E. M., Bernasconi P., Pascutto C. et al., “Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH”. *Hematological Oncology* 2013; vol. 31, no. 3, pp. 136–142.

Oscier D. G., Stevens J., Hamblin T. J., Pickering R. M., Lambert R., Fitchett M., “Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia”. *The British Journal of Haematology* 1990; vol. 76, no. 3, pp. 352–358.

Oscier D., Wade R., Davis Z. et al., “Prognostic factors identified three risk groups in the LRF CLL4 trial, independent of treatment allocation”. *Haematologica* 2010; vol. 95, no. 10, pp. 1705–1712.

Ouillette P., Collins R., Shakhan S. et al. “Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2011; vol. 118, no. 11, pp. 3051–3061.

Ouillette P., Erba H., Kujawski L., Kaminski M., Shedden K., and Malek S. N., “Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14”. *Cancer Research* 2008; vol. 68, no. 4, pp. 1012–1021.

Ouillette P., Fossum S., Parkin B. et al., “Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks”. *Clinical Cancer Research* 2010; vol. 16, no. 3, pp. 835–847.

Ouillette P., Li J., Shaknovich R. et al. “Incidence and clinical implications of ATM aberrations in chronic lymphocytic leukemia”. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2012; vol. 51, no. 12, pp. 1125–1132.

P Dreger, P Corradini, E Kimby, M Michallet, D Milligan, J Schetelig, W Wiktor-Jedrzejczak, D Niederwieser, M Hallek & E Montserrat, Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007; volume 21, pages 12–17

Parker H., Rose-Zerilli M. J. J., Parker A. et al., “13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia”. *Leukemia* 2011; vol. 25, no. 3, pp. 489–497.

Porpaczy E., Bilban M., Heinze G. et al., “Gene expression signature of chronic lymphocytic leukaemia with Trisomy 12”. *The European Journal of Clinical Investigation* 2009; vol. 39, no. 7, pp. 568–575.

Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, Trbusek M, Rossi D, Kater AP, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26 : 1458-61.

Preud'homme J.L., Seligmann M.. Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lympho-proliferative disease. *Blood* 1972; 40:777.

Puente XS, Quesada V, Osorio FG, Cabanillas R, Cadinanos J, Fraile JM, et al. Exome sequencing and functional analysis identifies BANF1 mutation as the cause of a hereditary progeroid syndrome. *Am J Hum Genet* 2011; 88 : 650-6.

Puiggros A., Blanco G., Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int* 2014; 2014:435983.

Puiggros A., Collado R., Calasanz M.J., Ortega M., Ruiz-Xivillé N., Rivas-Delgado A., Luño E., González T., navarro B., García-Malo M., Valiente A., Hernández J.Á., Ardanaz M.T., Piñan M.Á., Blanco M.L., Hernández-Sánchez M., Batlle-López A., Salgado R., Salido M., Ferrer A., Abrisqueta P., Gimeno E., Abella E., Ferrá C., Terol M.J., Ortuño F., Costa D., Moreno C., Carbonell F., Bosch F., Delgado J., Espinet B. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget* 2017; 8(33):54297–54303.

Puiggros A., Delgado J., Rodriguez-Vicente A. et al., “Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion”. *The British Journal of Haematology* 2013; vol. 163, no. 1, pp. 47–54,

Put N., Konings P., Rack K., Jamar M., Van Roy N., Libouton J.M., Vannuffel P., Sartenaer D., Ameye G., Speleman F., Herens C., Poirel H.A., Moreau Y., Hagemmeijer A., Vandenberghe P., Michaux L. Belgian Cytogenetic Group for Hemato-Oncology (BCGHO). Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48(10):843–853.

Put N., Meeus P., Chatelain B. et al., “Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia,” *Leukemia*, vol. 23, no. 6, pp. 1201–1204, 2009.

Put N., van Roosbroeck K., Konings P. et al., “Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations: a subgroup with an aggressive disease course,” *Annals of Hematology* 2012; vol. 91, no. 6, pp. 863–873.

Quijano S., Lopez A., Rasillo A. et al. “Impact of trisomy 12, del(13q), del(17p), and del(11q) on the immunophenotype, DNA ploidy status, and proliferative rate of leukemic B-cells in chronic lymphocytic leukemia,” *Cytometry B: Clinical Cytometry* 2008; vol. 74, no. 3, pp. 139–149.

R Kath, K Blumenstengel, H J Fricke, K Höffken J. Bendamustine monotherapy in advanced and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res Clin Oncol.* 2001Jan; 127(1):48-54

Rai K.R., Sawitsky A., Cronkite E.P. & al. Clinical staging of CLL. *Blood* 1975; 46:219.

Rassenti L. Z., Jain S., Keating M. J. et al., “Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2008; vol. 112, no. 5, pp. 1923–1930.

Reddy K. S., “Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel”. *The British Journal of Haematology* 2006; vol. 132, no. 6, pp. 705–722.

Reindl L, Bacher U, Dicker F, Alpermann T, Kern W, Schnittger S, et al. Biological and clinical characterization of recurrent 14q deletions in CLL and other mature B-cell neoplasms. *Brit J Haematol* 2010 ; 151 : 25-36.

Rigolin G. M., Cibien F., Martinelli S. et al., “Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters”. *Blood* 2012; vol. 119, no. 10, pp. 2310–2313.

Rigolin G.M., Cibien F., Martinelli S., Formigaro L., Rizzotto L., Tammiso E., Saccenti E., Bardi A., Cavazzini F., Ciccone M., Nichele I., Pizzolo G., Zaja F., Fanin R., Galièni P., Dalsass A., Mestichelli F., Testa N., Negrini M., Cuneo A. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood* 2012; 119(10):2310–2313.

Robert KH, Moller E, Gahrton G, Eriksson H, Nilsson B. B-cell activation of peripheral blood lymphocytes from patients with chronic lymphatic leukaemia. *Clin Exp Immunol* 1978 ; 33 : 302-8.

Rodriguez A. E., Hernandez J. A., Benito R. et al., “Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14”. *PLoS ONE* 2012; vol. 7, no. 11,

Romana S, Malan V, Cytogénétique moléculaire, Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale, 2011.

Roos-Weil D., Nguyen-Khac F., Chevret S., Touzeau C., Roux C., Lejeune J., Cosson A., Mathis S., Feugier P., Leprêtre S., Béné M.C., Baron M., Raynaud S., Struski S., Eclache V., Sutton L., Lesty C., Merle-Béral H., Cymbalista F., Ysebaert L., Davi F., Leblond V.; FILO working group. Mutational and cytogenetic analyses of 188 CLL patients with trisomy 12: A retrospective study from the French Innovative Leukemia Organization (FILO) working group. *Genes Chromosomes. Cancer* 2018; 57(11):533–540.

