

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2021

THÈSE POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Intérêts et limites de l'étude de la maladie résiduelle
par cytométrie en flux dans la Leucémie Lymphoïde Chronique
à l'heure des thérapies ciblées**

Présentée et soutenue publiquement le 19 octobre 2021 à 18h
En salle 4 (Pôle Formation)
Par Quentin LUPA

JURY

Président :

Madame le Professeur *Myriam LABALETTE*

Assesseurs :

Madame le Professeur *Agnès CHARPENTIER*

Monsieur le Docteur *Christophe ROUMIER*

Directeur de thèse :

Madame le Docteur *Claire HEMAR*

Avertissement

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

ABREVIATIONS

AA700	APC-Alexa Fluor 700
AA750	APC-Alexa Fluor 750
Ac	Anticorps
ADCC	Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
APC	Allophycocyanine
ASO-qPCR	Allele Specific Oligonucleotide-quantitative Polymerase Chain Reaction
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BAKs	Kinases associées au BCR
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCR	Récepteur du lymphocyte B
BR	Bendamustine-Rituximab
BrdU	Bromodésoxyuridine
BTK	Bruton tyrosine kinase
CAR	Chimeric antigen receptor
CD	Cluster de différenciation
CDC	Cytotoxicité dépendante du complément
CMF	Cytométrie en flux
CR	Rémission complète
CV	Coefficient de variation
DLBCL	Lymphome diffus à grandes cellules B
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECD	Phycoérythrine Texas Red
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EMA	European Medicines Agency
ERIC	European Research Initiative on CLL
ESCAA	Société Européenne d'Analyse Cellulaire Clinique
FCG	Fludarabine-Cyclophosphamide-Obinutuzumab
FCR	Fludarabine-Cyclophosphamide-Rituximab

FILO	French Innovative Leukemia Organization
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FISH	Hybridation in situ par fluorescence
FS	Forward Scatter
G-CLB	Chlorambfucil-Obinutuzumab
GI	Obinutuzumab-Ibrutinib
HCL	Leucémie à tricholeucocytes
HLA	Human leukocyte antigen
ICT	Immunochimiothérapie
Ig	Immunoglobuline
IgVH	Chaines lourdes des immunoglobulines
IPI	International Prognostic Index
iwCLL	International workshop on chronic lymphocitic leukemia
LDH	Lactate déshydrogénase
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
MBL	Lymphocytose B monoclonale
MFI	Intensités moyennes de fluorescence
MPP	Multipotent progenitor
MRD	Minimal residual disease
MYD88	Myeloïd differentiation primary response 88
NF-κB	Nuclear factor kappa B
NGS	Next generation sequencing
NK	Natural killer
NLC	Nurse-like cells
OS	Overall survival (survie globale)
PBS	Tampon phosphate salin
PC5.5	Phycoérythrine Cyanine 5.5
PC7	Phycoérythrine Cyanine 7
PCD	Programmed cell death
PCR	Polymerase chain reaction

PD	Maladie en progression
PE	Phycoérythrine
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
PFS	Progression free survival (survie sans progression)
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PMT	Photomultiplicateurs
PR	Rémission partielle
RC	Réponse complète
RFC	Rituximab-Fludarabine-Cyclophosphamide
ROR1	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
RP	Réponse partielle
SAB	Sérum albumine bovine
SF3B1	Splicing factor 3b subunit 1
SLP-B	Syndrome lymphoprolifératif B
SS	Side Scatter
Syk	Spleen tyrosine kinase
TDM	Tomodensitométrie
TEP	Tomographie par émission de positons
TP53	Tumor protein 53
VR	Vénétoclax-Rituximab
XPO1	Exportine 1
ZAP-70	Zeta-associated protein-70

Sommaire

Introduction	19
I- La Leucémie Lymphoïde Chronique	21
1. Définition.....	21
2. Epidémiologie	21
3. Facteurs de risque	21
4. Physiopathologie	22
A. Rappel sur la lymphopoïèse B	22
B. Leucémogénèse dans la LLC.....	24
a) Aspects moléculaires	24
b) Aspects cellulaires	26
C. Rôle du microenvironnement	27
5. Diagnostic.....	28
A. Clinique et circonstances diagnostiques	28
B. Critères diagnostiques.....	28
C. Bilan biologique	29
a) Hémogramme et frottis sanguin	29
b) Immunophénotypage lymphocytaire	30
c) Examens biochimiques	31
D. Place de l'imagerie	31
6. Diagnostic différentiel	31
A. Formes frontières de la LLC.....	31

