

Place de la cytogénétique dans la prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique : actualisation du Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH)

Cytogenetics in the management of chronic lymphocytic leukemia: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH)

Florence Nguyen-Khac¹

Claire Borie²

Evelyne Callet-Bauchu³

Virginie Eclache⁴

Stéphanie Struski⁵

¹ Hôpital Pitié-Salpêtrière, UPMC Paris 6, Inserm UMR51138, Paris, France <florence.nguyen-khac@psl.aphp.fr>

² Secteur cytogénétique onco-hématologique, Laboratoire d'hématologie, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France

³ Laboratoire de biologie moléculaire et de cytogénétique des hémopathies, Service d'hématologie biologique – CBPAS, Groupement Hospitalier Sud-Hospices Civils de Lyon, Pierre-Bénite, France

⁴ Laboratoire d'hématologie et de cytogénétique, Hôpital Avicenne APHP, Bobigny, France

⁵ Institut universitaire du cancer Toulouse-Oncopole, Laboratoire d'hématologie/Plateau technique hématologie-oncologie, Toulouse, France

Article reçu le 24 février 2016,
accepté le 29 février 2016

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

Résumé. Les anomalies cytogénétiques récurrentes acquises observées dans la leucémie lymphoïde chronique sont fréquentes, et peuvent être associées à des facteurs de bon ou mauvais pronostic, ainsi qu'à des mutations géniques somatiques. Ces anomalies chromosomiques peuvent être clonales ou sous-clonales. À l'heure actuelle, seule la recherche de la délétion 17p (gène *TP53*) (ainsi que la mutation du gène *TP53*) est obligatoire avant traitement, puisqu'elle oriente le choix thérapeutique. Il est cependant recommandé de rechercher également la délétion 11q (gène *ATM*). Enfin la valeur pronostique des autres anomalies cytogénétiques, et en particulier du caryotype complexe, est encore régulièrement discutée.

Mots clés : LLC, anomalies cytogénétiques, délétion 17p, *TP53*

Abstract. Acquired recurrent cytogenetic abnormalities are frequent in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). They can be associated with good or poor prognostic factors, and also with gene mutations. Chromosomal abnormalities could be clonal or sub-clonal. Assessing the *TP53* status (deletion/mutation) is currently mandatory before treating patients. The search for 11q deletion (*ATM* gene) is also recommended. Finally, the prognostic value of other chromosomal abnormalities including complex karyotype is still debated.

Key words: CLL, cytogenetic abnormalities, 17p deletion, *TP53*

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

Tirés à part : F. Nguyen-Khac

chromosomes puis sur puces (*CGH-array*), *single nucleotide polymorphism* (SNP)-*array*) [1-12].

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 [6]. 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 [13-17].

Anomalies cytogénétiques

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 [6]. 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. Les gènes codant pour ces 2 miRNAs sont ubiquitaires et non-codants, ils ont une fonction régulatrice de l'expression des gènes dont ils se fixent sur la partie UTR. Dans le cas de la LLC, l'haplo-insuffisance des miRNAs semble jouer un rôle de suppresseur de tumeur et de faibles variations d'expression du gène ont une répercussion majeure sur le phénotype. Ces micro-RNAs favorisent l'apoptose, en régulant de façon négative le gène *BCL2* [18-20]. 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 [11].

Trisomie 12

La trisomie 12 est observée dans 11 à 25 % des cas [3, 6, 21, 22]. La trisomie 12 est considérée comme un

marqueur de risque intermédiaire dans le modèle pronostique hiérarchique initialement proposée par Döhner *et al.* [6]. 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) [7, 23-32]. La trisomie 12 est considérée par certaines équipes comme une anomalie clonale précoce, la LLC pouvant évoluer secondairement avec l'apparition d'aberrations chromosomiques secondaires ou de mutations touchant en particulier les gènes *NOTCH1*, *TP53*, et *FBXW7* [33].

Délétion 11q22-23

La délétion du bras long du chromosome 11, de taille assez hétérogène, est retrouvée chez 6 à 20 % des patients, selon les études [6, 21]. Elle est associée cliniquement à une lymphadénopathie importante, ainsi qu'à des facteurs de mauvais pronostic comme le statut non muté des gènes *IGHV* [34]. Depuis la mise en place de la trithérapie par rituximab-fludarabine-endoxan, les patients avec délétion 11q ont une survie sans progression plus courte, mais n'auraient plus une survie globale diminuée [35].

