

UNIVERSITE DE LILLE 2

FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2019

THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Mise en place d'un panel de quantification de la maladie résiduelle
par cytométrie en flux multiparamétrique dans la Leucémie
Lymphoïde Chronique**

Présentée et soutenue publiquement le 09 Octobre 2019 à 16h
au Pôle Formation
par Alan APETE

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME

Assesseurs :

Madame le Professeur Myriam LABALETTE

Monsieur le Professeur Laurent PASCAL

Monsieur le Docteur Florent DUMEZY

Directrice de thèse :

Madame le Professeur Agnès CHARPENTIER

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Table des matières

<u>I- GENERALITES</u>	11
I.1- La leucémie lymphoïde chronique	11
I .1.1- Définition	11
I.1.2- Epidémiologie	11
I.1.3- Facteurs prédisposants	11
I.1.4- Diagnostic clinique de LLC	12
I.1.5- Diagnostic biologique de LLC	12
I.1.6- Facteurs pronostiques	17
I.1.7- Complications	20
I.1.8- Physiopathologie de la LLC	21
I.1.9- Traitements utilisés dans la LLC	31
I.2- Evaluation de la réponse au traitement.....	37
Critères de réponse en routine	37
I.3- La maladie résiduelle (MRD)	38
I.3.1- Quelques définitions	38
I.3.2- Intérêt de la détection de la maladie résiduelle	39
I.3.3- Place de l'évaluation de la MRD dans le parcours thérapeutique de la LLC	42
1.3.4- Méthodes d'évaluation de la maladie résiduelle dans la LLC	44
I.3.5- Détection de la maladie résiduelle dans la LLC par cytométrie en flux	45
I.3.6- Limites du test de détection de la MRD par cytométrie en flux	49
I.3.7- Nombre de cellules à analyser pour la détection de la MRD-LLC	52
I.3.8- Analyse des résultats de MRD en cytométrie	54
I.4 - Présentation du panel de cytométrie à tester pour la détection de la MRD-LLC	55
I.5- Proposition de nouvelles approches d'analyse de la MRD : les méthodes automatiques	58
<u>II. Contexte de l'étude</u>	64
II.1- Rationnel de l'étude	64
II.2- Objectifs de l'étude	66
<u>III- Matériel et méthodes</u>	67
III.1- Population de l'étude	67
III.2- Comparaison de la détection de la MRD de la MRD dans la LLC par deux panels d'anticorps. 71	
III.2.1- Détection de la MRD dans la LLC avec le panel LLC classique	71
III.2.2- Détection de la MRD dans la LLC avec le panel MRD-LLC	74
III.3- Analyse des données sur flowSOM	81
IV. Résultats	82
IV.1- Panel LLC-classique	82

IV.1.1- Spécificité du panel LLC classique	82
IV .1.2- Sensibilité mesurée de détection des cellules résiduelles : panel LLC Classique	82
IV.2- Panel MRD-LLC.....	85
IV.2.1- Volume d’anticorps nécessaire	85
IV.2.2- Spécificité du panel MRD-LLC	89
IV.2.3- Sensibilité mesurée de détection des cellules résiduelles : panel MRD-LLC	95
IV.4- Comparaison de la quantification des cellules résiduelles par les 2 panels de cytométrie	97
IV.5- Comparaison pour la quantification de la maladie résiduelle en cytométrie en flux avec celle en biologie moléculaire	100
IV.3- Pour Aller plus loin : stratégies de « gating » alternatives	101
IV .3.1- Les populations de pré-ciblage	101
IV.3.2- FlowSOM	104
IV.6- Validation du panel MRD-LLC	111
IV.6.1- Répétabilité de mesure du panel	111
IV.6.2- Test de contamination	113
V. Discussion.....	114
V.1- Résultats obtenus	114
V.2- Contraintes de réalisation des tests : du point de vue technique	115
V.2.1- Choix de la lyse macrovolume	115
V.2.2- Marqueurs d’exclusion (exemple : cas des cellules NK)	116
V.2.3- Limite de détection du panel MRD-LLC	116
V.2.4- Contraintes de réalisation des dilutions pour les panels	116
V.3- Moyens d’améliorations du panel MRD-LLC.....	117
V.3.1- Amélioration de la sensibilité du panel MRD-LLC :	118
V.3.2- Amélioration de la spécificité du panel MRD-LLC	118
V.3.3- Apport de FlowSOM et des logiciels automatiques	121
V.5- Perspectives	125
VI. Conclusion	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Frottis sanguin de cellules de LLC avec ombres de Gümprecht	13
Figure 2 : Schéma de la voie du BCR	22
Figure 3: Interactions entre les cellules de LLC et le micro-environnement lymphoïde et effets des IBTK.....	25
Figure 4 : Recommandations de l'iwCLL sur la 1ère ligne de traitement d'après B. EICHHORST	35
Figure 5 : Suggestion de prise en charge des patients avec une LLC en rechute/réfractaire (d'après Hallek & al)	36
Figure 6 : Exemples de la cinétique de la MRD dans les hémopathies	40
Figure 7 : Evolution de la survie sans progression (PFS) au cours du temps en fonction du résultat de la MRD chez des patients atteints de LLC et traités par RFC. D'après EHA Library. Letestu R. Jun 16, 2018; 215408; PS1094	41
Figure 8 : Répartition des taux de réponse partielle/complète médullaire selon la durée du traitement à 3, 6, 9 et 12 mois (58).....	43
Figure 9 : Principe d'analyse d'un cytomètre en flux	46
Figure 10 : Spectre de fluorescence des fluorochromes	47
Figure 11 : Présentation de la variabilité inter-opérateur d'une étude multicentrique pour des valeurs proches des limites du test en CMF	51
Figure 12 : Liste d'une sélection d'anticorps testés dans la LLC selon la confiance accordée par les groupes d'étude	56
Figure 13 : Exemple de moyens d'analyse automatique des données de cytométrie de masse en fonction des objectifs (65).....	60
Figure 14 : Principe de fonctionnement de flowSOM (S. Van Gassen & al, Ghent University (2014)) .	62
Figure 15 : Aperçu d'une analyse leucocytaire par immunophénotypage sur flowSOM (via R).....	62
Figure 16 : Exemple d'interprétation d'un cluster lymphocytaire chez la souris, selon ses marqueurs (sur flowSOM).....	63
Figure 17 : Schéma de réalisation d'une série de dilution pour déterminer la sensibilité du panel LLC-classique	74
Figure 18: Schéma explicatif d'une série de dilution après l'étape de lyse.	79
Figure 19: Exemple d'identification d'une population de LLC avec le panel LLC-classique	82
Figure 20: Graphe d'un résultat pour une dilution au 1/10 ⁴ ème avec le panel LLC-classique.....	83
Figure 21: Décroissance des cellules de LLC en fonction des dilutions pour le panel LLC-classique	83
Figure 22: Exemple de graphes après dilution d'un échantillon LLC pour le panel LLC-classique (monotypie kappa)	84
Figure 23: Comparaison d'un échantillon de sang marqué avec le panel MRD-LLC avec des volumes décroissants d'anticorps.....	86
Figure 24: Représentation monoparamétrique des populations lymphocytaires chez un patient ayant une LLC à partir du panel MRD-LLC.....	87
Figure 25: Cartographie schématique de la répartition cellulaire de différentes populations (lymphocytes non NK et monocytes) en présence de cellules de LLC avec le panel MRD-LLC. Les cellules résiduelles de LLC sont dénombrées dans le graphe F qui correspond à la booléenne des cellules de LLC dans les graphes A à E.	88
Figure 26: Détail des résultats de test du panel MRD-LLC chez des patients non LLC.....	90
Figure 27 : Exemple de profils d'autres syndromes lymphoprolifératifs B avec le panel MRD-LLC	94
Figure 28: Cas d'une série de dilution d'échantillon d'un patient atteint de LLC avec le panel MRD-LLC	95

Figure 29: Corrélacion entre le nombre de cellules attendues et mesurées pour une série de dilution (panel MRD-LLC).....	96
Figure 30: Corrélacion de la MRD entre le panel LLC-classique et le panel MRD-LLC.....	99
Figure 31: Cas de recherche cellules de LLC selon la technique de pré-ciblage	103
Figure 32 : Série de graphes de comparaison du gating manuel avec le gating automatique (FlowSOM) pour le panel LLC classique et le panel MRD LLC	110
Figure 33: Test de répétabilité d'une série pour le panel MRD-LLC.....	111
Figure 34: Séries de test de répétabilité pour le panel MRD-LLC (cas d'évènements rares, faibles quantifiables et facilement quantifiable)	112
Figure 35: Expression des lymphocytes notamment T, B et de LLC sur le CD5 et le CD79b, le CD22 ou le CD22+CD79b.....	120

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Score du Royal Marsden Hospital (Matutes et Moreau). Le score de la population lymphocytaire s'étend de 0 à 5.	14
Tableau 2: Formes frontières de la LLC	14
Tableau 3: Profil d'expression des syndromes lymphoprolifératifs B	15
Tableau 4 : Classification pronostique de Binet selon le stade clinico-biologique	17
Tableau 5 : Survie globale à 5 ans selon le score CLL-IPI.....	18
Tableau 6 : Principales anomalies cytogénétiques retrouvées dans la LLC	27
Tableau 7 : Intérêt de différents traitements dans la LLC.....	32
Tableau 8: Taux de réponse et efficacité de différents traitements au cours de la LLC	33
Tableau 9 : Techniques de biologie moléculaire de détermination de MRD	44
Tableau 10: Caractérisation de la technique d'immunophénotypage concernant la MRD	49
Tableau 11 : Nombre théorique de cellules à analyser selon la fréquence de l'évènement recherché et le coefficient de variation. Issu de la présentation Suivi de la maladie résiduelle dans la leucémie lymphoïde chronique à la JFPC-AFC de juin 2018. Dr Letestu. Les valeurs sur fond rouge correspondent aux nombres d'évènements à acquérir incompatibles avec une analyse de cytométrie dans les conditions pratiques.	53
Tableau 12 : Intérêt individuel des molécules du panel à tester dans le MRD-LLC	57
Tableau 13 : Répartition des populations de l'étude selon l'âge	69
Tableau 14 : Répartition des populations de l'étude selon la pathologie.....	69
Tableau 15: Caractéristiques au moment du diagnostic des patients atteints de LLC et faisant l'objet d'une recherche de MRD.....	70
Tableau 16 : Caractéristiques des réactifs d'anticorps utilisés pour le panel LLC-classique	71
Tableau 17 : Liste des réactifs d'anticorps utilisés pour le panel MRD-LLC	75
Tableau 18 : Profil d'expression des leucocytes par anticorps du panel MRD-LLC.....	76
Tableau 19: Composition du groupe de patients non LLC utilisés pour la spécificité du panel MRD-LLC	89
Tableau 20: Limites calculées du panel MRD-LLC	91
Tableau 21: Résultat de la mesure de la MRD avec le panel LLC classique et le panel MRD-LLC pour des patients malades.....	97
Tableau 22: Série de tests de contamination du panel MRD-LLC	113
Tableau 23: Intérêt de marqueurs additionnels pour le panel MRD-LLC.....	121

Liste des abréviations

ASO-PCR : allele-spécifique-oligonucléotide polymérase chain reaction

ATM : ataxia telangiectasia mutated

BCL2 : B-cell lymphoma 2

BCR : B-cell receptor

BIRC3 : baculoviral IAP repeat containing 3

BTK : Bruton tyrosine-kinase

CSH : cellule souche hématopoïétique

ERIC : European Research Initiative on CLL

FILLO : French Innovative Leukemia Organization

FISH : fluorescence in situ hybridation

ICT : immunochimiothérapie

IGHV : gène codant pour la partie variable de la chaîne lourde des immunoglobulines

IWCLL : international workshop on chronic lymphocytic leukemia

LBDGC : lymphome B diffus à grandes cellules

LL : lymphome lymphocytaire LLC : leucémie lymphoïde chronique

MBL : lymphocytose B monoclonale

MRD : minimal residual disease ou maladie résiduelle minimale

MYD88 : myeloid differentiation primary response 88

NF- κ B : nuclear factor kappa B

NK : natural killer

OS : overall survival (survie globale)

PCR : polymérase chain reaction

PI3K : phosphatidyl-inositol-3-kinase

RB : Rituximab-Bendamustine

RC : réponse complète RCi : réponse complète avec récupération hématologique incomplète

RFC : Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide

RP : réponse partielle

SF3B1 : splicing factor 3b subunit 1

TEP : tomographie par émission de positons

ZAP-70 : zeta-associated protein 70

I- GÉNÉRALITÉS

I.1- La leucémie lymphoïde chronique

I.1.1- Définition

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie à cellules B matures caractérisée par l'accumulation de petits lymphocytes B monoclonaux matures dans le sang, la moelle osseuse et les organes hématopoïétiques secondaires (OMS 2016). Les lymphocytes B de LLC présentent un immunophénotype B CD5+ caractéristique. Leur accumulation résulte à la fois d'un défaut d'apoptose et d'une prolifération excessive. La LLC évolue généralement de manière chronique avec une présentation indolente (espérance de vie la plus souvent celle de la population générale) (1).

I.1.2- Epidémiologie

Il s'agit de la leucémie la plus fréquente chez l'adulte mais elle demeure rare en représentant moins de 1% de l'ensemble des cancers. Elle touche préférentiellement les sujets de sexe masculin (sex ratio d'environ 2/3) avec un âge médian au diagnostic de 70 ans chez l'homme et 72 ans chez la femme.

I.1.3- Facteurs prédisposants

Dans la majorité des cas, il est observé un état pré-LLC appelé Lymphocytose B monoclonale (MBL), et parfois des facteurs génétiques individuels et des facteurs héréditaires.

On note une incidence plus élevée de LLC dans la population caucasienne que asiatique (1). De plus, le risque pour des apparentés au premier degré de patient porteur de LLC de

développer un SLB est augmenté, également dans le cas de jumeaux monozygotes. On retrouve chez 8-10% des patients une histoire familiale (2-4). Des polymorphismes nucléotidiques seraient impliqués dans ces formes familiales(5).

I.1.4- Diagnostic clinique de LLC

La majorité des patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic. Le diagnostic de LLC peut être posé :

- Fortuitement dans plus de 50% des cas : découverte d'une hyperlymphocytose $>5G/L$ sur un hémogramme réalisé à titre systématique.
- A l'occasion de la découverte d'un syndrome tumoral : adénopathies +/- multiples, bilatérales symétriques, fermes, indolores, mobiles et non inflammatoires ; splénomégalie (50-75% des cas).
- Plus rarement, suite à des complications infectieuses ou des cytopénies.

I.1.5- Diagnostic biologique de LLC

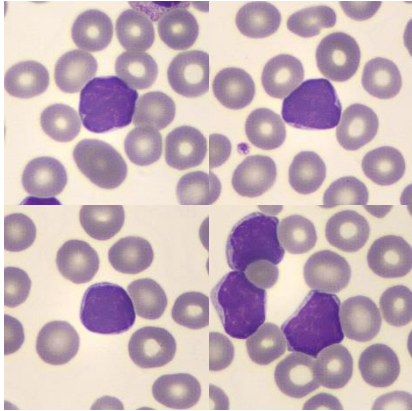
I.1.5.a- Hémogramme avec analyse cytologique du frottis sanguin

Les hémogrammes montrent la persistance d'une hyperlymphocytose $> 5G/L$, stable ou en augmentation, depuis plus de 3 mois consécutifs.

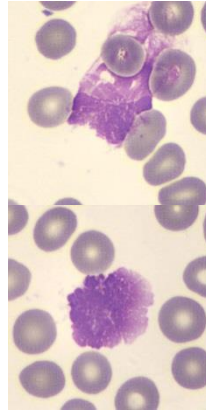
Par ailleurs, une anémie et/ou une thrombopénie peuvent s'observer, définissant des formes de plus mauvais pronostic (cf. infra).

L'aspect cytologique du frottis sanguin est indispensable et met en évidence, dans la forme typique, une population de cellules lymphocytaires matures de petite taille, d'aspect monomorphe, pouvant être accompagnées d'un nombre élevé de lymphocytes éclatés

(nommés ombres de Gümprrecht) (figure 1). Les ombres de Gümprrecht correspondent à des cellules altérées et réduites à l'état de noyaux nus ou ombres cellulaires lors de la réalisation des frottis sanguins. Les lymphocytes de LLC peuvent être associés à une proportion de prolymphocytes inférieure à 10%.



Cellules de LLC : petits lymphocytes matures d'aspect monomorphe, de chromatine dense et mottée avec peu de cytoplasme



Ombres de Gümprrecht : cellules de LLC éclatées à la réalisation du frottis

Figure 1 : Frottis sanguin de cellules de LLC avec ombres de Gümprrecht

1.1.5.b- Immunophénotypage des lymphocytes sanguins

L'analyse immunophénotypique par cytométrie en flux est nécessaire pour porter le diagnostic de LLC. Les cellules de LLC, issues de la lignée lymphocytaire B, expriment classiquement un profil B CD5+ atypique : CD5+, CD19+, CD23+, FMC7-, associé à des expressions faibles en CD20, CD22 et CD79b. La nature monotypique des cellules B est mise en évidence par une restriction isotypique des chaînes légères d'Ig Kappa ou Lambda, de faible intensité. Le score de Matutes est un outil permettant d'orienter le diagnostic de LLC. Il est présenté dans le tableau 1 et attribue des points selon le profil d'expression des marqueurs suivants :

Antigène / point accordé	1	0
Ig de surface	faible	modérée / forte
CD5	+	-
CD23	+	-
CD22 (ou CD79b)	- / faible	forte
FMC7	-	+

Tableau 1 : Score du Royal Marsden Hospital (Matutes et Moreau). Le score de la population lymphocytaire s'étend de 0 à 5.

Un score de Matutes à 4 ou 5 est fortement en faveur du diagnostic de LLC classique.

Un score à 3 avec un profil CD5+, CD23+, CD43+, CD20+ faible et une absence d'expression de la cycline D1 est en faveur d'une LLC. Sinon on parle de LLC atypique.

Un score entre 0 et 2 écarte, en règle générale, le diagnostic de LLC.

Il existe des formes frontières de LLC dans lesquelles la lymphocytose est inférieure au seuil de 5G/L, tout en étant constituée de lymphocytes de morphologie et de profil phénotypique évocateurs de LLC. Selon l'existence ou non d'un syndrome tumoral, cette situation devra faire évoquer une Lymphocytose B monoclonale (MBL) ou un passage sanguin de cellules de lymphome lymphocytaire (tableau 2).

Hyperlymphocytose, lymphocytes B < 5G/L mais population caractéristique de LLC	ET absence de signes généraux, cytopénies ou syndrome tumoral (ADP, SMG)	MBL : Monoclonal B Lymphocytosis -High count MBL (HcMBL) : cellules de LLC entre 0.5 et 5G/L -Low count MBL (LcMBL) : (cellules de LLC inférieures à 0.5G/L)
	ET syndrome tumoral sans cytopénie par envahissement médullaire	Lymphome lymphocytaire

Tableau 2: Formes frontières de la LLC

La Lymphocytose B monoclonale (MBL) est une nouvelle entité de la classification OMS 2016 et est définie comme la présence d'une population B monoclonale circulante avec moins de 5G/L de lymphocytes sanguins de phénotype LLC et l'absence de signes tumoraux. On considère que toutes les LLC sont potentiellement précédées par une MBL, souvent passée inaperçue. A l'inverse, toutes les MBL n'évoluent pas en LLC. En effet, seules les MBL de nombre élevé (HcMBL : 0.5 à 5G/L) ont un risque de progression en LLC. Ce risque est estimé à 1 à 2% par an et nécessite une surveillance annuelle des seuls patients présentant une MBL de nombre élevé (6).

Diagnostic différentiel de LLC

Les autres syndromes lymphoprolifératifs B présentent une morphologie lymphocytaire ainsi qu'un profil immunophénotypique différents de ceux des cellules de LLC. Le tableau 3 résume les différentes caractéristiques immunophénotypiques des autres syndromes lymphoprolifératifs B, afin de permettre le diagnostic différentiel de LLC.

	LLC	LPL-B	MCL	FL	SMZL/SLVL	HCL	MW
CD19	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	+/-	+	-	+/-	-	-
Ig	faible ou -	+++	+	+	+++	+++	+
CD23	+	-	-	+/-	+/-	-	-
CD79b	faible/-	++	+	+	+	+	+
CD22	faible/-	+	+	+	+	++	+
CD20	faible	+	+	+	+	+	++
FMC7	faible ou -	+	+	+	++	++	+/-
CD43	++	-	+	-	+/-	+/-	-
CD10	-	-/+	-	+/-	-	-/+	-
CD11c	-/+	-	-	-	+/-	+	-
CD103	-	-	-	-	-/+	+	-
CD123	-	-	-	-	-	+	-
CD25	-/+	-	-	-	+/-	+	+

Tableau 3: Profil d'expression des syndromes lymphoprolifératifs B

LLC : leucémie lymphoïde chronique ; LPL-B : leucémie prolymphocytaire B ; MCL : lymphome du manteau ; FL : lymphome folliculaire ; SMZL/SLVL : Lymphome de la zone marginale, HCL : leucémie à tricholeucocytes, MW : Maladie de Waldenström.

Dans la majorité des cas, l'hémogramme et le typage lymphocytaire par cytométrie suffisent à évoquer le diagnostic de LLC, qui repose sur les recommandations de l'IWCLL 2018 (International Workshop on Chronic lymphocytic leukemia) (7). Les principaux critères sont :

- une lymphocytose B ≥ 5 G/L persistante au moins 3 mois,
- de caractère clonal mis en évidence par restriction isotypique des chaînes légères des immunoglobulines (de faible intensité) par cytométrie en flux,
- de caractéristiques phénotypiques de LLC. Des marqueurs additionnels (CD43, CD81, CD200, CD10, ROR1) ont été ajoutés dans les nouveaux critères iwCLL de 2018.

1.1.5.c- Examens biochimiques

Certains autres examens sont nécessaires dès le diagnostic posé pour rechercher d'éventuels signes avancés de LLC :

- Une électrophorèse des protéines à la recherche d'une hypogammaglobulinémie (présente chez 10% des patients au diagnostic (>50% après 10 ans)). Cet examen peut mettre en évidence un pic d'Ig monoclonale (10% des cas) majoritairement à IgM mais <5g/L. Dans 30% des cas, une protéinurie de Bence Jones à faible concentration est observée.
- Un test de Coombs direct : celui-ci est positif dans 10-15% des cas, de type IgG ou de type Complément.

D'autres examens sont réalisables selon le contexte (β 2-microglobuline et LDH pouvant être augmentés selon la masse tumorale, bilan d'hémolyse...).

I.1.6- Facteurs pronostiques

La LLC a une évolution hétérogène selon les patients et il est important de classer ces derniers pour justifier la prise en charge. Les traitements sont potentiellement lourds pour le terrain (âge, comorbidités) et facteurs de risque d'émergence de formes résistantes.

Nous citerons 2 scores pronostiques utiles :

- La classification de Binet (8) communément utilisée en France et donnant une estimation de la survie médiane en fonction de critères clinico-biologiques facilement accessibles :

Pronostic	Stade	Critères de définition		Survie médiane (années)	% des LLC	
Bon	A	<3 aires ganglionnaires	Pq >100 G/L	Lymphocytose <30G/L ; Hb>12g/dL (stade A')	>10	49%
				Lymphocytose >30G/L ; 10g/dL < Hb < 12g/dL (stade A'')	7	14%
Intermédiaire	B	Au moins 3 aires ganglionnaires		Lymphocytose ; Hb>10g/dL	5	30%
Mauvais	C	Quelques soit le nombre		Lymphocytose ; Hb < 10g/dL et/ou Pq < 100 G/L	2	7%
5 aires ganglionnaires : tête + cou, creux axillaire, région inguinale, hépatomégalie, splénomégalie						

Tableau 4 : Classification pronostique de Binet selon le stade clinico-biologique

- le score CLL-IPI (Chronic Lymphocytic Leukemia – International Prognostic) qui étudie la survie à 5ans des patients par groupe à risque. Les différents paramètres ont des valeurs pronostiques différentes (tableau 5).

Valeur des variables

Variable	critère	valeur
<i>TP53</i>	Déléte ou muté	4
<i>IGHV</i>	Non muté	2
β 2microglobuline	>3,5 mg/L	2
Stade clinique	Binet B ou C	1
Age	>65 ans	1

La somme des variables détermine les groupes pronostics :

Groupe	Score	OS à 5ans
Bas risque	0-1	93,2%
Risque intermédiaire	2-3	73,3%
Haut risque	4-6	63,3%
Très haut risque	7-10	23,3%

Tableau 5 : Survie globale à 5 ans selon le score CLL-IPI (OS : survie globale)

De nombreux facteurs pronostics ont été identifiés dans la leucémie lymphoïde chronique.

Ceux indépendants de la survie globale sont (8) :

- une anomalie 17p
- une anomalie 11q
- un taux de β 2-microglobuline > 3,5 mg/L
- un statut mutationnel non muté des gènes codant pour la partie variable de la chaîne lourde des Ig (*IGHV*)
- un temps de doublement des lymphocytes <12 mois
- l'âge >60 ans.

D'autres facteurs pronostics également non négligeables peuvent être recherchés et conditionner la prise en charge :

- L'expression du CD38 par les cellules de LLC : glycoprotéine transmembranaire exprimée à des moments clés du développement des lymphocytes B. La moitié des cas de LLC CD38+ sont associés à un mauvais pronostic. Il s'agit d'un facteur indépendant de la mutation du gène *IGVH*.
- L'expression de ZAP-70 par les cellules de LLC : protéine intracytoplasmique de 70 kDa (zêta associated protein 70), exprimée par les lymphocytes T et NK. Elle se fixe aux récepteurs cellulaires après activation de ceux-ci et favorise les réactions de phosphorylation à l'origine des voies de signalisation. Sa présence au niveau des cellules de LLC est un facteur prédictif de progression vers les formes agressives. Les hypothèses retenues pour expliquer cette relation(9) sont :
 - une augmentation de la réactivité du BCR (une stimulation plus efficace avec un taux trois fois plus important qu'en absence de Zap70),
 - une protection contre les phénomènes d'apoptose (par l'interaction avec la protéine chaperonne Hsp90),
 - une augmentation des phénomènes de migration et de survie.

La protéine ZAP-70 est exprimée dans 40-50% des cas de LLC. Lors d'une étude de cohorte réalisée en 2003, l'étude de l'expression du gène de ZAP-70 permettait de prédire le sous-type de LLC selon le statut muté du gène *IGVH* dans 93% des cas. En effet l'expression de ZAP-70 était en moyenne 5.5 fois plus élevée chez les patients atteints de LLC avec le gène des immunoglobulines non muté par rapport aux patients atteints de LLC de profil muté pour les immunoglobulines (différence statistiquement significative $p < 10^{-21}$ pour 28 patients) (10).

Elle peut également être retrouvée dans d'autres lymphomes non hodgkiniens comme le lymphome du manteau ou le lymphome T périphérique (11).

I.1.7- Complications

Certains patients peuvent développer des complications :

- Infections à répétitions à tropisme bronchique ou sinusien, secondaires à l'hypogammaglobulinémie et/ou à la neutropénie. Il s'agit de la principale cause de décès. Les infections peuvent être bactériennes (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*), virales ou opportunistes (candidoses, aspergillose, pneumocystose). En prévention, les patients bénéficient souvent d'injection d'immunoglobulines polyvalentes en période hivernale.
- Aggravation de l'insuffisance médullaire (anémie, thrombopénie, neutropénie).
- Manifestations auto-immunes : elles sont rares (de l'ordre de 1 à 7%) et on retrouve par ordre de fréquence décroissant, les anémies hémolytiques auto-immunes (AHAI), les thrombopénies auto-immunes et les érythroblastopénies auto-immunes(12).
- Evolution en leucémie prolymphocytoïde plus agressive (augmentation de la fraction de prolymphocytes à plus de 10%).
- Syndrome de Richter : correspond à la survenue d'un lymphome de haut grade de malignité. Cette complication affecte 5% des patients atteints de LLC et survient 2 à 8 ans après le diagnostic initial de LLC stable ou peu active. Les manifestations classiques sont une altération rapide de l'état général et une polyadénopathie rapidement progressive confirmée au TEP-scan. On retrouve principalement deux formes agressives : un lymphome B diffus à grande cellules (90% des cas) ou un lymphome de Hodgkin (10%). La survie est généralement inférieure à 1an.

- Cancers secondaires : il existe un risque de syndrome myélodysplasique et de Leucémie Aiguë Myéloïde après une immuno-chimiothérapie (ICT) avec analogue de purine d'environ 5% et plus élevé après autogreffe de CSH(13). De plus, environ 10-15% des patients atteints de LLC développent une tumeur solide non hématopoïétique (cancers épithéliaux digestifs, broncho-pulmonaires, cutanés....).

I.1.8- Physiopathologie de la LLC

On a longtemps considéré que le principal mécanisme en jeu dans l'apparition du clone de cellules de LLC était un défaut d'apoptose de cellules B quiescentes, conduisant à une accumulation cellulaire. En effet, l'étude des cellules de LLC met en évidence l'inactivation de nombreuses voies d'apoptose et la surexpression de protéines anti-apoptotiques(14). Néanmoins, des études réalisées in vivo ont établi que chez les patients progressifs, la prolifération était à la base de l'accumulation du clone, avec un renouvellement cellulaire jusqu'à 1% du clone par jour (15). Par ailleurs, cette prolifération a lieu au contact d'un microenvironnement, situé en particulier au niveau ganglionnaire, expliquant ainsi la corrélation entre masses ganglionnaires et progressivité de la maladie.

1.1.8.a- La signalisation B normale

Les cellules B possèdent un récepteur à l'antigène, le BCR, centré sur une immunoglobuline formée d'une partie constante et d'une partie variable, formées de différentes combinaisons de segments V, D, J pour la chaîne lourde et V et J pour la chaîne légère. Ces différentes combinaisons permettent de constituer des BCR différents d'un lymphocyte B à l'autre, leur permettant de reconnaître un très important répertoire antigénique. A l'issue de la lymphopoïèse, lorsque les cellules B naïves (n'ayant jamais été exposées à l'antigène) pénètrent dans le centre germinatif, elles vont être exposées aux antigènes, en présence de

cellules T. La reconnaissance de l'antigène par le BCR aboutit à la prolifération des cellules B. Les lymphocytes B deviennent alors soit des plasmocytes capables de sécréter des anticorps, soit des cellules B mémoires. Cette transformation est possible grâce à l'acquisition de mutations somatiques dans les chaînes des immunoglobulines. La Figure 2 montre le début des voies de signalisations initiées par la stimulation du BCR.

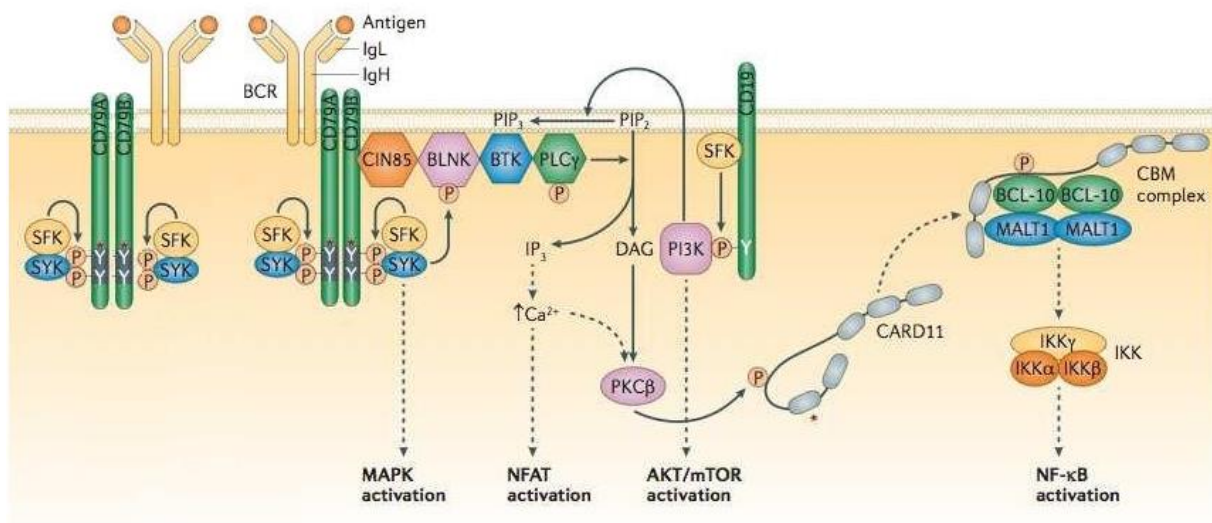


Figure 2 : Schéma de la voie du BCR

Image d'après *Nature Reviews Drug Discovery* volume12, pages229–243 (2013)

La stimulation antigénique permet d'activer différentes voies de signalisation de prolifération, survie cellulaire et réponse immunitaire (mTOR, NF-κB, MAPK, NFAT...).

1.1.8.b- Rôle de l'exposition de l'antigène dans la LLC

Au cours de la genèse de la LLC, la sélection du clone leucémique serait favorisée par une exposition préalable du BCR à un antigène particulier (auto-Ag ou xéno-Ag). La sélection clonale de quelques-uns des lymphocytes B aboutit à la phase de MBL. Des événements oncogéniques additionnels provoquent ensuite l'expansion de cette MBL en LLC, aboutissant à l'accumulation de cellules B mémoire : les cellules de LLC (16).

Même si ce sont toutes des cellules B mémoire, les cellules de LLC se répartissent en deux catégories :

- dans la moitié des cas, les gènes des chaînes des régions variables des chaînes lourdes des Immunoglobulines (*IGVH*) sont mutés. Ceci correspond à un mécanisme de maturation T helper dépendant dans le centre germinatif (au niveau des cellules B, le phénomène d'hypermutation somatique favorise la modulation de la réactivité du BCR à divers stimuli. Il en résulte une activation des voies de signalisation en cas de liaison à un antigène spécifique de haute affinité). Ce groupe de patients a une forme de maladie le plus souvent peu évolutive.
- Dans l'autre moitié des cas, les gènes *IGHV* n'ont pas acquis de mutations somatiques. Dans ce cas, le mécanisme de maturation serait T indépendant et non centro germinatif. Ce groupe de patients développe une LLC agressive (probablement dû à une réactivité accrue et plus fréquente pour des antigènes variés et de faible affinité).

Les formes de LLC avec le gène *IGVH* muté des cellules malignes circulantes présentent une homologie de moins de 98% par rapport à une séquence dite germinale (qui est reconnaissable pour un patient). Une homologie de séquence supérieure à 98% définit la forme non mutée.

La majorité des lymphocytes de LLC a une vie longue et est en phase quiescente 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) (16,17)

1.1.8.c- Rôle du microenvironnement

Les deux sites de prolifération des cellules de LLC sont la moelle osseuse et préférentiellement les pseudo-follicules au sein des ganglions (18,19). Le microenvironnement médullaire et ganglionnaire joue un rôle important dans la survie et la prolifération des cellules de LLC. Les cellules de LLC expriment fortement des L-sélectines et de l'intégrine CD49d favorisant la migration, l'adhésion de celles-ci aux veinules endothéliales d'accès au microenvironnement (20). Une fois dans le microenvironnement (de la moelle ou des pseudofollicules ganglionnaires), elles interagissent avec des cellules spécialisées : les cellules stromales mésenchymateuses (dans la moelle), les cellules dendritiques folliculaires (zone folliculaire des ganglions) et les cellules « nurse-like » NLC (moelle et ganglions) notamment.

Ces cellules ont des rôles multiples dans la LLC :

- Chimiotactisme des cellules de LLC
- Adhésion et rétention des cellules dans le microenvironnement (21)
- Présentation d'antigène (T indépendante), prolifération tumorale, augmentation de la survie (via des cytokines) et échappement à l'apoptose (expliquant en partie la résistance aux drogues).

On remarque également l'attraction de lymphocytes T (surtout CD4+), de cellules NK devenant dysfonctionnelles et de monocytes se différenciant en NLC (22,23). Celles-ci participent également à l'évasion immune des cellules pathologiques (24,25).

Les cellules de LLC entretiennent de fortes interactions avec celles du micro-environnement. D'un point de vue thérapeutique, ces interactions constituent un frein à la rémission sous certaines molécules. Cependant, d'autres traitements comme les inhibiteurs du BRC (IBTK)

(voir partie traitement) ont une action sur les cellules malignes et accessoirement les cellules du système immunitaire perturbant ces interactions. Cela explique leur efficacité. Un aperçu de leur effet est également illustré sur la figure 3.