Roos-Weil D., Nguyen-Khac F., Chevret S. et al., “Mutational and cytogenetic analyses Of 177 CLL patients with trisomy 12: a retrospective study of the CLL french intergroup,” *Blood* 2013; vol. 122, no. 21, p. 4144.

Rosenwald A., Alizadeh A.-A., Widhopf G. & al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194:1625-38.

Rosenwald A., Alizadeh A.A., Widhopf G., Simon R., Davis R.E., Yu X. & al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in b cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001; 194: 1639-47.

Rose-Zerilli M. J., Forster J., Parker H. et al. “ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial”. *Haematologica* 2014; vol. 99, no. 4, pp. 736–742,.

Ross G.D., Polley M.J., Rabellino E.M. & al. Two different complement receptors on human lymphocytes. *J Exp Med* 1973; 138: 798.

Rossi D., Khiabani H., Spina V. et al., “Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2014; vol. 123, no. 14, pp. 2139–2147.

Rossi D., Fangazio M., Rasi S. et al., “Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2012; vol. 119, no. 12, pp. 2854–2862.

Rossi D., Khiabani H., Spina V. et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014; 123:2139–2147.

Rossi D., Rasi S., Spina V. et al., “Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2013; vol. 121, no. 8, pp. 1403– 1412,

Rossi D., Rasi S., Spina V., Bruscaggin A., Monti S., Ciardullo C. et al.: Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013; 121:1403–1412.

Sampath D., Liu C., Vasan K. et al., “Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia”. *Blood* 2012; vol. 119, no. 5, pp. 1162– 1172,.

Sarfati M., Chevret S., Chastang C. et al. Prognostic importance of serum soluble CD23 level in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996; 88 4259-64.

Schnittger S., Haferlach T., Kern W., Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients : a study of 132 CLL cases with correlation to FISH. IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 2008; 3152-60.

Schroeder Jr H.W., Dghiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: Analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today* 1994; 15:288-94.

Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S, Salvi T, Wrobel G, Radlwimmer B, et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia : development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 2004; 101 :1039-44.

Sellmann L., Gesk S., Walter C. et al., “Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lympho-cytic leukaemia,” *The British Journal of Haematology* 2007; vol. 138, no. 2, pp. 217–220.

Shanafelt T.D., Greyer S.M., Kay N.E. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; 103: 1202-10.

Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, Jenkins RB, Paternoster SF, Smoley SA, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2006; 24 : 4634-41.

Sheppard J.R., Gormus R., Moldow C.G. Catecholamine hormone receptors are reduced on CLL lymphocytes. *Nature* 1977; 269:693.

Smadja N.V., Bastard C., Brigaudeau C., Leroux D., Fruchart C. Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98(7):2229–2238.

Smith H., O’Kennedy R. Depletion surface sialopeptide in leukemic cells. *Br J Cancer* 1977; 35:255.

Speckart S.F., Boldt B.H., Mac Dermott R.P. CLL: cell surface changes detected by lectin binding and their relation to altered glycotransferase activity. *Blood* 1978; 52:681.

Stankovic T, Weber P, Stewart G, Bedenham T, Murray J, Byrd PJ, *et al.* Inactivation of ataxia telangiectasia mutated gene in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 1999 ; 353 : 26-9.

Stevens-Kroef M.J., van den Berg E., Olde Weghuis D., *et al.* Identification of prognostic relevant chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia using microarray-based genomic profiling Identification of prognostic relevant chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia using microarraybased. *Mol Cytogenet* 2014; 7:3.

Stilgenbauer S, Bullinger L, Benner A., Wildenberger K., Bentz M., Dohner K., *et al.* Incidence and clinical significance of 6q deletions in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1999; 13:1331-4.

Stilgenbauer S., Schnaiter A., Paschka P., Zenz T., Rossi M., Dohner K. *et al.* Gene mutations and treatment outcome in chronic lymphocytic leukemia : results from the CLL8 trial. *Blood* 2014; 123 : 3247-54.

Stilgenbauer S., Zenz T., Winkler D. *et al.* “Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group,” *Journal of Clinical Oncology* 2009; vol. 27, no. 24, pp. 3994–4001.

Struski S., Gervais C., Helias C., Herbrecht R., Audhuy B., Mauvieux L. Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities. *Leukemia* 2009; 23(3):617–619.

Struski S., Helias C., Gervais C. et al. “13q deletions in B-cell lymphoproliferative disorders: frequent association with translocation,” *Cancer, Genetics and Cytogenetics* 2007; vol. 174, no. 2, pp. 151–160.

Sutton L, Chevret S, Tournilhac O, Divine M, Leblond V, Corront B, *et al.* Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia : a multicenter, randomized, controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood* 2011 ; 117 : 6109-19.

Tam C. S., Shanafelt T. D., Wierda W. G. et al., “De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity: the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience,” *Blood*, vol. 114, no. 5, pp. 957–964, 2009.

Thomas J. Kipps, Freda K. Stevenson, Catherine J. Wu, Carlo M. Croce, Graham Packham, William G. Wierda, Susan O’Brien, John Gribben and Kanti Rai. Chronic lymphocytic leukemia. *Nature Reviews* 2017; 16069: 1-21.

Thompson P.A., O’Brien S.M., Wierda W.G., Ferrajoli A., Stingo F., Smith S.C., Burger J.A., Estrov Z., Jain N., Kantarjian H.M., Keating M.J.. Complex Karyotype is a Stronger Predictor than Del(17p) for Inferior Outcome in Relapsed or Refractory CLL Patients Treated with Ibrutinib-Based Regimens. *Cancer* 2015; 121(20):3612–3621.

Tobin G., Thunberg U., Johnson A. & al. Somatically mutated Ig V(h)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99:2262-4.

Travella A., Ripolles L., Aventin A. et al., “Structural alterations in chronic lymphocytic leukaemia. Cytogenetic and FISH analysis”. *Hematological Oncology* 2013; vol. 31, no. 2, pp. 339–347.

Troussard X., Malet M., Cornet E. Phase précoce de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) et concept de lymphocytose B monoclonale (MBL). *Elsevier Masson SAS* 2011; 433 ;47-53.

Tsimberidou A.M., Tam C., Abruzzo L. V. et al., “Chemotherapy may overcome the adverse prognostic significance of 11q deletion in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia”. *Cancer* 2009; vol. 115, no. 2, pp. 373– 380,

Van den Neste E., Robin V., Francart J. et al., “Chromo-somal translocations independently predict treatment fail-ure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine”. *Leukemia* 2007; vol. 21, no. 8, pp. 1715–1722,.