B.	Autres syndromes lymphoprolifératifs B	32
7.	Facteurs pronostiques au diagnostic	33
A.	Scores pronostiques cliniques.....	33
B.	Marqueurs sériques	34
C.	Cytogénétique	35
D.	Biologie moléculaire	36
E.	Marqueurs en cytométrie en flux	37
F.	CLL International Prognostic Index (CLL-IPI)	38
8.	Bases thérapeutiques	39
A.	Molécules	39
a)	Chimiothérapies	39
b)	Ac monoclonaux.....	39
c)	Inhibiteurs du BCR	44
d)	Inhibiteurs de la voie du BCL-2	47
e)	CAR-T cells	47
B.	Stratégies thérapeutiques	49
a)	Paramètres à considérer	49
b)	Traitements de première ligne.....	51
c)	Traitements de deuxième ligne	52
d)	Greffe allogénique	53
9.	Évaluation de la réponse au traitement	54
	II-Place de l'évaluation de la maladie résiduelle dans le suivi de la LLC.....	57

1. Définition de la maladie résiduelle	57
2. Impact clinique.....	58
A. Place de la MRD-LLC comme biomarqueur de substitution.....	58
B. La place de la MRD-LLC dans la démarche thérapeutique.....	61
3. Méthodes d'évaluation de la MRD-LLC	63
A. MRD-LLC en biologie moléculaire.....	63
B. MRD-LLC en Cytométrie en flux	66
a) La cytométrie en flux	66
b) Principe de la MRD-LLC en cytométrie en flux.....	71
C. Limites et comparaison des deux approches	81
III. Impact des nouvelles thérapeutiques sur l'immunophénotypage des cellules de LLC	85
1. Thérapeutiques anti-CD20.....	85
2. Inhibiteurs du BTK	91
3. Inhibiteur de BCL2	95
4. Reconstitution lymphocytaire après thérapeutique agressive	96
5. Perspectives : traitement par CAR-T cells et autres immunothérapies.....	97
IV- Axes d'optimisation de la MRD-LLC en cytométrie en flux.....	101
1. Aspects préanalytiques.....	101
2. Protocole technique	102
A. Standardisation du protocole.....	102
B. Adaptation du protocole et stratégies de marquage alternative	102

a) Étape de perméabilisation.....	102
b) Utilisation de nanocorps.....	104
c) Evaluation de l'index de prolifération cellulaire.....	105
3. Panels.....	107
A. Choix des marqueurs	107
C. Choix d'un panel adapté au site du prélèvement	121
D. Cas particulier des LLC de phénotype atypique.....	121
E. Choix des réactifs.....	122
4. Nombre d'évènements acquis	124
5. Stratégie de réanalyse et rendu de résultats	125
A. Standardisation de la stratégie de réanalyse	125
B. Stratégies d'analyses non supervisées	126
V – Discussion	129

Index des Figures

Figure 1 : Lymphopoïèse B et maturation du BCR.	24
Figure 2 : Mécanisme de leucémogénèse dans la leucémie lymphoïde chronique	25
Figure 3 : Récepteur BCR et voies de signalisation.	27
Figure 4 : Frottis sanguin avec cellules de LLC et ombres de Gumprecht.	29
Figure 5 : Démarche diagnostique en cytométrie en flux des principaux syndromes lymphoprolifératifs B.	33
Figure 6 : Survie globale chez des patients atteints de LLC, selon les anomalies cytogénétiques au diagnostic.	35
Figure 7 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-CD20.....	40
Figure 8 : Principales voies de signalisation associées au BCR.....	44
Figure 9 : Principe et structure d'un récepteur antigénique chimérique.....	48
Figure 10 : Recommandations du groupe FILO dans le traitement de 1ère ligne de la LLC, septembre 2021.....	52
Figure 11 : Concept de maladie résiduelle (MRD).....	57
Figure 12 : Survie sans progression et survie cumulée en fonction de la MRD-LLC chez des patients traités par chimiothérapie ou immunochemiothérapie.....	58
Figure 13 : Survie sans progression en fonction du statut MRD des patients traités par Vénétoclax, Etude MURANO,	61
Figure 14 : Adaptation de la stratégie thérapeutique selon le statut de la MRD, étude CLARITY.	62
Figure 15 : Principes de base de l'analyse de la MRD par RQ-PCR.	65
Figure 16 : Fonctionnement d'un cytomètre.	67
Figure 17 : Représentation schématique d'un banc optique.....	68