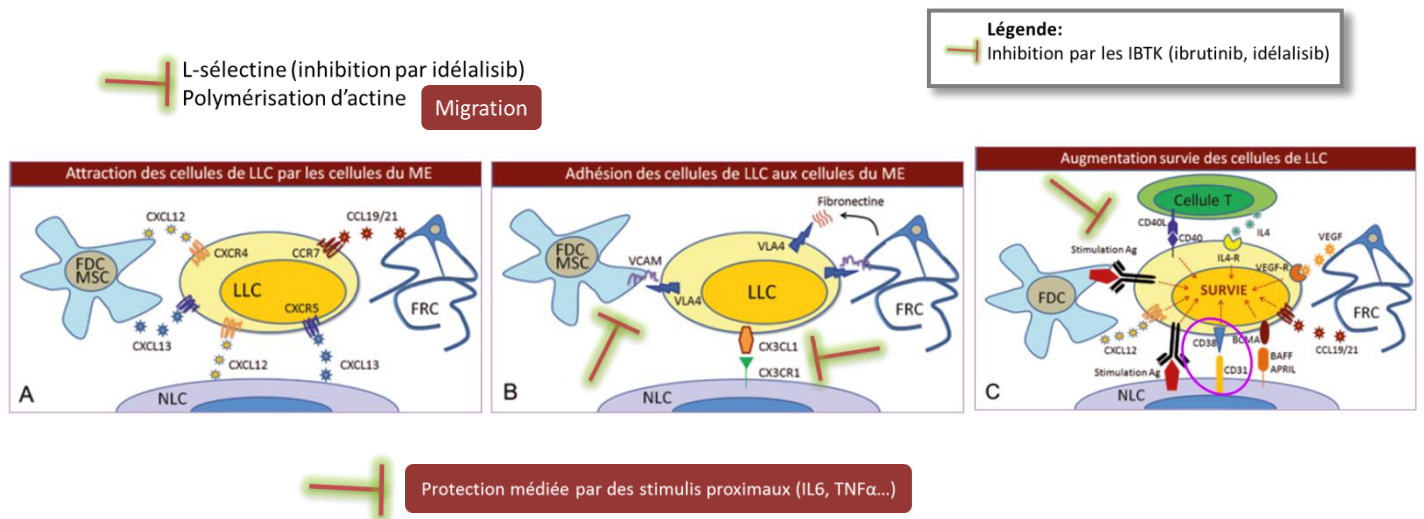


Figure 3: Interactions entre les cellules de LLC et le micro-environnement lymphoïde et effets des IBTK

Image d'après *Horizons Hémato Janvier-Mars 2012, Volume 2, n° 1* : Micro-environnement, D. Ledoux

La place de l'évaluation de l'expression du CD38 sur les cellules de LLC dans le bilan pronostic (voir partie « facteurs pronostics ») est expliquée par son rôle dans la survie de celles-ci favorisée par les cellules nurse-like (ellipse figure 3C).

Au sein du microenvironnement, les cellules de LLC sont soumises à une stimulation chronique : notamment par la présence d'antigènes endogènes divers, d'antigènes exogènes de nature protéique ou non protéique (agent infectieux). La réactivité des cellules à ceux-ci conditionne la forme indolente ou agressive de la maladie.

Il est retrouvé une grande hétérogénéité sous clonale dans la LLC (26,27). Cela explique la sélection de clones de différente sensibilité-aux traitements (28,29).

Il semblerait que des altérations génétiques et épigénétiques soient présentes au niveau des CSH pluripotentes (30) dont les manifestations seraient retrouvées lors de l'expansion clonale suite à la stimulation chronique au stade de lymphocyte.

Au cours de la Leucémie Lymphoïde Chronique, de nombreux mécanismes demeurent inconnus mais des anomalies fonctionnelles des cellules tumorales sont décrites. L'ordre de survenue de celles-ci reste à déterminer. Elles pourraient être présentes antérieurement (facteurs prédisposants) ou apparaître pendant la prolifération tumorale.

1.1.8.d- Anomalies cytogénétiques

L'étude du caryotype associé à la FISH (Interphase fluorescence in situ hybridization) sur les lymphocytes du sang périphérique permettent d'identifier des anomalies cytogénétiques dans plus de 80% des cas (31). A noter qu'un caryotype complexe, c'est-à-dire avec plus de 2 anomalies, sans particularité détectée à la FISH est également de mauvais pronostic.

Le tableau 6 présente les principales anomalies retrouvées dans la LLC (32) par ordre de fréquence avec des gènes d'intérêt susceptibles d'être impactés.

Anomalies cytogénétiques (fréquence %)	gène pouvant être atteinte	Implication	Apparition	Intérêt
Del13q14 (55%)	<i>MYD88</i>	Inflammation voie des TLR activation NF-κB	Hétérozygote : précoce, clonale Homozygote : secondaire	Meilleur pronostic si isolée (sauf grande délétion) Association au gène <i>IGVH</i> muté
tris12 (10-15%)	<i>NOTCH1</i> (risque de syndrome de Richter si associée)	signalisation	<i>NOTCH1</i> (Précoce, clonale) Mais tris12 souvent secondaire	Cellules de morphologie atypique (50% des cas) <i>NOTCH1</i> : moindre expression membranaire du CD20
Del11q22-23 (6-20%)	<i>ATM</i> (ataxia- telangiectasa mutated)	identification, réparation de l'ADN. En amont de p53.	Secondaire	Forte masse tumorale. Association <i>IGVH</i> non muté, instabilités génétiques Rechute plus précoce et/ou résistance accrue aux chimiothérapies
Del17p (5-8%)	<i>TP53</i> (suppresseur de tumeur)	Réparation ADN et cycle cellulaire	secondaire	Formes agressives/évoluées

Tableau 6 : Principales anomalies cytogénétiques retrouvées dans la LLC

Anomalies de mauvais (en rouge) et de bon pronostic (en vert).

TLR : Toll-Like Receptor.

Il semble exister des associations significatives entre les mutations et les anomalies cytogénétiques mais la fréquence de celles-ci diffèrent d'une étude à l'autre. Bien que l'on retrouve une association entre la del13q et une atteinte du gène *MYD88*, cette dernière est nettement plus rare dans la LLC que dans d'autres hémopathies comme la maladie de Waldenström.

Au diagnostic, il est recommandé de rechercher par FISH les del11q22 (*ATM*) et les del17p13(*TP53*) (obligatoire avant traitement) La mutation du gène *TP53* et/ou la délétion 17p permet d'identifier environ 29% des patients réfractaires ou à risque après traitement par Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide (RFC). Il existe d'autres mutations plus rares et également de mauvais pronostic comme les délétions del2p, del14q.

Au niveau cytogénétique, il existe une grande hétérogénéité sous-clonale en compétition pendant l'évolution de la maladie et les plus résistants sont sélectionnés par les traitements (mutation de *BTK* et *PLCG2* sous ibrutinib, de la famille *BCL-2* sous vénétoclax) (11,12).

Ainsi après traitement par RFC, la proportion des del17p par exemple augmente significativement tandis que celle des del13q, del11q, tris12 demeurent stables(33).

1.1.8.e- Anomalies moléculaires

La principale exploration moléculaire réalisée à visée pronostique chez les patients LLC est la détermination du statut mutationnel du gène *IGVH*. Ce statut traduit la capacité du clone tumoral à proliférer en réponse aux stimuli du microenvironnement et du BCR. Ce statut demeure indépendant du clone de LLC et reste constant au cours du temps (34,35) .

Le statut non muté des immunoglobulines est associé à de nombreuses anomalies :

- Un complexe BCR plus sensible et réactif à plusieurs antigènes (infectieux, autoanticorps...) surtout non protéiques.
- Une expression accrue de molécules telles que l'intégrine CD49d, les L-sélectines, le CD38 (survie par NLC), des immunoglobulines de surfaces notamment IgM, Zap70 (favorisant l'efficacité de la signalisation IgM)(36).
- De nombreuses anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (dont del17p, del11q).

D'autres anomalies moléculaires peuvent également être retrouvées par séquençage haut débit (NGS) : une atteinte du gène *TP53* (souvent par perte d'un allèle suite à la del17p, et mutation inactivatrice sur l'autre allèle (37)). La prévalence augmente au cours du traitement (sélection du clone muté). Peuvent également être retrouvés une absence de remaniement de *BCL1* ou une hyperexpression de la cycline D1, des mutations *SF3B1*, *BIRC3*...

Enfin, les cellules de LLC sont également caractérisées par une résistance à l'apoptose : la surexpression de protéines de survie dont BCL-2 (B-cell lymphoma 2) et la faible expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax (BCL-2-associated X protein).

1.1.8.f- Le système immunitaire dans la LLC

Divers mécanismes contribuent à la défaillance du système immunitaire au cours de la LLC :

- une hypogammaglobulinémie par les lymphocytes T et les cellules de LLC (via IL10),
- concernant l'immunité innée : un défaut d'activation, de présentation des antigènes et de production cytokinique par des monocytes (CD14+CD16++) et une diminution de cellules NK cytotoxiques,

- concernant l'immunité adaptative : l'hypogammaglobulinémie touchant surtout les IgG3 et les IgG4 avec une altération de la réponse T helper (faible efficacité vaccinale qui est partiellement améliorée par des vaccins conjugués),
- une augmentation des lymphocytes TCD4 et TCD8 avec une diminution du rapport CD4/CD8 sanguin au stade précoce de la maladie (recrutement des CD4 dans les centres prolifératifs) (38), altération des synapses immunologiques.

Pour récapituler

- Le diagnostic de Leucémie Lymphoïde Chronique repose sur un faisceau d'arguments notamment devant une lymphocytose B chronique (au moins 5G/L pendant 3 mois) présentant un immunophénotypage caractéristique dans la plupart des cas (score de Matutes ≥ 4).
- Certains examens peuvent s'avérer utiles en cas d'incertitude diagnostique et/ou avant traitement : une analyse par FISH associée au caryotype, le statut mutationnel *IGHV* en biologie moléculaire.
- D'autres examens sont également indicatifs dans le bilan de retentissement : EPS, test de Coombs...
- Le statut mutationnel de la chaîne lourde des immunoglobulines est associé à de nombreux facteurs pronostiques orientant dans la majorité des cas les formes indolentes et agressives de la pathologie.
- De nombreux mécanismes demeurent inconnus et cette pathologie est caractérisée par une hétérogénéité clonale. Le phénomène d'envahissement lymphocytaire résulterait d'un déséquilibre entre des phénomènes de prolifération secondaires à une stimulation chronique et un défaut d'apoptose.
- La prise en charge est conditionnée par les scores pronostiques comme le score CLL-IPI et la classification de Binet.

I.1.9- Traitements utilisés dans la LLC

La leucémie lymphoïde est d'évolution le plus souvent lente et ses formes d'évolution lui ont valu le qualificatif de « maladie des 3 tiers ». Ainsi, environ :

- 1/3 des patients ne nécessitent pas de traitement et meurent d'une autre cause que la LLC,
- 1/3 présentent une forme progressive nécessitant un traitement des années après le diagnostic,
- 1/3 présentent une forme d'emblée agressive nécessitant une prise en charge rapide, pouvant conduire à un état réfractaire, des complications infectieuses, auto-immunes et un décès.

Au cours des années, la leucémie lymphoïde chronique, est passée du stade de maladie incurable de traitement palliatif/symptomatique, à celui de maladie potentiellement progressive, avec possibilité de rémission complète de plus en plus prolongée, grâce aux nouveaux traitements (Plusieurs médicaments ont été testés et prouvé une efficacité variable).

Cependant, devant l'hétérogénéité des réponses, efficacité et effets indésirables, les molécules sont attribuées selon les indications et objectifs.

Le tableau 7 présente les effets des molécules retenues dans le traitement des patients atteints de LLC (39–41).

Choix de traitement	Propriété	indications	avantages	inconvénients
Chlorambucil	alkylant	Patients âgés, « unfit »	Faible coût/toxicité Prise orale	Long terme risque SMD
Immunochimiothérapie				
Rituximab	Anti-CD20	Sujets « fit »	Tolérance, synergie avec d'autres molécules+++	Moins efficace seul dans la LLC (faible expression)
fludarabine	Analogue de purine		Amélioration de la survie globale	Cytopénie (neutropénie), infections opportunistes
Cyclophosphamide	Alkylant		anti-néoplasique et immunomodulateur	Neutropénie
Bendamustine	Alkylant + propriétés d'analogue de purine	Patients âgés, « frail »	Meilleure tolérance rénale que la fludarabine	infections
Alemtuzumab	Anti CD52 humanisé	Patients réfractaires, stade avancé, 2 ^{ème} ligne après fludarabine	Action synergique avec la fludarabine sur del17p	Réactivation CMV Plus toxique que RFC (cytopénies prolongées) Peu efficace en cas d'adénopathie volumineuse
Inhibiteurs du BCR				
Ibrutinib*	Inhibiteur (irréversible) de la Bruton Tyrosine Kinase (BTK)	Patient en rechute ou réfractaire, même del17q(42)	Meilleur choix en 2 ^{ème} ligne (âgés, comorbidités)	Modalités d'arrêt de traitements, Saignement/FA, neutropénie, toxicité hépatique...
idélalisib	Inhibiteur PI3K delta		Alternative à l'ibrutinib	Diarrhées/colites grade 3 ou 4(43) Pneumocystoses...
Inhibiteurs du BCL-2				
Vénétoclax (ABT-199)	Inhibiteur du BCL-2	Rechute	Prise orale	Réponse durable (44)

Tableau 7 : Intérêt de différents traitements dans la LLC

« fit » : patient en forme pouvant supporter une chimiothérapie ; « frail » : patient fragile sans contre-indication à une chimiothérapie. « unfit » : sujet contre-indiqué à la chimiothérapie.

* : les patients sous ibrutinib présentent une lymphocytose commune avec un pic 4 semaines après le début du traitement. Chez 80% des patients, elle est résolue ou au moins diminuée de 50%. La chute est plus rapide chez les non mutés *IGHV*(45).

Le tableau 8 montre les différents traitements utilisés selon leur taux de réponse et efficacité.

Les chiffres sont donnés à titre indicatif sans prendre en compte les spécificités des patients (avec et/ou sans délétion del17p) (46).

Choix du traitement	Réponse globale	Réponse complète	MRD<10-4	Durée de rémission
Chlorambucil	40-60%	<10%	Non attendue	1-2 ans
RFC	95%	50%	Oui (>50%)	>4ans
R-Bendamustine	97%	31%	Pas d'information	21,6 mois
Alemtuzumab	83%	53%	Oui (7%)	9-15 mois
Ibrutinib	82%	3.7%	Non attendue	PFS 89% à 24 mois
Idélasilib	96%	14%	Non attendue	PFS 93% à 36mois
Vénétoclax	79%	20%	5%	30 mois (47)
Greffe CSH	Pas d'information	69%	oui	OS 70% à 5ans

Tableau 8: Taux de réponse et efficacité de différents traitements au cours de la LLC

CSH : Cellules souches hématopoïétiques.

Il existe d'autres traitements comme le linalidomide, un immunomodulateur avec des effets anti-angiogéniques ayant une action synergique avec le rituximab même chez les patients présentant une délétion 17q(48). Différents anti-CD20 de 2^{ème} génération sont également disponibles (Obinutuzumab une plus grande efficacité que rituxumab en se liant au CD20 extracellulaire plus longtemps mais avec une toxicité plus importante(49) et l'Ofatumumab, un anti CD20 humanisé se liant à un épitope distinct, efficace et mieux toléré(50)).

Plusieurs sont en cours d'essais thérapeutiques : Nous pouvons citer les CAR-T cells, les inhibiteurs de BTK de 2^{ème} génération, et d'autres anticorps monoclonaux comme le blinatumomab (anticorps bi-spécifique anti-CD3 et anti-CD19), le lumiliximab (anti-CD23) (51).

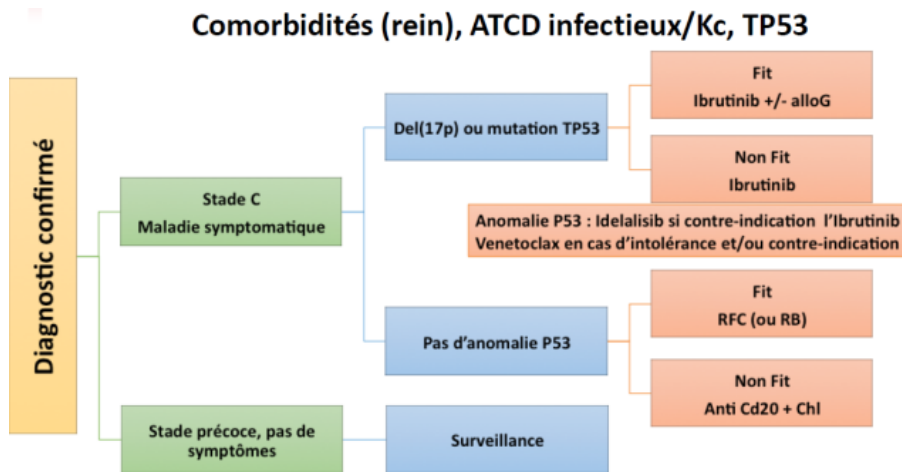
Cas de la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) :

En première intention, l'allogreffe est indiquée chez les patients en rechute précoce ou présentant une forme évolutive avec del17p et échec de l'alemtuzumab. En cas de non éligibilité à l'allogreffe, l'autogreffe est possible.

L'efficacité à long terme d'une allogreffe n'est pas affectée par des facteurs de mauvais pronostic comme le statut non muté du gène *IGVH*, les anomalies cytogénétiques et moléculaires ni le caractère réfractaire de la pathologie à la fludarabine (52).

Il s'agit d'une alternative souvent lourde (préférentiellement chez les patients jeunes, en forme) avec possibilité de guérison contrairement aux traitements classiques.

La figure 4 montre une stratégie thérapeutique proposée à l'initiation selon les recommandations de l'iwCLL (d'après Hallek & al (7)).



B. Eichhorst, Chronic Lymphocytic Leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines, updated June 2017

Objectif = OS avec QDV: MRD surrogate

Figure 4 : Recommandations de l'iwCLL sur la 1ère ligne de traitement d'après B. EICHHORST

QDV : qualité de vie

La stratégie d'initiation du traitement dépend de l'évolutivité de la maladie, du terrain du patient (âge, comorbidités) du statut TP53 et/ou de la présence de la délétion del17p. Les sujets jeunes sans comorbidités majeures pouvant supporter les chimiothérapies sont classés « fit » (en forme) et ceux non indiqués pour la chimiothérapie, « unfit ». La compréhension des mécanismes physiopathologiques au cours de la LLC a favorisé ces dernières années l'émergence de thérapies ciblées. En effet, l'alemtuzumab, anticorps anti CD52 (également utilisé dans des lymphomes T) a des effets plus importants que l'immunothérapie classique en termes d'efficacité mais également de toxicité. Il tend à être remplacé par ces nouveaux traitements comme les inhibiteurs du BCR (ibrutinib, idélalisib).

Le vénétoclax, semble efficace chez les patients de haut risque, en alternative aux précédents cités en cas d'échec ou d'inéligibilité de ceux-ci.

Traitement à la rechute

Le choix du 2^{ème} traitement est généralement fondé sur les critères du premier et donc, il est souhaitable d'envisager une inclusion des patients en rechute précoce ou résistants aux traitements dans les essais thérapeutiques de nouveaux médicaments ou associations de médicaments.

La figure 5 montre une proposition thérapeutique des patients réfractaires ou en rechute issue des recommandations de 2018 (d'après Hallek & al).

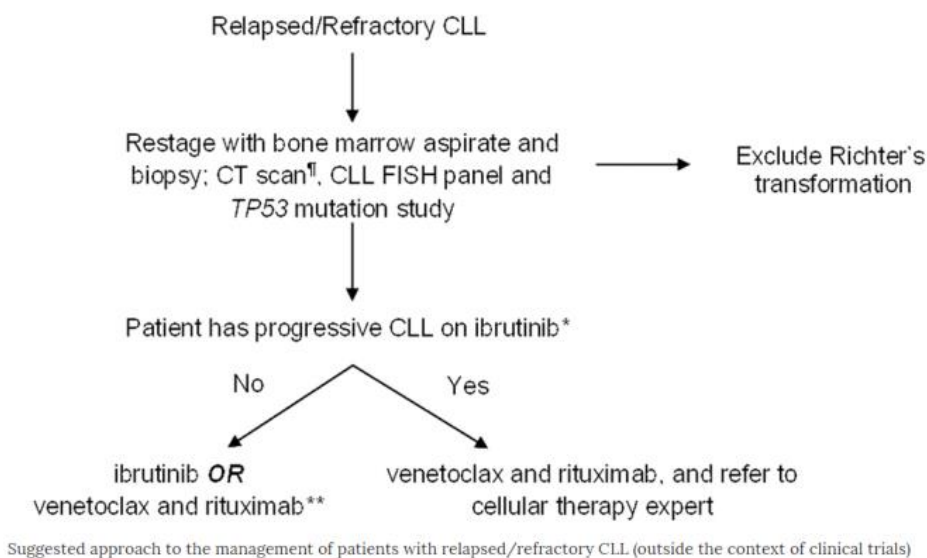


Figure 5 : Suggestion de prise en charge des patients avec une LLC en rechute/réfractaire (d'après Hallek & al)

Chez un patient présentant des signes de récurrence après traitement ou une forme de LLC réfractaire, il est nécessaire d'exclure en priorité une éventuelle transformation en syndrome de Richter. Dans ce cas, le traitement repose plutôt sur une polychimiothérapie comme l'association cyclophosphamide-vincristine-doxorubicine-dexaméthadone par exemple. Ensuite, les anomalies secondaires en FISH ou au moins une mutation du gène *TP53* sont recherchées. Si le patient n'a pas encore reçu de traitement par ibrutinib, cette molécule est priorisée si elle est tolérée. Si ce n'est pas le cas ou elle est mal tolérée, une solution serait la combinaison Rituximab-vénétoclax selon les cas.

Pour récapituler

- Le traitement de première intention lorsque la maladie devient symptomatique est fonction du terrain du patient (âge, comorbidités, le statut del17p).
- Les principales lignes de traitement sont si possible les immunochimiothérapies en 1^{ère} intention (Ritixumab-Fludarabine-Cyclophosphamide), les inhibiteurs du BCR (dont l'ibrutinib) et les molécules émergentes souvent en association (dont le vénétoclax).
- Le traitement à la rechute est fonction du traitement de 1^{ère} ligne, de la réponse de celui-ci et de sa tolérance, de l'évolutivité de la maladie.

I.2- Evaluation de la réponse au traitement

L'évaluation de la réponse se fait à l'examen clinique, sanguin et médullaire. Le timing préconisé se situe au moins 2 mois après la fin du traitement.

Critères de réponse en routine

Pour juger de l'efficacité d'un traitement pour un patient donné, l'évaluation de la réponse se fait au moins 2 mois après la fin de la ligne de traitement ou après la réponse maximale pour les traitements continus. La réponse maximale peut être représentée comme une période pendant laquelle la cinétique d'amélioration des symptômes atteint un plateau. Les patients

sont stratifiés dans le but de déterminer la suite de leur prise en charge allant de la surveillance simple à l'intensification du traitement.

Deux groupes de paramètres pour l'évaluation de la réponse aux traitements sont définis. Le nombre de critères remplis selon les groupes détermine les catégories de réponse.

On distingue quatre catégories de réponse :

- La réponse complète : tous les critères sont respectés (de groupe A en rapport avec la masse tumorale lymphoïde, les symptômes constitutionnels et de groupe B en rapport avec l'atteinte hématopoïétique),
- la réponse partielle (amélioration d'au moins 2 paramètres ou 1 seul selon les cas),
- la maladie progressive (au moins 1 critère d'aggravation des symptômes),
- la maladie stable ne remplissant pas les critères de réponse complète / partielle

Ces critères ne suffisent plus pour prédire le devenir des patients avec les traitements actuels.

Dans le cadre de protocoles, il est recommandé de rechercher la maladie résiduelle par techniques sensibles ou de très haute sensibilité.

I.3- La maladie résiduelle (MRD)

I.3.1- Quelques définitions

- **La maladie résiduelle** (minimal residual disease – MRD) est internationalement reconnue comme le niveau de maladie qui peut être détecté par les techniques sensibles après traitement. La présence de cellules résiduelles suggère un traitement insuffisant et la probabilité de rechute de la pathologie. Ou plus simplement, elle renvoie à la recherche de la persistance ou de la réapparition de cellules pathologiques après traitement chez un patient. Elle est essentiellement étudiée en tant que critère de substitution de la survie sans progression et de la survie globale.

- La **survie globale** correspond à la durée entre le traitement et le décès quelle qu'en soit la cause. Elle est le critère de référence dans les essais cliniques en termes d'utilité clinique mais présente des limites. Son évaluation peut s'avérer extrêmement longue, coûteuse, avec de très grands effectifs et poser des problèmes de jugement d'efficacité des médicaments en présence de nombreux facteurs pronostiques ou nombreuses lignes de traitement.

De nombreux critères de substitution de la survie globale sont en évaluation pour faciliter la détermination de l'efficacité de stratégies thérapeutiques et faciliter l'autorisation de mise sur le marché des médicaments innovants. Parmi ces critères, notre intérêt porte sur la survie sans progression :

- La **survie sans progression** est caractérisée par la durée entre le traitement et les premiers signes de progression de la maladie ou le décès. Bien que ces définitions soient non standardisées et hétérogènes selon les études (part de subjectivité dans la description de la progression clinique), la survie sans progression semble parfois corrélée à la survie globale et constitue une de ces principales alternatives étudiées.

I.3.2- Intérêt de la détection de la maladie résiduelle

I.3.2.a- Généralités sur l'intérêt de l'étude la maladie résiduelle

L'étude de la maladie résiduelle, associée aux facteurs pronostiques moléculaires, est un puissant outil de prédiction de l'évolution des hémopathies comme les leucémies aiguës et chroniques.

Le niveau de maladie résiduelle est lié à la proportion de cellules tumorales présentes parmi les cellules analysées chez le patient. La figure 6 explique la relation entre l'évolution de maladie résiduelle et le risque de rechute dans les hémopathies.

Equivalent de la quantité de cellules en masse tumorale
(d'après la maladie résiduelle dans les LAM de F. VERGEZ)

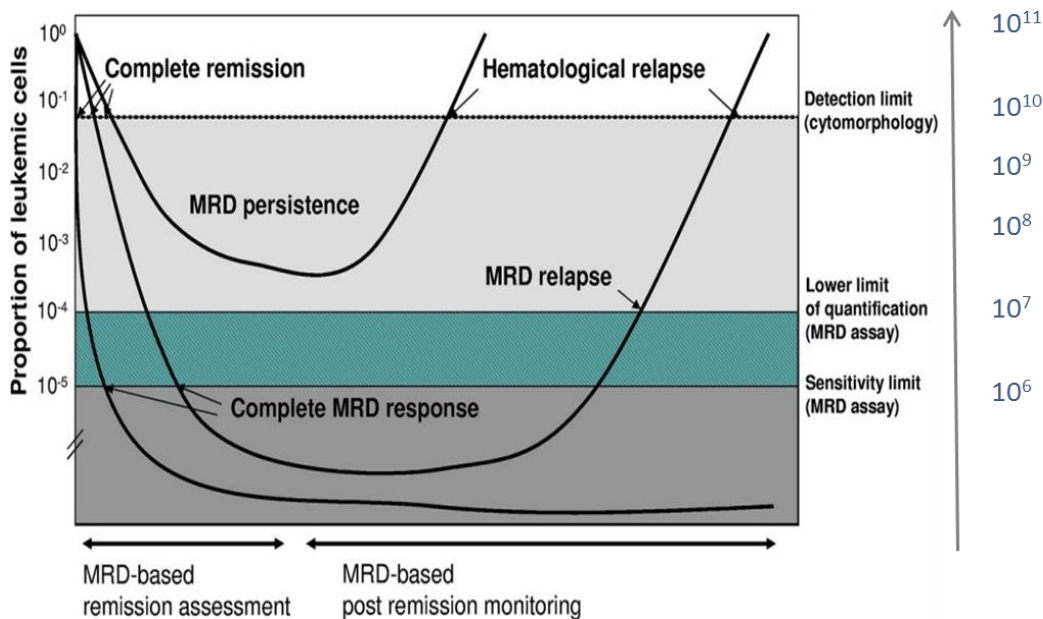


Image d'après Brüggemann & al.

Figure 6 : Exemples de la cinétique de la MRD dans les hémopathies

L'étude de la MRD, qui consiste à mettre en évidence des événements rares, dépend de la sensibilité de détection de la technique utilisée : une MRD « négative » ne signifie donc pas nécessairement disparition des cellules pathologiques mais peut seulement correspondre à une MRD indétectable avec la sensibilité de la technique utilisée.

En fin de traitement d'induction, elle est le reflet de la chimiosensibilité des cellules malignes. Les patients ayant une MRD positive en fin de traitement ont un risque de récurrence cytologique précoce en rapport avec une forte proportion de cellules malignes chez le patient. *A contrario*, ceux ayant initialement une décroissance rapide et importante ont préférentiellement une rémission prolongée. Le suivi de ces derniers aide à repérer (à partir de la limite de quantification) antérieurement à la réapparition des symptômes imputables à une nouvelle progression tumorale. Une maladie résiduelle positive argumente une éventuelle réévaluation de la conduite thérapeutique dans le cadre de la prévention secondaire.

1.3.2.b- Intérêt de l'étude de la maladie résiduelle dans la leucémie lymphoïde chronique

Il est admis que le niveau maladie résiduelle au cours de la LLC est un facteur indépendant de la survie sans progression chez les patients traités par immunochimiothérapie (d'après Rawstron & al). La figure 7 montre la courbe de survie sans progression des patients traités par immunochimiothérapie selon le résultat de la détection de la maladie résiduelle dans la LLC.

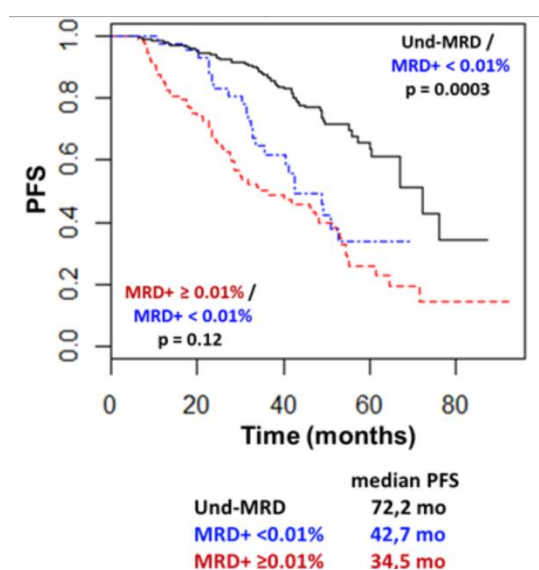


Figure 7 : Evolution de la survie sans progression (PFS) au cours du temps en fonction du résultat de la MRD chez des patients atteints de LLC et traités par RFC. D'après EHA Library. Letestu R. Jun 16, 2018; 215408; PS1094

Und-MRD : maladie résiduelle indétectable ; MRD+ maladie résiduelle positive ; RFC : Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide. 72,2 mo : 72,2 mois.

D'après l'étude de Letestu & al portant sur 540 patients et dont les résultats sont représentés sur la figure 7, seuls les patients ayant une MRD indétectable ont une amélioration significative de la survie sans progression (PFS). Ainsi, obtenir une MRD indétectable est le seul facteur important prédictif de la survie sans progression (PFS) et de la survie globale (OS) chez les patients traités par immunochimiothérapie (ICT), indépendamment du statut de rémission clinique et des caractéristiques précliniques du patient.

I.3.3- Place de l'évaluation de la MRD dans le parcours thérapeutique de la LLC

Actuellement, l'impact de l'étude de la MRD est différent selon le traitement utilisé (54) :

- Patients sous immunochimiothérapie (ICT) : la valeur pronostique des tests de détection de la MRD se confirme après immunochimiothérapie et permet d'envisager son utilisation à moyen terme dans la prise de décision thérapeutique. La valeur de la MRD permettrait de juger de l'efficacité d'une ligne de traitement, de mettre en place des critères de stratification et d'adaptation thérapeutique et de poser l'indication d'un nouveau traitement (essai CLL8 montrant une corrélation entre la MRD en fin de traitement et la survie sans progression de même que la survie globale et plusieurs cohortes de patients)(55).

- *A contrario*, l'intérêt de l'étude de la MRD est discutable pour les patients traités par les inhibiteurs de kinase. Ceux-ci prescrits en continu permettent d'obtenir des survies sans progression très prolongées même en rechute chez des patients de haut risque malgré une $MRD < 10^{-4}$ très exceptionnelle dans sa fréquence (même après 3 ans de traitement) (56). Les inhibiteurs de kinase sont actuellement sujet à débats à propos du remplacement du RFC comme traitement standard, en particulier l'ibrutinib.

- Toutefois, l'arrivée des inhibiteurs de BCL-2 (comme le vénétoclax) a fait repenser la stratégie thérapeutique. La corrélation entre la PFS et la $MRD < 10^{-4}$ sous vénétoclax montrée par l'étude MURANO et les résultats prometteurs d'associations de classe (en particulier vénétoclax+ ibrutinib)(47) ont relancé la mesure de la maladie résiduelle comme critère décisionnel dans les protocoles. L'objectif à long terme selon les études permettrait l'interruption de traitements au long cours (notamment l'ibrutinib) ou l'épargne de chimiothérapie par association avec d'autres molécules dites « chemo-free » (IVG : ibrutinib, venetoclax, obinutuzumab). Des évaluations de la maladie résiduelle ont été réalisées sur prélèvement de sang périphérique et prélèvements médullaires. Ainsi, des études portant sur

la maladie résiduelle dans la moelle en première ligne et à la rechute ont débutés. Nous pouvons citer l'étude CAPTIVATE (Phase II)(57). La figure 8 montre l'efficacité de l'association ibrutinib et vénétocloz pendant 12 mois permettant d'obtenir chez les 3 patients testés une maladie résiduelle indétectable dans la moelle et une réponse complète.

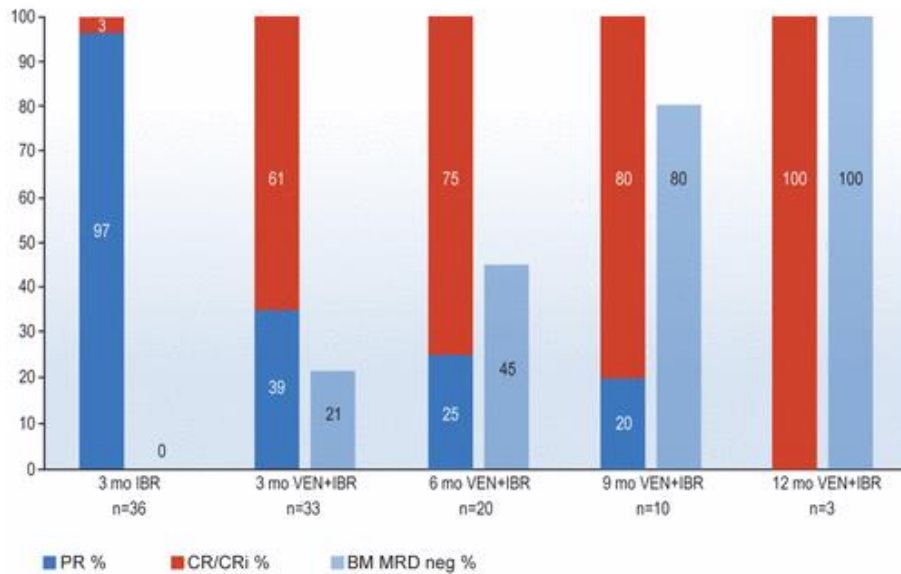


Figure 8 : Répartition des taux de réponse partielle/complète médullaire selon la durée du traitement à 3, 6, 9 et 12 mois (58)

PR : réponse partielle ; CR : réponse complète ; CRi : réponse complète avec rémission hématologique incomplète ; BM MRD neg : maladie résiduelle indétectable dans la moelle osseuse.

Les groupes de patients recevant les traitements sont quantitativement inhomogènes mais la durée de l'association de l'ibrutinib et du vénétocloz semble augmenter la proportion de patients en réponse complète ± avec rémission hématologique complète avec une MRD indétectable.

Les inhibiteurs du BCR ne sont en général pas utilisés dans le but d'obtenir une MRD indétectable mais leur association aux immunochimiothérapies semble en faveur d'une augmentation du taux de réponse profonde.

1.3.4- Méthodes d'évaluation de la maladie résiduelle dans la LLC

Les deux techniques de référence de recherche de la maladie résiduelle sont la cytométrie en flux multiparamétrique sensible (ou de très haute sensibilité) et la recherche du réarrangement du gène *IGVH* par PCR en temps réel.

Les techniques de cytométrie en flux, qui font l'objet de ce travail, seront détaillées plus loin.

Les méthodes moléculaires de détection de la maladie résiduelle reposent sur la détection du réarrangement du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline spécifique du clone de LLC.

Différentes techniques de recherche de maladie résiduelle par biologie moléculaire sont représentées dans le tableau 9 (53) :

Méthode	Sensibilité	Quantification	Avantages	Inconvénients
PCR à amorces consensus <i>IGVH</i>	10 ⁻³	Non	Simple, rapide standardisation	Sensibilité patient dépendant
ASO <i>IGVH</i> RQ-PCR (temps réel)	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	standardisation	prétraitement chronophage, fastidieux, « primers » spécifiques par patient
Nested ASO <i>IGVH</i> PCR	10 ⁻⁶	non	sensible	Séquençage individuel des gènes
Séquençage haut débit	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	Moins fastidieux et chronophage	Accessibilité

Tableau 9 : Techniques de biologie moléculaire de détermination de MRD

I.3.5- Détection de la maladie résiduelle dans la LLC par cytométrie en flux

Dans la LLC, l'évaluation de la maladie résiduelle par cytométrie est la méthode de choix des protocoles. En effet, la cellule de LLC a un phénotype très caractéristique la rendant facilement distinguable des lymphocytes normaux. De plus, celui-ci est peu modifié par les traitements antinéoplasiques.