La délétion 11q peut être primitive ou secondaire dans l'évolution de la maladie, mais semble être plus souvent sous-clonale [33, 36]. 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 [37-39]. La délétion 11q peut aussi impliquer le gène *BIRC3*, localisé en 11q22.2, à environ 6 000 kb. 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* [40]. Ces données restent cependant à confirmer.

Délétion 17p13

La délétion du bras court du chromosome 17 [de117p/17p-] est identifiée chez moins de 10 % des patients au diagnostic [41, 42]. 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. *In fine*, le traitement aura donc l'effet inverse de celui escompté et conduira à la sélection clonale d'une population cellulaire dépourvue des mécanismes apoptotiques [42].

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 [42, 43].

Les mutations du gène *TP53* sont identifiées sur l'autre copie du gène chez environ 90 % des patients avec del17p [44, 45]. 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 [46].

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. Mêmes petits, ces clones présentent la même valeur pronostique péjorative que ceux identifiés par des techniques plus classiques de séquençage [33, 47]. 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 [48, 49].

Gain 2p

Le gain de tout ou partie du bras court du chromosome 2 est présent dans 5 à 28 % selon les séries et le stade de la maladie [8, 12, 50]. 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, comme la délétion 11q et le statut non muté des gènes *IGHV* [50].

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 [3, 7, 22]. 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 [4, 24].

Bien qu'une association significative entre caryotypes complexes et délétions 17p ou 11q ait été décrite [51], Jaglowski *et al.* ont montré que la complexité caryotypique conserve sa valeur prédictive dans la survie sans progression et la survie globale [52].

Translocations chromosomiques

Les translocations réciproques ont été détectées dans ~ 20 % des cas dans l'étude de Haferlach *et al.* [7]. 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, alors que l'évolution des LLC avec t(14;18)(q32;q21) - *IGH-BCL2* - (ou variantes) ne semble pas être différente des LLC classiques [25-27]. 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 [29].

Autres anomalies cytogénétiques récurrentes

La délétion 6q est observée dans environ 5 % des cas, sans gène candidat identifié à ce jour [6]. La délétion 14q 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 *ZFP36L1* pouvant être impliqué en 14q24 [31, 32]. La duplication 8q24 impliquant le locus du gène *MYC* est également rapportée dans la LLC. La délétion 15q15 impliquant le gène *MGA* est observée dans environ 4 % des cas [12]. Enfin il est décrit dans environ 5 % des LLC la présence de chromothripsis [53], qui serait associée à un mauvais pronostic [12].

Mutations géniques

Les techniques de séquençage ont permis de découvrir de nouvelles altérations [13]. L'étude de Wang *et al.* par séquençage du génome à haut débit a identifié 9 gènes dans lesquels les mutations étaient plus fréquentes : 4 étaient déjà rapportés dans la LLC (*TP53*, *ATM*, *MYD88* et *NOTCH1*) et 5 étaient nouveaux (*SF3B1*, *ZMYM3*, *MAPK1*, *FBXW7* et *DDX3X*) [14]. D'autres mutations récurrentes sont également décrites, comme *XPO1*, *NFKBIE*, *FAT1*, *EGR2*, *POT1*, *BIRC3*, *MED12* [13, 15-17].

Certaines études suggèrent que ces anomalies sont associées de façon significative aux anomalies cytogénétiques déjà connues, comme les mutations de *NOTCH1* et *FBXW7* à la trisomie 12, celles de *MYD88* aux délétions 13q [14, 54-56]. Même si les fréquences de mutations diffèrent d'une étude à l'autre, l'analyse de ces mutations a deux intérêts majeurs :

- d'une part, ces mutations permettent d'entrevoir d'autres mécanismes de résistance que l'inactivation de p53, qui ne représente qu'environ 1/3 des patients réfractaires. Avec la découverte de ces nouvelles mutations, qui sont relativement exclusives, la proportion de patients réfractaires à la fludarabine seule chez lesquels on trouve une mutation de l'un de ces gènes atteint les 70 % [57]. Il reste encore à comprendre les mécanismes exacts concourant au pronostic défavorable de ces patients ;