Figure 18: Exemples d'histogrammes obtenus en CMF dans une LLC.....	69
Figure 19 : Recouvrement des spectres d'émissions de fluorescence de différents fluorochromes.....	70
Figure 20 : Evolution des panels d'étude de la MRD LLC par CMF	73
Figure 21 : Stratégie de réanalyse d'une MRD-LLC	78
Figure 22 : Dilutions successives d'un échantillon de patient atteint de LLC	81
Figure 23 : Détection ex vivo du CD20 et du Rituximab à la surface des cellules de LLC.....	86
Figure 24 : Internalisation du CD20 et du Rituximab au cours d'un traitement par Rituximab.....	87
Figure 25 : Histogrammes bi-paramétriques d'échantillons de LLC traitées.....	88
Figure 26 : Profil d'expression des différents marqueurs utilisés dans le suivi de la LLC chez des patients traités par Rituximab.....	89
Figure 27 : Perte d'expression du CD19 sous Rituximab	90
Figure 28 : Modulation de l'expression du CD19 sous Rituximab.....	91
Figure 29 : Cinétique de l'expression du Ki67 par les cellules de LLC chez les patients traités par Ibrutinib.....	92
Figure 30 : Profil d'expression relative du CD23 par les cellules de LLC au cours d'un traitement par Ibrutinib.....	93
Figure 31 : Profils d'expression relative du CD19 et du CD20 par les cellules de LLC au cours d'un traitement par Ibrutinib	94
Figure 32 : Profil d'expression du CD200 par les cellules de LLC au cours d'un traitement par Ibrutinib.....	94
Figure 33 : Expression de différents marqueurs de surfaces de la LLC sous Vénétoclax	95

Figure 34 : Pourcentage de cellules B CD19+ exprimant le CD5 après thérapeutique agressive	96
Figure 35 : Évaluation de l'expression du CD19 au cours d'un traitement par Tafasitamab.....	99
Figure 36 : Principe des anticorps à chaînes lourdes de camélidés.	104
Figure 37 : Effet de l'Ibrutinib et du Vénétoclax sur la prolifération cellulaire dans la LLC.....	106
Figure 38 : Analyse de la combinaison CD81/CD22/CD19/CD5 pour la séparation des cellules de LLC des progéniteurs et lymphocytes B matures.	112
Figure 39 : Expression de ROR1 dans le sang par les cellules de LLC et les différentes cellules hématopoïétiques	114
Figure 40 : Profil d'expression relative de ROR1 par les cellules de LLC au cours d'un traitement par Ibrutinib.....	114
Figure 41 : Expression de ROR1 à la surface des hématogones.....	115
Figure 42 : Survie sans progression selon le statut clinique et de la MRD incluant le CD160	116
Figure 43 : Expression de HLA-DR à la surface des cellules de LLC après traitement ciblant le BCR.....	117
Figure 44 : Utilisation du CD22 couplé au CD79b dans la stratégie d'identification des cellules résiduelles de LLC	119
Figure 45 : Images de distorsion du signal observé avec différents fluorochromes	124
Figure 46 : Aide au positionnement des fenêtres pour le fenêtrage du panel MRD-LLC	125

Index des tableaux

Tableau 1 : Score du Royal Marsden Hospital (Matutes et Moreau) selon l'expression de différents marqueurs par la population lymphoïde anormale.....	30
Tableau 2 : Les différents stades cliniques de la LLC selon Rai et Binet et leurs médianes de survie associées.....	34
Tableau 3 : Index pronostic international de la LLC (CLL-IPI).....	38
Tableau 4 : Définitions des niveaux de réponse au traitement dans la LLC	55
Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de biologie moléculaire utilisés dans la MRD LLC	66
Tableau 6 : Rappel sur les profils d'expression cellulaire des principaux marqueurs d'identification utilisés dans le panel MRD-LLC.....	74
Tableau 7 : Nombre théorique de cellules nécessaires à analyser en fonction du pourcentage de cellules cibles présentes dans l'échantillon et le coefficient de variation de la technique	76
Tableau 8 : Comparatifs des différentes techniques utilisées dans l'étude de la MRD LLC.....	83
Tableau 9 : LLC "atypiques" : implications pour le diagnostic différentiel et le suivi de la maladie	122
Tableau 10 : Valeurs cibles des principaux marqueurs utilisés dans la MRD-LLC ..	123

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la leucémie la plus fréquente dans les pays industrialisés. Longtemps considérée comme indolente de par l'âge avancé des patients au diagnostic et la balance bénéfices/risques généralement peu favorable à un traitement par chimiothérapie agressive et non curatif, son évolutivité clinique et biologique reste néanmoins très variable.