I.3.5.a- Principe de la technique de cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de mettre en évidence et de quantifier des populations cellulaires normales ou pathologiques grâce à l'analyse de l'expression de leurs profils antigéniques membranaires. Pour cela, les antigènes membranaires des cellules doivent être marqués à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques conjugués à des fluorochromes. La révélation de la fixation de l'anticorps sur l'antigène se fait grâce à l'excitation du fluorochrome par un faisceau laser, aboutissant à l'émission d'un signal lumineux spécifique par le fluorochrome. Pour cela, après marquage, les cellules sont entraînées dans le flux d'un liquide de gainage afin de passer une à une devant un faisceau laser. Plusieurs marquages sont simultanément possibles grâce à l'utilisation de différents fluorochromes, voire de différents faisceaux laser (comme un laser Argon à de longueur d'onde à 488nm). Plusieurs fluorochromes, excitable à la même longueur d'onde par un même faisceau laser, peuvent être utilisés en même temps à condition qu'ils aient un spectre d'émission différent pour être différenciés.

Trois paramètres sont simultanément déterminés après passage des cellules devant le faisceau laser :

- Les paramètres de taille et granularité/complexité interne des cellules : la lumière diffractée mesurée dans l'axe du faisceau laser permet d'évaluer la taille des cellules

(paramètre FSC). La lumière diffractée, mesurée à 90°, permet d'évaluer la granularité des cellules (paramètre SSC).

- Expression antigénique des cellules : si la cellule exprime l'antigène recherché, les fluorochromes seront excités lors de leur passage devant le laser et émettront un spectre lumineux qui leur est propre. L'analyse de la fluorescence ainsi émise donnera des informations sur la présence ou l'absence d'expression de l'antigène recherché, ainsi que sur son niveau d'expression (selon le niveau d'intensité de la fluorescence).

Les données lumineuses sont recueillies par des photomultiplicateurs (PMT) puis converties en signaux électriques.

La figure 9 schématise le principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux.

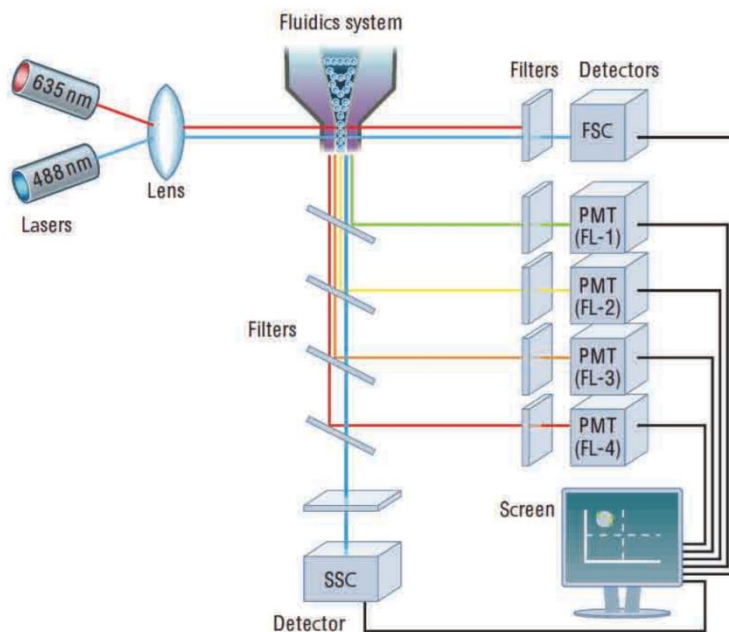


Figure 9 : Principe d'analyse d'un cytomètre en flux

Image issue du cours de paristech.institutoptique.fr : introduction à la cytométrie.

FCS : forward scatter ; SSC : side scatter ; PMT : photomultiplicateur.

Le cytomètre utilisé au laboratoire (Navios, Beckman Coulter) permet des marquages simultanés de 10 antigènes différents (« marquage 10 couleurs ») à l'aide de trois lasers.

Les fluorescences dépendent des spectres d'émission des différents fluorochromes. Ceux-ci peuvent se chevaucher et nécessitent des compensations (soustraction de signaux non-spécifiques d'autres fluorochromes interférants). Ce phénomène est un des principaux freins à une analyse exhaustive des populations cellulaires. La figure 10 montre le spectre de fluorescence selon les fluorochromes utilisés.

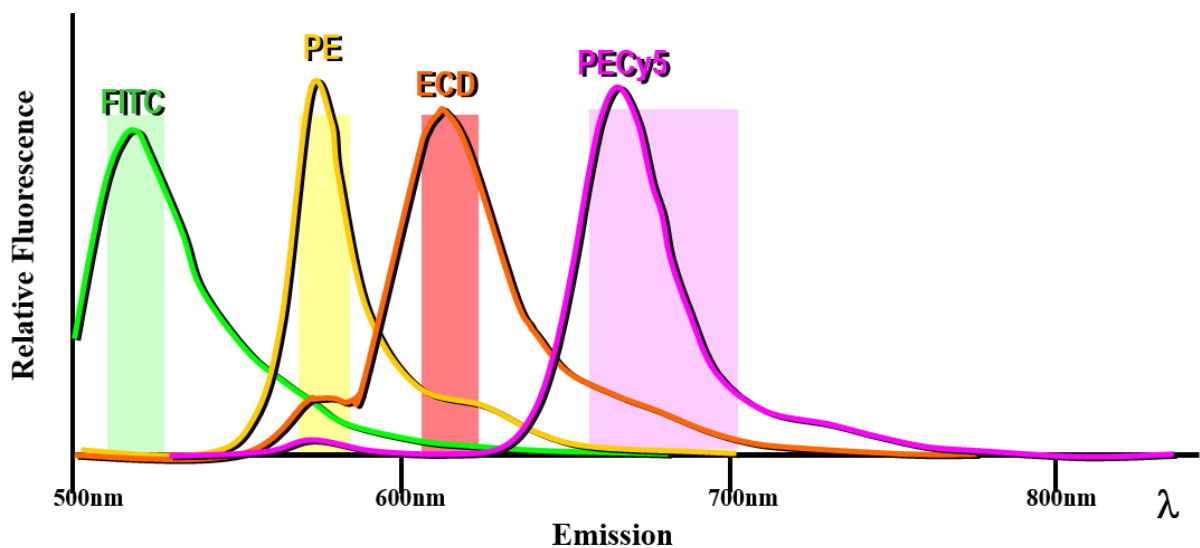


Figure 10 : Spectre de fluorescence des fluorochromes

Image d'après « CMF strasbourg partie 1 : origine et principes généraux ».

Pour chaque fluorochrome, la fluorescence moyenne d'intérêt est délimitée par la zone rectangulaire et il peut y avoir des fuites de fluorescence en dehors de ces zones. La compensation est plus importante pour les spectres de fluorescence ayant le plus de chevauchement. Elle pose le problème d'interprétation des signaux pour 2 fluorochromes proches comme le PE et l'ECD. Elle est moins importante pour l'utilisation simultanée de la FITC et du PECy5

1.3.5.b- Intérêt de la cytométrie en flux

La technique de cytométrie est plus accessible que la biologie moléculaire pour les centres. Le rendu du résultat en général rapide pouvant être rendu en moins de 2 heures. Cependant, la fiabilité du résultat dépend de plusieurs facteurs : les performances de l'automate et surtout des anticorps de marquage. On peut citer la différence de sensibilité des marqueurs selon le

fluorochrome, la spécificité du signal recueilli (fluorescence spontanée, contamination...) ou la discrimination des populations exprimant des marqueurs par rapport aux autres.

On distingue 3 situations de détection de la maladie résiduelle par cytométrie en flux :

- Les cellules pathologiques sont suffisamment nombreuses pour être repérées et quantifiées (par exemple 5% des leucocytes analysés),
- Les cellules pathologiques sont repérées en faible quantité mais leur nombre est proche du seuil de détection avec une incertitude de mesure (risque de surestimation par le bruit de fond et les événements faussement positifs dus à une erreur de ciblage) : dans ce cas, les cellules résiduelles sont dites détectables mais non quantifiables,
- Les cellules sont indétectables. Cette situation peut se présenter lorsque :
 - Les cellules pathologiques sont présentes dans le prélèvement mais extrêmement rares et la méthode de détection utilisée est trop peu sensible pour qu'elles soient repérées,
 - Les cellules résiduelles ne sont pas présentes dans le prélèvement : répartition hétérogène ou localisation ganglionnaire/médullaire sans diffusion sanguine,
 - Le patient n'a plus de cellules pathologiques au moment du prélèvement (guérison ?).

Dans le cadre de la maladie résiduelle, la qualification de la technique dépend principalement de sa capacité de détection. Le tableau 10 montre que, plus le nombre de marqueurs utilisé pour marquer les cellules est élevé, meilleure sera la sensibilité de détection de la MRD (59).

	Ordre de valeur de la limite de détection	Qualification de la technique	Evaluation de la MRD dans les essais cliniques en fonction du panel
4 couleurs	0.01% (10^{-4})	Moyenne résolution	Etudiée à visée observationnelle dans les premiers essais (performances modestes du panel)
6 couleurs	0.001% (10^{-5})	Technique sensible	L'arrivée de ces panels a permis l'évaluation de la MRD en objectif secondaire des essais.
8 - 10 couleurs	0.0001% (10^{-6})	Technique de très haute sensibilité	L'amélioration des panels renforce la fiabilité de l'évaluation de la MRD en tant qu'objectif principal des essais cliniques actuels.

Tableau 10: Caractérisation de la technique d'immunophénotypage concernant la MRD

Le nombre de couleurs correspond au nombre de canaux/fluorochromes utilisés pour l'évaluation de la MRD.

Pour illustrer, un panel (CD5 - PC7) + (CD19 - ECD) + (CD22 et CD79b - ECD) + (CD45 – KO) correspond à 4 couleurs si tous les marqueurs sont utilisés dans le fenêtrage ou 3 couleurs si le CD45-KO n'est utilisé que pour vérifier la cohérence du résultat.

1.3.6- Limites du test de détection de la MRD par cytométrie en flux

1.3.6.a- Spécificité

La spécificité consiste à ne pas détecter de cellules normales interprétées à tort comme des cellules de LLC : pas de faux positif.

Le **bruit de fond** correspond à la limite de spécificité c'est-à-dire au nombre de cellules classées comme des cellules de LLC dans un échantillon n'en contenant pas (faux positifs).

Idéalement, il doit être réduit le plus possible pour pouvoir ne pas gêner la limite de

détection. Plus les panels comportent un nombre élevé de marqueurs, meilleure sera la spécificité du test.

1.3.6.b- Sensibilité

La sensibilité est définie comme la capacité à donner un résultat positif lorsque les cellules de LLC sont présentes : pas de faux négatif. La limite de sensibilité est évaluée en réalisant des dilutions cellulaires et correspond à la plus faible concentration cellulaire à laquelle on parvient encore à détecter des cellules. La limite de sensibilité dépend surtout de la quantité de cellules analysées puisque les chances de trouver un événement rare augmentent avec le nombre de cellules étudiées.

On considère que les techniques de faible résolution, comme la quantification des cellules de LLC en cytométrie avec une simple recherche de monotypie Kappa/Lambda, ont une sensibilité de détection des cellules de LLC de l'ordre de 10^{-2} (R. Letestu, journées de l'AFC 2018).

La première étude standardisée de cytométrie dans la MRD-LLC a utilisé un panel 4 couleurs (technique de moyenne résolution, panel ERIC), ce qui a permis d'abaisser le seuil de sensibilité à 10^{-4} (0.01%). Actuellement, ce seuil de 10^{-4} reste le seuil en vigueur pour les décisions cliniques thérapeutiques, même si l'apport de nouveaux panels 6 puis 8 couleurs (technique de haute résolution, protocole FILO) a encore amélioré la sensibilité de détection des cellules de MRD-LLC à 10^{-5} puis 10^{-6} respectivement.

1.3.6.c- Limites de détection

L'analyse de la MRD doit tenir compte des deux contraintes évoquées ci-dessus : spécificité et sensibilité.

La **limite de détection** (LOD) du test tient compte de la limite de spécificité (liée au bruit de fond cellulaire moyen) et de la limite de sensibilité (liée à la plus petite dilution détectable et au nombre de cellules analysées). La limite de détection correspond à la valeur minimale à partir de laquelle le nombre de cellules est suffisamment élevé pour ne pas être entièrement attribué au bruit de fond mais à la présence de cellules positives. Ce nombre de cellules présente toutefois une incertitude de mesure non négligeable, ne permettant pas une quantification fiable.

La **limite de quantification** (LOQ) est la valeur au-delà de laquelle le nombre de cellules identifiées peut être quantifié avec une exactitude acceptable, rendant par la même occasion ces valeurs obtenues plus reproductibles. La figure 11 montre un cas de variabilité inter-opérateur de différents résultats pour un panel 6 couleurs d'après Rawstron & al (60).

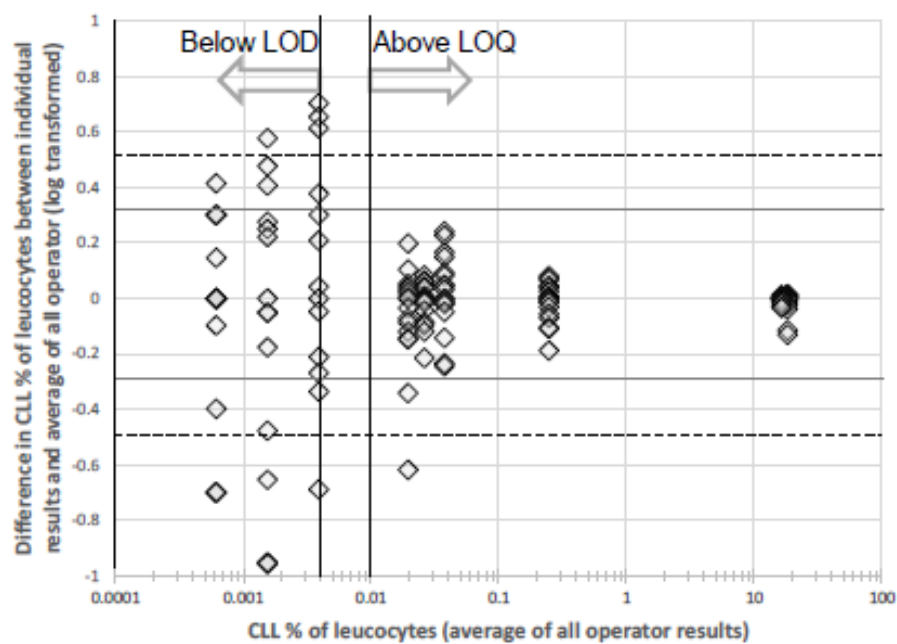


Figure 11 : Présentation de la variabilité inter-opérateur d'une étude multicentrique pour des valeurs proches des limites du test en CMF

LOD : limite de détection. LOQ : Limite de Quantification. Image issue de l'article (60).

Pour un même échantillon, un nombre de cellules résiduelles observé et inférieur à la limite de détection présente une grande variabilité selon l'opérateur. Un nombre de cellules résiduelles observé supérieur à la limite de quantification est caractérisé par une variabilité moins importante favorisant une meilleure reproductibilité du résultat.

D'après le guide de validation des méthodes d'analyses de l'Agence Nationale sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail (ANSES/PR3/07/01 version a (octobre 2015)), le calcul des valeurs théoriques de la limite de détection (LOD) et de la limite de quantification (LOQ) peut être calculé en fonction d'un multiple de l'écart-type du bruit de fond moyen (signal non spécifique). Pour la limite de détection, un facteur de 2 ou 3 permet un niveau de confiance à 95 ou 99%. La limite de quantification est généralement dérivée de la précédente avec un facteur de 2 ou 3. Ainsi, on peut dire que :

Limite de détection (LOD) \approx bruit de fond moyen + 3,3 écart-type (du bruit de fond moyen)

Limite de quantification (LOQ) \approx bruit de fond moyen + 10 écart-type (du bruit de fond moyen)

I.3.7- Nombre de cellules à analyser pour la détection de la MRD-LLC

La recherche de maladie résiduelle relève des événements rares.

Dans les conditions idéales, ceux-ci :

- Sont présents,
- Sont répartis de façon supposée homogène,
- Mesurés de manière spécifique (absence de faux négatif)

Une des principales questions qui se pose lors de la détection de la MRD en cytométrie est de savoir combien de cellules totales doivent être analysées pour détecter de rares événements pathologiques. Ainsi, on peut considérer que l'ensemble des événements analysés suit une loi binomiale : chaque cellule est classée en 2 catégories : positive ou négative. La fréquence des

cellules « positives » est $p = n/\text{nombre d'évènements}$ et celle des « cellules négatives » est $q = 1-p$.

Ces évènements rares obéissent à la loi de Poisson et le coefficient de variation du nombre de cellules n définissant la population rare est inversement proportionnel à la racine carrée de ce nombre n ($CV = 1/\sqrt{n}$). Le tableau 11 montre quel est le nombre théorique de cellules à analyser en cytométrie selon la fréquence de l'évènement recherché.

CV		5%	10%	14%	20%	22.4%	31.6%
Nbre de cellules cibles		400	100	50	25	20	10
%	Fqce 1/p	Nbre d'évènements à collecter					
0.01	10000	4x10 ⁶	10 ⁶	500.000	250.000	200.000	100.000
0.001	100000		10x10 ⁶	5x10 ⁶	2.5x10 ⁶	2x10 ⁶	10 ⁶
0.0001	1000000			50x10 ⁶	25x10 ⁶	20x10 ⁶	10x10 ⁶

Tableau 11 : Nombre théorique de cellules à analyser selon la fréquence de l'évènement recherché et le coefficient de variation. Issu de la présentation Suivi de la maladie résiduelle dans la leucémie lymphoïde chronique à la JFPC-AFC de juin 2018. Dr Letestu. Les valeurs sur fond rouge correspondent aux nombres d'évènements à acquérir incompatibles avec une analyse de cytométrie dans les conditions pratiques.

Le tableau 11 montre par exemple que plus on veut détecter des cellules de LLC avec une faible variabilité (CV), plus il faut augmenter le nombre de cellules à analyser. Cependant, l'analyse d'un très grand nombre de cellules a des limites : volume de sang à prélever au patient, quantité de réactifs, interprétation des résultats sur une très grande quantité de données, etc. Il faut donc trouver un compromis entre le nombre raisonnable de cellules à acquérir et la variabilité des résultats. Ainsi, le compromis communément admis pour le typage de la MRD-LLC en cytométrie est d'analyser 500 000 cellules au minimum (permettant de rendre un résultat positif à 0.01% (10^{-4}) avec un coefficient de variation acceptable (CV à 14%)).

I.3.8- Analyse des résultats de MRD en cytométrie

L'analyse des données de cytométrie multiparamétrique utilise la méthode classique de visualisation hiérarchique bi-paramétrique selon les marqueurs. Elle consiste habituellement à analyser successivement un ensemble de cellules selon 1 à 2 paramètres / marqueurs (dot plot 1D/2D) puis à comparer manuellement les différentes expressions selon plus ou moins des filtres pour identifier la population d'intérêt et la caractériser. La méthode manuelle est classiquement utilisée pour la plupart des analyses en cytométrie en flux et suffisante pour des analyses relativement simples Exemple : étude globale des populations lymphocytaires T, B et NK ou recherche d'un syndrome lymphoprolifératif B avec calcul du score de Matutes. Cependant, avec le nombre de marqueurs croissants, le nombre de graphes 2D augmente de manière exponentielle, notamment lorsque la population cible est sous représentée dans le prélèvement, l'analyse devient rapidement complexe et des informations peuvent être omises ou ignorées de manière subjective. Celle-ci peut s'avérer subjectif, chronophage, hétérogène en cas de multiples échantillons, mal expertisée (pour un utilisateur d'expérience panel dépendant) et poser des problèmes de reproductibilité. C'est pour limiter cette variabilité qu'il est nécessaire de standardiser les panels d'analyse, comme est en train de faire le groupe de travail MRD-LLC de l'Association Française de Cytométrie auquel nous participons, sous l'impulsion du Dr R. Letestu (CH d'Avicenne).

Pour récapituler

- La maladie résiduelle se traduit la persistance de cellules pathologiques après un traitement potentiellement efficace.
- Il s'agit d'un outil permettant d'orienter le classement d'un patient en statut de rémission complète ou partielle et semble prédictif de la durée de la survie sans progression
- En cytométrie en flux, la fiabilité de la mesure de la MRD dépend du nombre de cellules analysées, des limites du test (sensibilité, spécificité, limite de détection et limite de quantification).
- La MRD peut être évaluée par PCR en temps réel ASO ou par cytométrie en flux sensible avec un seuil clinique décisionnel historiquement fixé à 1 cellule pour 10 000 leucocytes (0,01%). Les techniques actuelles permettraient d'augmenter la sensibilité à des valeurs autour de 10^{-5} – 10^{-6}

I.4 - Présentation du panel de cytométrie à tester pour la détection de la MRD-LLC

L'arrivée d'automates de cytométrie en flux de plus en plus performants a permis l'émergence de nombreux panels, testés dans les essais cliniques. Toutefois, la diversité d ces panels de plus en plus sensibles (pouvant être distribués dans 1 à 4 tubes), soulevait le problème de la reproductibilité et de la comparaison des résultats issus des études. En effet, ces derniers étaient influencés notamment par le type de réactifs (solution de lyse, sensibilité des anticorps), des caractéristiques des appareils.

Une approche standardisée a été mise au point dans la littérature et améliorée (protocole FILO en 2013, en collaboration avec l'European Research Initiative on CLL (ERIC)) dans un but de

fiabilité, d'indépendance des caractéristiques des appareils/réactifs et d'adaptation à l'incorporation de futurs marqueurs additionnels. Elle a également l'avantage de nécessiter un seul tube afin de ne pas affecter la sensibilité en cas d'échantillon initial pauvre en cellules.

Les anticorps proposés dans le panel ont été sélectionnés parmi ceux utiles à l'identification des cellules de LLC en tenant compte de leur recommandation et de leur utilité/données d'étude.

Celui-ci découle d'anticorps sélectionnés (parmi plus de 60) de manière hiérarchique permettant d'identifier les cellules de LLC (61). Ces anticorps font par ailleurs partie de ceux ayant un niveau de recommandation suffisant accordé par des groupes d'études sur la LLC (cf. figure 12)

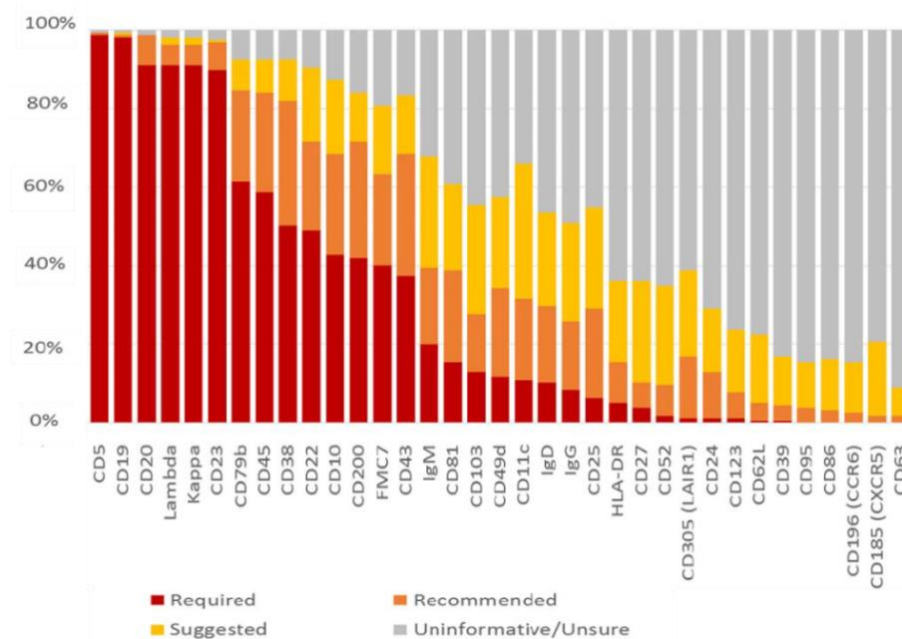


Figure 12 : Liste d'une sélection d'anticorps testés dans la LLC selon la confiance accordée par les groupes d'étude

Image d'après Rawstron (60)

Chaque anticorps a un niveau de recommandation différent mais l'intérêt porte sur leur combinaison.

Le panel retenu est composé des anticorps suivants : CD81, CD22, CD79b, CD19, CD5, CD43, CD20. Le tableau 12 présente brièvement le rôle des molécules détectées par le panel d'anticorps que nous avons utilisé. Nous avons choisi de présenter les anticorps de ce panel car bien qu'une partie soit connue et utilisée pour le score de Matutes (CD5, CD19, CD22 ou CD79b), d'autres sont suggérés pour conforter le diagnostic de LLC atypique (CD43, CD20) et enfin le CD81, en dehors de son implication dans certaines pathologies infectieuses, est plus utilisé dans les études et protocoles (sur la LLC, les leucémies aiguës myéloïdes... (62)) .

Marqueur	Corrélation au niveau cellulaire	Intérêt
CD81	Transduction du signal, adhésion cellulaire, différenciation lymphocytaire T, B...	Expression forte des lymphocytes T. Impliqué dans le système immunitaire
CD22	Régulateur négatif et stabilisant du BCR	Marqueur précoce de la lignée lymphocytaire B. Expression aberrante dans les SLPB (faible dans la LLC).
CD79b	Sous-unité du complexe BCR, initiation de la transduction du signal	Expression faible négative LLC et cellules B immatures
CD19	Co-recepteur du BCR	Marqueur pan-lymphocytaire B
CD5	Co-recepteur du TCR et du BCR de certains lymphocytes B (B1). Modulateur des signaux	Marqueur lymphocytaire T. Possible coexpression jusqu'à près de 5% des lymphocytes B circulants normaux chez l'adulte et plus chez l'enfant (rôle dans l'immunité naturelle). Coexprimé par les cellules B de LLC.
CD43	Glycoprotéine de surface des Lymphocytes T, des histiocytes et rarement des lymphocytes B activés (cas d'infection)	Surexprimé dans la LLC et un peu moins dans le lymphome du manteau
CD20	Protéine transmembranaire canal calcique, activation, différenciation LcB, adhésion homing moelle et gg	Marqueur lymphocytaire B d'expression tardive Permet une meilleure séparation des lymphocytes de LLC par rapport aux cellules normales

Tableau 12 : Intérêt individuel des molécules du panel à tester dans le MRD-LLC

Le CD81 est normalement exprimé par les lymphocytes T, les monocytes, les cellules NK, les polynucléaires éosinophiles. Son absence sur les cellules normales semble associée à un impact fonctionnel pour les lymphocytes B (un défaut d'expression du CD19 décrit dans un cas de déficit immunitaire humoral) (63,64).

Ainsi, ce panel s'affranchit de la restriction isotypique (chaîne d'immunoglobuline kappa, lambda ou absence d'expression de chaînes légères) permettant d'augmenter la comparabilité des expressions de cellules pathologiques entre patients. Il se base sur la différence d'expression relative des cellules par rapport aux lymphocytes T et B normaux du même prélèvement.

I.5- Proposition de nouvelles approches d'analyse de la MRD : les méthodes automatiques

Afin d'améliorer les techniques de détection de la MRD par cytométrie, il peut être envisagé d'utiliser des méthodes d'analyse automatiques dans le but d'augmenter le nombre de marqueurs utilisés et de diminuer la subjectivité de l'interprétation des données de cytométrie.

Ces solutions automatiques reposent sur 2 méthodes :

-supervisée : se réfère à une variable clinique ou biologique externe pour prédire le statut des échantillons. (Exemple d'application : statut de pathologique ou non, courbes de survie). Elle permet de répondre à une question ciblée. Le risque est d'ignorer un variant de la cible s'il n'a pas été pris en compte dans la stratégie d'identification.

-non supervisée : méthode de clustering, c'est-à-dire de regroupement de cellules ayant un profil d'expression protéique similaire. Ces clusters peuvent ensuite être étudiés individuellement ou comparés à d'autres échantillons. Elle permet de décrire les populations cellulaires avec un biais négligeable en prenant en compte toutes les données et de définir de

nouvelles populations inconnues. Un inconvénient peut être cette fois un excès d'informations à comprendre et à analyser (suivant la complexité de présentation des résultats).

De nombreux logiciels (supervisés et surtout non supervisés) ont été développés pour pallier les limites de la méthode manuelle, il n'y a actuellement pas de solution idéale et ils ont chacun des forces et des faiblesses selon les besoins et domaine d'utilisation.

Ils ont été développés devant la complexité croissante des analyses notamment en cytométrie de masse (cytomètre couplé à un spectromètre de masse utilisant des anticorps plutôt marqués par des métaux isotopiques). L'absence des phénomènes d'autofluorescence et de chevauchement de spectre permet d'augmenter le nombre de marqueurs, pouvant aller à 40, voire 100 par cellules.

La figure 13 compare les caractéristiques de certains logiciels utilisés notamment en cytométrie de masse. Leur champ d'application s'étend progressivement vers la cytométrie en flux.

B

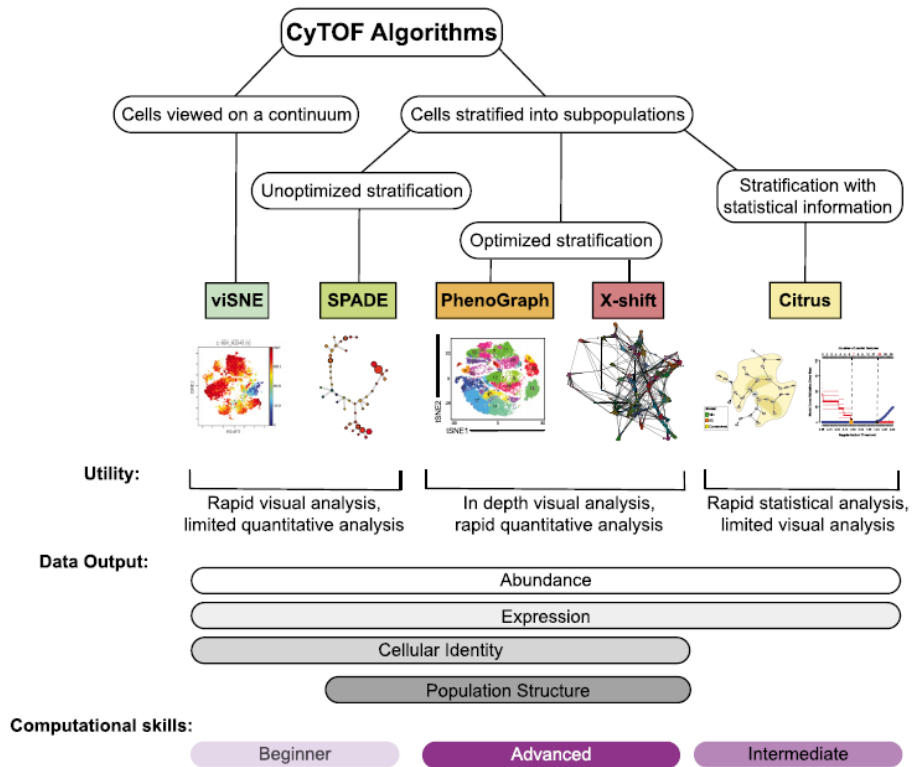


Figure 13 : Exemple de moyens d'analyse automatique des données de cytométrie de masse en fonction des objectifs (65)

Nous nous sommes intéressé à flowSOM, dérivé de SPADE qui est un bon compromis pour les analyses en cytométrie en flux pour diverses raisons(66) :

- il présente un avantage visuel sans compétences informatiques poussées une fois les bases comprises,
- il s'agit de l'un des logiciels les plus performants en termes de rapidité d'exécution,
- il est capable d'analyser une grande quantité de données, d'identifier les différentes populations en donnant le niveau d'expression de tous les marqueurs simultanés sur un seul graphe.

Un grand nombre de ces logiciels sont progressivement intégrés aux applications courantes d'analyses de données avec une interface conviviale (comme FlowJo), mais essentiellement accessibles via une un peu moins attractive.

Présentation de R

Il s'agit d'un logiciel système d'analyse statistique et graphique librement accessible disposant d'outils pour des applications diverses (allant de simples calculs et courbes de croissance... à la programmation). La force de cet outil est sa flexibilité et son utilisation simplifiée (une fois les règles comprises) par rapport aux principaux logiciels du genre. Il fonctionne sur le principe de demande – réponse à partir de fonctions intégrables dans des « bibliothèques » qui sont téléchargeables. R est l'interface par défaut permettant d'utiliser FlowSOM. Les utilisateurs se servent préférentiellement de RStudio qui est plus convivial. De nombreuses fonctions sont disponibles, modulables et donc personnalisables. Certaines interfaces graphiques sont accessibles comme FlowJo mais offrent moins de possibilités de modulation.

FlowSOM

Il s'agit d'un logiciel d'analyse automatisé flexible et intégrable à d'autres, dont l'intérêt est une approche simplifiée du reclassement des cellules sur une « map ». Il fonctionne sur le mode du clustering (regroupement de cellules ayant le même profil protéique) en 2 niveaux et constitue un bon compromis entre rapidité d'exécution, approche qualitative, compétences informatiques. La figure 14 montre les 4 étapes du processus.

- Lecture d'un ou d'une liste de fichiers
- Réorganisation des cellules en clusters
- Arrangement des clusters en arborescence
- Identification des populations sur une base de référence (« metaclustering »).

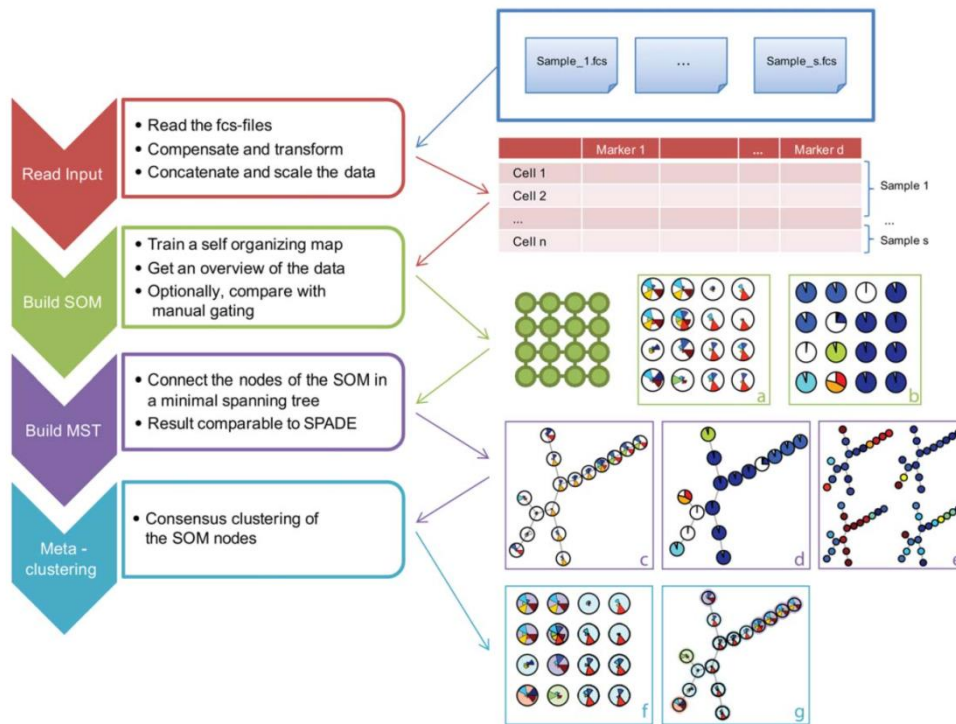


Figure 14 : Principe de fonctionnement de flowSOM (S. Van Gassen & al, Ghent University (2014))

La figure 15 donne l'aperçu d'une analyse test réalisée sur R, disponible sur internet. Chaque population est entourée d'un background propre.

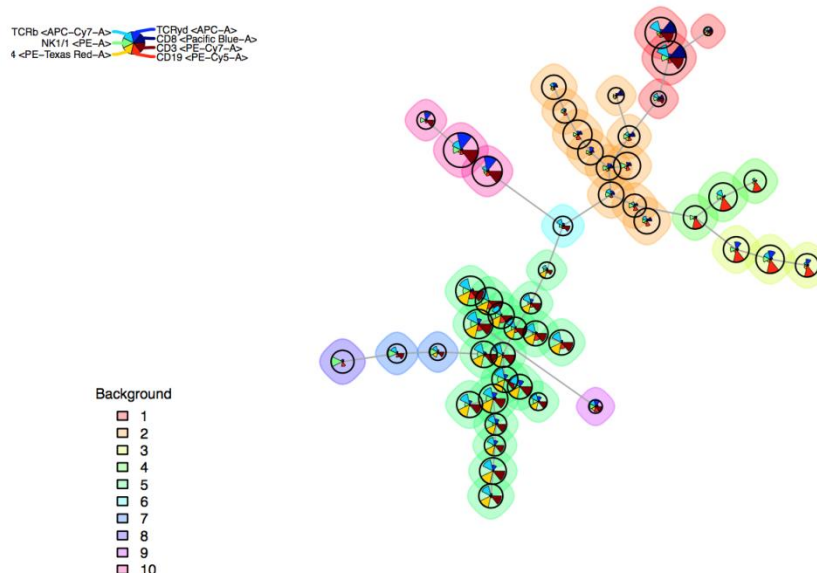


Figure 15 : Aperçu d'une analyse leucocytaire par immunophénotypage sur flowSOM (via R)

S. Van Gassen & al, Ghent University (2014). Background : « métaclustering » délimitation automatique des différentes populations (nombre choisis = 10) selon leur profil d'expression

L'interprétation du niveau d'expression des marqueurs d'un cluster sur R est illustrée par un exemple de la figure 16.