Van Dyke D. L., Shanafelt T. D., Call T. G. et al., “A comprehen-sive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia”. *The British Journal of Haematology* 2010; vol. 148, no. 4, pp. 544–550,.

Wawrzyniak E., Kotkowska A., Blonski J. Z. et al., “Clonal evo-lution in CLL patients as detected by FISH versus chromosome banding analysis, and its clinical significance”. *The European Journal of Haematology* 2014; vol. 92, no. 2, pp. 91–101,.

Wierda W. G., O’Brien S., Wang X. et al. “Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia,” *Journal of Clinical Oncology* 2011; vol. 29, no. 31, pp. 4088– 4095.

Wiestner A., Rosenwald A., Barry T.S., Wright G., Davis R.E., Henrikson S.E., Zhao H., Ibbotson R.E., Orchard J.A., Davis Z., Stetler-Stevenson M., Raffeld M., Arthur D.C., Marti G.E., Wilson W.H., Hamblin T.J., Oscier D.G., Staudt L.M. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944–4951.

Winkler D., Schneider C., Krober A. et al., “Protein expression analysis of chromosome 12 candidate genes in chronic lympho-cytic leukemia (CLL),” *Leukemia*, vol. 19, no. 7, pp. 1211–1215, 2005.

Woyach J. A., Heerema N. A., Zhao J. et al., “Dic(17;18)(p11.2;p11.2) is a recurring abnormality in chronic lymphocytic leukaemia associated with aggressive disease,” *The British Journal of Haematology* 2010; vol. 148, no. 5, pp. 754–759.

Woyach J. A., Lozanski G., Ruppert A. S. et al., “Outcome of patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia treated with flavopiridol: impact of genetic features”. *Leukemia* 2012; vol. 26, no. 6, pp. 1442–1444.

Xu X., Johnson E.B., Leverton L., et al. The advantage of using SNP array in clinical testing for hematological malignancies a comparative study of three genetic testing methods. *Cancer Genet* 2013; 206:317–326.

Zenz T, Krober A, Scherer K, Habe S, Buhler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia : results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008 ; 112 : 3322-9.

Zenz T, Krober A, Scherer K, Habe S, Buhler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia : results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008 ; 112 : 3322-9.

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia : evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010 ; 24 : 2072-9.

Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, Smardova J, Benner A, Soussi T, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia : evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010 ; 24 : 2072-9.

Zenz T., Mertens D., Kupperts R., Dohner H., Stilgen-bauer S. “From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia,” *Nature Reviews Cancer* 2010; vol. 10, no. 1, pp. 37–50.

Zenz T., Vollmer D., Trbusek M. et al. “TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations,” *Leukemia* 2010; vol. 24, no. 12, pp. 2072–2079.

Zhang Y, Matthiessen P, Harder S, Castoldi G, Calasanz MJ, et al. A 3-cM Commonly deleted region in 6q21 in leukemias and lymphomas delineated by fluorescence in situ hybridization. *Gene Chromosomes Cancer* 2000; 27:52-8.

Zucker Franklin D., Liebes L., Silber R. Difference in the behavior of the membrane and membrane associated filamentous structures in normal and CLL lymphocytes. *J Immunol* 1979; 1:97.

Acknowledgement

*J*e voudrais exprimer toute ma reconnaissance et toute ma gratitude à madame Agnès DAUDIGNON, docteur en Sciences, Praticien Hospitalier, Institut de Génétique Médicale, CHU de Lille, Lille, France pour sa contribution scientifique et humaine qui m'a été d'un grand apport dans la concrétisation et la finalisation de ma thèse.

Dr. Agnès DAUDIGNON m'a été d'une grande aide et d'une grande utilité dans mes recherches au sein du laboratoire et dont les résultats ont abouti et ont fait l'objet d'une publication dans une revue de renom à fort impact factor.

ANNEXES



ORIGINAL ARTICLE

Cytogenetic landscape in 1012 newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia

Amel Senouci¹ | Thomas Smol² | Sabine Tricot³ | Jania Bakala⁴ | Soraya Moulessehouli¹ | Benoît Quilichini⁵ | Dominique Penther⁶ | Charles Herbaux⁷ | Agnès Daudignon²

¹Laboratoire de Bio-toxicologie, Université de Sidi Bel Abbès, Sidi Bel Abbès, Algeria

²Institut de Génétique Médicale, CHU de Lille, Lille, France

³Service d'Hématologie Clinique, CH de Valenciennes, Valenciennes, France

⁴Service d'Hématologie Clinique, CH de Lens, Lens, France

⁵Service de Cytogénétique, Laboratoire Biomnis, Lyon, France

⁶Service de Génétique Oncologique, Centre Henri Becquerel, Rouen, France

⁷Service des Maladies du Sang, CHU de Lille, Lille, France

Correspondence

Agnès Daudignon, Institut de Génétique Médicale, CHU de Lille, Lille, France.
Email: Agnes.Daudignon@chru-lille.fr

Abstract

Background: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) stratification mainly relies on FISH markers according to Döhner's hierarchical model which includes high-risk FISH markers, intermediate FISH, or low-risk FISH. Recently, complex karyotype (CK) has been demonstrated as an independent negative prognostic factor in CLL.

Methods: A series of 1012 untreated CLL patients have been investigated with both FISH and chromosome banding analysis (CBA) on the same pellet obtained from interleukin IL-2-CPG DSP30 oligonucleotide-stimulated cultured cells.

Results: Combining both FISH and CBA has led to refine prognostic categories with identification of 30% of CK in low-risk and intermediate FISH group. This raises the issue of switching them to a high-risk group. While this series confirmed the significant association between CK and high-risk FISH ($P = .003$), 33% of CK present no *ATM* or *TP53* deletion. Three groups characterized by significant association between FISH markers and CBA have emerged: CK with *TP53* loss and monosomy 15; CK with *ATM* loss and 14q32 translocation; and CK without *ATM* or *TP53* losses but trisomies 12, 18, and 19 or t(14;18)(q32;q21).

Conclusion: We have observed that in addition to FISH analysis, the CBA allows detection of many abnormalities with potential impact on patient follow-up and treatment, mainly CK.

KEYWORDS

chronic lymphocytic leukemia, complex karyotype, FISH markers

1 | INTRODUCTION

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common form of leukemia in Western countries.¹ Today, CLL treatment is mainly stratified according to *TP53* status.² Indeed, deleted or mutated *TP53* patients are typically resistant to chemoimmunotherapy-based treatments.³ In clinical practice, prognostic factors can also include

advanced stage, unmutated germ-line configuration in the variable region in the immunoglobulin heavy chain (*IGHV*) gene and 11q22 deletion involving *ATM* identified by fluorescence in situ hybridization (FISH) or conventional cytogenetic.²

Since the use of Döhner classification based on FISH analysis, conventional cytogenetic approaches have not been taken into account for CLL cytogenetic descriptions, but complex karyotypes (CK) have recently been reported to predict worse clinical outcomes in patients treated either with standard treatments or new agents, such as *BCR* inhibitors or *BCL2* selective inhibitor venetoclax.⁴⁻⁸ This

Amel Senouci and Thomas Smol are joint first authors.