Au début des années 2000, l'arrivée des anticorps-monoclonaux anti-CD20 et le développement de l'immunochimiothérapie a changé le pronostic des patients, avec une amélioration significative de la survie. Ces dix dernières années, grâce à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques dans la leucémogénèse, le développement de thérapies ciblées comme les inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton (BTK) et inhibiteurs de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) a vu le jour. Moins agressives, et permettant l'obtention de réponses prolongées, ces thérapeutiques prennent peu à peu une place prépondérante dans la prise en charge thérapeutique du patient.

Avec l'évolution de ces thérapeutiques, l'intérêt pour la Maladie Résiduelle Minimale (MRD) n'a cessé de croître. Outil d'évaluation de la réponse au traitement dans le cadre d'essais cliniques, son intérêt a été remis en cause avec le développement de l'ibrutinib, pour revenir sur le devant de la scène comme marqueur de substitution à la survie sans progression dans l'évaluation des nouvelles combinaisons thérapeutiques. A l'ère des nouvelles associations et du développement croissant des immunothérapies, l'étude de la maladie résiduelle peut-elle dépasser le cadre des essais cliniques et guider la stratégie thérapeutique ?

L'objet de ce travail bibliographique a été tout d'abord de faire un état des lieux de la LLC en 2021, sa prise en charge thérapeutique, et la place de la MRD dans le suivi de la maladie. Nous nous sommes plus spécifiquement intéressés à la MRD-LLC évaluée par cytométrie en flux (CMF), technique de prédilection pour cette analyse spécialisée. Un intérêt particulier sera apporté à l'impact des nouvelles thérapeutiques sur les données de CMF et les difficultés d'interprétation qu'elles engendrent au moment de la réanalyse. Enfin, ont été répertoriés les principaux axes d'optimisation de la technique de MRD-LLC en CMF et les principales perspectives en clinique.

I- La Leucémie Lymphoïde Chronique

1. Définition

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne définie par l'accumulation dans le sang, la moelle, les ganglions ou la rate, de petits lymphocytes à la chromatine mature et au profil phénotypique caractéristique (1).

2. Epidémiologie

En 2018, il a été dénombré 4674 nouveaux cas de LLC en France, avec une prédominance masculine à 59.3% pour 40.7 % de femmes (2). La LLC représente plus de 1% de l'ensemble des cancers, et environ 30% des hémopathies.

L'âge médian au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et de 73 ans chez la femme.

Il existe également une variation ethnique importante avec une incidence plus élevée dans les populations caucasiennes, et plus basse dans les populations asiatiques (3).

3. Facteurs de risque

Une histoire familiale est retrouvée dans 8 à 10% des cas de LLC. Le risque relatif d'avoir une LLC lorsqu'au moins un parent au premier degré en est lui-même atteint est de 8,5. De nombreux polymorphismes nucléotidiques ont été décrits et seraient responsables de ces formes familiales (4).

Par ailleurs, l'exposition à certains insecticides et rayons ionisants pourrait augmenter le risque de LLC (5). En revanche, l'impact de l'alimentation et du mode de vie n'a pas été démontré.

4. Physiopathologie

A. Rappel sur la lymphopoïèse B

La lymphopoïèse B s'effectue dans la moelle osseuse et fait appel à de nombreux mécanismes génétiques et épigénétiques dont la compréhension reste encore aujourd'hui imparfaite. La présence d'un microenvironnement spécifique au niveau médullaire va favoriser la différenciation lymphocytaire grâce à des contacts intercellulaires, des cytokines et des facteurs de croissance. Ces interactions vont ainsi conduire à des réarrangements de gènes et à l'expression de marqueurs de différenciation caractérisant les différents stades de la lymphopoïèse B (6).

Les cellules souches multipotentes, qui possèdent des capacités d'auto-renouvellement, vont progressivement se différencier en progéniteurs multipotents (*multipotent progenitors* : MPP) ayant perdu la capacité d'auto-renouvellement et exprimant le récepteur *FLT3* (7).