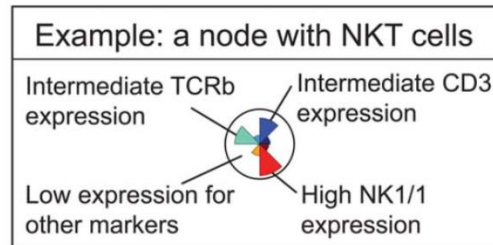


Figure 16 : Exemple d'interprétation d'un cluster lymphocytaire chez la souris, selon ses marqueurs (sur flowSOM)

S. Van Gassen & al, Ghent University (2014)

Un cluster désigne un groupe de cellules ayant des profils d'expression similaires selon les marqueurs. Dans ce cas, les cellules ont une expression forte en NK1/1, intermédiaire en TCRb et CD3, faible pour les autres marqueurs.

La réalisation de toutes les illustrations issues de flowSOM et transcrites dans Kaluza a été possible grâce l'aide de M. le Dr F. Dumézy, CHRU de Lille.

Pour récapituler

- FlowSOM est un outil automatisé performant offrant une présentation des données de cytométrie différente de la méthode de gating manuel. Toutes les données sont présentes sur un seul graphe et l'identification de populations n'est pas dépendante de l'opérateur.

Il compte parmi les logiciels automatiques les plus performants en termes de vitesse d'analyse et de reproductibilité par rapport au gating manuel, tout en restant lui-même simple d'utilisation (il n'en n'est pas de même pour le support R s'il est utilisé sans être compris)

- Les données recueillies sont réutilisables et intégrables à d'autres logiciels en utilisant les outils adaptés.

II. Contexte de l'étude

II.1- Rationnel de l'étude

La réponse clinique est souvent insuffisante pour fournir une indication de réponse au traitement et de pronostic chez les patients atteints de LLC. Parmi les nouveaux indicateurs, l'étude de la maladie résiduelle a pris une place croissante dans le suivi des patients traités pour une LLC. La détection de la maladie résiduelle dans la LLC a débuté de manière annexe dans les essais cliniques puis a pris une place grandissante ces dernières années, jusqu'à devenir le critère de jugement principal de certains d'entre eux. Cette analyse est maintenant considérée comme un indicateur de réponse au traitement et sa signification pronostique se confirme après immunochimiothérapie. La valeur pronostique de la MRD permet d'envisager son utilisation dans la prise de décision thérapeutique : indication d'un nouveau traitement et surtout, décision de l'interruption d'un traitement au long cours (25).

D'après les recommandations de l'iwCLL 2018(7), il n'y a pas d'indication de la mesure de la maladie résiduelle dans la LLC en dehors des essais cliniques. Cependant, dans le domaine hospitalier, l'évolution des pratiques montre une augmentation du nombre de prescriptions de ce test, même hors des protocoles. Les 2 techniques de référence d'étude de la MRD sont la biologie moléculaire et la cytométrie en flux sensible ou de haute sensibilité.

Dans notre pratique au laboratoire de l'hôpital St Philibert, nous recevons de plus en plus de prescriptions hors essai clinique dans le cadre de l'évaluation par cytométrie en flux de patients atteints de LLC en fin de traitement. Jusqu'à présent, nous appliquons le même panel de marquage que celui que nous utilisons pour le diagnostic de LLC (panel permettant, entre autres, d'établir le score de Matutes et comportant au minimum les anticorps suivants : CD19,

CD5, CD23, FMC7, CD22, CD20, Kappa, lambda). L'utilisation de ce panel ne nous pose pas de difficulté d'interprétation s'il y a persistance de nombreuses cellules de LLC. En revanche, ce panel n'est pas adapté lorsque le nombre de cellules B CD5+ est très faible. En effet, nous utilisons un panel de faible résolution qui repose sur la monotypie des chaînes légères d'Ig Kappa ou Lambda qui est souvent difficile à identifier lorsqu'il y a très peu de cellules.

C'est pour cette raison que nous avons décidé d'évaluer si l'utilisation d'un nouveau panel de cytométrie dédié à l'étude de la MRD dans la LLC nous permettrait de détecter de rares cellules de LLC de façon plus spécifique et plus sensible que notre panel actuel. Nous nous sommes également posé la question de savoir si des logiciels d'analyse tels FlowSOM, nous permettraient d'améliorer l'analyse classique des graphes de cytométrie.

Notre problématique touche plusieurs autres laboratoires. Ainsi, selon une enquête nationale du GFHC réalisée en 2019, une proportion non négligeable de centres souhaiterait une formation ou rejoindre un groupe de travail pour l'expertise de la MRD-LLC(59).

II.2- Objectifs de l'étude

Le but de notre étude consiste à mettre en place un nouveau panel de détection de la maladie résiduelle par cytométrie en flux chez les patients atteints de Leucémie Lymphoïde Chronique, dans le but d'améliorer la spécificité et la sensibilité d'analyse des cellules résiduelles de LLC par rapport à la méthode actuellement utilisée au laboratoire d'hématologie de l'hôpital St Philibert.

Pour atteindre cet objectif, nous avons défini les étapes suivantes :

- Détermination du panel d'anticorps
- Détermination de la procédure préanalytique de marquage cellulaire
- Détermination des performances du panel :
 - o Sensibilité
 - o Spécificité
 - o Calcul de la limite de détection (LOD) et de la limite de quantification (LOQ)
- Comparaison de l'analyse des résultats obtenus avec l'ancien panel pour des patients relevant d'une recherche de maladie résiduelle de LLC.
- Comparaison des résultats avec le logiciel Kaluza et le logiciel FlowSOM
- Mise en place d'une stratégie d'analyse et d'interprétation des résultats.

III- Matériel et méthodes

III.1- Population de l'étude

Les patients étaient hospitalisés ou vus en consultation, au sein des hôpitaux St Philibert, St Vincent de Paul et du Centre Hospitalier de Dunkerque.

Les patients pour lesquels un tube de sang EDTA a été prélevé pour une demande d'analyse d'immunophénotypage ou à défaut de numération formule sanguine, ont été sélectionnés selon les critères suivants :

- Un volume de sang suffisant (100-500 μ L pour une analyse simple et jusqu'à 4mL pour réaliser les dilutions) recueilli après les analyses de routine,
- un prélèvement réalisé dans les 24h,
- la quantité de leucocytes (pour les échantillons servant de diluant, le volume nécessaire était plus important pour de faibles concentrations en leucocytes. Les échantillons présentant une lymphocytose proche de 5G/L et non explorée étaient exclus pour éviter que d'éventuels clones méconnus interfèrent dans les résultats (MBL ou autre syndrome lymphoprolifératif débutant)
- les antécédents hématologiques ou les orientations diagnostiques des hémopathies issues des résultats d'immunophénotypage réalisés au plus la veille.

Nous avons inclus les patients selon 3 groupes (tableau 13) :

- le groupe « LLC » (patients porteurs de LLC avec un score de Matutes à 4-5/5) :
n= 24 patients,
- Le groupe « SLPB non LLC » : n= 11 patients,
- Le groupe « témoin non SLPB » (patients a priori non diagnostiqués d'un syndrome lymphoprolifératif B). Ont été sélectionnés des adultes et des enfants de moins de

15ans provenant de divers services comme la réanimation, la médecine interne, la neurologie, la gériatrie, la pédiatrie : n= 58 patients.

Au total, nous avons analysé les échantillons de 90 patients

- 30 patients issus des groupes « témoins non SLPB » et « SLP non SLPB » pour étudier la spécificité du panel MRD-LLC
- 1 patient du groupe « LLC » et 2 patients du groupe « témoins non SLPB » pour réaliser le test de contamination,
- 5 patients du groupe « LLC » et 5 patients du groupe « témoins non LLC » pour l'étude de la sensibilité du panel LLC-classique,
- 4 patients du groupe « LLC » et 18 patients du groupe « témoin non SLPB » pour l'étude de la sensibilité du panel MRD-LLC (différence de taille expliquée par des dilutions réalisées dans des pools de sang normaux. Cf partie « Réalisation des dilutions avec le panel MRD-LLC »).

Aussi, parmi les 4 premiers, 3 nous ont permis d'évaluer la répétabilité de la quantification de la maladie résiduelle avec ce panel,

- 9 patients du groupe « LLC » pour comparer les résultats de recherche de maladie résiduelle des 2 panels chez des patients traités,
- 16 échantillons de patients ont été utilisés pour des vérifications et autres mise au point techniques (tests de dilution, réglages des fenêtres d'analyse, comparaison des techniques de lyse des hématies pour les échantillons).

Le tableau 13 présente la répartition des groupes de patients étudiés selon l'âge et le sexe.

Groupe	Homme Age moyen	Femme Age moyen
LLC	n=14 Age : 66,5 ans (\pm 6,2)	n=10 Age : 75,3 ans (\pm 10,9)
SLP non LLC	n=9 Age : 76,9 ans (\pm 6,3)	n=2 Age : 54 ans (\pm 8)
Témoïn non SLP	n=29 Age : 61,6 ans (\pm 24)	n=29 Age : 61,6 ans (\pm 23,4)

Tableau 13 : Répartition des populations de l'étude selon l'âge

La composition détaillée des 3 groupes ci-dessus est présentée dans le tableau 14 :

Groupe LLC	Effectif
Score de Matutes =4/5	
LLC en abstention thérapeutique	n=7
LLC en cours de traitement	n=7
LLC en évaluation de la MRD	n=9
MBL	n=1

Groupe SLP non LLC	Effectif
Lymphome du manteau (MCL)	n=2
Lymphome de la zone marginale (LZM)	n=2
Lymphome splénique à lymphocytes villeux (SLVL)	n=1
Lymphome folliculaire en rémission partielle (FL)	n=1
Leucémie à tricholeucocytes (HCL)	n=1
Maladie de Waldenström (MW)	n=1
Syndrome lymphoprolifératif T	n=3

Témoïn non SLP	Effectif
LAM	n=2
LAL-T	n=1
SEP sous Tysabri	n=1
Patients adultes sans hémopathie avec des lymphocytes B CD5+/CD19+ <1%	n=40
Patients adultes sans hémopathie avec des lymphocytes B CD5+/CD19+ de 1 à 4%	n=9
Patients pédiatriques avec des lymphocytes B CD5+CD19+ jusqu'à 19%	n=2

Tableau 14 : Répartition des populations de l'étude selon la pathologie

Abréviations : LLC (Leucémie Lymphoïde Chronique) ; MBL (Lymphocytose B monoclonale) ; SLP (syndrome lymphoprolifératif), LAM (Leucémie Aiguë Myéloïde), LAL-T (Leucémie Aiguë Lymphoïde T)

Parmi les patients atteints de LLC, 9 faisaient l'objet d'une demande d'évaluation de la MRD (un suivi a été réalisé chez un patient sur 2 prélèvements à 6 mois d'intervalle). On peut considérer dans notre étude le deuxième échantillon comme un autre patient (patient n°8).

Les caractéristiques des patients au moment de l'évaluation de la maladie résiduelle de la LLC sont présentées dans le tableau 15 :

N°	Caryotype + FISH	Biologie moléculaire	Autres données	traitement
1	del13q isolée	congelé	Atteinte rétro-péritonéale	Ibrutinib
2	del13q isolée dans 7% des noyaux	congelé	Rien à signaler	Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide
3	t(13q ;18p) del13q14 cryptique clonale	Mutation <i>NRAS</i> (SNP)	Infiltration médullaire	R-Bendamustine (arrêt après 3 cures pour toxidermie de grade 3)
4	Normaux	Non réalisée	Rien à signaler	FC (6cures)
5	del13q	Absence d'anomalie détectée	Rien à signaler	R-Bendamustine
6	tris12 (55%)	<i>ATM</i> (52%)	CD38+ (62%)	R-Bendamustine (6 cures) 2è ligne : ibrutinib
7	Normaux	Non réalisée	Rien à signaler	Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide
8*	Non réalisés	Non réalisée	Infiltration médullaire	Abstention thérapeutique
9	Non contributifs	Absence d'anomalie détectée	Atteinte médullaire	R-Bendamustine
10	Normaux	congelé	Atteinte médullaire, amygdalienne	Fludarabine-Cyclophosphamide (3 cures) + Fludarabine (3 cures)

Tableau 15: Caractéristiques au moment du diagnostic des patients atteints de LLC et faisant l'objet d'une recherche de MRD.

F : Fludarabine; FC : Fludarabine-Cyclophosphamide ; RFC : Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide

* : Le patient n°8 correspond au patient n°3 qui a été revu 6 mois après la dernière évaluation MRD.

Nature des échantillons :

Il s'agissait de sang total prélevé sur tube EDTA. Le volume utilisé était entre 100µL et 4mL.

III.2- Comparaison de la détection de la MRD dans la LLC par deux panels d'anticorps

Nous avons comparé l'évaluation de la MRD à l'aide du panel de marquage classique utilisé au laboratoire et à l'aide d'un nouveau panel précédemment présenté et dédié à la détection de la MRD que nous avons appelé « panel MRD-LLC ».

III.2.1- Détection de la MRD dans la LLC avec le panel LLC classique

III.2.1.a- Liste des anticorps utilisés dans le panel LLC classique

Le tableau 16 présente les caractéristiques des anticorps utilisés dans le panel « LLC classique » utilisé au laboratoire.

Anticorps	Clone	Isotype	Fluorochrome	Référence	Volume	Fournisseur
Kappa	Polyclonal	F(ab') ₂	FITC	A07709	10µL	Beckman coulter
Lambda	Polyclonal	F(ab') ₂	PE			
CD19	J3-I19	IgG1	ECD			
CD5	BL1a	IgG2a	PC7	A21690	5µL	
CD45	J.33	IgG2a	KO	B36294	5µL	

Tableau 16 : Caractéristiques des réactifs d'anticorps utilisés pour le panel LLC-classique

Nous utilisons au laboratoire un panel de 2 tubes plus complet permettant d'établir le score de Matutes et d'obtenir des informations supplémentaires pour caractériser les syndromes lymphoprolifératifs :

- le premier tube contenant les anticorps : FMC7-FITC, CD23-PE, CD19-ECD, CD10-PC5.5, CD5-PC7, CD22-APC, CD3-AA750, CD20-PB, CD45-KO ;
- le deuxième tube contenant les anticorps : Ig Kappa-FITC, Ig Lambda-PE, CD19-ECD, CD11c-PC5.5, CD5-PC7, CD103-APC, CD25-AA750, CD38-PB, CD45-KO.

III.2.1.b- Solution de lyse : Optilyse C

Il s'agit d'une solution utilisée pour lyser les hématies, contenant 1,5% de formaldéhyde commercialisée par Beckman Coulter (réf A11895). Elle est habituellement utilisée au sein du laboratoire de St Philibert car compatible avec l'exploration des syndromes lymphoprolifératifs B.

III.2.1.c- Technique de marquage des échantillons

Pour un échantillon de patient, la méthode de marquage habituelle des cellules est la suivante :

- 100µL de sang ont été recueillis par tube,
- pour décrocher les immunoglobulines au contact des cellules pouvant interférer avec la fixation des anticorps (en particulier Kappa et Lambda), 2 étapes de lavage (mise en suspension dans du PBS avec agitation douce) ont été réalisées,
- une centrifugation à 300g pendant 5 min suivie de l'élimination du surnageant après chaque lavage,

- les anticorps ont été rajoutés : 5µL par anticorps et 10µL pour ceux des canaux FITC ou PE (la détection est en général plus faible à ces positions par rapport aux autres canaux à volume égal) puis le mélange brièvement vortexé,
- l'échantillon a été incubé pendant 15 min à l'obscurité,
- 500µL d'Optilyse a été mise en contact avec l'échantillon pendant 10 min,
- la lyse des hématies a été interrompue avec 0,5-3mL environ de PBS,
- une nouvelle centrifugation (5minutes à 300g) a été réalisée,
- le surnageant a été retiré puis le culot mis en suspension dans environ 1mL de PBS avant passage au cytomètre.

III.2.1.d- Détermination de la sensibilité du panel LLC classique

Pour cela, nous avons réalisé des dilutions de cellules de LLC à l'aide de cellules de sang normal d'un témoin. Afin de déterminer la plus grande dilution à laquelle les cellules monotypiques sont détectées, 5 séries de dilutions ont été réalisées dans du sang normal à partir de **5 patients du groupe LLC**.

Contexte : dans le cadre des dilutions,

- les quantités de leucocytes des échantillons sont connues avant la dilution (lyse réalisée après les mélanges),
- l'identification des cellules rares étant basée sur une restriction isotypique, nous cherchions à éviter de marquer les cellules normales du sujet témoin (risque de faux positif en présence de quelques cellules CD5+CD19+ non pathologiques).

Nous avons jugé arbitrairement la présence d'une population monotypique lorsque celle-ci est en quantité suffisante et facile à identifier sur les graphes.

Critère de positivité : minimum 10 cellules CD5+CD19+ avec une restriction isotypique sans ambiguïté.

Pour chaque série, la dilution a été réalisée après l'incubation des anticorps et juste avant la lyse des globules rouges, car le respect de la proportionnalité des volumes est possible.

La figure 17 schématise l'ordre de la technique de dilution.

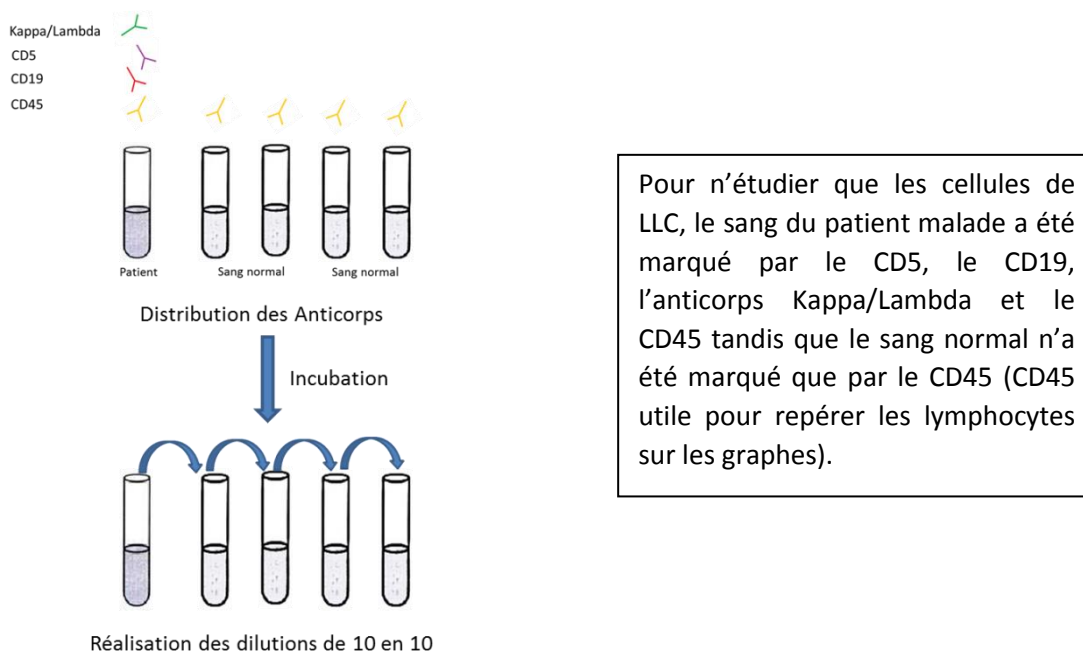


Figure 17 : Schéma de réalisation d'une série de dilution pour déterminer la sensibilité du panel LLC-classique

III.2.2- Détection de la MRD dans la LLC avec le panel MRD-LLC

III.2.2.a- Liste des anticorps utilisés dans le panel MRD-LLC

Divers panels ont été évalués depuis plus d'une quinzaine d'années. Nous avons utilisé un panel dérivé de celui utilisé dans le protocole FILO (60). Le panel MRD-LLC que nous avons utilisé comporte les mêmes anticorps que ceux du protocole FILO dans un ordre différent de fluorochromes (choix des anticorps en fonction de ceux initialement disponibles au

laboratoire) sans le CD200. Le CD200 n'a pas été inclus car étant un autre marqueur pouvant orienter le diagnostic de LLC atypique, nous voulions vérifier dans un second temps s'il était indispensable pour les performances du test. (67–69)

Le panel MRD-LLC ne se base plus sur l'identification d'une restriction isotypique mais sur la discrimination des cellules pathologiques par rapport aux lymphocytes T et B.

Le tableau 17 présente les anticorps constituant notre panel.

Anticorps	Clone	Isotype	Fluorochrome	Référence	Volume	Fournisseur
CD81	JS64	IgG2a	FITC	B25329	10µL	Beckman Coulter
CD22	SJ10.1H11	IgG1	ECD	B10245	5µL	
CD79b	CB3-1	IgG1 kappa	PC5.5	B21445	5µL	
CD19	J3-119	IgG1	PC7	IM3628	5µL	
CD5	BL1a	IgG2a	APC-AF 750	A60790	5µL	
CD43	DFT1	IgG1	APC	B49195	5µL	
CD20	B9E9	IgG2a	Pacific Blue	B49208	5µL	
CD45	J.33	IgG2a	Krome Orange	B36294	5µL	

Tableau 17 : Liste des réactifs d'anticorps utilisés pour le panel MRD-LLC

Le profil d'expression de ces antigènes par les cellules mononuclées du sang est présenté dans le tableau 18. Ceci est utile pour le repérage des populations sanguines sur les graphes de cytométrie.

Antigène	Lymphocytes B	LLC	Lymphocytes T	Monocytes	Granuleux
CD81	++	+	++	+	-
CD22	+++	+	-	-	-
CD79b	+++	+	-	-	-
CD19	++	++	-	-	-
CD5	- ou +/-	++	++	-	-
CD43	-	++	+++	-	-
CD20	+++	+	-	-	-

Tableau 18 : Profil d'expression des leucocytes par anticorps du panel MRD-LLC

III.2.2.b- Solution de lyse macrovolume : Hybri-Max

La lyse macrovolume est réalisée avant le marquage pour réduire la quantité de réactif nécessaire car les globules rouges à éliminer peuvent gêner l'accessibilité des anticorps aux cellules mononuclées.

Pour acquérir un grand nombre de cellules en évaluation de la maladie résiduelle, nous avons choisi une solution permettant de lyser une quantité de sang suffisante (plus importante que pour une analyse classique d'exploration). Elle est autrement appelée lyse macrovolume. Nous avons utilisé une solution de NH₄Cl à 8,3g/L « Red Blood Cell Lysis Buffer Hydri-max » (référence R7757) de Sigma-Aldrich ayant déjà été testée en interne par la société. Celle-ci permet une action douce qui peut être renouvelée si la lyse est visuellement jugée insuffisante avant le lavage au PBS. Elle requiert également un volume de solution modéré permettant plus d'analyses (1,5mL de solution pour 0,5mL de sang).

III.2.2.c- Détermination du volume d'anticorps pour le panel MRD-LLC

Pour vérifier si la diminution de la quantité d'anticorps par rapport aux préconisations du fournisseur n'impactait pas l'interprétation des résultats, différentes concentrations

d'anticorps ont été testées pour un même échantillon (500µL de sang). Cette manipulation a été effectuée sur 2 patients. Les prélèvements cibles avaient une numération de leucocytes comprise entre 5 et 10G/L.

III.2.2.d- Détermination de la sensibilité du panel MRD-LLC

Pour cela, nous avons réalisé des dilutions de cellules de LLC à l'aide de cellules de sang normal de sujets témoins.

Contexte :

- les concentrations en leucocytes des échantillons ont été modifiées par la lyse macrovolume suivie de la mise en suspension dans du PBS,
- des volumes initiaux plus importants que la lyse classique sont nécessaires pour réaliser des dilutions dans l'hypothèse du panel MRD-LLC plus sensible que le panel LLC classique,
- La présence de cellules normales CD5+CD19+ ne gêne pas l'identification des cellules pathologiques,
- le CD45 sert à séparer les leucocytes des éventuels débris.

Dilution visant des concentrations attendues :

Pour réaliser une série de dilutions permettant de passer suffisamment de cellules (au moins 200 000 événement à chaque fois) tout en tenant compte de la contrainte d'être limité par les volumes de sang du patient atteint de LLC et du sang normal, nous avons procédé comme suit.

Deux préparations ont été réalisées. La première provenait d'un échantillon lysé de sang de patient riche en cellules LLC (pourcentage de cellules de LLC par rapport aux lymphocytes connu) puis recueilli dans du PBS. La seconde, un pool d'échantillons de sang normaux ne présentant pas de coexpression CD5+CD19+ pour s'affranchir du risque de contamination à l'analyse par un éventuel MBL ou autre SLPB. Le sang lysé de 2 à 4 patients selon la quantité de leucocytes disponible par pool était remis en suspension dans le PBS. Cette étape modifiant les concentrations des leucocytes, une numération avec formule était ensuite réalisée pour chacune des solutions d'où découlèrent les calculs par la suite. L'étape de centrifugation pouvant entraîner jusqu'à 50% de perte cellulaire a été prise en compte.

Pour chaque tube, le nombre de cellules de LLC attendu variait selon le facteur de dilution mais celui de leucocytes totaux visé était le même pour tous.

Cette technique de dilution a été réalisée ainsi car au vu de la quantité de cellules requise pour passer au moins 200 000 évènements, cela aurait nécessité une importante consommation de la solution Optilyse si celle-ci était utilisée.

La figure 18 montre un schéma illustratif d'une série de dilution pour obtenir dans chaque tube un nombre décroissant de lymphocytes de LLC avec un nombre constant de leucocytes totaux.

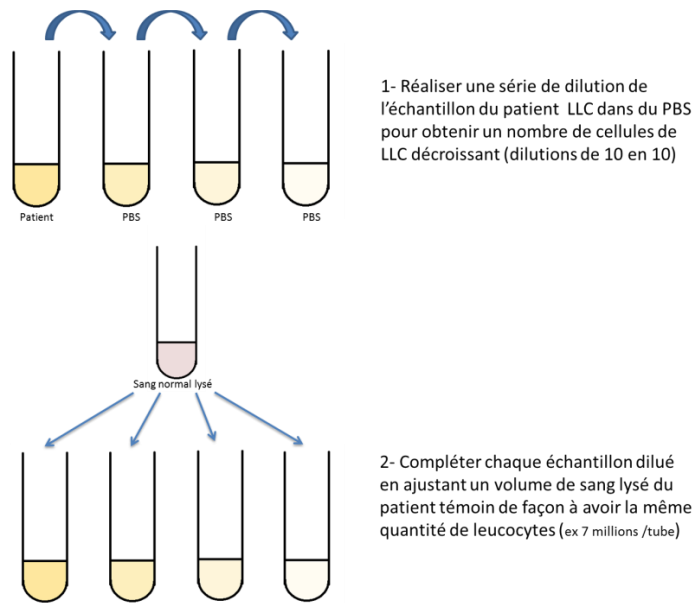


Figure 18: Schéma explicatif d'une série de dilution après l'étape de lyse.

Déroulement de la technique :

- Des échantillons de sang du patient et de sang normal ont été lysés avec la solution hybrimax conformément au guide d'utilisation (1mL de solution avec 500µL de sang sont agités lentement par retournement pendant 10minutes) puis le tout centrifugé à 500g pendant 5minutes. Le surnageant est éliminé puis le culot est remis en suspension dans 1mL de solution de lyse et centrifugé à 500g pendant 3minutes,
- le nouveau culot fait l'objet de 2 lavages au PBS (chacun séparé par une centrifugation à 300g pendant 5min) pour éviter une lyse excessive des leucocytes,
- 100µL de la solution obtenue sont prélevés pour le marquage. Tous les anticorps du panel MRD-LLC peuvent être utilisés pour les différents échantillons mais seuls le CD19 et le CD45 ont été utilisés dans les pools de témoins pour des raisons de coût (repérage des lymphocytes B et des leucocytes),

- Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à l'obscurité, remis dans du PBS puis centrifugés à 300g pendant 5 minutes pour éliminer l'excès d'anticorps non fixé,
- Le surnageant est retiré et les cellules sont mises en suspension dans environ 1mL de PBS avant le passage au cytomètre.

III.2.2.e- Nombre de cellules à analyser pour le panel MRD-LLC

Le nombre de cellules à analyser est indispensable pour déterminer les performances du test, (à savoir la sensibilité, la limite de détection et de quantification et donc la fiabilité du résultat final qui en dépend). D'après les études portant sur le panel 6 couleurs (CD20 exclu), il est recommandé pour le panel MRD-LLC en 6 couleurs d'acquérir au moins 200 000 évènements ou idéalement 500 000. Les seuils retenus sont respectivement 20 et 50 cellules(70).

Ainsi, pour 500 000 évènements analysés, la positivité du résultat dépend du nombre de cellules supposées de LLC comptabilisées (70).

- 0-20 cellules : MRD indétectable
- 20-50 cellules : MRD détectable mais non quantifiable
- >50 cellules : MRD positive quantifiable : le pourcentage peut être rendu.

III.3- Analyse des données sur flowSOM

Une fois les dilutions réalisées et passées au cytomètre, nous avons voulu voir si l'utilisation de flowSOM permettait de détecter les cellules de LLC. Les fichiers au format « .LMD » ont été convertis au format « .fcs » pour être lus par le logiciel sur R.

Pour récapituler

- Pour déterminer la spécificité du panel MRD-LLC, 31 patients non LLC ont été testés.
- Pour déterminer la sensibilité des panels, des dilutions successives ont été réalisées. Les méthodes différaient pour les panels selon les objectifs et les procédures de marquage.
- Pour le panel LLC-classique, le nombre de cellules analysées était au minimum 30 000 évènements voire 100 000.
- Pour le panel MRD-LLC, le nombre de cellules analysées était au minimum de 200 000 évènements et idéalement 500 000.

IV. Résultats

IV.1- Panel LLC-classique

La figure 19 illustre un exemple de résultat d'analyse repérant des cellules de LLC dans le panel LLC classique utilisé au laboratoire :

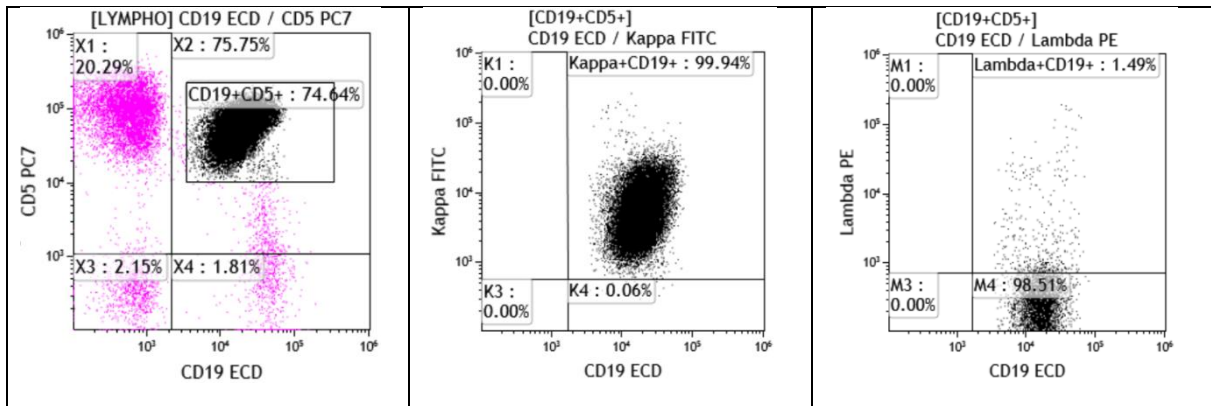


Figure 19: Exemple d'identification d'une population de LLC avec le panel LLC-classique

Il est constaté la présence d'une population B CD5+, CD19+ avec une monotypie Kappa d'intensité moyenne pour les chaînes légères.

IV.1.1- Spécificité du panel LLC classique

La spécificité de ce panel n'a pas été testée car elle est admise dans la littérature. Pour réduire le risque de faux positif, 2 étapes de lavage au PSB suivies de centrifugation sont réalisées et la combinaison de plusieurs marqueurs du panel (FMC7, CD23 etc.) facilite l'interprétation.

IV.1.2- Sensibilité mesurée de détection des cellules résiduelles : panel LLC Classique

Pour tester la sensibilité du panel LLC classique, nous avons réalisé des séries de dilution des cellules de LLC de 5 patients. Pour les 5 séries de dilution, on pouvait encore rendre un

résultat positif au seuil de 10^{-3} . En dessous, le nombre de cellules positives était inférieur à 10 ou ces cellules étaient trop dispersées, faisant évoquer un marquage non spécifique.

La figure 20 montre un cas de population cellulaire trop faible et dispersée pour affirmer sa détection.

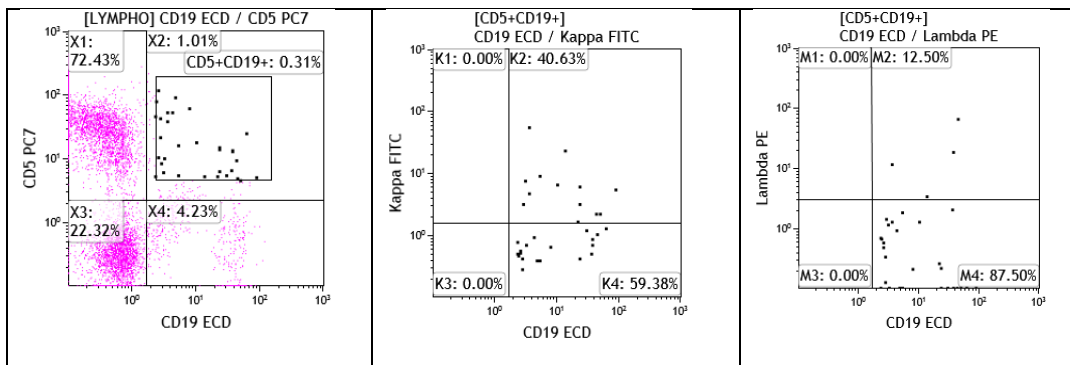


Figure 20: Graphe d'un résultat pour une dilution au $1/10^{4\text{ème}}$ avec le panel LLC-classique

A cette dilution, il ne nous est pas possible de nous prononcer sur la présence de cellules résiduelles de LLC.

La figure 21 illustre la décroissance progressive du nombre de cellules de LLC au cours des dilutions par patient malade.

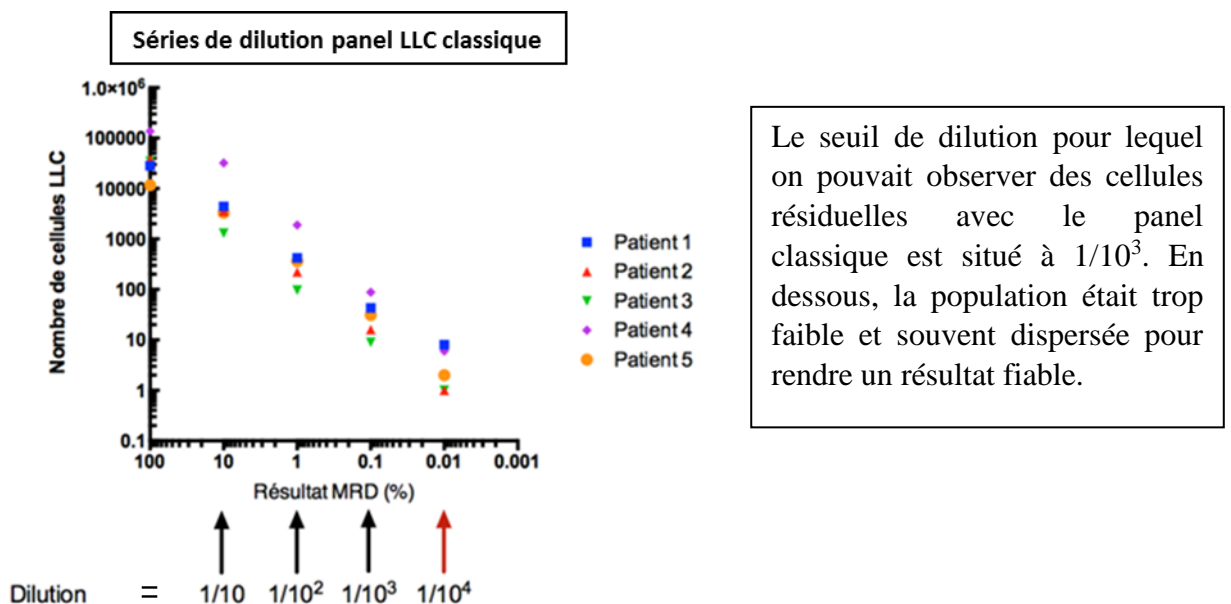


Figure 21: Décroissance des cellules de LLC en fonction des dilutions pour le panel LLC-classique

La décroissance des cellules de LLC était similaire entre les séries malgré des concentrations initiales différentes. A la dilution au $1/10^{4\text{ème}}$, le nombre de cellules de LLC variait de un à dix.

La figure 22 illustre en détail la décroissance des cellules de LLC au cours d'une dilution d'un échantillon de patient marqué avec le panel classique.