- d'autre part, elles identifient des nouvelles voies de dérégulation, qui n'étaient pas explorées jusqu'ici dans la LLC. Des mutations se retrouvent dans plusieurs molécules participant à une voie commune de signalisation, ce qui suggère l'importance potentielle de cette voie dans la pathogénie de la LLC. Ainsi, les 9 gènes ciblés dans l'étude de Wang jouent un rôle dans des voies de signalisation importantes : réparation de l'ADN et cycle cellulaire (*TP53*, *ATM*), signalisation de Notch (*FBXW7*, *NOTCH1*), inflammation (*MYD88*, *DDX3X*, *MAPK1*), et épissage de l'ARN (*SF3B1*, *DDX3X*) [14].

Enfin, ces mutations pourraient avoir une valeur pronostique. Rossi *et al.* ont proposé un modèle hiérarchique pronostique associant anomalies cytogénétiques et géniques, qui devra être validé par d'autres études [40]. Ces anomalies peuvent également être associées entre elles, et cette combinaison pourrait là aussi avoir un impact péjoratif [48].

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 homozygotes, le gain 2p) [33, 36].

Les indications de l'analyse cytogénétique dans la LLC (tableau 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 [4, 5].

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 [58]. 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).

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* [59]. Les patients avec délétion 11q rechutant plus précocement, il est également recommandé de rechercher la délétion 11q (sonde ATM) [35].

Tableau 1. Indications du caryotype et de la FISH dans la LLC.

Diagnostic	Indispensable/ obligatoire	Recommandé	Optionnel/ protocole
Caryotype FISH		del(11)(q22)(<i>ATM</i>) del(17)(p13)(<i>TP53</i>)	x 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 FISH	del(17)(p13)(<i>TP53</i>)	x del(11)(q22)(<i>ATM</i>)	x 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>

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. Si autre syndrome lymphoprolifératif circulant : voir chapitre Lymphome. Caryotype sur moelle osseuse en cas de suspicion de myélodysplasie : voir chapitre MDS. *IG* : gènes des immunoglobulines : 14q32 (*IGH*), 2p12 (*IGK*), 22q11 (*IGL*).

Remerciements. Les auteurs remercient D. Leroux, I. Radford-Weiss, S. Taviaux pour leur contribution lors de la parution de la première version de ces recommandations (*Pathol Biol (Paris)* 2004 ; 52 : 254-6).

Liens d'intérêts : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

- 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.
- Gahrton G, Juliusson G, Robert KH, Friberg K. Role of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 1987 ; 1 : 183-92.
- Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, *et al.* Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990 ; 323 : 720-4.
- Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, Strehl J, Busch R, *et al.* Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006 ; 107 : 742-51.
- 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 : 3152-60.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, *et al.* Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000 ; 343 : 1910-6.
- Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL : a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007 ; 21 : 2442-51.
- 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 Natl Acad Sci (USA)* 2004 ; 101 : 1039-44.
- Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, Rawluk J, Kreutz C, Martens UM, *et al.* Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 2007 ; 109 : 1202-10.
- Gunnarsson R, Isaksson A, Mansouri M, Goransson H, Jansson M, Cahill N, *et al.* Large but not small copy-number alterations correlate to high-risk genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia : a high-resolution genomic screening of newly diagnosed patients. *Leukemia* 2010 ; 24 : 211-5.
- Ouillet P, Collins R, Shakhani S, Li J, Peres E, Kujawski L, *et al.* Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 ; 118 : 3051-61.
- 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.