Charles Herbaux and Agnès Daudignon are joint last authors.

was recently confirmed in a large retrospective study for patients with 5 anomalies or more on chromosomal banding analysis (CBA).⁹ This study also individualized CK with 3 or 4 aberrations, who followed aggressive disease courses only in the presence of *TP53* aberrations, and CK with trisomy 12 and/or trisomy 19, displaying an indolent profile. It has also been shown that patients with CLL with unbalanced rearrangements might represent a very high-risk subset, with distinct clinical and biological characteristics.¹⁰ Conventional cytogenetic is a well-known technique with variable sensitivity, mostly depending on the leukemic cells mitogen stimulation choice which increases assessable metaphases in most patients.¹¹ Similarly, the FISH sensitivity is more effective on metaphase chromosomes than on interphase nuclei in CLL.

The aim of the present study is therefore to characterize one of the largest already described cohorts of 1012 patients with CLL at diagnosis with a sensitive and standardized cytogenetic methodology.

2 | METHODS

2.1 | Patients

Between 2009 and 2016, 1012 peripheral blood or bone marrow samples from 1012 newly diagnosed CLL patients were collected. They all provided informed consent in accordance with local institutional review board. Patients were involved in accordance with the WHO 2008 CD5⁺/CD19⁺ lymphocyte proliferation and 4-5 Matutes score diagnostic criteria for CLL.¹² All patients included have been investigated by both conventional cytogenetic with CBA and fluorescent in situ hybridization (FISH).

2.2 | Conventional cytogenetic analysis

Chromosomal banding analysis was assessed on peripheral blood (n = 911, 90%) or on bone marrow (n = 101, 10%). All samples, both blood and bone marrow, were cultured for 72 hours with interleukin IL-2 (PerproTech) and CPG DSP30 oligonucleotides (TIB Molbiol) in accordance with standard procedures.¹¹ Karyotype analyses were performed using GTG and RHG banding. No less than 20 metaphases were karyotyped, and chromosomal aberrations were described following the International System for Human Cytogenetic 2016.¹³ A clone was defined either by 2 cells with the same additional or structurally rearranged chromosome or by 3 cells with the same chromosome loss. A CK was defined by the presence of three or more chromosomal abnormalities in a single clone.¹⁴ Multiple related clones (MRC) were defined by at least two related cell lines on karyotype at diagnostic stage. All karyotypes were reviewed by expert cytogeneticists.

2.3 | Fluorescence in situ hybridization

FISH analyses were performed on both interphasic nuclei and metaphases of cultured cells, in accordance with the manufacturer's instructions. The routine FISH panel included a XL *TP53/ATM* probe

Novelty statement

- The description of three different subgroups of CK in CLL is extremely recent; our study provides important data in this regard.
- Karyotyping allows detection of many abnormalities with potential impact on patient follow-up and treatment.
- Karyotyping should be included among the desirable evaluations in clinical trials in CLL.

(MetaSystems) and XL *DLEU/LAMP/12cen* probe (MetaSystems). For each probe, 200 interphase nuclei and a maximum of 40 metaphases were evaluated. Clonality at low interphasic FISH level may be additionally validated on at least 2 metaphases carrying the expected FISH hybridization abnormal signal(s). The cutoff for each individual probe was determined from negative sample analysis and calculated as the mean + 3 standard deviation. For XL *DLEU/LAMP/12cen* mix, cutoff for monoallelic 13q14 loss, biallelic 13q14 loss, or trisomy 12 was 2.9%, 0.5%, and 7%, respectively. For XL *TP53/ATM* mix, cutoff for monoallelic *ATM* or *TP53* loss was 3% and 4.7%, respectively. FISH chromosomal aberrations were categorized in accordance with Döhner's hierarchical model high-risk FISH (HR-FISH) aberrations for *ATM* and *TP53* loss, intermediated FISH aberration (Inter-FISH) for trisomy 12 or no FISH abnormality, and low-risk FISH (LR-FISH) aberration for isolated 13q14 deletion.¹⁵

2.4 | Statistical analysis

Discrete variables were compared between groups using Fisher's exact tests, and a Mann-Whitney test was performed for continuous variables.

3 | RESULTS

One thousand and twelve patients (pts), 61% (n = 613) males and 39% (n = 399) females, median age at diagnosis 72 (35-95 years), were recorded. According to the Döhner's hierarchical model, pts's distribution was 40% for LR-FISH (n = 405), 39% for Inter-FISH (n = 383) and 22% for HR-FISH (n = 224; Table 1A). In CBA, abnormal karyotypes were found in 65% of cases (n = 660) and CK was observed in 19% of pts (n = 194). The median number of abnormalities per CK was 4 (range 3-12), 39% with 3 abnormalities (n = 77), 18% with 4 abnormalities (n = 34), and 43% with more than 4 abnormalities (n = 83). Chromosomal banding analysis abnormalities were described in Table 1B. Each FISH prognostic group was faced with the corresponding CBA results.

In LR-FISH group, isolated 13q14 deletions were confirmed by CBA in 270 out of the 405 detected by FISH and were reported either as cryptic deletion in a normal karyotype for 48% of cases (195 pts) or associated with CBA detectable 13q deletion (75