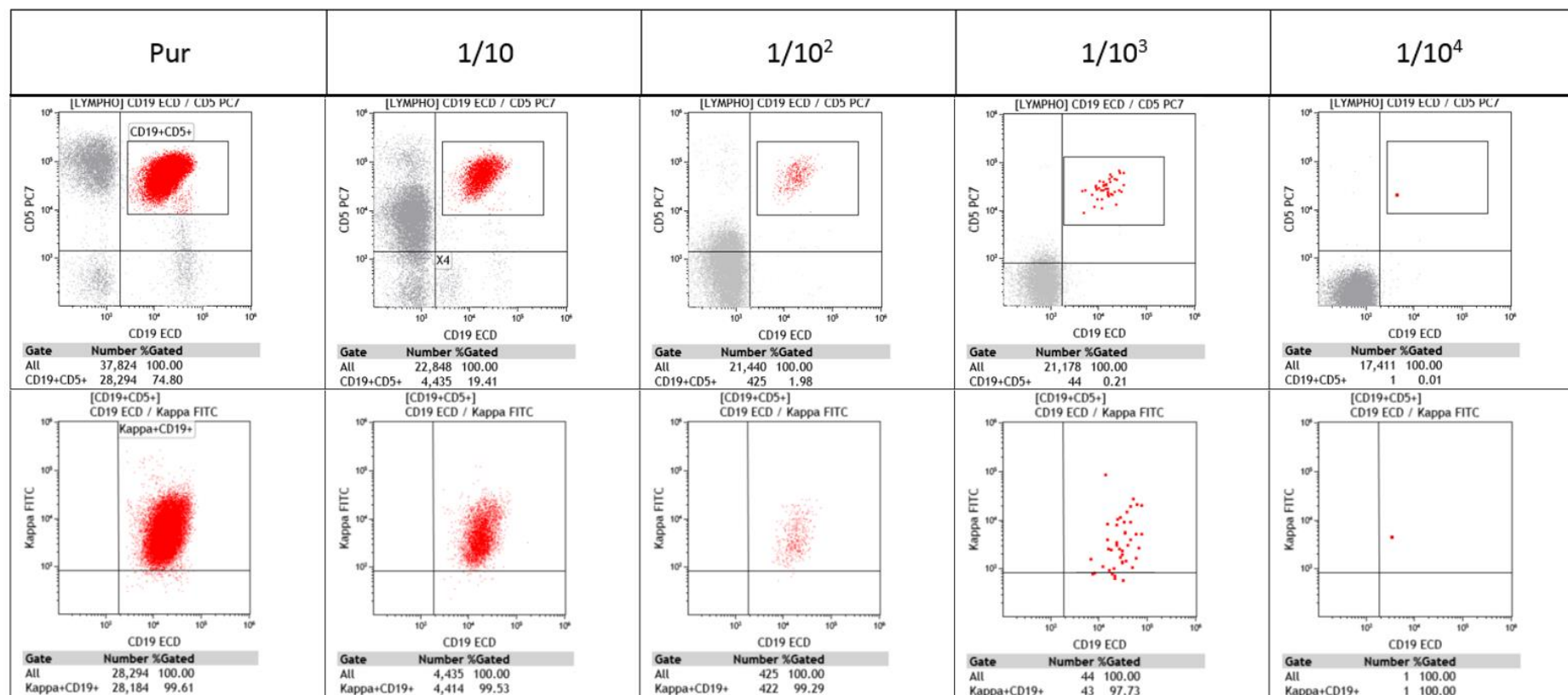


Figure 22: Exemple de graphes après dilution d'un échantillon LLC pour le panel LLC-classique (monotypie kappa)

Les cellules de LLC étaient spécifiquement marquées (en rouge) et la position de la fenêtre cible CD19+CD5+ était inchangée pour les différentes dilutions de l'échantillon. Nous observons la décroissance des cellules avec la quantité de cellules exprimant l'immunoglobuline Kappa. Les cellules normales n'ont pas été marquées pour faciliter l'interprétation des résultats.

IV.2- Panel MRD-LLC

Nous avons utilisé le panel 7 couleurs décrit dans la partie matériel et méthodes : CD81-FITC, CD22-ECD, CD79b-PC7.5, CD19-PC7, CD5-APC-AF 750, CD43-APC, CD20-PB. Le CD45-KO est également présent pour repérer les lymphocytes mais n'est pas utilisé pour la détection des cellules résiduelles.

IV.2.1- Volume d'anticorps nécessaire

Dans le but de réduire la consommation d'anticorps par analyse (qui ont un coût non négligeable), nous avons vérifié que la diminution des volumes d'anticorps par rapport aux préconisations du fournisseur n'impactait pas les résultats.

D'après les recommandations fournisseur, il est préconisé d'utiliser un volume de 20 μ L par anticorps marqué en FITC ou PE et 10 μ L par anticorps pour les autres fluorochromes, pour un échantillon de 2 millions de leucocytes. Nous avons marqué 2 échantillons contenant 5 et 8 millions de leucocytes environ à différents volumes d'anticorps. Pour les anticorps marqués en FITC et PE, nous avons réalisé des essais de 20 μ L, 10 μ L et 7 μ L. Pour les autres anticorps, nous avons réalisé des essais de 10 μ L, 5 μ L et 3 μ L. Le volume de l'échantillon à tester pour chaque patient était de 500 μ L de sang.

La figure 23 montre un marquage de lymphocytes d'un patient avec le panel MRD-LLC avec différents volumes d'anticorps. Le même nombre d'évènements était recueilli et nous avons jugé qu'il n'y avait pas de différence importante en termes d'intensité de fluorescence.

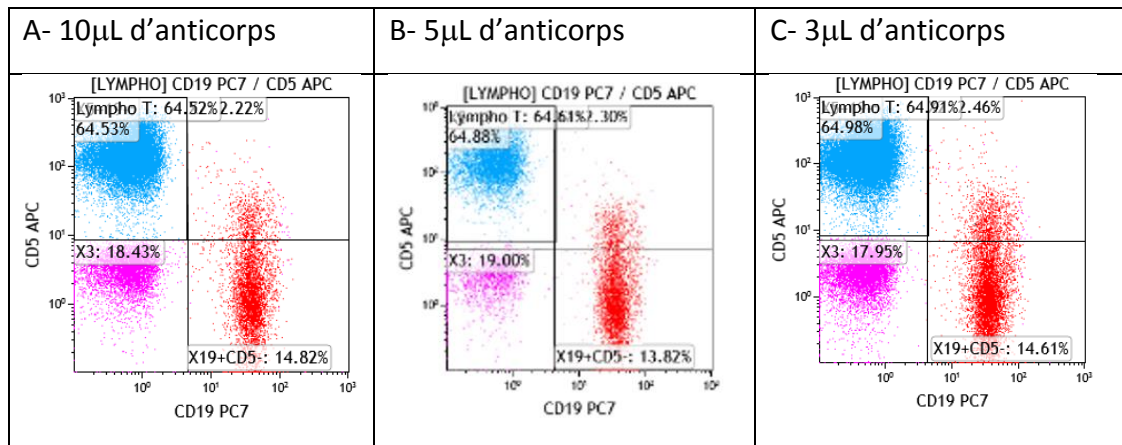


Figure 23: Comparaison d'un échantillon de sang marqué avec le panel MRD-LLC avec des volumes décroissants d'anticorps.

La première colonne (A) montre un marquage réalisé avec un volume de 10µL par anticorps, la deuxième (B) avec 5µL et la troisième (C) avec 3µL.

Gating réalisé sur les lymphocytes : les lymphocytes T en bleu, les lymphocytes B en rouge. Les autres cellules (dont les NK, précurseurs lymphoïdes non explorés sont par défaut en rose).

Pertinence de la combinaison d'anticorps pour identifier les cellules de LLC

Pour justifier le choix des anticorps sélectionnés dans le panel MRD-LLC, la figure 24 montre chez un patient atteint de LLC, la localisation de la population de cellules LLC par rapport aux lymphocytes T et B en fonction des différents marqueurs du panel.

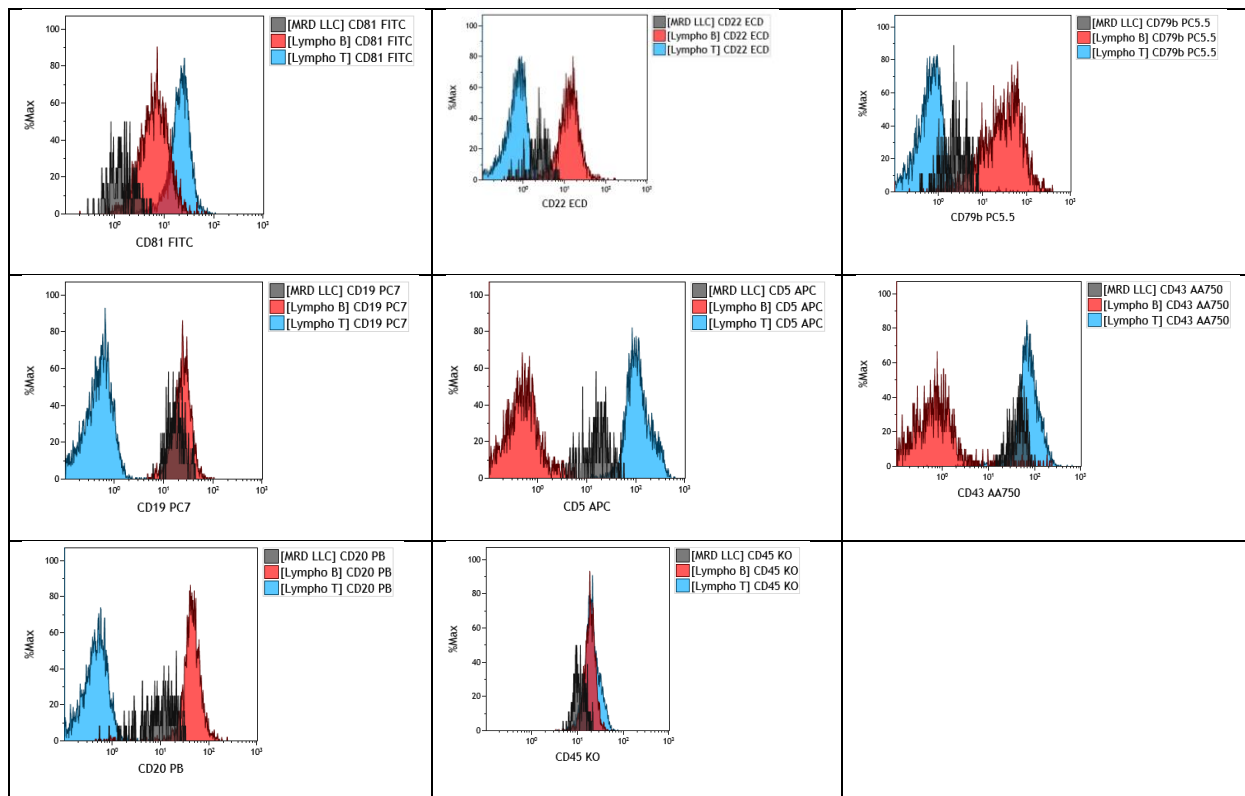


Figure 24: Représentation monoparamétrique des populations lymphocytaires chez un patient ayant une LLC à partir du panel MRD-LLC

En gris : cellules de LLC, en rouge : lymphocytes B, en bleu : lymphocytes T.

Les graphes de la figure 24 montrent que la majorité des anticorps pris individuellement permet de séparer aisément les 3 populations lymphocytaires (B, T et LLC) surtout le CD81, le CD20, le CD5.

Afin de faciliter l'analyse des cellules de LLC avec le panel MRD-LLC, nous avons schématiquement représenté sur la figure 25 la localisation attendue des différentes populations cellulaires sur les graphes d'analyse du cytomètre. Ce schéma représente la synthèse de l'analyse de tous les patients de LLC que nous avons testés (24 patients)

L'intersection des fenêtres A à E (sur les cellules CD19+) est rendue sur le graphe F. Les fenêtres G, H et I (sur les lymphocytes) servent à vérifier la cohérence du résultat final F.

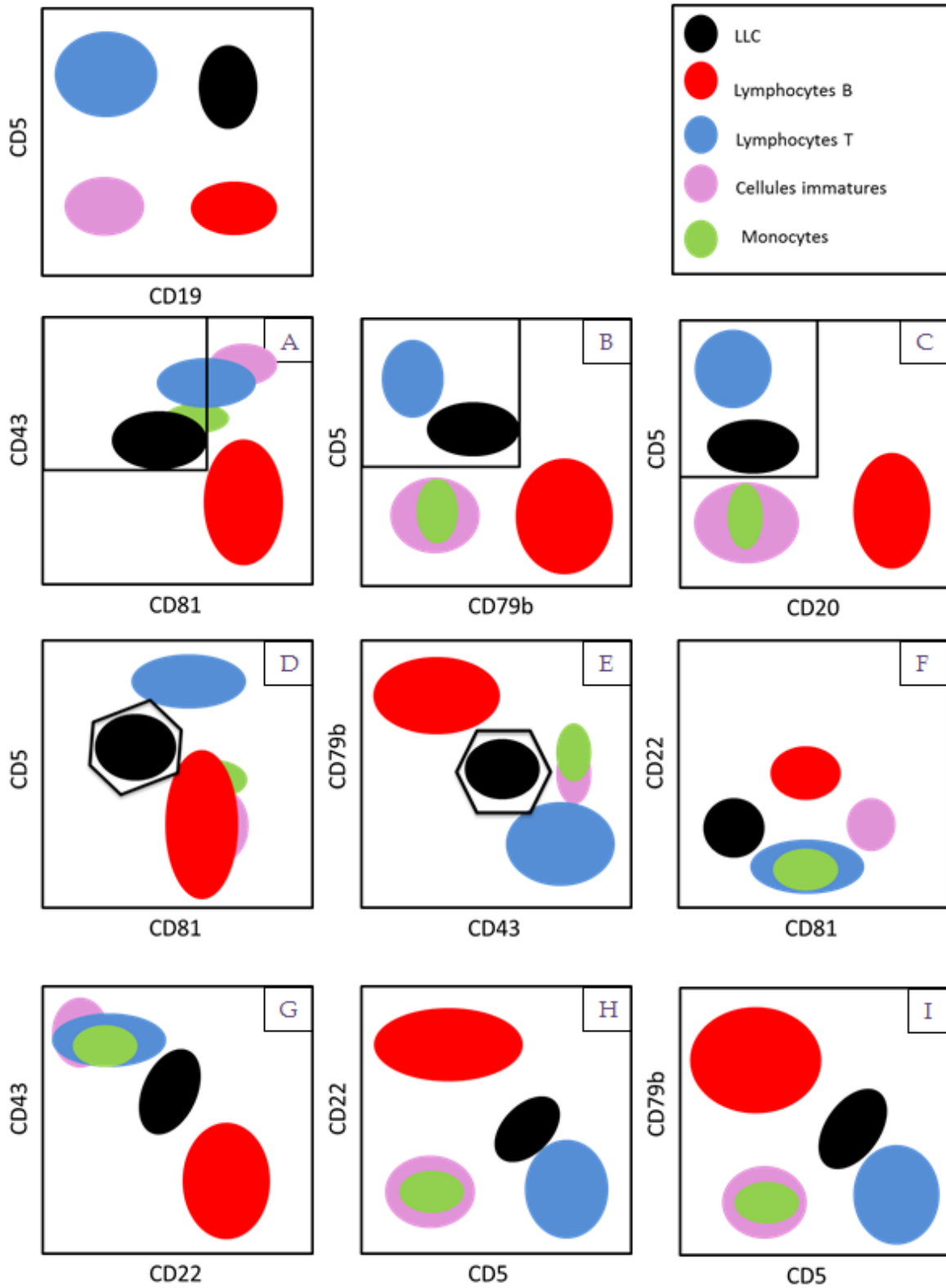


Figure 25: Cartographie schématique de la répartition cellulaire de différentes populations (lymphocytes non NK et monocytes) en présence de cellules de LLC avec le panel MRD-LLC. Les cellules résiduelles de LLC sont dénombrées dans le graphe F qui correspond à la booléenne des cellules de LLC dans les graphes A à E.

IV.2.2- Spécificité du panel MRD-LLC

IV.2.2.a- Détermination des limites de détection et de quantification du panel MRD-LLC

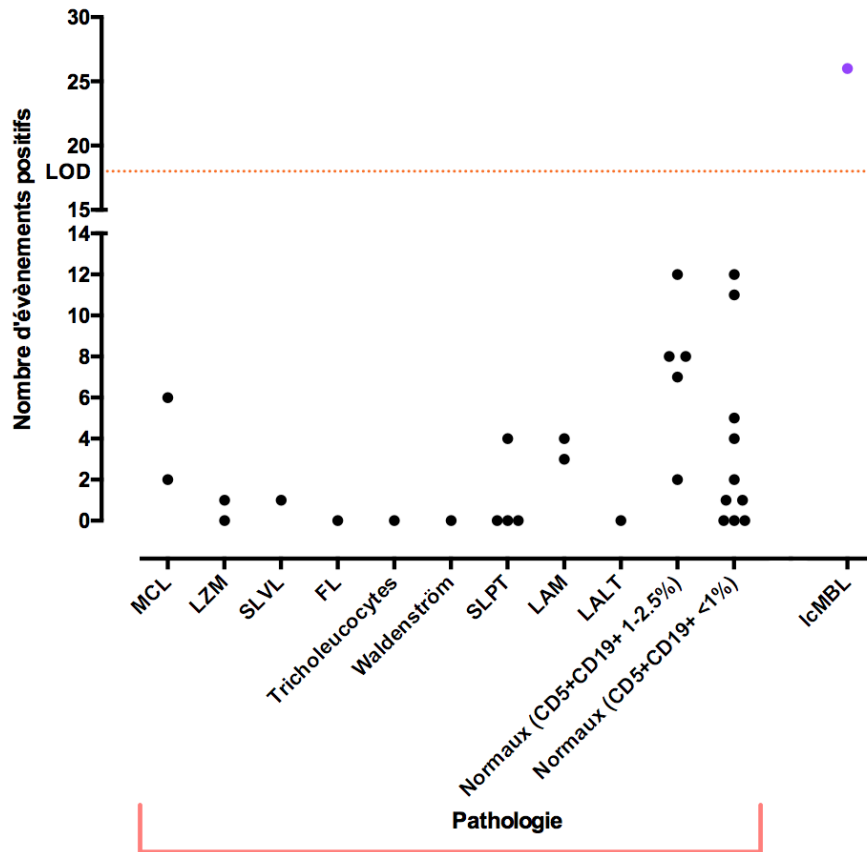
Nous avons d'abord vérifié que le panel testé rendait des résultats négatifs chez des patients non LLC (moins de 0.01% des leucocytes conformément aux recommandations de iwCLL2018 (7)). Nous en avons calculé les limites de détection et de quantification.

Pour cela, nous avons testé 30 patients non LLC (tableau 19) :

Caractéristique phénotypique du sujet témoin	Effectif
Lymphome du manteau (MCL)	n=2
Lymphome de la zone marginale (LZM)	n=2
Lymphome splénique à lymphocytes villeux (SLVL)	n=1
Lymphome folliculaire en rémission partielle (FL)	n=1
Leucémie à tricholeucocytes (HCL)	n=1
Maladie de Waldenström (MW)	n=1
Syndrome lymphoprolifératif T	n=4
Leucémies aiguës (LAM et LAL-T)	n=3
Normaux (1 à 2.5% de co-expression CD5+/CD19+)	n=5
Normaux (pas de co-expression CD5+/CD19+ ou co-expression CD5+CD19+<1%)	n=10

Tableau 19: Composition du groupe de patients non LLC utilisés pour la spécificité du panel MRD-LLC

La figure 26 présente les résultats de la mesure de la MRD chez des patients non LLC. Le cas de lcMBL est expliqué plus loin.



Patients utilisés pour le calcul de la limite de détection (n=30)

LOD : Limite de détection
IcMBL : low count MBL

Figure 26: Détail des résultats de test du panel MRD-LLC chez des patients non LLC

Le patient atteint de IcMBL présentait un nombre de cellules de LLC supérieur à la limite de détection déterminée à partir des résultats faussement positifs des patients non LLC.

La limite de détection peut se traduire par le seuil minimal permettant de repérer les cellules de LLC. En dessous de ce seuil, les signaux comptés sont considérés comme négatifs ou indétectables (les évènements comptés sont attribués au bruit de fond cellulaire).

Au-delà de la limite de détection, un résultat peut être considéré comme positif mais, du fait de la variabilité de mesure proche du seuil, un résultat est communément admis comme positif à partir de la limite de quantification. En effet, le seuil de quantification est utile pour des raisons de reproductibilité et de fiabilité du résultat.

Comme cité dans les généralités, la limite de détection se calcule à partir du bruit de fond cellulaire (faux positifs des patients non LLC) selon la formule :

Limite de détection (**LOD**) \approx bruit de fond moyen + 3,3 écart-type (du bruit de fond moyen)

Limite de quantification (**LOQ**) \approx bruit de fond moyen + 10 écart-type (du bruit de fond moyen).

Le tableau 20 présente les limites de détection et de quantification que nous avons obtenues avec le panel MRD-LLC.

p= 0.01%		Nombre d'évènements = 500 000			
Panel	Bruit de fond	Bruit de fond moyen	écart-type du bruit de fond moyen	LOD	LOQ
7 couleurs : MRD-LLC	0-12 évènements	3,3 évènements	4.4	~18 soit 0.0036%	~47 soit 0.0094%

Tableau 20: Limites calculées du panel MRD-LLC

LOD : limite de détection ; LOQ : limite de quantification

Nous n'avons pas observé de discordance avec les valeurs de référence d'après Rawstron & al (70) : 20 évènements pour 500 000 cellules ou 0,004% pour la LOD et 50 évènements pour 500 000 cellules ou 0,01% pour la LOQ.

Par ailleurs, nous avons étudié un patient atteint de low-count MBL (lcMBL : présence d'une population clonale retrouvée avec le panel d'exploration du laboratoire et exprimant les marqueurs CD19+, CD5+, FMC7-, CD23+, CD20 et CD22 faibles). Ce patient n'a pas été inclus dans le groupe de patients pour le calcul des limites de détection et de quantification du test en raison d'un phénotype identique à celui d'une LLC. On constate que le nombre de cellules détectées chez ce patient (26 cellules) est situé entre les limites de détection (18 cellules) et de quantification (47 cellules). Ce résultat positif n'était pas surprenant vu la

relation physiopathologique entre la MBL et la LLC S'il s'agissait d'une étude de la MRD de LLC, l'interprétation du résultat serait « maladie résiduelle détectable et non quantifiable ».

Pour certains échantillons, l'analyse de 500 000 évènements n'a pu être atteinte pour raisons techniques (volume insuffisant notamment). Toutefois, pour ne pas sous-estimer le bruit de fond (pas de majoration significative du nombre de faux positifs en augmentant le nombre d'acquisitions), nous avons pu tester un échantillon de patient sans hémopathie : lors d'un premier passage avec acquisition d'environ 350 000 évènements, le nombre de cellules détectées était de 12, puis il a été de 7 cellules lors d'un second passage avec acquisition d'environ 850 000 cellules.

Nous avons ainsi pu définir nos limites de détection et de quantification au laboratoire pour 500 000 évènements, détection de :

- 0-18 cellules : MRD indétectable
- 18-47 cellules : MRD détectable mais non quantifiable
- >47 cellules : MRD positive quantifiable : le pourcentage peut être rendu.

IV.2.2.b- Recherche des faux positifs pour le panel MRD-LLC : cas des autres syndromes lymphoprolifératifs B

Nous avons choisi de tester des patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs B non LLC pour avoir une idée du profil des autres pathologies et vérifier que le panel n'identifiait pas à tort d'autres lymphomes comme des LLC (absence de faux positifs). Avant l'inclusion dans un protocole de traitement pour une LLC, il est conseillé d'évaluer son profil avant traitement à la recherche d'éventuel clone non LLC potentiellement responsable de l'apparition d'une autre pathologie après rémission apparente.

Connaissant le profil d'expression des cellules de LLC, nous avons adapté le positionnement des gates en fonction des autres populations présentes dans l'échantillon. En dehors des 2 patients atteints de Lymphome du Manteau (MCL) les différentes pathologies ne posaient pas de difficulté d'interprétation et les cellules anormales étaient clairement identifiées comme des cellules non LLC. En absence de correction du gating, les populations sélectionnées auraient été tronquées de manière aberrante.

Concernant les patients de la catégorie MCL, le profil d'expression était atypique notamment concernant les marqueurs CD43, CD79b et la gate finale CD81/CD22. Pour nous assurer qu'un clone de cellules MCL en faible proportion ne soit pas confondu avec un clone de cellules de LLC, nous avons procédé à une dilution au 1/20^{ème} de l'échantillon dans celui d'un patient sans hémopathie (résultat non présenté). Le profil restait atypique et similaire à l'échantillon initial. Cependant, dans le cas où nous aurions dilué le clone MCL jusqu'à un seuil proche de la limite de quantification, l'interprétation aurait été probablement plus difficile, nécessitant l'utilisation de marqueurs complémentaires recommandés en deuxième intention comme le CD200, le ROR-1 (7).

La figure 27 montre les différents profils d'expression des divers marqueurs du panel MRD-LLC pour les populations pathologiques non LLC. Notre population d'étude étant composée de patients ayant un score de Matutes à 4 ou 5, nous nous sommes assuré que le profil d'expression des marqueurs chez les patients LLC n'était pas identique à un autre syndrome lymphoprolifératif B. Des marqueurs complémentaires (CD200, ROR-1) pourront s'avérer utiles dans le cas d'extension à d'autres groupes de patients (score à 3, lymphomes complexes avec des clones différents...).

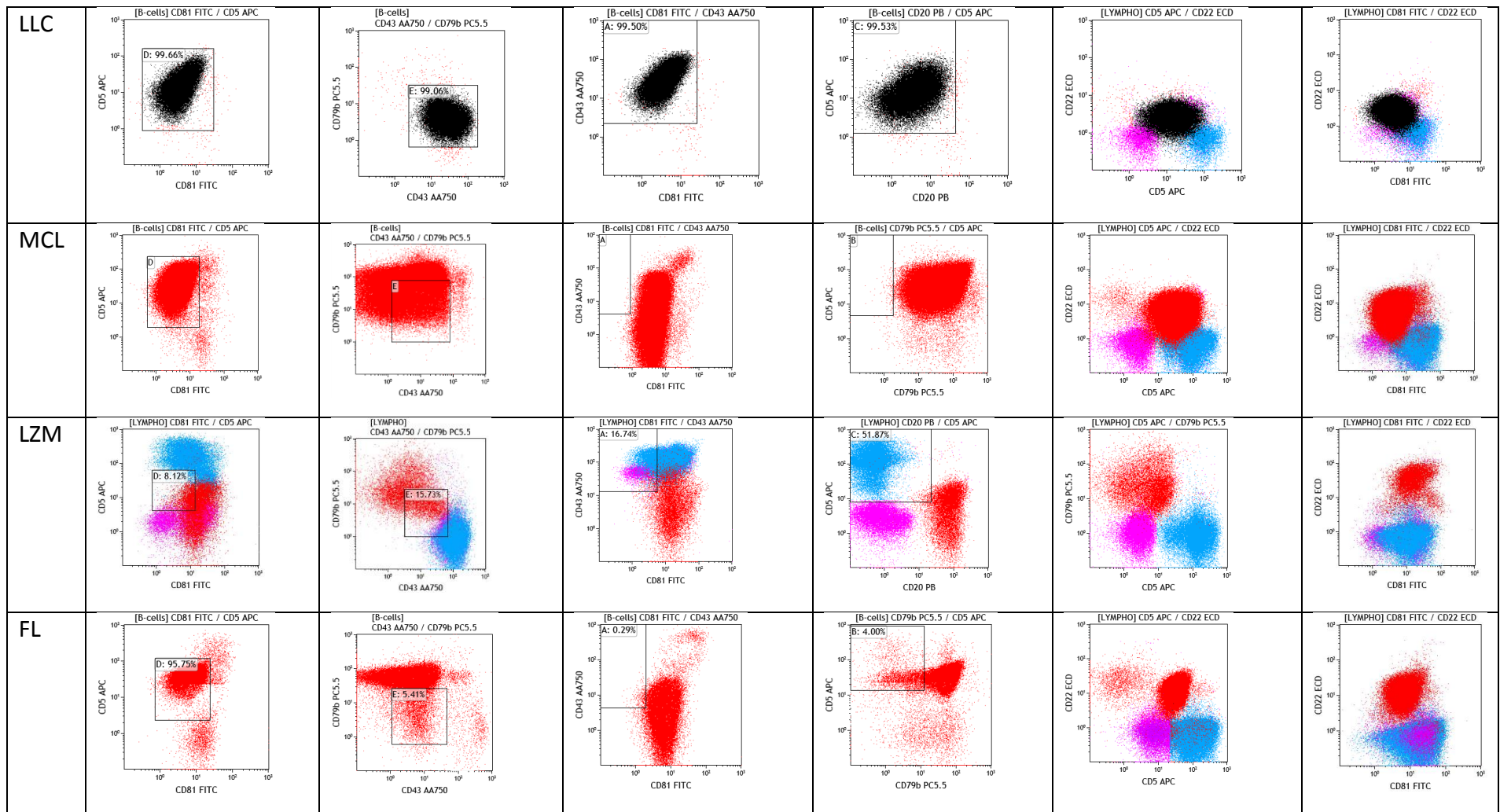


Figure 27 : Exemple de profils d'autres syndromes lymphoprolifératifs B avec le panel MRD-LLC

Les cellules présentes dans la booléenne sont des cellules exprimant un profil de LLC et sont colorisées en noir. Lorsque les cellules lymphocytaires B ne sont pas retrouvées dans la booléenne, elles restent colorisées en rouge. Le résultat final est quantifié dans le graphe de la dernière colonne.

IV.2.3- Sensibilité mesurée de détection des cellules résiduelles : panel MRD-LLC

Pour mesurer la sensibilité de détection des cellules de MRD, 4 séries de dilution ont été réalisées. A noter que nous avons directement commencé la dilution au 1/10^{ème} par l'approche des dilutions attendues.

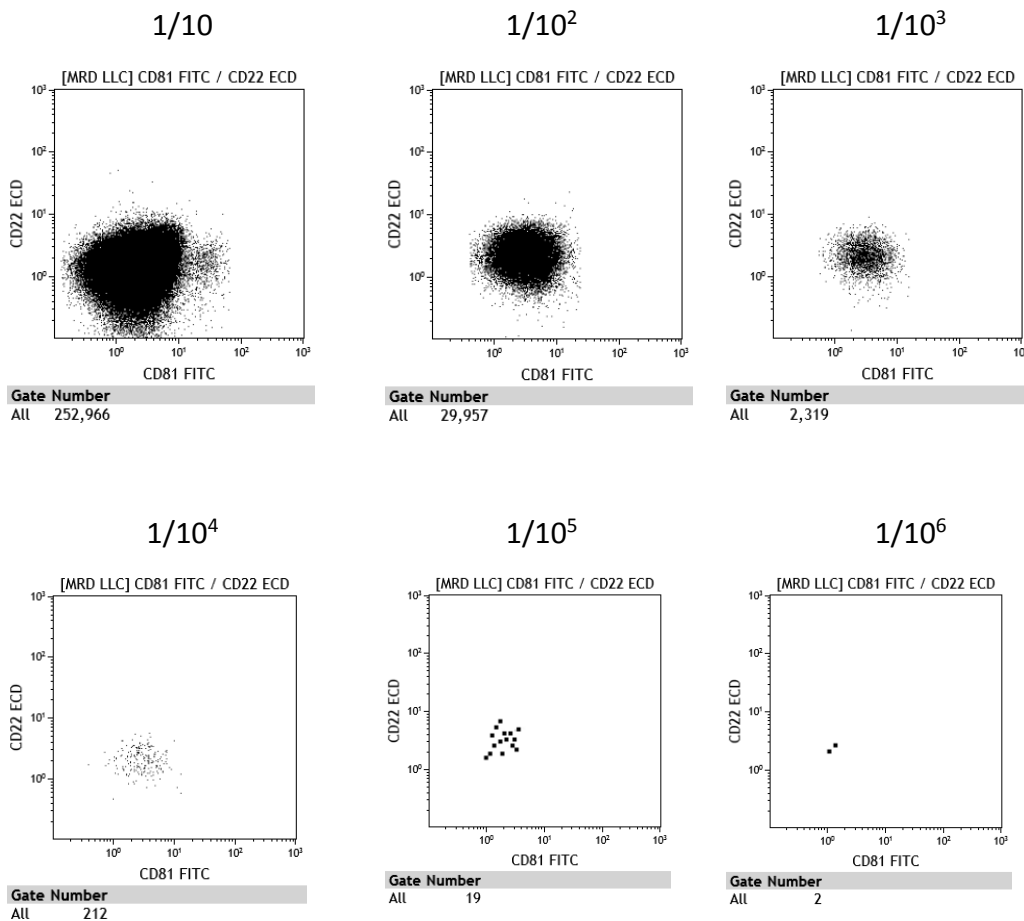


Figure 28: Cas d'une série de dilution d'échantillon d'un patient atteint de LLC avec le panel MRD-LLC

En visant un échantillon de 7 millions de leucocytes après la lyse, on considère une perte d'environ 50% des cellules avec les étapes de centrifugation.

La figure 29 compare les résultats d'une série de dilution théorique avec ceux observés.

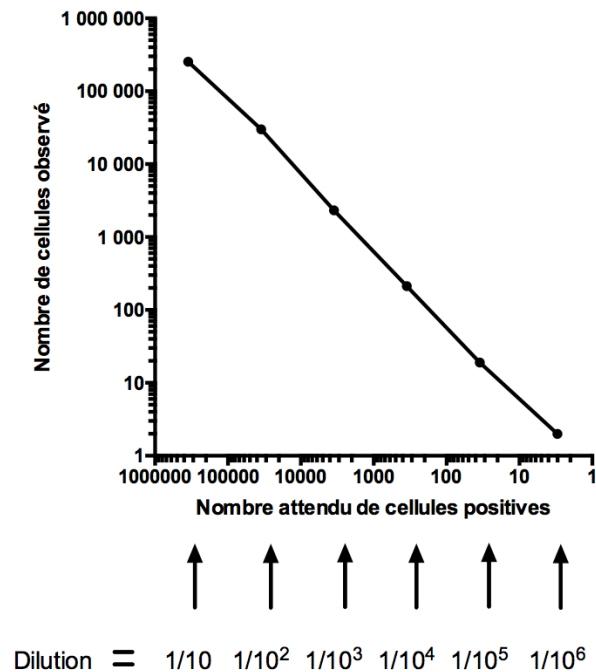


Figure 29: Corrélation entre le nombre de cellules attendues et mesurées pour une série de dilution (panel MRD-LLC)

Pour récapituler

- Pour le panel LLC-classique et par dilution successive de 5 échantillons de patients LLC, la sensibilité déduite était de 10^{-3} .
- Pour le panel MRD-LLC, les cellules de LLC ont été repérées par dilutions successives jusqu'à 10^{-5} (sensibilité observée).
- Pour le panel MRD-LLC, en testant 30 patients non LLC (cf parade d'identification ou figure 26) la limite de détection était de 0,003% et la limite de quantification était de 0,0094%.

IV.4- Comparaison de la quantification des cellules résiduelles par les 2 panels de cytométrie

9 patients traités ont fait l'objet d'une demande de recherche de maladie résiduelle au laboratoire (un patient a fait l'objet de deux évaluations de la maladie résiduelle à 6 mois d'intervalle : échantillon n° 3 et 8). Nous avons comparé les résultats de MRD obtenus avec les 2 panels : panel LLC classique et panel MRD-LLC. Le tableau montre les résultats obtenus sur le cytomètre.

N° d'échantillon	Nombre de cellules LLC / Nombre évènements			
	Panel SLPB (LLC classique + autres Ac)		Panel MRD-LLC	
	Résultat MRD	Interprétation du résultat	Résultat MRD	Interprétation du résultat
1	11.61%	Positif	12,44%	MRD quantifiable
2	0.08%	Positif	0.07%	MRD quantifiable ^a
3	<0.01% Après ré analyse (24 cellules)	Négatif	Pas de pourcentage rendu (21 cellules)	MRD détectable mais non quantifiable
4	Absence de monotypie	Négatif	Pas de pourcentage rendu (11 cellules)	MRD indétectable ^b
5	0.46%	Positif	0.46%	MRD quantifiable
6	2.67%	Positif	2.53%	MRD quantifiable
7	Absence de monotypie	Négatif	Pas de pourcentage rendu (0 cellules)	MRD indétectable
8	Absence de monotypie	Négatif	Pas de pourcentage rendu (0 cellules)	MRD indétectable
9	5.78%	Positif	3.94%	MRD quantifiable
10	5,56%	Positif	6,6%	MRD quantifiable

Tableau 21: Résultat de la mesure de la MRD avec le panel LLC classique et le panel MRD-LLC pour des patients malades

^a : pour une limite de quantification à 0,0094% ; ^b : pour une limite de détection à 0,0036%

Pour le patient 3, l'interprétation avec le panel LLC classique semblait peu aisée et *a priori* négative devant la prédominance de cellules normales. Etant donné que le panel MRD-LLC semblait repérer des cellules de LLC, nous avons réanalysé les graphes du panel LLC classique et nous avons détecté des cellules positives en se basant sur le profil théorique des cellules de LLC avec les marqueurs complémentaires du panel d'exploration classique (FMC7-FITC, CD23-PE, CD22-APC, CD20-PB).

Pour l'échantillon d'un patient testé avec les deux panels, le nombre d'évènements à acquérir était à l'appréciation de l'opérateur et sensiblement identique dans les cas où le panel LLC classique rendait un résultat positif (cas de l'échantillon 1 par exemple qui ne nécessitait pas 500 000 évènements d'acquisition). Lorsqu'un résultat semblait négatif avec le panel LLC classique, l'acquisition se poursuivait avec le panel MRD jusqu'à 500 000 évènements à la recherche de cellules de LLC rares.

Au vu de l'effectif, nous n'avons pas observé de discordance de résultats entre les 2 panels.