La différenciation en progéniteurs multipotents lymphoïdes (LMPP) se fait grâce à plusieurs protéines importantes dans la répression de la différenciation myéloïde (BMI-1, PRC-1 et PU.1), puis en progéniteurs lymphoïdes très précoces exprimant les enzymes RAG1 et RAG2. C'est à ce stade que la cellule commence à réarranger les segments D et J du gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines. Elle pourra se différencier en progéniteur T précoce qui rejoindra le thymus, ou en progéniteur lymphoïde commun qui continuera sa différenciation, jusqu'à atteindre le stade pro-B avec l'expression en surface du CD19 et le réarrangement des segments variables Vh-DJh. Le passage du stade pro-B au stade pré-B se fait grâce au facteur de transcription *EBF-1*.

Au stade pré-B, la cellule commence à réarranger les segments de gène de la chaîne légère, qui, lorsqu'ils seront productifs, aboutiront à une cellule B immature, exprimant à sa surface une immunoglobuline M (IgM) complète (6).

À ce stade, le récepteur B du lymphocyte (BCR) nouvellement exprimé va jouer un rôle dans la survie cellulaire avec une sélection négative visant à éliminer les cellules exprimant un BCR auto-réactif. La co-expression en surface d'IgM et d'IgD est caractéristique du lymphocyte de stade B mature naïf qui pourra commencer à circuler dans le sang et dans les organes hématopoïétiques secondaires, où il pourra fixer un antigène (Ag) au niveau de son BCR. L'Ag sera alors dégradé en peptides antigéniques nichés en surface dans des molécules HLA de classe II, qui seront reconnus par les lymphocytes T *helpers* T CD4. Le Lymphocyte B ainsi stimulé peut proliférer au niveau folliculaire sous forme de centroblastes où auront lieu des hypermutations somatiques des régions variables des chaînes d'Ig, et également d'autres gènes pour devenir des centrocytes programmés pour mourir en l'absence de signaux de survie. Les centrocytes survivants présentant un BCR d'affinité augmentée pour l'Ag peuvent soit de nouveau proliférer, soit présenter de nouveau un Ag aux lymphocytes T CD4 qui déclencheront le switch de classe des Ig, ou termineront leur différenciation en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes (7).

La figure 1 illustre de façon simplifiée les différentes étapes de la lymphopoïèse normale.

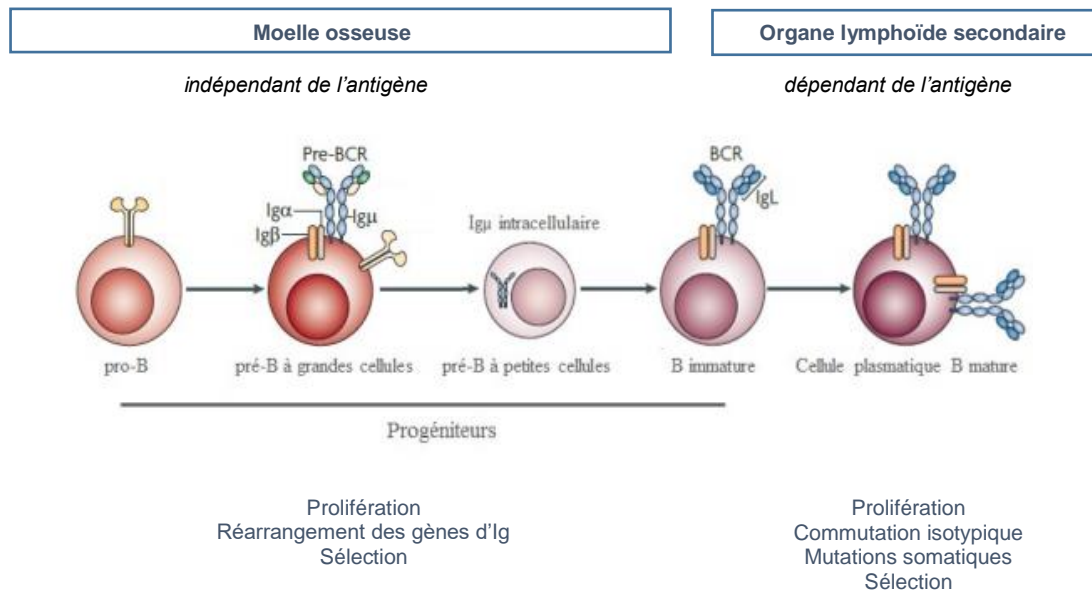


Figure 1 : Lymphopoïèse B et maturation du BCR, Herzog et al (7).