TABLE 1 CBA and FISH data of the cohort

	Dohner's FISH risk categories							
	LR-FISH		Inter-FISH		HR-FISH			
	Single mono and/or biallelic 13q14 loss	Single monoallelic 13q14 loss	Biallelic 13q14 loss	Normal FISH	Trisomy 12	ATM loss	TP53 loss	
Total population	1012	405	325	80	225	158	138	92
1A: CBA synthetic characteristic								
CBA normal	352/1012 (35%)	195/405 (48%)	154/325 (48%)	41/80 (51%)	150/225 (67%)	3/158 (2%)	3/138 (2%)	1/92 (1%)
CBA with abnormalities	660/1012 (65%)	209/405 (52%)	170/325 (52%)	39/80 (49%)	75/225 (33%)	155/158 (98%)	135/138 (98%)	91/92 (99%)
CBA with complexity	194/1012 (19%)	28/405 (7%)	24/325 (7%)	4/80 (5%)	11/225 (5%)	35/158 (22%)	61/138 (44%)	64/92 (70%)
CBA with complexity > 3	118/1012 (12%)	13/405 (3%)	12/325 (4%)	1/80 (1%)	8/225 (4%)	17/158 (11%)	34/138 (25%)	49/92 (53%)
CBA with complexity > 4	84/1012 (8%)	11/405 (3%)	11/325 (3%)	0/80 (0%)	7/225 (3%)	9/158 (6%)	21/138 (15%)	39/92 (42%)
CBA with CE	224/1012 (22%)	49/405 (12%)	43/325 (13%)	6/80 (8%)	12/225 (5%)	37/158 (23%)	74/138 (54%)	56/92 (61%)
1B: Chromosome abnormality distribution								
13q deletion	265/1012 (26%)	115/405 (28%)	92/325 (28%)	23/80 (29%)	1/225 (0%)	14/158 (9%)	39/138 (28%)	26/92 (28%)
Trisomy 12/12q	186/1012 (18%)	0/405 (0%)	0/325 (0%)	0/80 (0%)	1/225 (0%)	154/158 (97%)	13/138 (9%)	19/92 (21%)
11q22 deletion/t(11q22)	148/1012 (15%)	2/405 (0%)	1/325 (0%)	1/80 (1%)	3/225 (1%)	2/158 (1%)	130/138 (94%)	6/92 (7%)
17/17p monosomy	86/1012 (8%)	1/405 (0%)	1/325 (0%)	0/80 (0%)	0/225 (0%)	0/158 (0%)	5/138 (4%)	85/92 (92%)
6q deletion	71/1012 (7%)	21/405 (5%)	19/325 (6%)	2/80 (3%)	15/225 (7%)	9/158 (6%)	15/138 (11%)	11/92 (12%)
8p deletion	39/1012 (4%)	7/405 (2%)	6/325 (2%)	1/80 (1%)	4/225 (2%)	4/158 (3%)	11/138 (8%)	13/92 (14%)
7q deletion	28/1012 (3%)	11/405 (3%)	10/325 (3%)	1/80 (1%)	4/225 (2%)	3/158 (2%)	4/138 (3%)	6/92 (7%)
t(14;18) and variants	27/1012 (3%)	12/405 (3%)	11/325 (3%)	1/80 (1%)	7/225 (3%)	8/158 (5%)	0/138 (0%)	0/92 (0%)
14q23 deletion	26/1012 (3%)	5/405 (1%)	5/325 (2%)	0/80 (0%)	10/225 (4%)	6/158 (4%)	0/138 (0%)	5/92 (5%)
Trisomy 18	21/1012 (2%)	5/405 (1%)	4/325 (1%)	1/80 (1%)	2/225 (1%)	13/158 (8%)	1/138 (1%)	0/92 (0%)
Monosomy 15	19/1012 (2%)	2/405 (0%)	2/325 (1%)	0/80 (0%)	1/225 (0%)	1/158 (1%)	2/138 (1%)	14/92 (15%)
Others 14q32 translocations	17/1012 (2%)	4/405 (1%)	3/325 (1%)	1/80 (1%)	1/225 (0%)	3/158 (2%)	8/138 (6%)	1/92 (1%)
Monosomy X	16/1012 (2%)	4/405 (1%)	3/325 (1%)	1/80 (1%)	4/225 (2%)	1/158 (1%)	1/138 (1%)	6/92 (7%)
Y loss	16/1012 (2%)	5/405 (1%)	4/325 (1%)	1/80 (1%)	0/225 (0%)	4/158 (3%)	3/138 (2%)	4/92 (4%)
Trisomy 19	15/1012 (1%)	1/405 (0%)	1/325 (0%)	0/80 (0%)	0/225 (0%)	13/158 (8%)	1/138 (1%)	0/92 (0%)
Trisomy 3/3q	10/1012 (1%)	2/405 (0%)	2/325 (1%)	0/80 (0%)	2/225 (1%)	3/158 (2%)	1/138 (1%)	3/92 (3%)
8q24 translocation	10/1012 (1%)	3/405 (1%)	3/325 (1%)	0/80 (0%)	1/225 (0%)	0/158 (0%)	2/138 (1%)	4/92 (4%)
10q deletion	9/1012 (1%)	2/405 (0%)	2/325 (1%)	0/80 (0%)	4/225 (2%)	2/158 (1%)	1/138 (1%)	0/92 (0%)



pts). For the remaining patients ($n = 134$), CBA showed additional chromosome anomalies with CK occurrence in 28 cases. Taking into account the CBA, 32% of the LR-FISH cases should not be considered as 13q14 isolated deletion ($n = 135$) and 7% presented with CK ($n = 28$) and thus should be excluded from the low-risk category. It is noteworthy that a group of pts exhibited 13q14 biallelic loss ($n = 80$). This sub-group is not isolated in the Döhner's curves but loss of the second 13q14 allele may be considered as a sub-clonal evolution since most pts presented both isolated and biallelic deletions. The CBA profile of this group is comparable to those of the monoallelic 13q14 loss.

The Inter-FISH group (39% of patients) included 225 normal FISH and 158 trisomy 12. Normal FISH was associated with abnormal CBA in 75 out of the 225 pts (33%), and abnormal karyotype was found in 98% of trisomy 12 FISH pts. CK was identified in 11 and 35 cases, respectively, representing 12% of the whole Inter-FISH group ($n = 46$). Finally, for both initially LR-FISH and the Inter-FISH assigned group ($n = 788$), 9.5% of cases were associated with CK ($n = 74$) and constituted a possible change in prognostic risk group.

HR-FISH represented by *ATM* loss ($n = 138$) and/or *TP53* loss ($n = 92$) were identified in 22% of pts, and associated in 98% of cases with an abnormal karyotype. CK was identified in 44% ($n = 61$) and 70% ($n = 64$) of *ATM* loss and *TP53* loss cases, respectively, with a higher significant occurrence in the *TP53* loss group ($P = .0002$). Chromosomal banding analysis demonstrated that chromosomal mechanisms leading to *TP53* loss mostly occurred from chromosome 17 unbalanced rearrangements ($n = 67$), or unbalanced translocation involving chromosome 17p ($n = 37$), chromosome 17p addition ($n = 16$), iso-chromosome 17q ($n = 7$), and ring of chromosome 17 ($n = 4$). Interstitial 17p deletion was detected in 18% of cases ($n = 15$), and 4 additional cases presented with cryptic *TP53* deletion (4%). Conversely, *ATM* loss was mainly found as non-cryptic 11q interstitial deletion with break points spanning from 11q13 to 11q24 (91% of cases, $n = 126$). The last remaining cases were associated with either a translocation at 11q22 locus ($n = 3$), or add(11)(q22) ($n = 2$), or cryptic 11q22.3 deletion ($n = 3$). A sub-clonal interphasic evolution not detected by CBA was observed in 4 other cases.