Chez 7 patients, les résultats sont identiques avec les deux panels. Pour 2 patients (n° 1 et 10), le panel MRD-LLC identifie plus de cellules que le panel LLC classique et pour 1 patient (n°9), le panel classique identifie plus de cellules. Au final, l'interprétation du résultat rendu est identique avec les 2 panels.

Cependant l'identification des cellules de LLC est plus simple, rendue avec plus de confiance et permet de mieux stratifier les patients. La délimitation de la population de cellules de LLC par rapport aux cellules normales est souvent moins aisée avec le panel LLC classique.

La figure 30 illustre la corrélation des résultats de MRD obtenus avec les 2 panels. Pour des raisons de lisibilité des résultats en échelle logarithmique, la zone de valeur entre 0 et 1% a été agrandie sur le graphe inférieur.

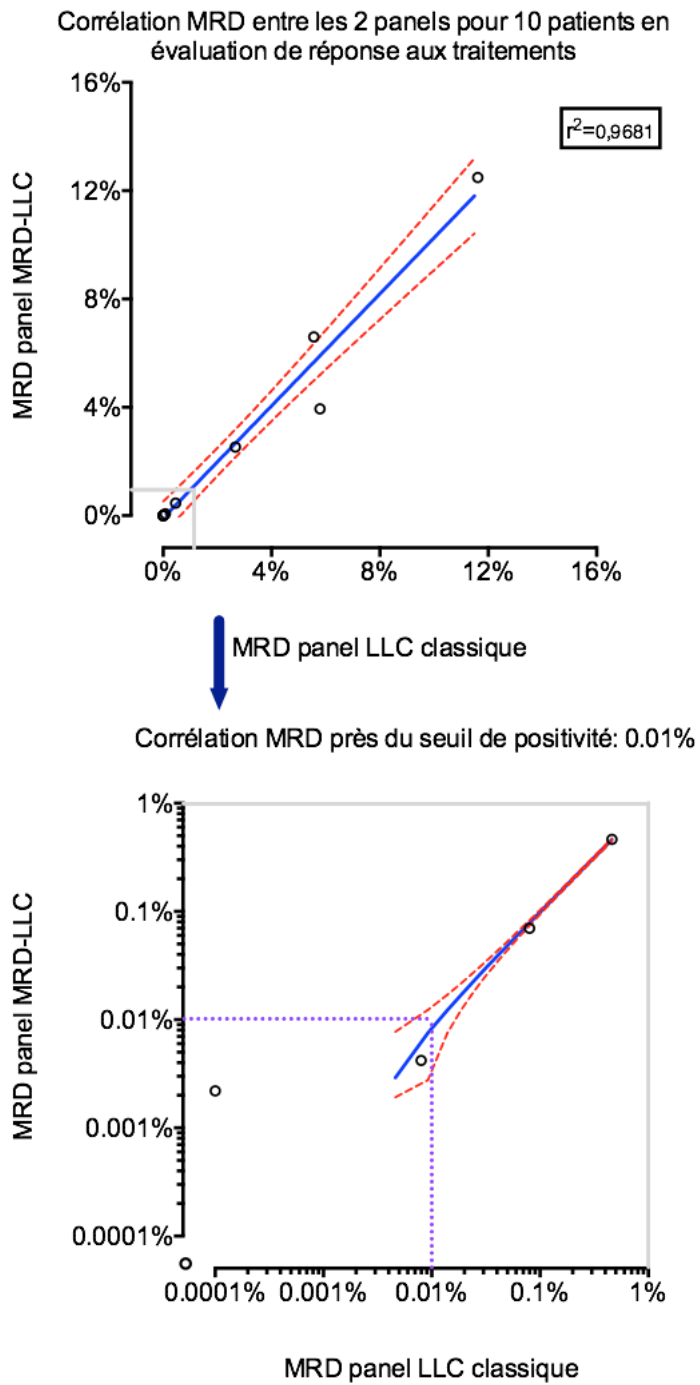


Figure 30: Corrélation de la MRD entre le panel LLC-classique et le panel MRD-LLC

Le coefficient de corrélation pour les résultats de MRD selon les 2 panels chez les patients relevant de l'indication était $r^2 = 0.9704$. En s'intéressant aux valeurs proches du seuil de positivité, il n'a pas été observé de discordance (positivité pour un seul panel) pour l'effectif.

La fréquence des consultations de suivi ne nous a pas permis d'évaluer la cinétique de la maladie résiduelle par patient (Délai entre les consultations de 6 à 9 mois).

La significativité et l'impact pronostique de rares cellules pathologiques avec le panel LLC classique n'est pas clairement standardisée.

IV.5- Comparaison pour la quantification de la maladie résiduelle en cytométrie en flux avec celle en biologie moléculaire

Nous avons souhaité évaluer l'apport des techniques de détection de la MRD LLC par cytométrie en flux et par biologie moléculaire. Aucun des 9 patients de notre étude suivis pour une recherche de la maladie résiduelle par cytométrie en flux n'a bénéficié d'une recherche de celle-ci par biologie moléculaire. Ceci suggère que l'évaluation de la maladie résiduelle par analyse moléculaire n'est pas systématiquement dans les pratiques des services cliniques de notre établissement.

IV.3- Pour Aller plus loin : stratégies de « gating » alternatives

Pour vérifier que notre stratégie de repérage des cellules résiduelles était convenable, nous avons secondairement testé 2 alternatives.

En effet, la stratégie que nous avons utilisée pour cibler les cellules positives avec le panel MRD-LLC est issue d'une combinaison personnalisée après analyse de la littérature. Nous l'avons progressivement testée et améliorée. Les résultats nous semblaient cohérents intrinsèquement malgré une approche a priori simplifiée.

Les 2 stratégies annexes de ciblage suivantes ont en commun une approche plus exhaustive : elles réduisent considérablement le nombre d'informations potentiellement omises pendant l'analyse des graphes et donnent un aperçu de l'expression simultanée de tous les marqueurs pour les cellules d'intérêts pour l'un, et de tous les lymphocytes pour l'autre. Il s'agit de :

- L'utilisation de populations de pré-ciblage (utilisées dans certains centres comme le laboratoire de l'hôpital Avicenne). Nous les avons testées pour le panel MRD-LLC.
- L'utilisation du logiciel flowSOM (qui a l'avantage d'être non opérateur dépendant et permettrait de repérer des cellules rares sous certaines conditions). Il a été utilisé pour analyser les graphes obtenus avec les panels LLC classique et MRD-LLC.

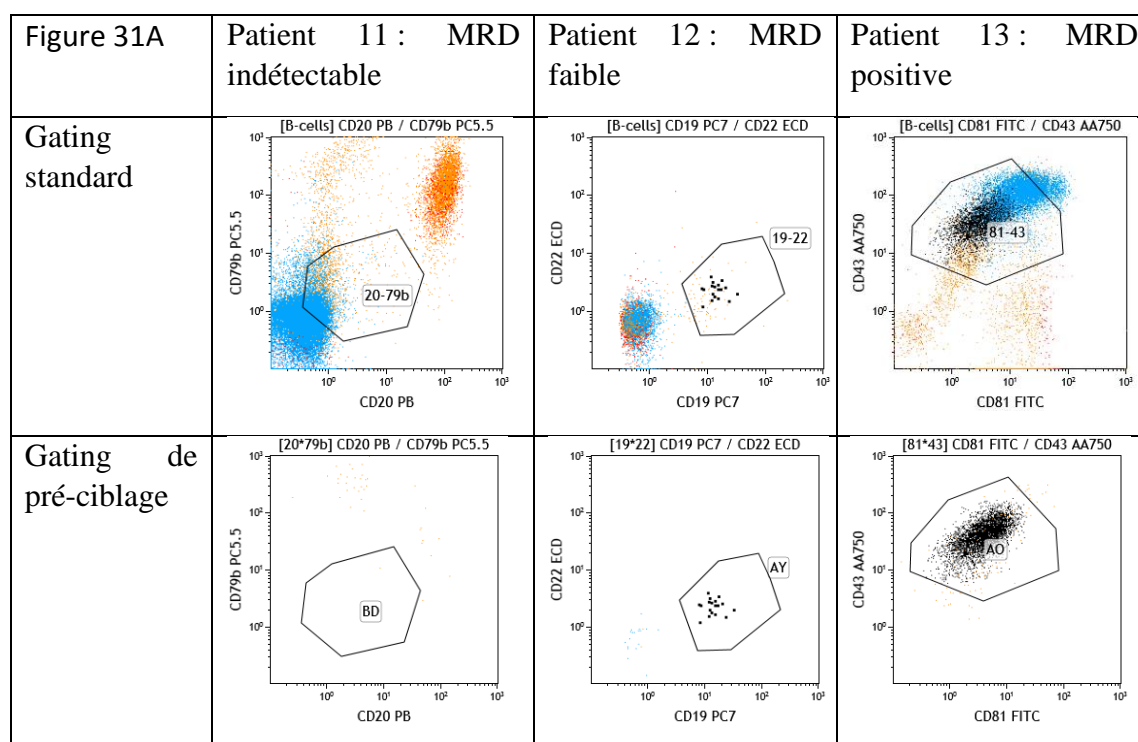
IV .3.1- Les populations de pré-ciblage

IV.3.1.1- principe du pré-ciblage

Le pré-ciblage permet de montrer sur un graphe les cellules sélectionnées dans les autres fenêtres à partir des marqueurs complémentaires. Il permet de vérifier la cohérence de la sélection en prenant en compte tous les marqueurs dans chaque fenêtre pour réduire le risque de faux négatif par erreur de ciblage. Ayant un intérêt pour un nombre important d'acquisition, cette stratégie n'a été testée que pour le panel MRD-LLC.

IV.3.1.2- résultat du pré-ciblage

Pour faciliter l'identification des cellules de LLC rares sur des graphes riches en cellules, nous avons testé cette méthode alternative de gating de pré-ciblage et nous l'avons comparée au gating classique pour 15 patients. Le pré-ciblage ne s'est pas avérée indispensable et les résultats n'étaient pas discordants entre les 2 techniques de gating (par exemple détection de 24 cellules avec la méthode de gating standard et 28 cellules avec la méthode de gating de pré-ciblage). Il s'agit donc d'une méthode optionnelle permettant d'améliorer l'aspect visuel de la population des cellules de LLC.



Les graphes de la première ligne (gating standard) montrent le positionnement théorique d'une population de cellules de LLC si elle est présente (polygone dans la fenêtre des lymphocytes CD19+ avec quelques lymphocytes T).

Ceux de la deuxième ligne (gating de pré-ciblage) montrent pour chaque graphe correspondant (à 2 marqueurs), le même positionnement en tenant compte de tous les autres graphes de l'analyse : si une population a été sélectionnée dans toutes les fenêtres excluant ces 2 marqueurs, elle apparaîtra dans la fenêtre ci-présente. Les cellules de LLC resteront dans le polygone (en noir) et les cellules non LLC se retrouveront en dehors (en orange).

Figure 31B	Patient 14 : MRD indétectable	Patient 12 : MRD faible	Patient 13 : MRD positive
Gating standard			
Gating de pré-ciblage			
Commentaire	Aucune des cellules sélectionnées dans les autres graphes ne se retrouve dans la région cible et sont trop dispersées: spécificité accrue du gating de préciblage.	Les cellules de LLC sont très repérables pour mieux positionner les gates : ciblage des populations rares	Les cellules de LLC sont très proches de la population de lymphocytes T (bleu) sur 1 graphe mais isolées sur un autre : les limites de la population plus facilement repérées avec le gating de préciblage

Figure 31: Cas de recherche cellules de LLC selon la technique de pré-ciblage

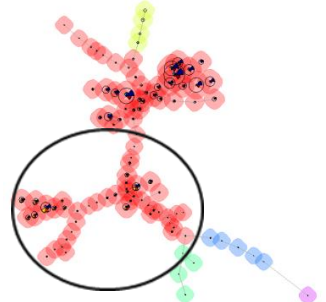
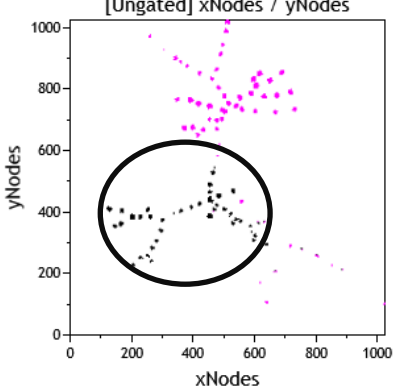
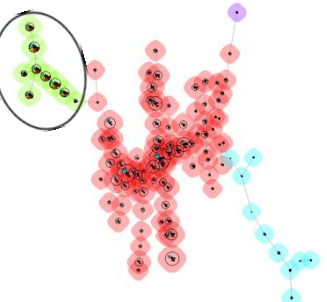
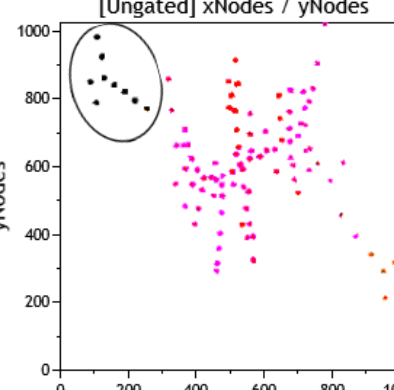
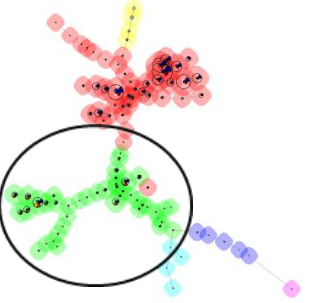
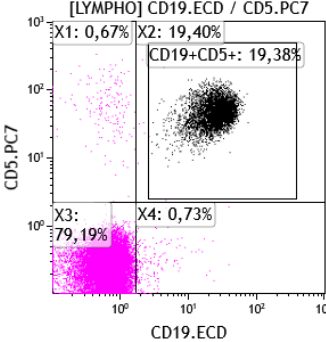
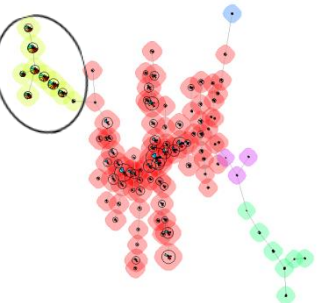
Les lymphocytes B sont par défaut en rouge. Les cellules lymphocytaires B, sélectionnées dans au moins un polygone sont représentées en orange et celles retrouvées dans tous les polygones donc avec une forte suspicion deviennent noires. Les lymphocytes T sont en bleu. Ils servent de repère pour positionner les fenêtres.

IV.3.2- FlowSOM

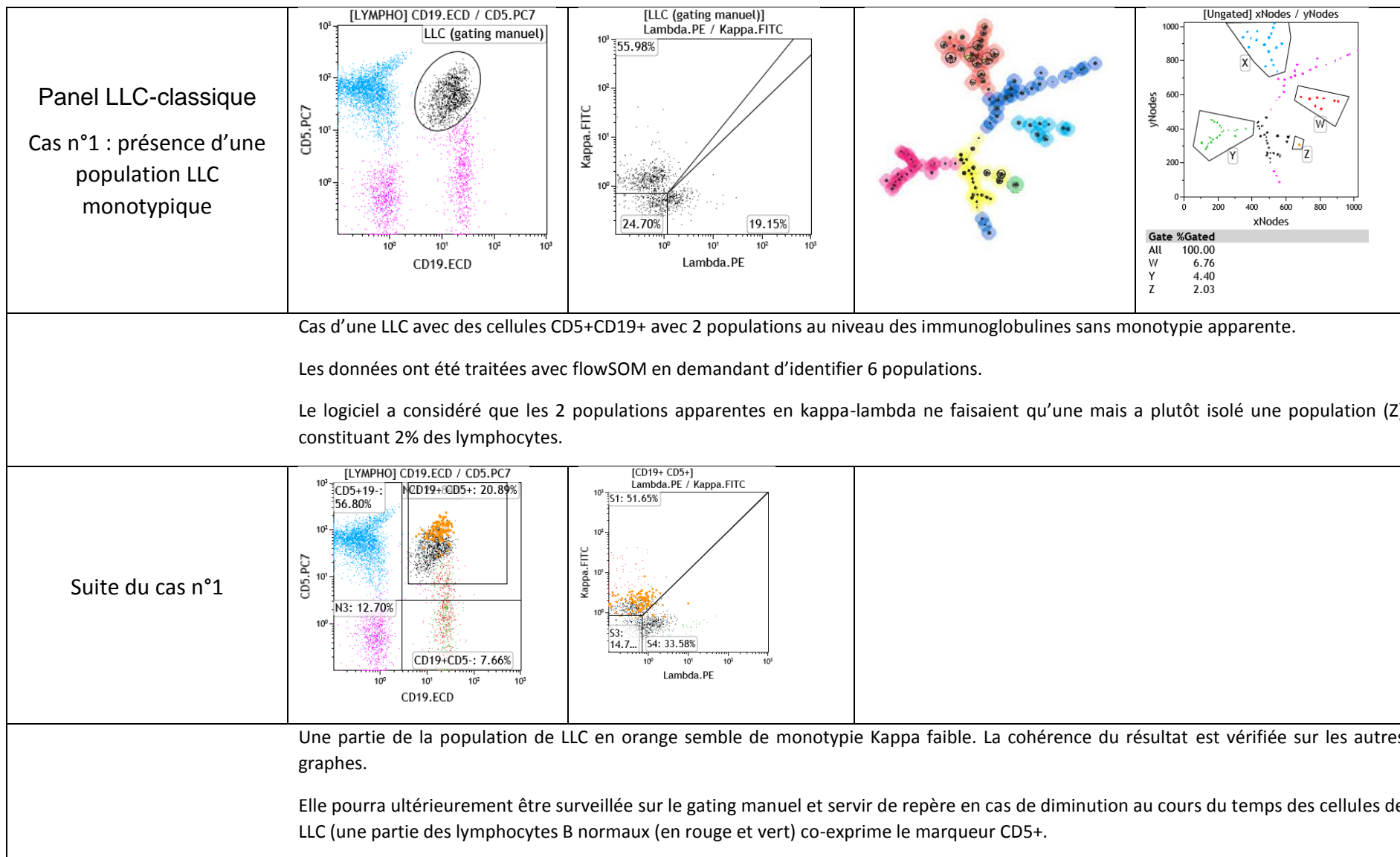
Nous avons souhaité évaluer si l'utilisation du logiciel FlowSOM, en limitant la subjectivité de l'interprétation des graphes de cytométrie, permettait d'améliorer la sensibilité de détection des cellules résiduelles de LLC.

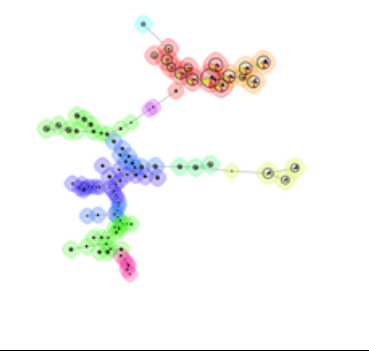
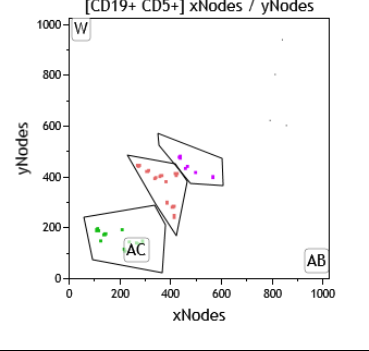
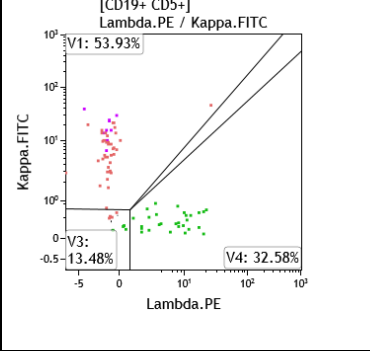
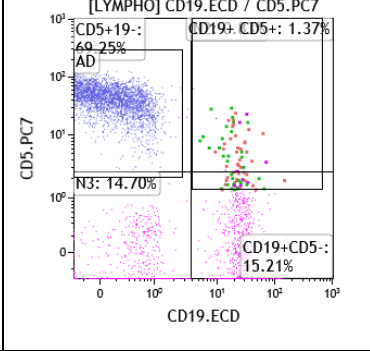
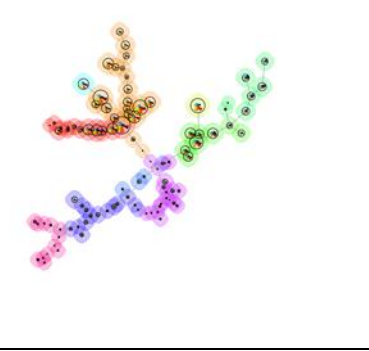
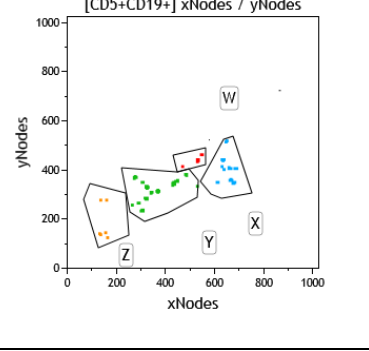
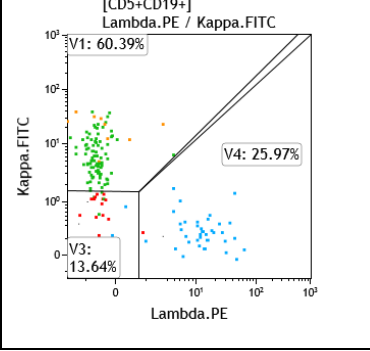
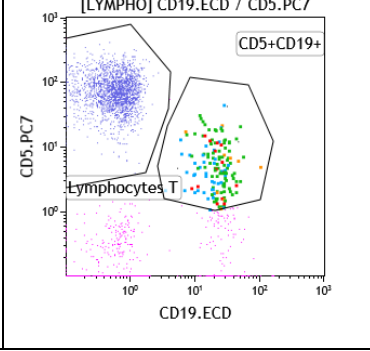
Une fois les réglages mis au point, nous avons observé une bonne concordance entre l'identification des cellules pathologiques de façon « manuelle » (réglage des graphes de cytométrie par un opérateur) et de façon automatique par FlowSOM, aussi bien pour un panel que pour l'autre. Au vu de la composition du groupe de patients LLC, 15 échantillons ont pu être testés même après dilution en visant des valeurs proches des limites de détection et de quantification (en particulier du panel MRD-LLC). De plus, avec FlowSOM, l'identification n'était pas extrêmement précise : les clusters de cellules LLC contenaient souvent quelques cellules normales (lymphocytes T ou lymphocytes B).

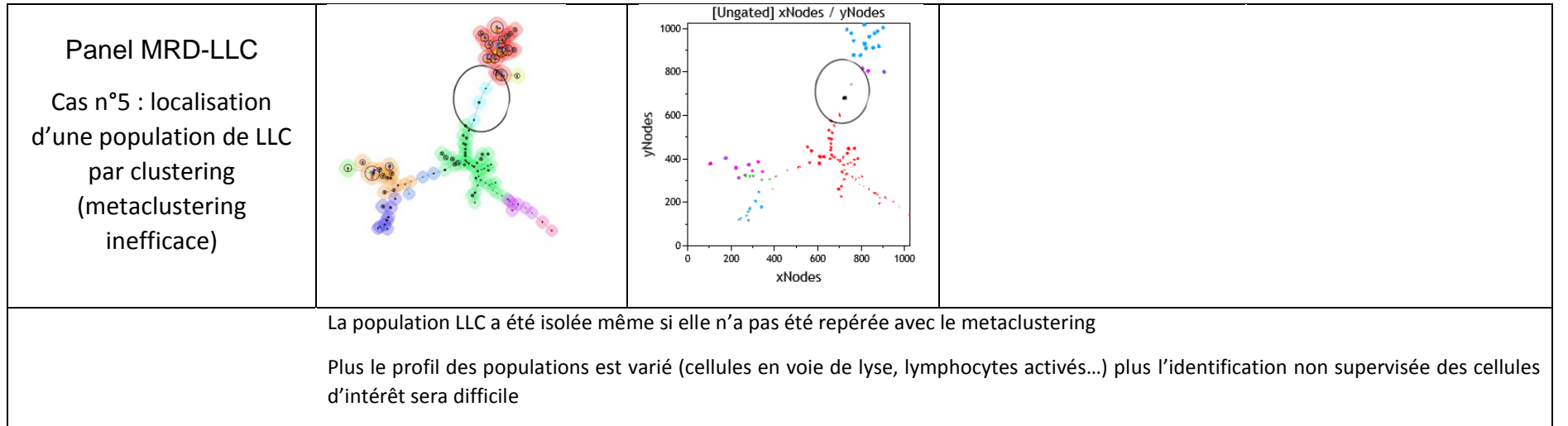
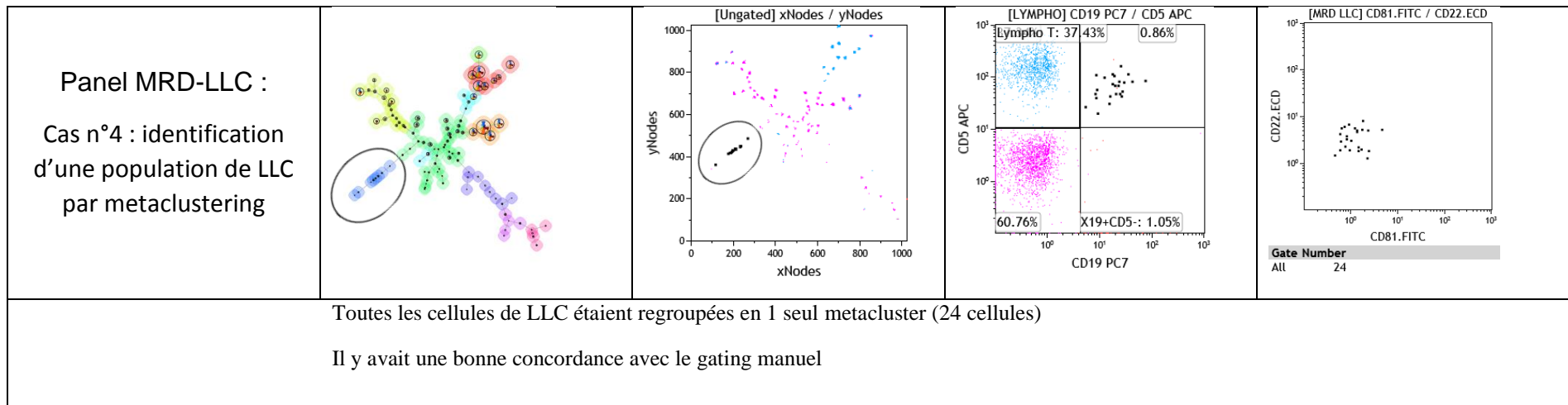
La série de graphes figure 32 compare le résultat du clustering manuel avec le clustering automatique par FlowSOM pour les deux panels (LLC classique et panel MRD-LLC). Nous présentons d'abord les cas où les cellules de LLC sont fréquentes dans les échantillons puis les cas où les cellules de LLC sont rares.

	Panel LLC classique		Panel MRD-LLC	
	Clustering automatique sur R	Clustering avec le gating manuel réalisé antérieurement	Clustering automatique sur R	Clustering avec le gating manuel réalisé antérieurement
Underclustering : nombre de populations à identifier sous estimé				
Overclustering : nombre de populations à identifier en excès		 <p><i>La population de LLC était identifiée en sélectionnant le bon nombre de metacluster (5 ici)</i></p>		<i>Même échantillon de patient, l'identification n'étant pas perturbée par la variation du nombre de metacluster (pour ce cas)</i>

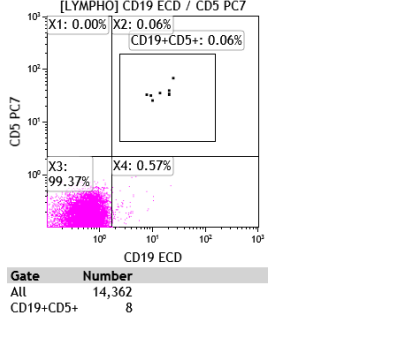
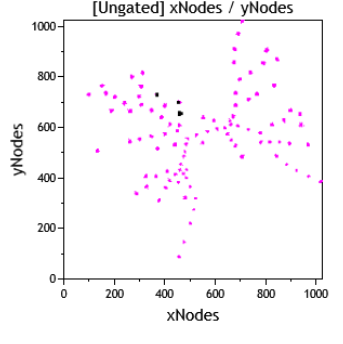
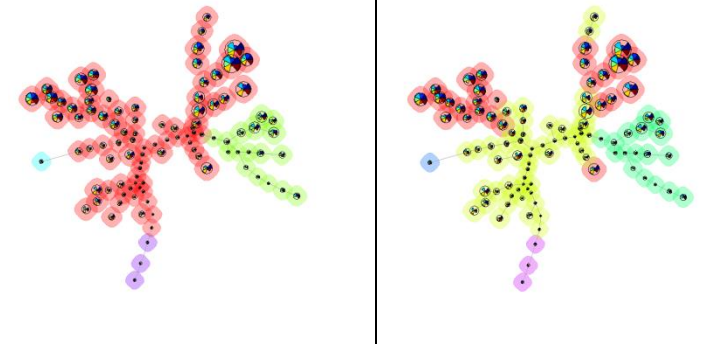
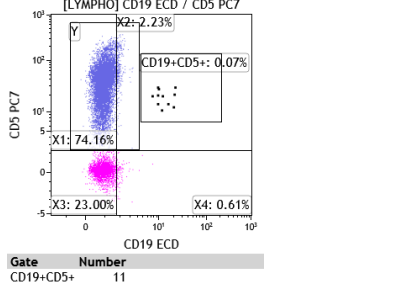
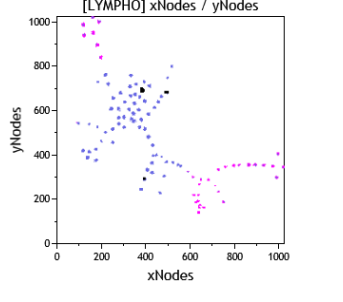
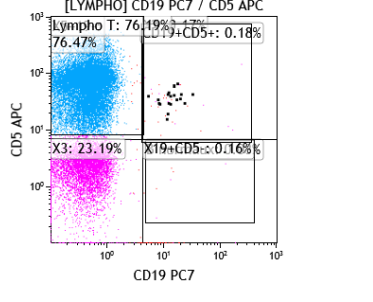
Cas de populations rares (au moins une vingtaine de cellules)



	Clustering sur R	Traduction sur Kaluza	Expression Kappa/Lambda	Expression CD5+CD19+
<p>Panel LLC-classique : Cas n°2 : une recherche de monotypie négative.</p>				
<p>Pour gagner en sensibilité, le nombre de metacluster était en excès. (Parmi les lymphocytes) Les populations étaient regroupées par restriction d'hétérogénéité artificielle (parmi les CD5+CD19+) Aucune des populations n'avait de répartition suspecte (pas d'aspect clonal à faible intensité) Cela était confirmé sur les autres graphes (ici la fenêtre CD5/CD19).</p>				
<p>Panel LLC-classique : Cas n°3 : une recherche de monotypie négative.</p>				
<p>Le clustering a été réalisé sur R 4 populations ont été isolées dans la fenêtre CD5+CD19+ sur Kaluza La population rouge bien que de faible intensité ne semblait pas suspecte (excès de clustering de la population verte). Il a été confirmé sur les autres graphes la répartition diffuse du cluster.</p>				



Cas de populations rares (nombre de cellules au moins inférieur à 20)

	Identification sur le panel avec Kappa/Lambda	Vérification du résultat	
<p>Panel LLC-classique</p> <p>Cas n°6 : échantillon de cellules de LLC dilué</p>			
<p>Un échantillon positif a été dilué pour avoir peu de cellules</p> <p>Ces cellules ont été dispersés dans différents clusters après analyse sur R et Kaluza</p> <p>L' augmentation du nombre de metacluster n'a pas permis de repérer les cellules pathologiques</p>			
<p>Panel LLC classique (à gauche) et panel MRD-LLC (à droite)</p> <p>Cas n°7 : cellules résiduelles « indétectables »</p>			
<p>Cas de cellules résiduelles. Même prélèvement de patient testé dans les 2 panels (LLC classique à gauche et MRD-LLC à droite).</p> <p>Les cellules ont été réparties aléatoirement dans les autres lymphocytes</p>			

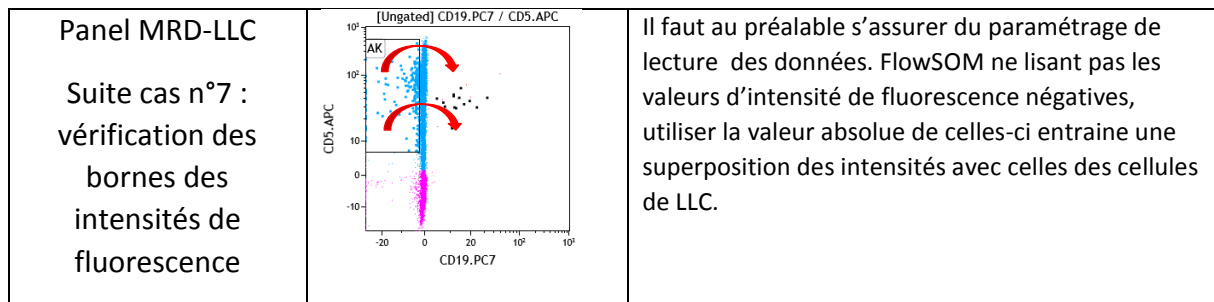


Figure 32 : Série de graphes de comparaison du gating manuel avec le gating automatique (FlowSOM) pour le panel LLC classique et le panel MRD LLC

Nous avons constaté que FlowSOM identifie facilement les populations LLC dans les 2 panels lorsqu'elles sont fortement représentées (exemple 10% des lymphocytes).

Cas des évènements rares :

- **Après le marquage avec le panel LLC-classique :**

FlowSOM identifie souvent les populations à environ plus de 20 cellules.

- **Après marquage avec le panel MRD-LLC**

FlowSOM identifie la population de LLC sans discordance franche avec le gating manuel. Selon la répartition lymphocytaire (cellules activées lymphocytose T...), les cellules de LLC peuvent être identifiées en metaclustering souvent pour un nombre de cellules en valeur absolue au-delà de 40 environ. Entre 40 et 20 cellules environ, le metaclustering était moins précis mais les cellules regroupées dans des clusters adjacents. En dessous de 20 cellules environ, la précision diminuait pour le clustering et le metaclustering.

IV.6- Validation du panel MRD-LLC

IV.6.1- Répétabilité de mesure du panel

Afin d'augmenter la fiabilité du rendu d'un résultat quantifié, nous avons réalisé des tests de répétabilité sur 3 niveaux.

Des échantillons dilués, présentant des cellules résiduelles à différentes concentrations ont été individuellement analysés 5 fois de suite au cytomètre. Pour les besoins du test, la position des fenêtres de ciblage restait inchangée et le nombre de cellules analysées limité à 200 000 (nombre minimal d'évènements souhaité).

La figure 33 montre les résultats d'une série de test de répétabilité pour 1 niveau.

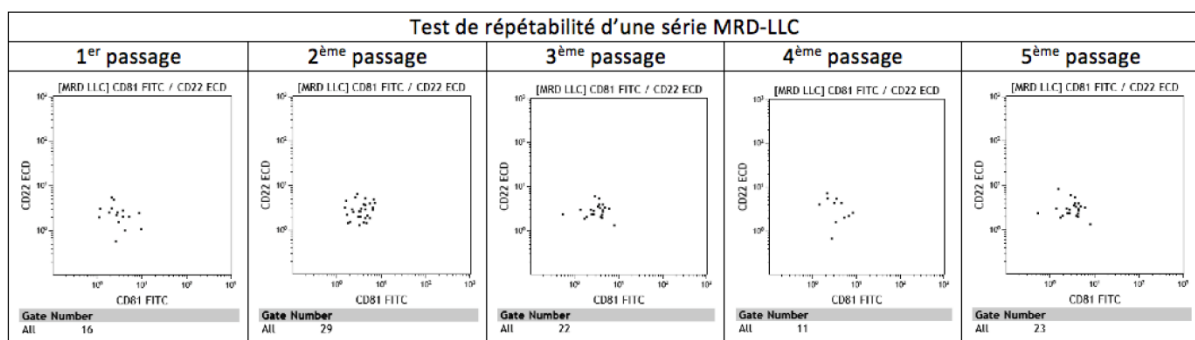


Figure 33: Test de répétabilité d'une série pour le panel MRD-LLC

Il est admis que, pour le rendu de résultat de la maladie résiduelle en général par cytométrie en flux, le coefficient de variation toléré se situe autour de 10% pour les évènements rares et peut varier jusqu'à 30% pour des valeurs proches de la limite de détection (71).

La figure 34 présente les 3 niveaux de test de répétabilité réalisés pour le panel MRD-LLC.