Les cellules pré-B à grandes cellules présentent à leur surface un récepteur transitoire pré-BCR fonctionnel doté de chaînes lourdes Ig réarrangées et de chaînes légères Ig transitoires. Le stade des cellules pré-B à petites cellules est caractérisé par l'accumulation d'IgM dans le cytoplasme. À partir du stade B immature, les cellules présentent à leur surface le BCR mature constitué de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères d'Ig réarrangées, exprimant à leur surface une IgM complète. Les cellules B immatures vont ensuite sortir de la moelle osseuse afin de terminer leur maturation dans la rate.

B. Leucémogénèse dans la LLC

a) Aspects moléculaires

Le processus de transformation leucémique dans la LLC est actuellement largement méconnu. Les anomalies génétiques et épigénétiques initiales favorisant la survenue d'une LLC semblent survenir dans les cellules souches hématopoïétiques même si cette hypothèse reste controversée. De meilleures connaissances dans le paysage génomique de la LLC ont également montré que le plus souvent la maladie peut être initiée par la perte ou le gain de matériel chromosomique (délétion (13q), délétion (17p), délétion (11q), trisomie 12). En particulier, les délétions 13q14, impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose, sont retrouvées chez la majorité des patients atteints de LLC (6) et joueraient un rôle dans la leucémogénèse. Ensuite, l'apparition ultérieure de mutations additionnelles, pouvant survenir dans des cellules B matures, peut rendre la leucémie plus agressive (8).

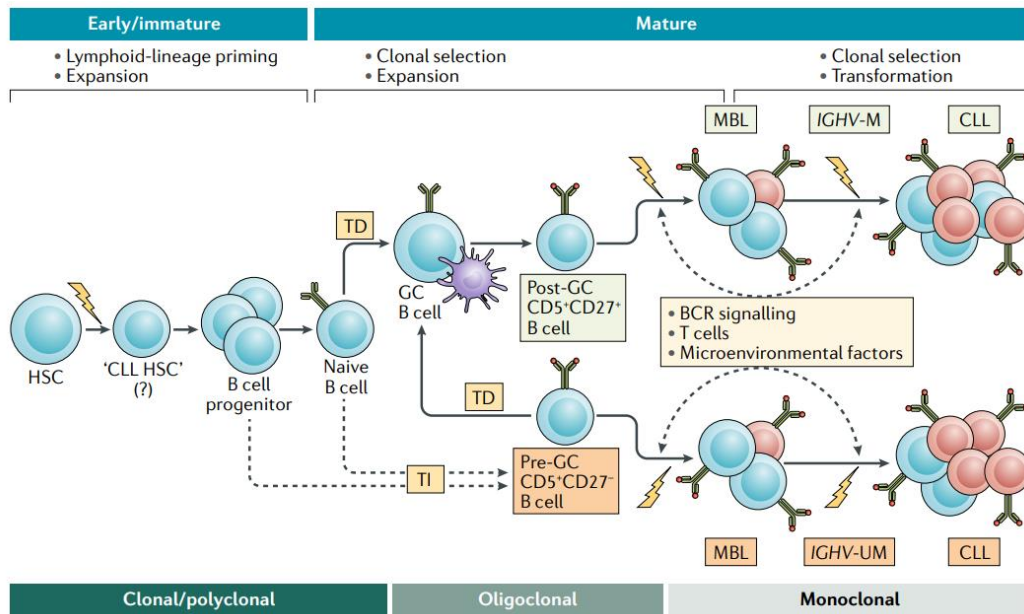


Figure 2 : Mécanisme de leucémogénèse dans la leucémie lymphoïde chronique, Botsch et al (9).

Anomalies génétiques et épigénétiques supposées survenir initialement dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH ou HSC). Des évènements ultérieurs pouvant survenir dans les cellules B matures vont conduire à la prolifération des cellules de LLC. Les LLC avec statut non muté (UM) des gènes des régions variables des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IGHV) proviendraient de cellules naïves CD5+CD27- pré-centre germinatif (pré-GC). Tandis que les LLC avec statut muté (M) proviendraient de cellules post centre germinatif (post-GC) ayant eu un contact avec l'antigène (lymphocytes B mémoires). D'autres évènements participent à la leucémogénèse : voie du BCR, microenvironnement cellulaire, lymphocytes T.