It is noteworthy that CBA rearrangements at 11q22 and 17p13 were not always associated with *ATM* or *TP53* loss, as observed in 4 patients with 11q deletion without *ATM* deletion and 1 patient with add(17p) and *TP53* preservation. With the contribution of CBA, 16.5% of FISH categorized patients of this series should be reclassified to a higher risk category ($n = 167$) according to the recent proposed refined prognostic classification.¹⁶

Focusing on CK, we showed a strong association between CK and HR-FISH, but one third of patients presented a CK without detectable *ATM* or *TP53* deletion (74 out of 224 patients). Thus, we defined four distinct categories within CK group (Table 2): CK without *TP53* or *ATM* deletion (CK+/no HR-FISH, $n = 74$), CK and *TP53* deletion (CK+/*TP53* loss, $n = 59$), CK and *ATM* deletion (CK+/*ATM* loss, $n = 56$), and CK with both *ATM* and *TP53* losses ($n = 5$; Table 2). Significant chromosomal abnormalities association could be described for each

group. CK+/*TP53* loss was significantly associated with monosomy 15 (22%, $P < .001$). CK+/*ATM* loss was significantly associated with 14q32 translocation (14%, $P = .012$) except of the t(14;18)(q32;q21) and was never been associated with 14q32 deletion ($P = .042$). CK+/no HR-FISH was associated with trisomy 12 (45%, $P < .001$), t(14;18)(q32;q21) (7%, $P = .018$), and trisomies 18 and 19 (15% and 12%, respectively, $P < .001$). Trisomy 18/trisomy 19 and t(14;18)(q32;q21) have never been observed together but most cases shared trisomy 12 association.

Moreover, unbalanced rearrangements were significantly observed in CK (80% CK vs 19% non-CK, $P < .001$). Occurrences of unbalanced rearrangements were higher as the number of described anomalies increased, with a maximum reached for more than 4 abnormalities ($P < 10^{-5}$; Figure 1). Indeed, occurrences of unbalanced rearrangements followed an ascendant evolution from CK without HR-FISH to CK with *ATM* loss and *TP53* loss and both (72%, 79%, 92%, and 100%, respectively, $P = .016$; Figure 1). *In fine*, among the whole CK subgroups, the CK+/*TP53* loss group display the worst CBA profile with higher occurrence of more than 4 abnormalities and expected unbalanced rearrangements.

4 | DISCUSSION

The spectrum of underlying cytogenetic abnormalities in CLL has long been limited owing to CBA failure. Cytogenetic stratification of CLL often relied on the detection by FISH of four cytogenetic markers (13q14 deletion, trisomy 12, *ATM*, and *TP53* deletion) on interphasic cells, preventing all other abnormalities and sub-clonal evolution to be detected and investigated.^{17,18} In this study, 1012 untreated CLL patients were investigated both by CBA and FISH performed on the same cells pellet obtained from IL2-DSP30 stimulation of B-lymphocytes.

Abnormal karyotypes were obtained in 65% of pts, and FISH was positive for at least one marker in 78% of pts. Data comparisons have shown that CBA led to reassign 16% of pts to a higher risk group than using FISH stratification alone. Taking into account the CBA in LR-FISH group, 28% of cases might be reclassified in intermediate risk category ($n = 90$) and 7% in defavorable risk category ($n = 24$). The observation of additional chromosome abnormalities in LR-FISH category had previously been noticed.^{19,20} Indeed, one to two additional chromosomal anomalies were reported to be sufficient to modify time to first treatment and even overall survival independently if the number of anomalies is exclusively superior to 3.²¹ Consequently, some authors proposed a new category of very low risk defined by isolated monoallelic 13q14 loss with normal CBA, including molecular mutation data as no *TP53*, *NOTCH1*, or *SBFB3* mutation. This category displayed OS similar to the general age-matched population.¹⁶ Additionally, FISH allowed to detected most of the 13q14 deletions as 47% of them are cryptic. In contrast, cryptic *ATM* or *TP53* losses are rare. But subsequent *TP53* loss from CBA chromosomal 17p or 11q22 rearrangement needs to be confirmed by FISH because in some cases *loci* of interest are conserved. Overall, combination of



TABLE 2 FISH and CBA characteristics of patients with a complex karyotype

	No HR-FISH	HR-FISH ATM	HR-FISH TP53	HR-FISH ATM&TP53	Statistical significances	
Total	194	74	56	59	5	
Age > 65 y	139	54/74 (73%)	39/56 (70%)	41/59 (69%)	5/5 (nr)	NS
M/F sex ratio	1.8	2	1.7	1.8	1.5	NS
CK>=5	84	27/74 (36%)	18/56 (32%)	36/59 (61%)	3/5 (nr)	P = .003
MRC	129	48/74 (65%)	38/56 (68%)	39/59 (66%)	4/5 (nr)	NS
CC	92	36/74 (49%)	24/56 (43%)	30/59 (51%)	2/5 (nr)	NS
Unbalanced rearrangement	156	53/74 (72%)	44/56 (79%)	54/59 (92%)	5/5 (nr)	P = .016
13q deletion/t(13q14)	164	71/74 (96%)	48/56 (86%)	53/59 (90%)	2/5 (nr)	NS
17p deletion	61	1/74 (1%)	0/56 (0%)	55/59 (93%)	5/5 (nr)	NS
11q deletion/t(11q22)	51	4/74 (5%)	41/56 (73%)	1/59 (2%)	5/5 (nr)	NS
Trisomy 12	49	33/74 (45%)	4/56 (7%)	11/59 (19%)	1/5 (nr)	P < .001
6q deletion	40	18/74 (24%)	11/56 (20%)	10/59 (17%)	1/5 (nr)	NS
8p deletion	31	10/74 (14%)	9/56 (16%)	11/59 (19%)	1/5 (nr)	NS
7q deletion	21	11/74 (15%)	4/56 (7%)	6/59 (10%)	0/5 (nr)	NS
Monosomy 15	19	4/74 (5%)	1/56 (2%)	13/59 (22%)	1/5 (nr)	P < .001
14q23 deletion	12	8/74 (11%)	0/56 (0%)	4/59 (7%)	0/5 (nr)	P = .043
Others 14q32 translocations	12	3/74 (4%)	8/56 (14%)	1/59 (2%)	0/5 (nr)	P = .012
Trisomy 18	11	11/74 (15%)	0/56 (0%)	0/59 (0%)	0/5 (nr)	P < .001
Trisomy 19	9	9/74 (12%)	0/56 (0%)	0/59 (0%)	0/5 (nr)	P < .001
t(14;18)(q32;q21) and variants	5	5/74 (7%)	0/56 (0%)	0/59 (0%)	0/5 (nr)	P = .018

Abbreviations: CC, clonal complexity; CK, complex karyotype; F, female; M, male; MRC, multiple related clones; nr, non-relevant; NS, non-significative.