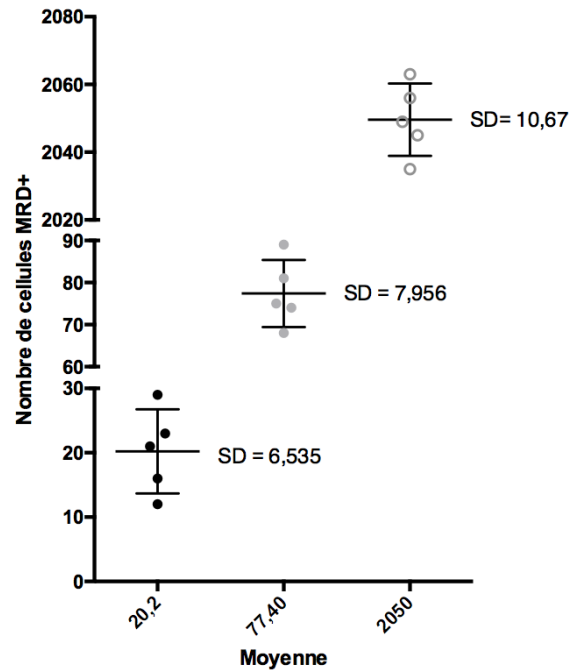


Figure 34: Séries de test de répétabilité pour le panel MRD-LLC (cas d'évènements rares, faibles quantifiables et facilement quantifiable)

SD : écart-type.

- Pour le **1^{er} niveau** (valeurs proches de la limite de détection théorique 0.004%), le coefficient de variation était de **32.4%**
- Pour le **2^{ème} niveau** (évènements rares et quantifiables soit plus de 50 cellules positives), le coefficient de variation était de **10.23%**
- Pour le **3^{ème} niveau** (forte proportion de cellules pathologiques), le coefficient de variation était de **0.52%**.

En pratique, les fenêtres seront adaptées pour rendre un résultat cohérent (exclusion de cellules faussement positives et inclusion de cellules suspectes dans les régions frontières du fenêtrage).

IV.6.2- Test de contamination

Le test de contamination consistait au passage d'un tube d'un sujet connu LLC non dilué (comptage d'au moins 20 000 cellules MRD+) immédiatement suivi de celui d'un témoin négatif (acquisition de 500 000 leucocytes). Cela a été réalisé avec 2 témoins et de l'eau (PBS). Le nombre de cellules finales MRD+ était au maximum de 4.

Série de test	1er passage témoin		Tube LLC positif	2ème passage témoin	
	Nbre d'acquisition totale	Nbre de cellules MRD+	Nbre cellules MRD+	Nbre d'acquisition totale	Nbre cellules MRD+
Témoin 1	500 000	1	>20 000	500 000	1
Témoin 2	Non réalisé		>20 000	500 000	3
PBS	Non réalisé		>20 000	500 000	4

Tableau 22: Série de tests de contamination du panel MRD-LLC

Pour les séries de test de contamination, le taux de faux positif était au maximum

de 4/500 000 évènements soit 0.0008% sachant que le bruit de fond cellulaire moyen calculé était de 0.00066%.

Pour récapituler

- Pour les 9 patients testés en maladie résiduelle, il y avait une bonne corrélation entre le panel LLC-classique et le panel MRD-LLC ($r^2=0,97$). Dans le cas des évènements rares, les cellules de LLC étaient plus facilement identifiées avec plus d'informations indirectement sur l'incertitude de leur identification.
- L'utilisation des populations de pré-ciblage et celle de FlowSOM sont 2 approches certes complexes à première vue mais efficaces avec moins d'appréhension lorsqu'elles sont utilisées correctement. Cependant, plus le nombre de marqueurs utiles (n) augmente pour un panel donné, plus la mise au place du pré-ciblage se complexifie (au moins $n(n-1)/2$ graphes à vérifier) alors que celle de FlowSOM demeure inchangé pour des résultats plus précis (1 seul graphe).

V. Discussion

V.1- Résultats obtenus

- Dans notre étude, le panel « LLC classique » utilisant le CD5/CD19/Kappa/Lambda permet de détecter des cellules jusqu'à 10^{-3} (1 cellule positive 1000 cellules comptées) en s'affranchissant des lymphocytes B. D'après Rawstron (66), la détermination de la sensibilité de ce panel soulevait le problème de la séparation des lymphocytes B normaux par rapport aux cellules pathologiques sans évoquer la possibilité de les exclure. La sensibilité obtenue de la littérature est estimée à 10^{-2} (1 cellule sur 100).
- Pour le panel MRD-LLC à 7 couleurs, nous avons pu observer des cellules pathologiques jusqu'à une dilution de 10^{-5} . Cependant, pour appliquer le concept d'évènements rares dans les conditions réelles, le domaine de mesure se situe en dehors du bruit de fond cellulaire : au-delà de la **limite de détection que nous avons calculée : 18 cellules pour 500 000 évènements soit 0,0036%**. Les cellules de LLC sont **quantifiables lorsqu'elles représentent plus de 47 cellules pour 500 000 évènements soit 0.0094% des leucocytes**.

Ces valeurs sont comparables avec la littérature (70) : LOD = 20 cellules pour 500 000 évènements soit 0.004% et LOQ = 50 cellules pour 500 000 évènements soit 0.01%.

- Le logiciel FlowSOM étant un logiciel pouvant faciliter l'identification des populations, son utilisation n'a pas montré une augmentation de la sensibilité de détection de la MRD, quel que soit le panel utilisé. FlowSOM nous a permis de repérer facilement les populations de LLC dans la majorité des cas en limitant la subjectivité de l'analyse.

V.2- Contraintes de réalisation des tests : du point de vue technique

Les points techniques qui nous sont apparus comme critiques sont les suivants :

V.2.1- Choix de la lyse macrovolume

La solution recommandée est du NH_4Cl à 8,6g/L qui est peu disponible en produits déjà / facilement constitués. Nous pouvons citer les solutions contenant du NH_4Cl : Versalyse et « IOT 3 Lysing solution x10 » de Beckman Coulter, Pharmlyse de BD. Le rapport coût/volume de la solution est à discuter en fonction de la fréquence et du nombre d'utilisation :

- Un faible volume permettant de ne passer qu'une dizaine d'échantillons voire moins selon la concentration en leucocytes de ces derniers
- D'autres solutions que du NH_4Cl mais nécessitant des volumes importants (comme la solution Optilyse).

Une alternative serait la préparation d'une solution NH_4Cl au sein du laboratoire à partir des différents composants dans des règles strictes (pesée des composants, évaluation du pH avec des instruments calibrés...), avantageuse en cas d'utilisation relativement courante et en grande quantité.

La solution Hybri-Max utilisée dans notre étude est une lyse NH_4Cl à 8,4g/L, disponible au laboratoire, dont le conditionnement nous permettait de passer plusieurs échantillons à coût réduit. Nous avons initialement comparé les résultats de la lyse que nous avons utilisée avec l'Optilyse. Les résultats étaient similaires à l'exception d'une augmentation en valeur absolue des intensités de fluorescence pour les marqueurs en APC sans variation des différences d'intensités entre les populations positives et négatives. Nous avons ainsi considéré que la

solution de lyse Hybri-Max que nous avons utilisée ne présentait pas de différence notable avec la lyse Optilyse.

V.2.2- Marqueurs d'exclusion (exemple : cas des cellules NK)

Une sous-population de cellules NK exprimant faiblement le CD19 pourrait éventuellement interférer dans la population CD19 positive. Le CD56 pourrait être utilisé comme marqueur d'exclusion pour des cellules NK CD19+CD56+. Nous l'avons testé dans le panel MRD-LLC pour un patient sans avoir observé de différence dans le dénombrement de cellules résiduelles. Cet essai nécessiterait toutefois d'être répété sur un plus grand nombre de patients.

V.2.3- Limite de détection du panel MRD-LLC

La limite de détection (18 cellules pour 500 000 évènements analysés soit 0.0036%) déduite de notre étude est cohérente avec celles réalisées antérieurement dans la littérature (20 pour 500 000 soit 0.004%).

V.2.4- Contraintes de réalisation des dilutions pour les panels

Au cours des opérations de dilution des différents panels, nous avons été confrontés à des contraintes que nous avons essayé de respecter au mieux. Ces contraintes étaient :

- *Liées aux échantillons de patients :*

Idéalement, les échantillons témoins servant de diluant devraient avoir une concentration en leucocytes et un volume suffisant pour réaliser une série complète et dilution, de phénotype sanguin compatible avec l'échantillon malade (pour éviter

d'éventuels agglutinats d'incompatibilité) et ne pas interférer avec le résultat (pas de syndrome lymphoprolifératif, de clone LLC ni de co-expression CD5+ CD19+). Nous avons essayé de respecter ces contraintes au mieux.

- *Liées à la technicité :*

Utilisant de faibles volumes, la dilution était sensible à plusieurs étapes critiques : sensibilité différente des cellules mononucléées à la lyse, lavage des échantillons, centrifugation, retrait au maximum de la solution de PBS (l'ajout d'une goutte de PBS soit environ à 100µL au mélange de 20µL de sang malade et 80µL de sang témoin modifie la concentration en cellules de LLC).

V.3- Moyens d'améliorations du panel MRD-LLC

Il est possible d'augmenter les performances du test en agissant sur certains paramètres. Nous pouvons citer l'augmentation du nombre total d'évènements comptés, le choix des anticorps, la méthode d'identification des populations sur les graphes. Ceux-ci peuvent avoir un impact différent sur la sensibilité et/ou spécificité. A titre d'exemple, l'ajout d'un marqueur de choix à la fois sensible et spécifique a un double effet bénéfique tandis qu'augmenter uniquement le nombre d'acquisition pour un test peu spécifique entrainera une croissance conjointe de la sensibilité et du nombre de faux positifs. Par ailleurs, l'augmentation du nombre d'évènements à acquérir a une limite car cela impliquerait de faire un prélèvement sanguin trop important (par exemple 10mL de sang pour dix millions d'évènements).

V.3.1- Amélioration de la sensibilité du panel MRD-LLC :

V3.1.a- Acquisition conditionnée par la fluorescence

L'acquisition conditionnée par la fluorescence est une technique d'analyse déjà utilisée dans certains centres comme le laboratoire de l'hôpital Avicenne. Cela permet d'augmenter le nombre total d'acquisition tout en réduisant ses inconvénients (saturation des signaux par le bruit de fond cellulaire). En effet, avec une acquisition conditionnée par la fluorescence, il est possible de s'affranchir des autres cellules comme les polynucléaires qui peuvent créer un bruit de fond important sur des acquisitions longues, de pouvoir acquérir plus rapidement en réduisant le risque de saturation de l'automate. Le principe plus approfondi est expliqué dans l'annexe 2.

L'inconvénient est la nécessité de passer un important nombre de cellules et donc, en absence d'hyperlymphocytose (post-traitement), un volume de sang conséquent serait nécessaire (pouvant aller jusqu'à 10mL de sang). Il est donc question d'un compromis entre fiabilité du résultat et accessibilité aux prélèvements. De plus, le risque d'augmentation considérable de l'acquisition est d'atteindre le plancher de détection à partir duquel le bruit de fond inhérent à la technique devient important, rendant tout résultat ininterprétable.

Enfin, il est important de rappeler que l'objectif des cliniciens en termes de seuil de détection se limite pour le moment à 10^{-4} .

V.3.2- Amélioration de la spécificité du panel MRD-LLC

La performance du test augmente avec le nombre de marqueurs (n) mais il en découle une augmentation du nombre de graphes à analyser. Dans un objectif d'exhaustivité, ce dernier peut aller jusqu'à $n(n-1)/2$. Il est donc égal à 15 pour 6 marqueurs utilisés et 28 pour 8

marqueurs. Lorsqu'elle n'est pas maîtrisée, cette stratégie est chronophage, source de biais.

Nous proposons trois moyens d'y remédier :

- *Utilisation de populations de pré-ciblage :*

Il est possible de personnaliser des booléennes (intersection de fenêtres) afin d'isoler une population d'intérêt en fonction de l'expression d'un ensemble de marqueurs (se rapprochant d'un clustering ciblé). Sa mise en place peut toutefois s'avérer fastidieuse lorsqu'elle n'est pas maîtrisée.

Elle permet une analyse plus fine et évite de sélectionner des populations de manière aléatoire lorsque les lymphocytes non LLC sont fortement représentés. La figure 35 montre différentes situations pour un pré-ciblage. Nous avons utilisé une dizaine de gates repérant théoriquement des cellules LLC. Les cellules contenues dans plusieurs gates sont colorisées en orange et deviennent noires lorsqu'elles y sont dans toutes. Le principe plus approfondi est expliqué dans l'annexe 3.

- *Utilisation d'anticorps différents ayant le même fluorochrome.*

Certaines combinaisons sont avantageuses. A titre d'exemple, le CD79b et le CD22 ayant des profils d'expressions semblables, leur combinaison a une action synergique permettant de mieux séparer les lymphocytes B des cellules de LLC. Cette association semble être plus efficace avec le fluorochrome PE. La figure 35 montre un effet de la combinaison de ces marqueurs pour un même échantillon.

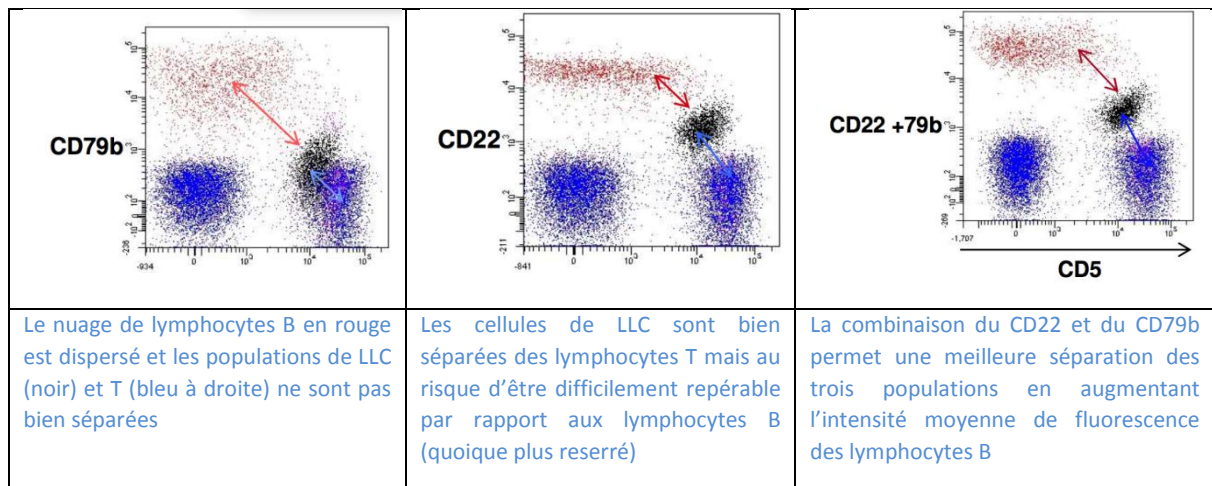


Figure 35: Expression des lymphocytes notamment T, B et de LLC sur le CD5 et le CD79b, le CD22 ou le CD22+CD79b

Issue du la présentation Suivi de la maladie résiduelle dans la leucémie lymphoïde chronique à la JFPC-AFC de juin 2018. Dr Letestu.

Nous n'avons pas utilisé la combinaison CD22 + CD79b dans notre panel mais cette possibilité pourrait être utile dans des analyses plus difficiles (marqueurs d'exclusion (faux positifs) ou de confirmation (LLC atypiques...)).

- **Utilisation de marqueurs additionnels** : Cas du CD200 et ROR1

L'utilisation de marqueurs additionnels est recommandée pour les cas difficiles d'interprétation(60). Le tableau 23 présente les caractéristiques de ces anticorps : CD200, ROR-1 et CD160.

	Rôle	Intérêt	Caractéristiques
CD200(67–69)	Suppresseur de signal médié par les lymphocytes T	Différentier la LLC atypique des autres SLPB	>80% des cas de LLC (expression faible), MCL-
			Hématogones ++, LcT+ et LcB+, cellules NK-,
ROR-1(72)	Récepteur oncofoetal tyrosine kinase	Identification des cellules de LLC, des LAL-B (cellules CD3- ; ROR1+). Un taux élevé serait associé à une forme accélérée(73).	LLC+++ : les plus intenses du sang périphérique,
			Hématogones ++ intérêt diminué dans la moelle
CD160(74)	Ig de surface, liaison du CMH1 (dont HLA-C et G) Impliquée dans les signaux de survie PI3K-dépendant.	Intérêt en association avec le CD200 au diagnostic (LLC atypique)	60% des cas de LLC
			Cellules NK positives, LcT(TCR $\gamma\delta$), une partie des CD3+CD8+

Tableau 23: Intérêt de marqueurs additionnels pour le panel MRD-LLC

SLPB : syndrome lymphoprolifératif B, MCL : Lymphome du Manteau ; LcT : lymphocytes T ; LcB : lymphocytes B ; LAL-B : Leucémie Aiguë Lymphoïde B ; LcT(TCR $\gamma\delta$) : lymphocytes T exprimant le récepteur TCR $\gamma\delta$)

V.3.3- Apport de FlowSOM et des logiciels automatiques

Dans notre étude, FlowSOM ne permet pas d'augmenter la sensibilité de détection ni la précision de la quantification des cellules résiduelles. Comme expliqué dans les généralités, d'autres logiciels sont plus adaptés pour la quantification mais en général, l'interprétation visuelle des résultats avec ces autres logiciels est beaucoup plus complexe qu'avec FlowSOM, le traitement est plus long et les exigences informatiques sont plus poussées.

Etant un logiciel automatisé non supervisé, FlowSOM est sensible à de nombreux paramètres qui doivent être pris en compte :

- Les phénomènes de compensation pour les populations ayant des valeurs extrêmes d'intensité de fluorescence,
- La population à analyser (il est plus aisé d'identifier les cellules de LLC rares dans les lymphocytes que dans tous les leucocytes),
- La capacité des anticorps à discriminer les populations (plus il y a des marqueurs discriminants, plus performante sera l'analyse. Ne pas utiliser de canaux inutiles comme ceux sans marqueurs ni le CD45 ou des marqueurs myélocytaires par exemple pour explorer une population lymphocytaire).

FlowSOM peut servir d'aide visuelle pour présélectionner une population qui pourra être compilée à d'autres applications (R-tsne par exemple qui procède à une répartition individuelle de cellules plus poussée mais nettement plus longue en particulier sur une population importante qu'un sous-groupe de clusters ou d'autres logiciels priorisant plutôt l'approche quantitative).

Il est sensible aux variations d'intensité des populations (perte d'intensité pour des échantillons vieillissants, distorsion du signal pendant la variation de vitesse d'acquisition...)

Une solution serait un pré-traitement par le logiciel flowAI qui permet d'exclure les distorsions de signal et homogénéiser les acquisitions avant lecture au risque d'écarter quelques cellules rares.

L'utilisation des logiciels automatiques peut également créer d'autres biais en fonction de leur modalité d'analyse. A l'heure actuelle, ils serviraient de guide consultatif pour conforter ou poursuivre les explorations, au jugement des utilisateurs. Il ne nous a pas été possible de tester de manière plus approfondie les limites.

Problème du suivi des patients

FlowSOM étant par défaut un logiciel non supervisé, il n'est pas directement adapté pour le suivi de patients LLC. Au cours de l'analyse non supervisée, les populations cellulaires sont identifiées puis traitées par un processus de répartition aléatoire propre au logiciel qui est nécessaire afin de réduire le risque d'aberration de clustering. Puis, la position de chaque cluster obtenu dépend de la différence relative du profil d'expression de celui-ci par rapport aux populations adjacentes.

Il est possible d'obtenir un résultat reproductible pour l'analyse d'un échantillon de patient en orientant le processus aléatoire et en faisant des répétitions d'analyses mais la cartographie obtenue est propre à cet échantillon. Un autre échantillon du même patient analysé dans les mêmes conditions aura une cartographie différente.

Une alternative pour identifier spécifiquement les cellules cibles serait de configurer l'analyse de FlowSOM par une méthode intermédiaire entre l'analyse non supervisée et l'analyse supervisée. Pour cela, un apprentissage du logiciel est réalisable à travers différentes étapes :

- tester le générateur aléatoire d'organisation des clusters le plus adapté au panel d'anticorps utilisé (il existe de nombreux générateurs mais celui retenu devra être dédié au panel),
- utiliser des répétitions d'analyse d'échantillons contenant la population cible en proportion importante et en évènement rares pour vérifier la performance de l'analyse,
- sauvegarder les résultats de metaclustering réalisées au cours de ces analyses dans la mémoire du logiciel (le metaclustering par hiérarchie consensuelle semble être la méthode la plus fiable),
- nommer les populations identifiées par metaclustering.

Le logiciel FlowSOM est assez sensible au début de l'apprentissage avec des résultats aléatoires mais après avoir analysé suffisamment d'échantillons (le nombre minimal est non définit) pour un générateur et un panel d'anticorps fixe, il sera capable de reconnaître populations connues même si elles ont des positions variables. (65,75)

Question des logiciels automatisés supervisés

Ils peuvent s'avérer intéressants pour une identification automatique des populations (« cellules LLC », « lymphocytes B », autres cellules) en fonction du conditionnement préalable mais le principal risque est l'échappement de cellules atypiques ou de profil modifié après traitement (cas des leucémies aiguës notamment). Pour information, des logiciels directement appliqués à la cytométrie sont progressivement en développement (pour le myélome multiple, un kit « Multiple Myeloma MRD » est commercialisé par le laboratoire cytognos en collaboration avec le groupe EuroFlow).

Pour récapituler

- Le panel MRD-LLC permet de détecter des cellules résiduelles de LLC avec une meilleure sensibilité que le panel classique de typage des hémopathies lymphoïdes B. Il permet une meilleure discrimination des populations de LLC.
- Nous avons confirmé une limite de détection et de quantification en accord avec les recommandations de la littérature.
- La technique est contraignante mais peut être améliorée (augmentation du nombre d'acquisition pour la sensibilité, utilisation de marqueurs additionnels pour la spécificité). C'est le cas du panel 8 couleurs de très haute sensibilité, incluant le CD200 et ROR-1.
- FlowSOM semble une aide intéressante mais plus d'interfaces graphiques seraient bienvenues pour une utilisation plus répandue et des tests approfondis.

Place de l'utilisation de billes marquées dans l'évaluation de la maladie résiduelle :

La quantification de la maladie résiduelle en cytométrie n'utilise pas des billes de quantification de concentration connue, comme cela est parfois réalisé lors de la quantification des sous-populations lymphocytaires. A notre connaissance, la quantification des cellules résiduelles de LLC à l'aide de billes n'a pas été testée (pour des raisons de limite de détection de très faibles concentrations de billes ?).

Cependant, l'utilisation des billes immunomagnétiques peut être envisagée plutôt en pré-analytique pour la sélection de la population à étudier et une alternative à la lyse macrovolume. En effet, une étape de pré-traitement d'un échantillon sanguin par ajout de billes magnétiques marquées au CD19+ permettrait une concentration et une séparation des lymphocytes B fixés. L'élimination des cellules non fixées magnétiquement après centrifugation permettrait de réduire le bruit de fond important de ces dernières en cas d'acquisition longue (cas des polynucléaires). Il en résulterait une acquisition plus rapide pour un résultat similaire à l'analyse après lyse macrovolume et visuellement plus « propre » (d'après Siewert et le laboratoire MACS). D'autres tests pourraient être envisagés pour juger de son efficacité.

V.5- Perspectives

Le seuil de positivité de la MRD-LLC (0,01%) a été fixé de manière historique à partir du panel LLC classique de moindre sensibilité qu'actuellement (4 couleurs). Ce seuil est susceptible d'être abaissé dans l'avenir (déjà en réévaluation pour la maladie résiduelle du myélome). De plus, la cinétique de la MRD, en se substituant à la survie sans progression permettra de tester plus rapidement des combinaisons de traitements. De nombreuses

associations sont étudiées dans le but d'obtenir des réponses prolongées en réduisant la durée de traitements. Il faudra toutefois encore attendre le résultat de l'étude de la MRD-LLC sur de nombreux patients pour pouvoir adopter des conduites thérapeutiques standardisées. Il est également important que les laboratoires standardisent leurs techniques de détection de la MRD-LLC pour la reproductibilité des résultats.

VI. Conclusion

La prise en charge des patients atteints de LLC est en pleine évolution et, dans ce contexte, l'étude de la maladie résiduelle prend une place grandissante pour la stratification thérapeutique des patients. Ainsi, le statut de la MRD est maintenant utilisé dans des essais cliniques comme paramètre de substitution à la survie sans progression et devient un critère décisionnel pour l'adaptation thérapeutique.

Initialement explorée au cours des essais cliniques, elle s'étend progressivement dans les pratiques, notamment dans notre groupement hospitalier.

La cytométrie en flux est actuellement la technique de prédilection pour évaluer la MRD dans la LLC. En effet, la cellule de LLC exprime un phénotype très homogène, caractéristique et stable après un traitement standard. Les approches par biologie moléculaire, moins accessibles, sont en pratique moins utilisées pour évaluer la MRD dans la LLC.

Dans ce contexte, il nous a semblé important de mettre au point dans notre laboratoire une nouvelle technique de détection de la MRD par cytométrie en flux à l'aide d'un panel d'anticorps 7 couleurs et d'un protocole d'analyse dédiés à la MRD-LLC. Nos objectifs consistaient à améliorer la sensibilité et la spécificité de détection de notre panel classique de

typage des SLP-B, ainsi qu'à standardiser notre technique. Pour cela, nous avons également intégré le groupe de travail MRD-LLC de l'AFC (Dr R. Letestu).

La mise au point méthodologique nous a permis d'établir un protocole analytique de détection de la MRD sur le sang des patients atteints de LLC (panel d'anticorps, volume d'anticorps, lyse etc.). Nous avons réalisé la cartographie schématique attendue des différents graphes de cytométrie de ce nouveau protocole (fig. 25), dans le but de guider l'interprétation des graphes par différents opérateurs. De plus, en présence de très peu de cellules, l'interprétation des graphes de cytométrie du panel MRD-LLC est moins ambiguë qu'avec le panel classique de typage des SLP-B (interprétation délicate et subjective de la monotypie des chaînes légères Kappa ou Lambda). Nous avons estimé, à l'aide de dilutions successives, que le panel MRD-LLC nous permettait de détecter des cellules de LLC avec une sensibilité de 10^{-5} . Le panel MRD-LLC nous permet ainsi de gagner en sensibilité de détection puisque nous avons constaté une sensibilité à 10^{-3} avec notre panel classique de typage des SLP-B. Ces résultats sont en accord avec la littérature.

L'utilisation d'outils automatisés de classification des cellules de cytométrie, tels le logiciel d'analyse cellulaire FlowSOM, nous a semblé intéressante à évaluer dans le cadre de la détection d'évènements rares. En effet, ce logiciel nous semblait plus puissant et moins subjectif que l'œil humain pour classer les cellules. Nous avons pu réaliser cette partie de notre travail grâce à l'aide de M. le Dr F. Dumézy au CHRU de Lille et de M. S. Granjeaud. La stratégie d'analyse flowSOM a facilité le repérage visuel de cellules rares mais nos essais n'ont cependant pas montré une amélioration de la sensibilité de détection des cellules résiduelles par rapport au panel de cytométrie standard. Ces essais devront sans doute être renouvelés à plus grande échelle, ce qui sera facilité lorsque l'accès à FlowSOM sera plus généralisé et que les biologistes maîtriseront mieux ces techniques d'analyse informatique encore confidentielles.

En cytométrie, le seuil de positivité clinique en vigueur dans les essais cliniques actuels a pour caractéristique d'avoir été fixé il y a quelques années à l'aide de techniques de cytométrie moins performantes (panels 4 couleurs) (7). Le seuil de positivité clinique ainsi fixé est de 10^{-4} (détection d'une cellule de LLC pour 10 000 leucocytes, soit 0.01%). De nos jours, les techniques de cytométrie de haute sensibilité (panels 8 à 10 couleurs) permettent d'atteindre une sensibilité bien supérieure, de l'ordre de 10^{-6} . De plus amples investigations permettront à terme d'évaluer l'impact pronostic et thérapeutique de la détection de cellules résiduelles à des seuils de plus en plus bas et, par là même, s'il est nécessaire de diminuer le seuil clinique actuel. En effet, dans la détection d'évènements de plus en plus rares, il faut penser à la significativité clinique de la persistance de quelques cellules résiduelles, c'est comme par exemple le cas après traitement par ibrutinib. De plus, il ne faut pas omettre que, en fin de compte, le principal critère de jugement reste, non pas la quantification de la MRD, mais la survie globale.

En conclusion, ce travail nous a permis de mettre techniquement au point au laboratoire un nouveau panel MRD-LLC standardisé selon les recommandations du groupe MRD-LLC de l'AFC, dont nous avons pu vérifier les bonnes sensibilité et spécificité. Cette méthode est mise en application au laboratoire, ce qui nous permettra de participer à des essais multicentriques pour continuer à évaluer l'impact pronostic clinique de la détection de la MRD LLC sur de grandes séries de patients.

Bibliographie

1. Li Y, Wang Y, Wang Z, Yi D, Ma S. Racial differences in three major NHL subtypes: Descriptive epidemiology. *Cancer Epidemiology*. févr 2015;39(1):8-13.
2. Cerhan JR, Slager SL. Familial predisposition and genetic risk factors for lymphoma. *Blood*. 12 nov 2015;126(20):2265-73.
3. Goldin LR, Bjorkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 1 mai 2009;94(5):647-53.
4. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, et al. Environmental and Heritable Factors in the Causation of Cancer — Analyses of Cohorts of Twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England Journal of Medicine*. 13 juill 2000;343(2):78-85.
5. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers* [Internet]. déc 2017 [cité 27 août 2019];3(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/nrdp201696>
6. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, et al. Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 7 août 2008;359(6):575-83.
7. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 21 juin 2018;131(25):2745-60.
8. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1 juill 1981;48(1):198-206.
9. Guillaume N, Gouilleux-Gruart V, Machu-Prestaux N, Claisse J-F, Capiod J-C, Lefrère J-J. Quid des implications physiopathologiques de l'expression de ZAP-70 dans les cellules lymphoïdes B ? *2006*;12:9.
10. Wiestner A. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood*. 27 févr 2003;101(>12):4944-51.
11. Admirand JH, Rassidakis GZ, Abruzzo LV, Valbuena JR, Jones D, Jeffrey Medeiros L. Immunohistochemical detection of ZAP-70 in 341 cases of non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma. *Modern Pathology*. août 2004;17(8):954-61.
12. Hodgson K, Ferrer G, Montserrat E, Moreno C. Chronic lymphocytic leukemia and autoimmunity: a systematic review. *Haematologica*. 1 mai 2011;96(5):752-61.
13. Benjamini O, Jain P, Trinh L, Qiao W, Strom SS, Lerner S, et al. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia who received frontline fludarabine, cyclophosphamide and

- rituximab therapy: distribution and clinical outcomes. *Leukemia & Lymphoma*. 3 juin 2015;56(6):1643-50.
14. Calissano C, Damle RN, Marsilio S, Yan X-J, Yancopoulos S, Hayes G, et al. Intraclonal Complexity in Chronic Lymphocytic Leukemia: Fractions Enriched in Recently Born/Divided and Older/Quiescent Cells. *Molecular Medicine*. nov 2011;17(11-12):1374-82.
 15. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, Kolitz JE, Kudalkar P, Cesar D, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1 mars 2005;115(3):755-64.
 16. Sutton LA. Molecular and Genetic Evidence for Antigen Selection in the Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia. :66.
 17. Schimmer AD, Munk-Pedersen I, Minden MD, Reed JC. Bcl-2 and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. 2003.
 18. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF- κ B activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 13 janv 2011;117(2):563-74.
 19. Vandewoestyne ML, Pede VC, Lambein KY, Dhaenens MF, Offner FC, Praet MM, et al. Laser microdissection for the assessment of the clonal relationship between chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma and proliferating B cells within lymph node pseudofollicles. *Leukemia*. mai 2011;25(5):883-8.
 20. Caligaris-Cappio F. Directing CLL-cell traffic. *Blood*. 10 sept 2015;126(11):1267-8.
 21. Vlad A, Deglesne P-A, Letestu R, Saint-Georges S, Chevallier N, Baran-Marszak F, et al. Down-regulation of CXCR4 and CD62L in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells Is Triggered by B-Cell Receptor Ligation and Associated with Progressive Disease. *Cancer Research*. 15 août 2009;69(16):6387-95.
 22. Ramsay AG, Johnson AJ, Lee AM, Gorgün G, Le Dieu R, Blum W, et al. Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *Journal of Clinical Investigation*. 1 juin 2008
 23. Riches JC, Ramsay AG, Gribben JG. T-cell function in chronic lymphocytic leukaemia. *Seminars in Cancer Biology*. déc 2010;20(6):431-8.
 24. Lad D, Hoeppli R, Huang Q, Garcia R, Xu L, Toze C, et al. Regulatory T-cells drive immune dysfunction in CLL. *Leukemia & Lymphoma*. févr 2018;59(2):486-9.
 25. Lad DP, Varma S, Varma N, Sachdeva MUS, Bose P, Malhotra P. Regulatory T-cell and T-helper 17 balance in chronic lymphocytic leukemia progression and autoimmune cytopenias. 2015.
 26. 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*. oct 2015;526(7574):525-30.
 27. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. oct 2015;526(7574):519-24.

28. Fresquet V, Rieger M, Carolis C, Garcia-Barchino MJ, Martinez-Climent JA. Acquired mutations in BCL2 family proteins conferring resistance to the BH3 mimetic ABT-199 in lymphoma. *Blood*. 26 juin 2014;123(26):4111-9.
29. Woyach JA, Furman RR, Liu T-M, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, et al. Resistance Mechanisms for the Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitor Ibrutinib. *New England Journal of Medicine*. 12 juin 2014;370(24):2286-94.
30. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-Renewing Hematopoietic Stem Cell Is the Primary Target in Pathogenesis of Human Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. août 2011;20(2):246-59.
31. Mayr C. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 15 janv 2006;107(2):742-51.
32. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic Aberrations and Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 28 déc 2000;343(26):1910-6.
33. Lazarian G, Guièze R, Wu CJ. Clinical Implications of Novel Genomic Discoveries in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 20 mars 2017;35(9):984-93.
34. ERIC, the European Research Initiative on CLL, Rosenquist R, Ghia P, Hadzidimitriou A, Sutton L-A, Agathangelidis A, et al. Immunoglobulin gene sequence analysis in chronic lymphocytic leukemia: updated ERIC recommendations. *Leukemia*. juill 2017;31(7):1477-81.
35. on behalf of the European Research Initiative on CLL (ERIC), Langerak AW, Davi F, Ghia P, Hadzidimitriou A, Murray F, et al. Immunoglobulin sequence analysis and prognostication in CLL: guidelines from the ERIC review board for reliable interpretation of problematic cases. *Leukemia*. juin 2011;25(6):979-84.
36. Chen L. ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1 mars 2005;105(5):2036-41.
37. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Dohner H, 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*. 15 juin 2008;111(12):5446-56.
38. Patten PEM, Buggins AGS, Richards J, Wotherspoon A, Salisbury J, Mufti GJ, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood*. 15 mai 2008;111(10):5173-81.
39. Rodrigues CA, Gonçalves MV, Ikoma MRV, Lorand-Metze I, Pereira AD, Farias DLC de, et al. Diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: recommendations from the Brazilian Group of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. oct 2016;38(4):346-57.
40. O'Reilly A, Murphy J, Rawe S, Garvey M. Chronic Lymphocytic Leukemia: A Review of Front-line Treatment Options, With a Focus on Elderly CLL Patients. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. avr 2018;18(4):249-56.

41. Tomuleasa C, Selicean C, Cismas S, Jurj A, Marian M, Dima D, et al. Minimal residual disease in chronic lymphocytic leukemia: A consensus paper that presents the clinical impact of the presently available laboratory approaches. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 4 juill 2018;55(5):329-45.
42. O'Brien S, Jones JA, Coutre SE, Mato AR, Hillmen P, Tam C, et al. Ibrutinib for patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion (RESONATE-17): a phase 2, open-label, multicentre study. *The Lancet Oncology*. oct 2016;17(10):1409-18.
43. O'Brien SM, Lamanna N, Kipps TJ, Flinn I, Zelenetz AD, Burger JA, et al. A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 17 déc 2015;126(25):2686-94.
44. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 28 janv 2016;374(4):311-22.
45. Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, et al. Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 4 juill 2013;369(1):32-42.
46. García Vela JA, García Marco JA. Minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia. *Medicina Clínica (English Edition)*. févr 2018;150(4):144-9.
47. Jain N, Keating M, Thompson P, Ferrajoli A, Burger J, Borthakur G, et al. Ibrutinib and Venetoclax for First-Line Treatment of CLL. *New England Journal of Medicine*. 30 mai 2019;380(22):2095-103.
48. Sher T, Miller KC, Lawrence D, Whitworth A, Hernandez-Ilizaliturri F, Czuczman MS, et al. Efficacy of lenalidomide in patients with chronic lymphocytic leukemia with high-risk cytogenetics. *Leukemia & Lymphoma*. janv 2010;51(1):85-8.
49. Mössner E, Brünker P, Moser S, Püntener U, Schmidt C, Herter S, et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*. 3 juin 2010;115(22):4393-402.
50. Teeling JL, Mackus WJM, Wiegman LJJM, van den Brakel JHN, Beers SA, French RR, et al. The Biological Activity of Human CD20 Monoclonal Antibodies Is Linked to Unique Epitopes on CD20. *The Journal of Immunology*. 1 juill 2006;177(1):362-71.
51. Robinson HR, Qi J, Cook EM, Nichols C, Dadashian EL, Underbayev C, et al. A CD19/CD3 bispecific antibody for effective immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia in the ibrutinib era. *Blood*. 2 août 2018;132(5):521-32.
52. Dreger P, Schnaiter A, Zenz T, Bottcher S, Rossi M, Paschka P, et al. TP53, SF3B1, and NOTCH1 mutations and outcome of allotransplantation for chronic lymphocytic leukemia: six-year follow-up of the GCLLSG CLL3X trial. *Blood*. 18 avr 2013;121(16):3284-8.
53. Thompson PA, Wierda WG. Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL. *Blood*. 21 janv 2016;127(3):279-86.