13. 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.
14. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, Stojanov P, Sougnez C, Stevenson K, *et al.* SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011 ; 365 : 2497-506.
15. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genet* 2012 ; 44 : 47-52.
16. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, Trifonov V, Khiabani H, Ma J, *et al.* Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome : role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011 ; 208 : 1389-401.
17. 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.
18. 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.
19. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Nat Acad Sci (USA)* 2005 ; 102 : 13944-9.
20. Klein U, Lia M, Crespo M, Siegel R, Shen Q, Mo T, *et al.* The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010 ; 17 : 28-40.
21. Letestu R, Levy V, Eclache V, Baran-Marszak F, Vaur D, Naguib D, *et al.* Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients : the strength of routine parameters. *Blood* 2010 ; 116 : 4588-90.
22. 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.
23. Ibbotson R, Athanasiadou A, Sutton LA, Davis Z, Gardiner A, Baliakas P, *et al.* Coexistence of trisomies of chromosomes 12 and 19 in chronic lymphocytic leukemia occurs exclusively in the rare IgG-positive variant. *Leukemia* 2012 ; 26 : 170-2.
24. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, Davis Z, Plevova K, Nguyen-Khac F, *et al.* Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia : a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol* 2014 ; 89 : 249-55.
25. Put N, Meeus P, Chatelain B, Rack K, Boeckx N, Nollet F, *et al.* Translocation t(14;18) is not associated with inferior outcome in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009 ; 23 : 1201-4.
26. Chapiro E, Radford-Weiss I, Bastard C, Luquet I, Lefebvre C, Callet-Bauchu E, *et al.* The most frequent t(14;19)(q32;q13)-positive B-cell malignancy corresponds to an aggressive subgroup of atypical chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2008 ; 22 : 2123-7.
27. 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.
28. Martin-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W, Michaux L, Callet-Bauchu E, Berger F, *et al.* A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation. *Leukemia* 2007 ; 21 : 1532-44.
29. Put N, Van Roosbroeck K, Konings P, Meeus P, Brusselmans C, Rack K, *et al.* Chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia with MYC translocations : a subgroup with an aggressive disease course. *Ann Hematol* 2012 ; 91 : 863-73.
30. Pospisilova H, Baens M, Michaux L, Stul M, Van Hummelen P, Van Loo P, *et al.* Interstitial del(14)(q) involving IGH : a novel recurrent aberration in B-NHL. *Leukemia* 2007 ; 21 : 2079-83.
31. 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.
32. 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.
33. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, *et al.* Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013 ; 152 : 714-26.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Schaffner C, Stilgenbauer S, Rappold GA, Dohner H, Lichter P. Somatic ATM mutations indicate a pathogenic role of ATM in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999 ; 94 : 748-53.
39. Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parker H, Parker A, Rodriguez AE, Chaplin T, *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 ; 99 : 736-42.
40. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggini A, Monti S, Ciardullo C, *et al.* Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013 ; 121 : 1403-12.
41. 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.
42. Tam CS, Shanafelt TD, Wierda WG, Abruzzo LV, Van Dyke DL, O'Brien S, *et al.* De novo deletion 17p13.1 chronic lymphocytic leukemia shows significant clinical heterogeneity : the M. D. Anderson and Mayo Clinic experience. *Blood* 2009 ; 114 : 957-64.

43. Delgado J, Espinet B, Oliveira AC, Abrisqueta P, de la Serna J, Collado R, *et al.* Chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion : a retrospective analysis of prognostic factors and therapy results. *Brit J Haematol* 2012 ; 157 : 67-74.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. Rossi D, Khiabani H, Spina V, Ciardullo C, Brusca A, Fama R, *et al.* Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014 ; 123 : 2139-47.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. Ouilliet P, Fossum S, Parkin B, Ding L, Bockenstedt P, Al-Zoubi A, *et al.* Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 2010 ; 16 : 835-47.
52. Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, Bingman A, Flynn JM, Grever MR, *et al.* Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Brit J Haematol* 2012 ; 159 : 82-7.
53. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, *et al.* Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011 ; 144 : 27-40.
54. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, Dicker F, Bayer K, Grossmann V, *et al.* SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia* 2014 ; 28 : 108-17.
55. Shedden K, Li Y, Ouilliet P, Malek SN. Characteristics of chronic lymphocytic leukemia with somatically acquired mutations in NOTCH1 exon 34. *Leukemia* 2012 ; 26 : 1108-10.
56. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, Alder H, Rassenti LZ, Kipps TJ, *et al.* NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012 ; 119 : 329-31.
57. Messina M, Del Giudice I, Khiabani H, Rossi D, Chiaretti S, Rasi S, *et al.* Genetic lesions associated with chronic lymphocytic leukemia chemo-refractoriness. *Blood* 2014 ; 123 : 2378-88.
58. Rigolin GM, Cibien F, Martinelli S, Formigaro L, Rizzotto L, Tammiso E, *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 : 2310-3.
59. 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.