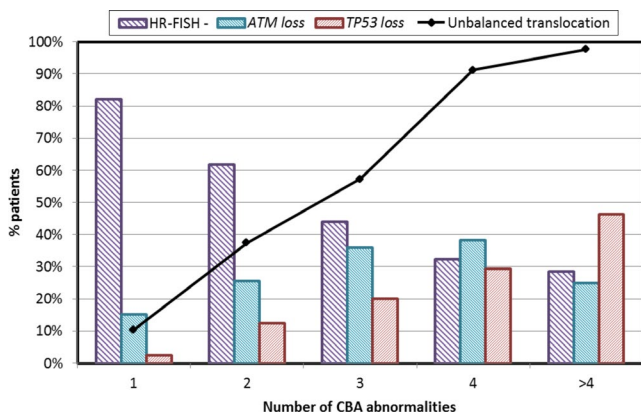


FIGURE 1 Evolution of pejorative chromosomal events according to FISH risk category

CBA and FISH data may refine prognostic stratification of CLL and both technics are complementary.

The most important data exclusively revealed by CBA, as pangenomic analysis, are the detection of CK recently characterized as an independent high-risk marker in CLL.^{4,22} We could have detected CK in 29% of pts in this series. CK was found in all FISH categories, and their occurrence increased with the FISH risk stratification, from 7% in LR-FISH and 32% in Inter-FISH risk group to 56% in HR-FISH risk

group. Without surprise, we confirmed that CK is statistically correlated to HR-FISH, and there was no difference in % of CK found in both ATM and TP53 losses groups. But CK is significantly more often associated with more than 4 anomalies in TP53 loss group than ATM loss group (61% vs 32%, P = .0027). This confirmed that TP53 loss is concomitant with high genetic instability. Nevertheless, CK aggravated CLL outcome across all FISH categories (Figure 2A) and had proved to be a predictive marker of poor response and short OS with both chemoimmunotherapy⁴ and more recent agents as ibrutinib, independently to TP53 disruption.⁷

However, CK remained a heterogeneous group.⁵ In our series, we could define 4 CK groups according to their FISH status. Approximately one third of CK displayed TP53 loss, one third ATM loss, and the last third no HR-FISH. Cumulative TP53 and ATM losses were anecdotal (5 cases over 194). Each group harbored specific chromosomal association. Of note, trisomy 12, t(14;18)(q32;q21) and variant, or cumulative trisomies 12, 18, and 19 are specifically observed in CK with no adverse FISH abnormalities. This is consistent with previous data showing that CLL with t(14;18) is associated with others favorable prognostic markers like mutated IGVH, no ATM deletion indicating a much less aggressive disease.²³ Conversely, CLL with multiple trisomies, namely trisomy 12, 18, and 19, represented a distinct category with increased auto-immune manifestation,

(A)

risk group according to CBA			risk group according to FISH abnormalities			
			Idel13q14 (405 pts)	Trisomy12 (383 pts)	ATM loss (138 pts)	TP53 loss (92 pts)
Combined CBA and FISH risk						
risk group according to CBA	Normal CBA		48%	40%	2%	1%
	abnormal CBA	non-complex CBA <3	single del13q	48%	54%	30%
			Others*			
	Complex CBA ≥3		7%	12%	44%	69%

(B)

risk group according to CBA			risk group according to FISH abnormalities				
			idel13q14	trisomy12	ATM loss	TP53 loss	
Combined CBA and FISH risk							
risk group according to CBA	Normal CBA		low-risk	int-risk	high-risk	high-risk	
	abnormal CBA	non-complex CBA <3 *	single del13q	low-risk	high-risk	high-risk	
			trisomy 12,18,19				low-risk
			Others	int-risk			int-risk
			t(8;14)(q24;q32) amp2p(NMYC)	high-risk			high-risk
	complex CBA ≥3	3≤CK<5	high-risk	high-risk	high-risk	very high-risk	
		CK≥5	very high-risk	very high-risk	very high-risk	very high-risk	

FIGURE 2 A, Combined CBA/FISH risk proposal according to our data. B, Combined CBA/FISH risk proposal with additional cytogenetic data according to published studies. (*) some anomalies may refine prognostic, *that is*, combined trisomies 12, 18, and 19 as good risk factor, and t(8;14)(q24;q32) and amp2p(NMYC) as lower risk factor. Risk group color code: low-risk in green; int-risk in blue; high-risk in orange; and very high-risk in red

increased *IGVH* mutated, and low rate of mutation^{24,25} and a particularly benign clinical evolution.^{5,26,27} This suggests that cytogenetic complexity defined by solely numerical aberration should not automatically be considered to be unfavorable prognostic CLL marker.

Criteria for CK definition in CLL should be revised as it was done for other hematological diseases where hyperdiploidy is considered as a one shot chromosome defect: In SMD/AML, ALL, and multiple myeloma, hyperdiploid CK with multiple trisomies (with no or few non-recurrent structural defect) is nevertheless considered as good prognostic marker.²⁷⁻²⁹ By opposition, losses of chromosome are mostly considered as secondary changes associated with evolutive disease in majority of hematological pathology. Here, we have demonstrated the significant association between the apparent higher risk category of CLL, namely CK/*TP53* loss, with monosomy 15. Moreover, this latter group presented the higher percentage of unbalanced rearrangement and cases with more than 4 anomalies, reflecting the major chromosomal instability in this group.

Likewise, the 4 groups observed seemed to represent a continuum accumulation of defavorable markers, as represented in Figure 1. However, the defavorable cytogenetic events—namely CK, unbalanced rearrangement, or specific loci rearrangements—mainly represented related events. Then notifying a higher representation of unbalanced rearrangement in CK+/*TP53* loss group, it is almost a pleonasm because most of *TP53* loss comes from unbalanced rearrangement. Under these conditions, the only valid chromosome criteria remain the karyotype complexity whose definition should be clearly re-evaluated as low CK (with 3-4 abnormalities) and high

CK (>4 abnormalities) as it was recently demonstrated by Baliakas et al.⁹ Other data showed that CK cases had a comparable OS as pts exhibiting *TP53* loss (whatever CBA result), and pts cumulating CK and *TP53* loss had the lower overall survival.⁵ Here we could define two supplementary subgroups of CK pts, CK without HR-FISH and CK with *ATM* loss, which represented 67% of CK cases remained to be clinically investigated.