54. Quinquenel A. Pertinence de la maladie résiduelle dans la prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique : données récentes et rôle des associations. 2019;7.
55. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, Stilgenbauer S, Busch RM, Fingerle-Rowson G, et al. Minimal Residual Disease Quantification Is an Independent Predictor of Progression-Free and Overall Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Multivariate Analysis From the Randomized GCLLSG CLL8 Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 20 mars 2012;30(9):980-8.
56. Quinquenel A, Fornecker L-M, Letestu R, Ysebaert L, Fleury C, Lazarian G, et al. Prevalence of BTK and PLCG2 mutations in a real-life CLL cohort still on ibrutinib after 3 years: a FILO group study. *Blood*. 15 août 2019;134(7):641-4.
57. Wierda WG, Siddiqi T, Flinn I, Badoux XC, Kipps TJ, Allan JN, et al. Phase 2 CAPTIVATE results of ibrutinib (ibr) plus venetoclax (ven) in first-line chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Journal of Clinical Oncology*. 20 mai 2018;36(15_suppl):7502-7502.
58. Owen C, Toze C, Christofides A. Updates from the 2017 American Society of Hematology annual meeting: practice-changing studies in untreated chronic lymphocytic leukemia. *Current Oncology*. 28 févr 2018;25(1):91.
59. Letestu R. Détermination de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans la leucémie lymphoïde chronique : état des lieux des pratiques techniques et perspectives. 2019;12.
60. Rawstron AC, Kreuzer K-A, Soosapilla A, Spacek M, Stehlikova O, Gambell P, et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project: ERIC/ESCCA CONSENSUS: REPRODUCIBLE CLL DIAGNOSIS BY FLOW CYTOMETRY. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. janv 2018;94(1):121-8.
61. Rawstron AC, de Tute R, Jack AS, Hillmen P. Flow cytometric protein expression profiling as a systematic approach for developing disease-specific assays: identification of a chronic lymphocytic leukaemia-specific assay for use in rituximab-containing regimens. *Leukemia*. déc 2006;20(12):2102-10.
62. Boyer T, Guihard S, Roumier C, Peyrouze P, Gonzales F, Berthon C, et al. Tetraspanin CD81 is an adverse prognostic marker in acute myeloid leukemia. *Oncotarget* [Internet]. 20 sept 2016 [cité 13 août 2019];7(38). Disponible sur: <http://www.oncotarget.com/fulltext/11481>
63. Smet J, van Zelm M, Schandené L, Adams B, van der Burg M, Mascart F. Rôle de la molécule CD81 dans le fonctionnement des lymphocytes B chez l'homme. *médecine/sciences*. janv 2011;27(1):33-5.
64. van Zelm MC, Smet J, Adams B, Mascart F, Schandené L, Janssen F, et al. CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *Journal of Clinical Investigation*. 1 avr 2010;120(4):1265-74.
65. Weber LM, Robinson MD. Comparison of clustering methods for high-dimensional single-cell flow and mass cytometry data: Comparison of High-Dim. *Cytometry Clustering Methods. Cytometry Part A*. déc 2016;89(12):1084-96.
66. Saey Y, Van Gassen S, Lambrecht BN. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nature Reviews Immunology*. juill 2016;16(7):449-62.

67. Challagundla P, Medeiros LJ, Kanagal-Shamanna R, Miranda RN, Jorgensen JL. Differential Expression of CD200 in B-Cell Neoplasms by Flow Cytometry Can Assist in Diagnosis, Subclassification, and Bone Marrow Staging. *American Journal of Clinical Pathology*. 1 déc 2014;142(6):837-44.
68. Köhnke T, Wittmann VK, Bücklein VL, Lichtenegger F, Pasalic Z, Hiddemann W, et al. Diagnosis of CLL revisited: increased specificity by a modified five-marker scoring system including CD200. *British Journal of Haematology*. nov 2017;179(3):480-7.
69. Sandes AF, de Lourdes Chauffaille M, Oliveira CRMC, Maekawa Y, Tamashiro N, Takao TT, et al. CD200 has an important role in the differential diagnosis of mature B-cell neoplasms by multiparameter flow cytometry: CD200 Role in the Diagnosis of B-Cell Neoplasms. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. mars 2014;86(2):98-105.
70. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*. mai 2007;21(5):956-64.
71. Oldaker TA, Wallace PK, Barnett D. Flow cytometry quality requirements for monitoring of minimal disease in plasma cell myeloma: Flow Cytometry Quality Requirements in Plasma Cell Myeloma Testing. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. janv 2016;90(1):40-6.
72. Broome HE, Rassenti LZ, Wang H-Y, Meyer LM, Kipps TJ. ROR1 is expressed on hematogones (non-neoplastic human B-lymphocyte precursors) and a minority of precursor-B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Research*. oct 2011;35(10):1390-4.
73. Cui B, Ghia EM, Chen L, Rassenti LZ, DeBoever C, Widhopf GF, et al. High-level ROR1 associates with accelerated disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 22 déc 2016;128(25):2931-40.
74. Lesesve J-F, Tardy S, Frotscher B, Latger-Cannard V, Feugier P, De Carvalho Bittencourt M. Combination of CD160 and CD200 as a useful tool for differential diagnosis between chronic lymphocytic leukemia and other mature B-cell neoplasms. *International Journal of Laboratory Hematology*. août 2015;37(4):486-94.
75. Nowicka M, Krieg C, Weber LM, Hartmann FJ, Guglietta S, Becher B, et al. CyTOF workflow: Differential discovery in high-throughput high-dimensional cytometry datasets. *F1000Research*. 26 mai 2017;6:748.

Annexe 1 : Exemple d'utilisation de R

R est un logiciel simple d'utilisation mais avec un langage codifié. Il fonctionne sur le principe d'une demande (saisir une fonction puis valider) suivi d'une réponse (exécution de la demande si celle-ci lui est compréhensible et s'il a les outils nécessaires). Il est possible d'importer dans un espace de stockage provisoire des fonctions externes (bibliothèque), des fichiers, de les personnaliser et de les exporter. Il est également possible de simplifier une succession de fonctions sur le principe des boucles (raccourcis d'un cheminement complexe en une fonction ou un objet simple).

Pour un aperçu du langage, une fonction imaginaire « fonc » est transcrite « fonc() », un objet « a » est transcrit « a » et une information qui n'est ni une fonction, ni un objet est transcrite entre crochets : « "cellules" ». Pour ne pas que R tienne compte d'une information, celle-ci doit être précédée du symbole « # ». Il est possible d'obtenir des renseignements sur une fonction « fonc » avec la demande « ?fonc », « help(fonc) » ou « help("fonc") ».

Pour démarrer, l'installation du logiciel est de fonctions spécialisées est nécessaire.

1. Installation de R

Pour débiter l'installation de R et de RStudio, un guide est disponible sur le site « IMPACT-CYTO » section formation. Seule la version Rx32 est compatible avec les postes de Beckman Coulter.

Les bases d'utilisation de R sont disponibles sur internet (par exemple le pdf « Débuter avec R de E. Paradis). Un guide d'utilisation de flowSOM est également accessible (pdf sur flowSOM de S. Van Gansen).

Les lignes de codes suivantes ont été adaptées à partir de la contribution et des conseils de M. S. Granjeaud. Cet exemple illustre une utilisation directe d'un fichier « .LMD » sur RStudio sans prétraitement sur Kaluza.

2. Installation des fonctions à la première utilisation

#aller sur le site de Bioconductor pour vérifier les versions disponibles

(flowCore, flowSOM, openCyto, ggCyto, devtool...)

```
rm(list=ls()) #nettoyer la mémoire de stockage de R
```

```
library(flowCore) # pour l'utilisation des fichiers de cytométrie
```

```
library(openCyto) #pour le gating
```

```
library(ggcyto) #pour les options de gating
```

```
library(data.table) #pour la lecture et modification de tableaux
```

```
library(FlowSOM)
```

```
impact.cyto::convert.navios.FCS(raw_dir = ".", fcs_dir = ".", keep_range = 10000) #Extraction
des fichiers ayant une extension puis conversion en format "... .fcs" (possibilité de remplacer
"." par un dossier au choix comme en utilisant la tabulation : " →| (sélection du dossier)"
pour extraire tous les fichiers le contenant).
```

```
# si devtool est installé, télécharger la fonction impact.cyto Navios
```

```
# copier et coller la fonction est également possible si elle est disponible sur internet.
```

3. liste de fichiers à charger pour les fonctions ultérieures

```
fileName <- dir(path = ".fcs", pattern = "...fcs", full.names = TRUE)#fichier à analyser
```

```
gtFile <- dir(pattern = "TemplateStar.csv", full.names = TRUE) # charger le modèle pour le
gating
```

```
gt_cell <- gatingTemplate(gtFile)
```

```
mylimits <- ggcyto_par_set(limits = "instrument") #"instrument" pour délimiter
automatiquement la région
```

```
colUse=c(4 :9, 10 :12)#colonnes de marqueurs à utiliser. Dans ce cas, utiliser tous les
marqueurs consécutifs de la 4ème à la 9ème colonne avec celui des colonnes 10, 11 et 12.
```

```
nMetac <- 8 ; #création d'un objet renvoyant à un nombre de metacluster à 8.
```

4. Utilisation de R

#1- lecture du fichier au format flowframe

2 sous parties : ff\$description (contient des valeurs comme les intensités de fluorescence...) et ff\$parameters (données associées : nom des marqueurs, durée d'acquisition...)

```
#chaque colonne de sous partie précédée du symbole $
```

```
#puis compensation des valeurs.
```

```
# enlever les symboles "+" qui apparaissent en collant les lignes de codes
```

```
ff <- flowCore::read.FCS(fileName,
  transformation = FALSE,
  min.limit = FALSE,
  truncate_max_range = FALSE)
```

```
ff.spillover = ff@description$`$SPILLOVER`
```



```

ff <- flowCore::compensate(ff, ff.spillover)

# enlever les symboles "#" si besoin

#pData(parameters(ff))["desc"] = c("FSH", "FSC", "SSC", "FMC7", "CD23", "CD19", "CD10",
"CD5", "CD22", "FL7", "CD3", "CD20", "CD45", "time") #nom des marqueurs à adapter

apply(exprs(ff), 2, range)# borner les valeurs (« range ») par colonnes du tableau exprs(ff).
Le chiffre 2 désigne des colonnes (pour les lignes, le chiffre 1 aurait été utilisé).

#transformation des données compensées pour adapter leur taille (si fichier d'origine ".LMD")

navios_transf = fonction(m, t, a = 0, length = 5)
  fonction (x) {
    length * (asinh(x * sinh(m * log(10))/t) / ((m + a) * log(10)))
  }
fft2 <- flowCore::transform(ff,
  flowCore::transformList(colnames(ff.spillover),
    navios_transf(m = 3.5, t = 10^3.5, a = 0)))
apply(exprs(fft2), 2, range)

```

#2- Gating à partir d'un modèle (gatingtemplate)

#tableau créé sur R puis transformé en ".csv". #(A partir de R, une fois par exemple la matrice « Templ » créée, utiliser la fonction write.table(dTemp, file = " Templatestar.csv", sep = " ", na= "NA", row.names = FALSE)

#mettre le flowframe transformé dans l'adaptateur: le gatingset.

```

gs <- GatingSet(flowSet(fft))
# vérifier le modèle de gating à partir du fichier csv
dTemp <- gfread(gtFile)

```

dTemp

```

      alias      pop      parent      dims gating_method
1: nonBoundary  +      root FSC-A,SSC-A boundary
2: nonDebris   +      /nonBoundary FSC-A mindensity
3: singlets    +      /nonBoundary/nonDebris FSC-A,FSC-H singletGate
4: lympho      + /nonBoundary/nonDebris/singlets FSC-A,SSC-A flowClust
5: * +/+/+/-   lympho CD5,CD19 mindensity

      gating_args collapseDataForGating
1: max = c(9e5,9e5) NA
2: gate_range = c(1.8e5, 2e5), adjust = 1.5 NA
3: prediction_level = 0.999, wider_gate = TRUE, subsample_pct = 0.2 NA
4: K=2,target=c(3.5e5,2e5) NA
5: gate_range=c(1,4) NA

      groupBy preprocessing_method preprocessing_args
1: NA NA
2: NA NA
3: NA NA
4: NA prior_flowClust NA
5: NA NA

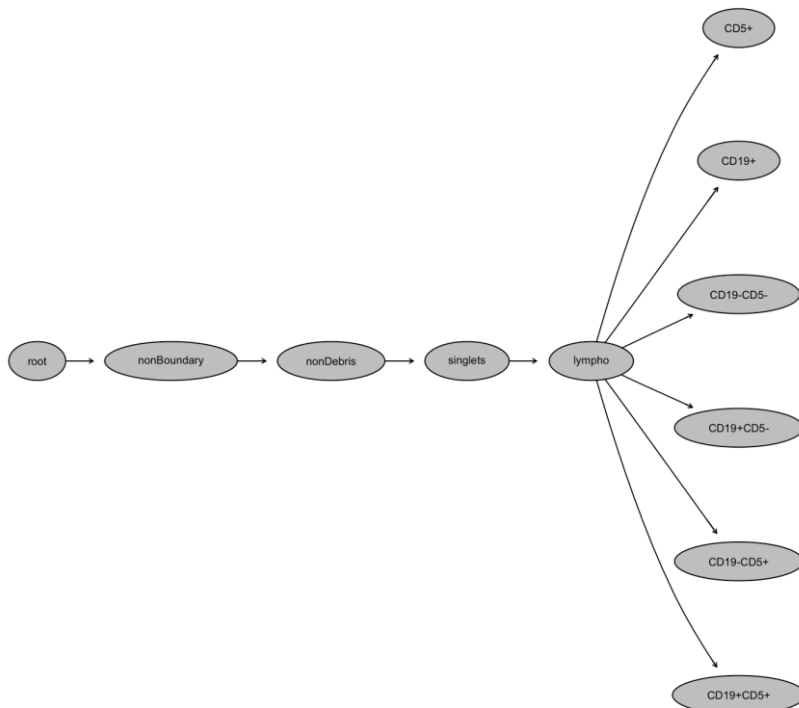
```

la matrice (ou tableau) dTemplate comporte 5 lignes et 10 colonnes allant de « alias » à « preprocessing_args ».

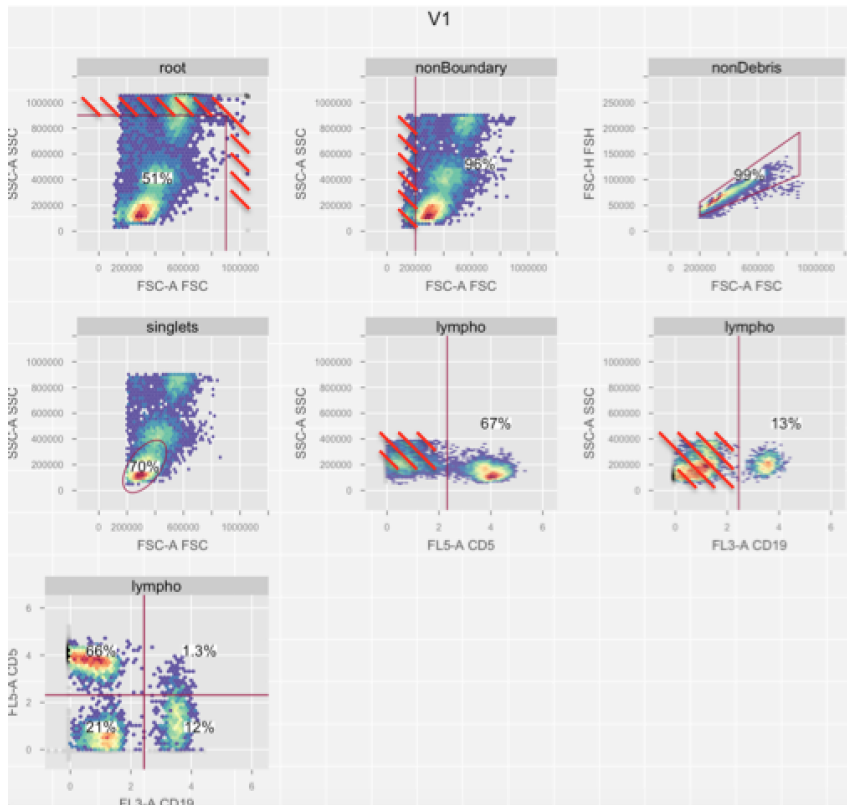
#Par exemple pour remplir les paramètres du tableau, il est possible de saisir : « dTemp[5,2] <- "+/+/+/-" ; dTemp[5,4] <- "CD5,CD19" ; dTemp[5,9] <- "" » pour demander de reproduire les différentes populations en utilisant les marqueurs CD5, CD19 (ligne 5, colonne 4), soit CD5+CD19-/CD5-CD19+/CD5+CD19+/CD5+CD19- (ligne 5, colonne 2) et la position en ligne 5, colonne 4 doit rester vide.

gating(gt_cell, gs) # réaliser le gating de gs à partir du modèle gt_cell

plot(gs[[1]]) #vérifier que le processus de gating a été enclenché



plotGate(gs[[1]]) #vérifier le résultat du gating



#Le nom au-dessus des graphes fait référence à la population « mère » utilisée et non à la population obtenue.

#si non satisfaisant, possibilité de reprendre à partir du dernier gating correct pour ajuster

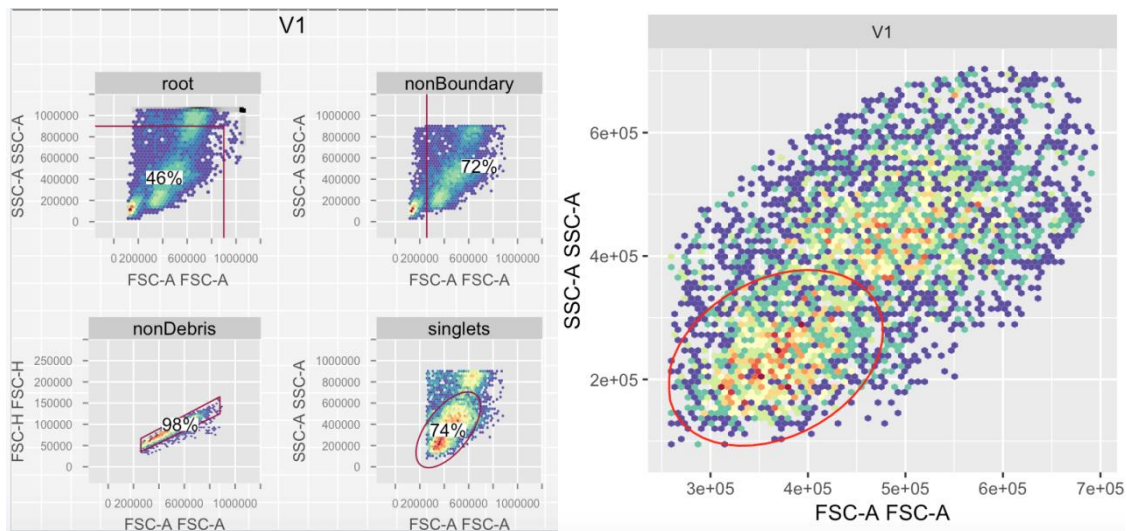
#enlever les "#" pour activer les fonctions

```
#dd = getData(gs[[1]], "singlets")
```

```
#chnl <- c("FSC-A", "SSC-A")
```

```
#h <- openCyto:::flowClust.2d(g, channels = chnl, K=2, target=c(2.5e5,5e5),  
quantile=0.95) #coordonnées des bornées (K: nombre de populations à séparer)
```

```
#autoplot(dd, "FSC-A", "SSC-A", bins = 64) + mylimits + geom_gate(h) #autoplot pour  
le graphe,
```

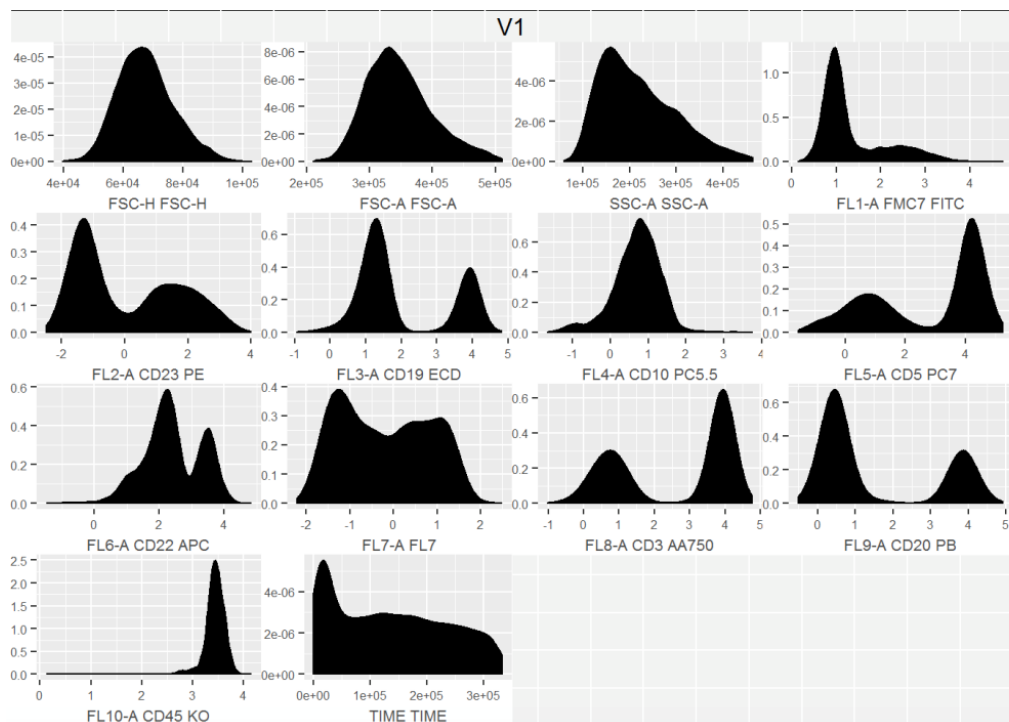


#A gauche, la fenêtre de gating des lymphocytes était trop large. A droite, la région a été filtrée automatiquement et la population lymphocytaire est mieux délimitée.

#lignes de code manquantes pour utiliser le nouveau gating.

#3- exécution de FlowSOM

`foo <- getData(gs[[1]], "lympho")` #enregistrer la population « lympho » de gs dans l'objet foo
`autoplot(foo)` # afficher les histogrammes de la population selon les marqueurs utilisés



```

library(FlowSOM)
#lancer flowSOM soit directement, #enlever le "#" si besoin.

#fSOM <- FlowSOM (foo, scale = TRUE, colsToUse = colUse, xdim=5, ydim=5, nClus=
nMetac , seed = 2)

#soit par étapes successives pour vérifier la démarche.

#Le nombre total de cluster demandé est xdim*ydim. Dans ce cas, 25.

set.seed(2) #générateur aléatoire de clustering pour que celui-ci soit relativement reproductible pour à la reanalyse du fichier
fSOM <- ReadInput(foo, scale = TRUE)
fSOM <- BuildSOM(fSOM, colsToUse = c(4:9, 10:12) , xdim = 5, ydim = 5)
fSOM <- BuildMST(fSOM, tSNE = TRUE)
PlotStars(fSOM, view = "MST")

```

#L'intensité moyenne de fluorescence par cluster peut également être obtenue

```

GetMFIs <- function(fsom, colsUsed = FALSE, prettyColnames = FALSE){
  if (class(fsom) == "list" & !is.null(fsom$FlowSOM)) {
    fsom <- fsom$FlowSOM
  }
  if (class(fsom) != "FlowSOM") {
    stop("fsom should be a FlowSOM object.")
  }
  MFIs <- fsom$map$medianValues
  rownames(MFIs) <- seq_len(nrow(MFIs))
  if(is.null(fsom$map$colsUsed)) colsUsed <- FALSE
  if(is.null(fsom$prettyColnames)) prettyColnames <- FALSE
  if(colsUsed && !prettyColnames){
    MFIs <- MFIs[, fsom$map$colsUsed]
  } else if(!colsUsed && prettyColnames) {
    colnames(MFIs) <- fsom$prettyColnames
  } else if(colsUsed && prettyColnames) {
    MFIs <- MFIs[, fsom$map$colsUsed]
    colnames(MFIs) <- fsom$prettyColnames[fsom$map$colsUsed]
  }
  return(MFIs)
}

```

#les objets créés à l'intérieur d'une fonction ne sont pas utilisables s'ils ne sont pas extraits de celle-ci (return). A condition que l'objet renvoie à une valeur. Pour extraire plusieurs objets a, b et c de la fonction fonc, il est possible de réaliser return(ls(a,b,c)). Il seront utilisables en tant que fonc@a, fonc@b et fonc@c.

#4 éditer les graphes au format pdf

```
fSOM0 <- UpdateNodeSize(fSOM, reset=TRUE)
pdf(file = "SOM KL.pdf", width = 10, height = 7)
PlotStars(fSOM, view = "MST")
PlotStars(fSOM0, view = "grid")
PlotNumbers(fSOM0)
dev.off() #ne pas oublier de marquer la fin de la fonction avec dev.off sinon toutes les lignes
de codes suivantes seront intégrées jusqu'au message d'erreur
```

Pour simplifier l'utilisation des fonctions, il est possible de copier le détail des fonctions et les bibliothèques dans un fichier texte à enregistrer au format « .R » (par exemple « Panier.R » dans l'espace de travail. Ainsi, en ouvrant R, il suffit d'exécuter la fonction « source(Panier) ». Utiliser la touche tabulation pour rechercher directement un fichier entre les crochets “ “ pour éviter les erreurs de saisie.

Il est possible de personnaliser les fonctions de manière à ce que seulement 3-4 fonctions suffisent lorsque les paramétrages sont correctement réalisés.

Annexe 2 : Acquisition conditionnée par la fluorescence

Celle-ci se déroule en 2 étapes : une première acquisition (en excluant les débris) est réalisée avec un nombre suffisant d'évènements (vitesse de passage normale) pour déterminer le ratio lymphocytes T / leucocytes et lymphocytes B / leucocytes (les deux ratios sont réalisés pour prévenir une erreur de calcul si une fenêtre d'acquisition a été mal positionnée. Cette situation peut se présenter par exemple en cas de lymphopénie B sévère). Puis sur le même tube, une acquisition plus longue (par exemple 500 000 d'évènements à vitesse de passage élevée) en ne tenant compte que des cellules exprimant les marqueurs T et/ou B (CD5+ et ou CD19+).

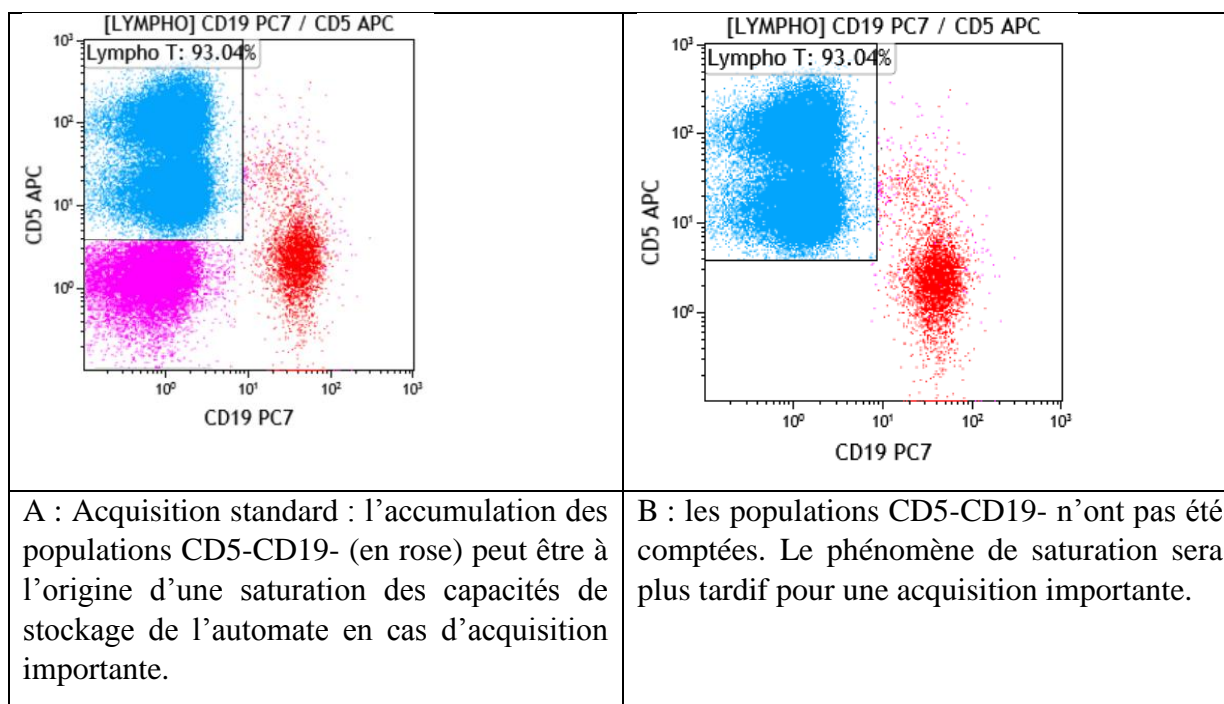


Figure annexe 2 : Illustration de l'acquisition conditionnées par la fluorescence.

Le résultat final est obtenu par déduction.

Soit le premier passage, le nombre d'évènements correspond au nombre de leucocytes analysés.

-un nombre d'évènements L1= 20 000 ; un nombre de lymphocytes CD5+ LT1=1000 ; un nombre de lymphocytes CD19+ LB1=5 et quelques cellules CD5+CD19+

Au deuxième passage, les autres cellules (polynucléaires, monocytes...) sont pour la plupart exclues.

-un nombre d'évènements EA = 400 000 ; un nombre de lymphocytes CD5+ LT2=300 000 ; un nombre de lymphocytes CD19+ LB2 = 150 000 et le nombre de cellules résiduelles M1 = 200.

Le pourcentage de LLC résiduelle par rapport au véritable nombre de leucocytes L2 est $MRD = M1/L2$

Par déduction, $L2 = (\text{ratio } LT1/L1) * LT2$ soit $MRD = M1 * (LT1 / (LT2 * L1))$ ou $MRD = (M1/L1) * (LT1/LT2)$

$MRD = 0.0033\%$ à confronter à la limite de détection. Si celle-ci est à 0.004%, les cellules sont considérées indétectables.

Annexe 3 : ébauche de pré-ciblage avec le panel MRD-LLC à titre d'exemple

La mise au point peut s'effectuer idéalement avec un échantillon contenant les 3 populations de repère à savoir des lymphocytes T, des lymphocytes B et des cellules de LLC. La première étape consiste à sélectionner les fenêtres que l'on souhaiterait utiliser pour le pré-ciblage (après avoir créé toutes les combinaisons de fenêtres en 2 dimensions). Les marquages retrouvant les 3 populations bien distinctes et relativement dispersées sont préférables.

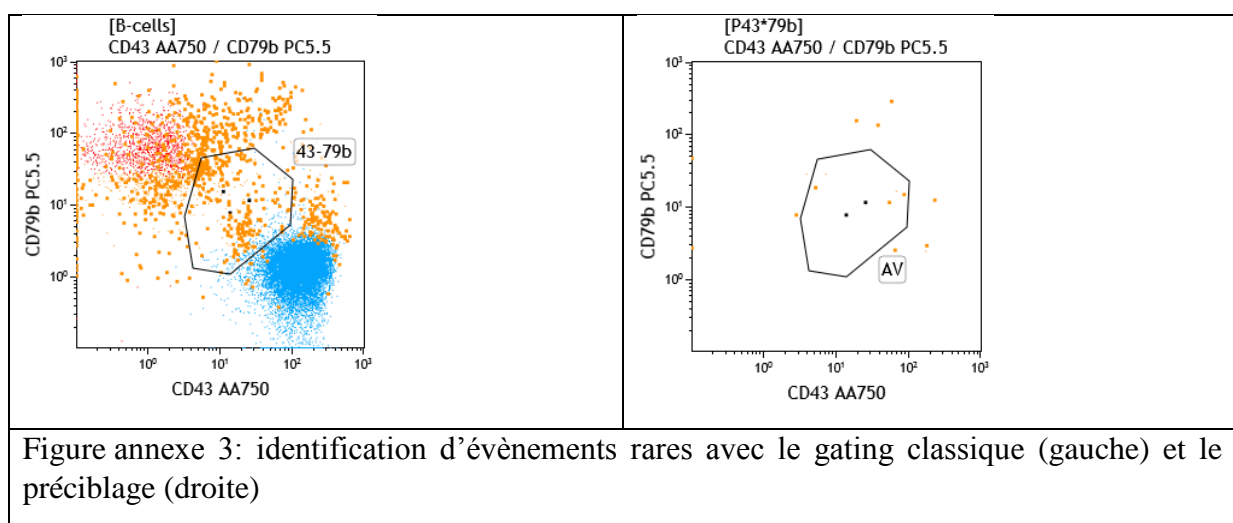
Pour cet exemple, nous choisirons au hasard les marquages suivants sur la fenêtre « B +/- T » : CD43/CD81, CD5/CD79b, CD20/CD22 et CD43/CD79b. Dans chaque fenêtre, les cellules de LLC seront délimitées par une zone polygonale nommée respectivement 43-81, 5-79b, 20-22 et 43-79b.

Puis une série de booléenne sera créé. Les 4 premières correspondront aux fenêtres de pré ciblage (la même couleur peut leur être attribuée) et la dernière à la fenêtre de quantification des cellules résiduelles (une couleur différente).

- P43°81 = (5-79b) et (20-22)
- P5°79b = (43-81) et (20-22)
- P20°22 = (43-81) et (5-79b) et (43-79b)
- P43°79b = (20-22)
- MRD-LLC = (43-81) et (5-79b) et (20-22) et (43-79b)

Ensuite, chaque fenêtre est dupliquée en liant les polygones respectifs. Les fenêtres de référence des duplicatas sont ensuite modifiées. Ainsi, chaque combinaison de marqueur est analysée sur 2 fenêtres. Par exemple, les populations sont observées pour le marquage CD43/CD81 sur les fenêtres « B+/-T » et « P43°81 » ; le marquage CD20/CD22 sur les fenêtres « B+/-T » et « P20°22 ». Une fois les réglages effectués et en ciblant les populations supposées cellules de LLC, celles confirmées auront des niveaux d'expression identiques dans les 2 fenêtres alors que les cellules non LLC auront un profil discordant.

Le figure annexe 3 illustre 2 fenêtres d'analyse : la première sur les lymphocytes B et T, la deuxième sur sa fenêtre de pré-ciblage associée.



AUTEUR : Nom : APETE

Prénom : Alan

Date de soutenance : 09 Octobre 2019

Titre de la thèse : Mise en place d'un panel de quantification de la maladie résiduelle par cytométrie en flux multiparamétrique dans la Leucémie Lymphoïde Chronique.

Thèse - Médecine - Lille 2019

Cadre de classement : *hématologie*

DES + spécialité : *Biologie médicale*

Mots-clés : maladie résiduelle, cytométrie, Leucémie Lymphoïde Chronique, FlowSOM.

Résumé :

Contexte : La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie B au long cours de présentation et de pronostic hétérogène, dans laquelle l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) prend une place grandissante pour stratifier les patients. La cytométrie en flux est la technique de choix pour sa quantification. Le panel de cytométrie utilisé au diagnostic de LLC est difficile à interpréter dans le cadre de la MRD. Le but de notre travail a consisté à mettre en place un panel d'anticorps 7 couleurs (MRD-LLC) adapté à la mesure de la MRD dans la LLC.

Méthodes : Après avoir établi le protocole analytique de détection de la MRD-LLC en cytométrie, nous avons établi et comparé les performances analytiques (sensibilité, limite de détection, limite de quantification, interprétation des résultats) de l'ancien et du nouveau panel. Nous avons évalué secondairement des stratégies d'analyse peu répandues comme l'utilisation du logiciel d'analyse de cytométrie FlowSOM dans la maladie résiduelle.

Résultats : L'utilisation du panel MRD-LLC améliore la sensibilité de détection des cellules résiduelles (10^{-3} avec l'ancien panel et 10^{-5} avec le nouveau) et permet une identification plus aisée des cellules résiduelles. Nous avons calculé le seuil de détection et le seuil de quantification des cellules résiduelles avec le nouveau panel MRD-LLC, pour 500 000 événements analysés (respectivement : 18 cellules, soit 0,0036% des leucocytes et 47 cellules, soit 0,0094% des leucocytes). L'analyse des données de cytométrie avec le logiciel FlowSOM apporte plus une aide visuelle qu'une amélioration de la sensibilité des résultats.

Conclusion : Nous avons mis en place au laboratoire un nouveau panel de quantification de la MRD-LLC standardisé et en accord avec les recommandations de l'iwCCL2018, qui nous permettra de participer aux essais cliniques sur l'impact pronostique de la détection de la MRD LLC chez les patients concernés.

Composition du Jury :

Président : Pr Claude PREUDHOMME

Assesseurs : Pr Myriam LABALETTE – Pr Laurent PASCAL – Dr Florent DUMEZY

Directrice de thèse : Pr Agnès CHARPENTIER