L'arrivée des séquenceurs à haut débit a permis de mieux comprendre la grande variabilité génétique dans la LLC. De nombreuses mutations somatiques récurrentes ont été décrites, pouvant toucher des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*TP53*, *ATM*), l'épissage de l'ARNm (*SF3B1*, *XPO1*), les modifications de la chromatine (*CHD2*, *ZMYM3*, *HIST1H1E*), la voie de signalisation Notch (*NOTCH1*) ou encore des voies de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire (*MYD88*) (10).

Les mutations somatiques les plus fréquentes sont *SF3B1* (jusqu'à 21% des patients), *ATM* (15% des patients), *TP53* (7% des patients), et *NOTCH1* (4 à 20% des patients) (11).

Plus récemment, des altérations des micro-ARN (miARN) ont été identifiées dans les régions critiques de la del(13q14). Les miARN sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'inhiber l'expression d'un gène. La LLC a été la première pathologie décrite associée à une altération des miARN. On retrouve chez 60% des patients atteints d'une LLC, une altération de mir-15a et mir-16-1, deux miARN ciblant des gènes importants dans la survie cellulaire comme le gène codant pour la protéine du lymphome à cellules B 2 (BCL-2) : protéine anti-apoptotique surexprimée dans la LLC (12–14).

Enfin, des études épigénomiques dans la LLC ont retrouvé un état global d'hypométhylation, associé cependant à une hétérogénéité de méthylation au sein de la population tumorale (15). Cette hétérogénéité de méthylation est associée à une plus grande instabilité génétique et favorise l'apparition de nouvelles mutations somatiques dans les sous populations clonales. Ces modifications épigénétiques jouent un rôle dans l'évolution de la tumorigénèse et son adaptation en réponse aux traitements.

b) Aspects cellulaires

Dans la LLC, les voies de signalisation du BCR jouent un rôle clé dans la survenue de la maladie. Le BCR est une protéine transmembranaire localisée à la surface membranaire des lymphocytes B. Le BCR est composé d'une immunoglobuline, fragment de liaison au ligand, et d'un hétérodimère CD79a et CD79b, fragment de transduction du signal, contenant des résidus tyrosine-kinase pouvant être phosphorylés. Les kinases activées activent à leur tour la Bruton Tyrosine Kinase (BTK) et la Phosphoinositol-3-kinases (PI3K) entraînant une cascade de signalisation en aval (14). Un BCR fonctionnel est requis pour la survie des cellules B matures.

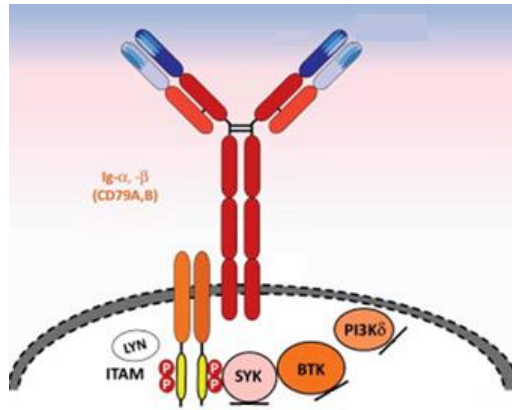


Figure 3 : Récepteur BCR et voies de signalisation, Burger et al (16).

Le BCR, immunoglobuline couplée à un hétérodimère CD79a et CD79b, permet après rencontre d'un antigène, la phosphorylation des motifs ITAMs via les kinases LYN (tyrosine kinases de la famille Src). Les motifs ITAMs phosphorylés vont ensuite activer la tyrosine kinase SYK, déclenchant une réaction en chaîne avec l'engagement de la voie de la tyrosine kinase de Bruton (BTK) et de la phosphoinositide 3-kinases (PI3K δ) permettant ensuite l'activation de facteurs nucléaires et mitogènes menant à la prolifération et à la survie cellulaire.

On retrouve dans les hémopathies B, dont la LLC, une activation constitutive du BCR par auto entretien antigénique, conduisant à une prolifération et survie cellulaire accrue (17).

L'importance du BCR est soulignée par l'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinase, bloquant les voies de signalisation du BCR, dans la prise en charge de la LLC.