In conclusion, our study characterizes one of the largest cohorts of CLL pts at diagnosis with a sensitive and uniform cytogenetic methodology. Note that, we were able to observe that in addition to FISH analysis, the CBA allows detection of many abnormalities with potential impact on patient follow-up and treatment, mainly CK (Figure 2B). However, CK remains a heterogeneous group that may be divided in at least 3 categories, 2 of them concerning the majority of patients with no *TP53* deletion. The clinical impact of these CK subgroups still needs to be investigated in this cohort, as well as the influence of others molecular abnormalities such as the mutational status of *NOTCH1*, *SBF1*, *BIRC3*, and *TP53*.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Pr Nigel Quayle for manuscript editing.

ORCID

Thomas Smol  <https://orcid.org/0000-0002-0119-5896>

Agnès Daudignon  <https://orcid.org/0000-0002-4574-3663>



REFERENCES

- Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17008.
- Fischer K, Hallek M. Optimizing frontline therapy of CLL based on clinical and biological factors. *Hematology*. 2017;2017(1):338-345.
- Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2010;376(9747):1164-1174.
- Le Bris Y, Struski S, Guièze R, et al. Major prognostic value of complex karyotype in addition to TP53 and IGHV mutational status in first-line chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol*. 2017;35(4):664-670.
- Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, et al. Patients with chronic lymphocytic leukemia and complex karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget*. 2017;8(33):54297-54303.
- Rigolin GM, Cavallari M, Quaglia FM, et al. In CLL, comorbidities and the complex karyotype are associated with an inferior outcome independently of CLL-IPI. *Blood*. 2017;129(26):3495-3498.
- Thompson PA, O'Brien SM, Wierda WG, et al. Complex karyotype is a stronger predictor than Del(17p) for inferior outcome in relapsed or refractory CLL patients treated with ibrutinib-based regimens. *Cancer*. 2015;121(20):3612-3621.
- Rigolin GM, Formigaro L, Cavallari M, et al. An extensive molecular cytogenetic characterization in high-risk chronic lymphocytic leukemia identifies karyotype aberrations and TP53 disruption as predictors of outcome and chemorefractoriness. *Oncotarget*. 2017;8(17):28008-28020.
- Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*. 2019;133(11):1205-1216.
- Rigolin GM, Saccenti E, Guardalben E, et al. In chronic lymphocytic leukaemia with complex karyotype, major structural abnormalities identify a subset of patients with inferior outcome and distinct biological characteristics. *Br J Haematol*. 2018;181(2):229-233.
- Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*. 2006;108(9):3152-3160.
- Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456.
- International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature, McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. *ISCN: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*; 2016.
- Rigolin GM, del Giudice I, Formigaro L, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: clinical and biologic correlations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(12):818-826.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343(26):1910-1916.
- Giudice ID, Rigolin GM, Raponi S, et al. Refined karyotype-based prognostic stratification of chronic lymphocytic leukemia with a low and very-low-risk genetic profile. *Leukemia*. 2018;32(2):543-546.
- Put N, Konings P, Rack K, et al. Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: a Belgian multicentric study. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009;48(10):843-853.
- Struski S, Gervais C, Helias C, Herbrecht R, Audhuy B, Mauvieux L. Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities. *Leukemia*. 2009;23(3):617-619.
- Dubuc AM, Davids MS, Pulluqi M, et al. FISHing in the dark: how the combination of FISH and conventional karyotyping improves the diagnostic yield in CpG-stimulated chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2016;91(10):978-983.
- Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int*. 2014;2014:435983.
- Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with "normal" FISH: correlations with clinicobiologic parameters. *Blood*. 2012;119(10):2310-2313.
- Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, et al. Complex karyotypes and KRAS and POT1 mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood*. 2016;128(3):395-404.
- Nguyen-Khac F, Chapiro E, Lesty C, et al. Specific chromosomal IG translocations have different prognoses in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Blood Res*. 2011;1(1):13-21.
- Baliakas P, Mattsson M, Stamatopoulos K, Rosenquist R. Prognostic indices in chronic lymphocytic leukaemia: where do we stand how do we proceed? *J Intern Med*. 2016;279(4):347-357.
- Roos-Weil D, Nguyen-Khac F, Chevret S, et al. Mutational and cytogenetic analyses of 188 CLL patients with trisomy 12: a retrospective study from the French Innovative Leukemia Organization (FILO) working group. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(11):533-540.
- Baliakas P, Puiggros A, Xochelli A, et al. Additional trisomies amongst patients with chronic lymphocytic leukemia carrying trisomy 12: the accompanying chromosome makes a difference. *Haematologica*. 2016;101(7):e299-302.
- Luquet I, Lai JL, Barin C, et al. Hyperdiploid karyotypes in acute myeloid leukemia define a novel entity: a study of 38 patients from the Groupe Francophone de Cytogénétique Hematologique (GFCH). *Leukemia*. 2008;22(1):132-137.
- Baranger L, Cucchini W, Lefebvre C, et al. Cytogenetics in the management of children and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris)*. 2016;74(5):547-560.
- Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C, Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood*. 2001;98(7):2229-2238.

How to cite this article: Senouci A, Smol T, Tricot S, et al. Cytogenetic landscape in 1012 newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. 2019;00:1-7. <https://doi.org/10.1111/ejh.13329>

Résumé

La stratification de la leucémie lymphoïde chronique (LLC) repose principalement sur les marqueurs FISH selon le modèle hiérarchique de Döhner qui inclut les marqueurs FISH à haut risque, FISH intermédiaire ou FISH à faible risque. Récemment, le caryotype complexe (CK) a été démontré comme facteur pronostique négatif indépendant dans la LLC.

Une série de 1012 patients atteints de LLC n'ayant pas été traités, a été étudiée avec FISH et analyse de bandes chromosomiques (CBA) sur le même culot obtenu à partir de cellules cultivées stimulées par oligonucléotide et interleukine « IL-2-CPG DSP30 ».

La combinaison de FISH et de CBA a permis d'affiner les catégories pronostiques avec l'identification de 30% de CK dans le groupe FISH à faible risque et intermédiaire. Cela soulève la question de les transférer dans un groupe à haut risque. Bien que cette série ait confirmé l'importante association négative entre CK et FISH à haut risque ($p = 0,003$), 33% des CK ne présentent pas de suppression *ATM* ou *TP53*. Trois groupes caractérisés par une association significative entre des marqueurs FISH et CBA ont émergés: CK avec perte de *TP53* et monosomie 15, CK avec perte *ATM* et translocation 14q32, et CK sans pertes *ATM* ou *TP53* mais trisomies 12, 18 et 19 ou t (14; 18) (q32; q21).

Nous avons observé qu'en plus de l'analyse FISH, CBA permet la détection de nombreuses anomalies pouvant avoir un impact sur le suivi et le traitement du patient principalement le caryotype complexe.

Mots-clés : Leucémie lymphocytaire chronique, caryotype complexe, marqueurs FISH.