C. Rôle du microenvironnement

Les cellules de LLC dépendent de signaux de survie qu'elles reçoivent du microenvironnement tumoral (18). Cette structure anatomique et fonctionnelle est constituée de cellules non tumorales ainsi que de facteurs d'adhésion, facteurs de croissance et de transcription, récepteurs de voies de transduction du signal.

Ces cellules de l'environnement tumoral ont des rôles multiples dans la physiopathologie de la LLC : rétention et adhésion des cellules dans le microenvironnement (cellules dendritiques folliculaires, cellules stromales mésenchymateuses, fibroblastes réticulaires), chimiotactisme des cellules de LLC et présentation d'antigène.

Les « *nurse-like cells* » NLC (ou macrophages associés aux lymphomes) ainsi que les cellules T induisent un entretien antigénique des cellules de LLC, via l'exposition de cytokines, chimiokines, intégrines et autres ligands de facteurs de survie, et participent à l'activation de nombreuses voies de signalisation (NF- κ B, WNT, Notch) ayant un rôle dans la survie, la prolifération cellulaire et l'évasion immunitaire.

Ces interactions au sein du microenvironnement expliquent les résistances à certains traitements, et sont aujourd'hui la cible de nombreuses thérapies ciblées.

5. Diagnostic

A. Clinique et circonstances diagnostiques

Dans environ 50% des cas, le diagnostic se fait de manière fortuite par la découverte d'une hyperlymphocytose sur un hémogramme réalisé à titre systématique ; dans l'autre moitié des cas, c'est un syndrome tumoral avec la présence d'adénopathies ou d'une splénomégalie qui motive la réalisation d'examens complémentaires. Enfin, dans de rares cas, le diagnostic est réalisé au décours de manifestations infectieuses, auto-immunes ou hémorragiques compliquant l'envahissement lymphocytaire et les cytopénies associées.

B. Critères diagnostiques

Dans la grande majorité des cas, seul l'hémogramme et l'immunophénotypage lymphocytaire par cytométrie sont nécessaires au diagnostic de LLC, qui repose sur les recommandations de l'iwCLL (*International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia*) de 2018. Les critères diagnostiques sont les suivants : (1)

- La présence de plus de $5 \times 10^9/L$ lymphocytes B dans le sang pendant plus de 3 mois.

- Le caractère clonal des lymphocytes, mis en évidence en cytométrie en flux par une restriction isotypique des chaînes légères d'immunoglobulines (Ig) Kappa ou Lambda.
- La présence de marqueurs immunophénotypiques caractéristiques de LLC en cytométrie.

C. Bilan biologique

a) Hémogramme et frottis sanguin

L'hémogramme montre une hyperlymphocytose supérieure à $5 \times 10^9/L$. L'examen cytologique des cellules de LLC présente certaines caractéristiques : dans sa forme « typique », il s'agit de lymphocytes de petite taille, d'allure monomorphe, au noyau régulier, à la chromatine dense et mottée et au rapport nucléocytoplasmique proche de 1. On peut retrouver également sur le frottis sanguin la présence « d'ombres de Gumprecht » ou cellules altérées et réduites à l'état de noyaux nus, témoins de l'hyperleucocytose et de la fragilité cellulaire.

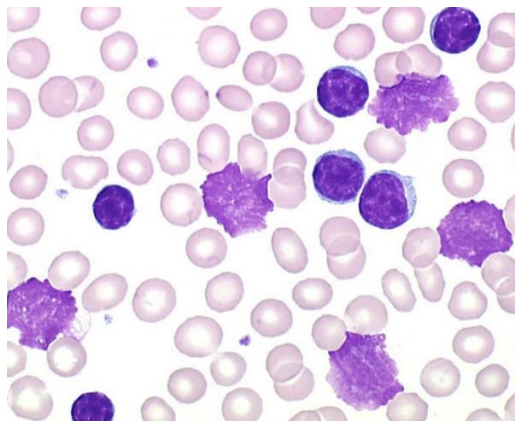


Figure 4 : Frottis sanguin avec cellules de LLC et ombres de Gumprecht.

Cellules de LLC : petits lymphocytes matures, à la chromatine dense et mottée et au cytoplasme réduit, avec des Ombres de Gumprecht : cellules de LLC éclatées lors de la réalisation du frottis leurs donnant un aspect de noyaux nus.

À côté de la forme typique de LLC, il existe des variants pouvant être observés dans environ 20% des cas : avec petits et grands lymphocytes, de morphologie atypique ou avec composante prolymphocytaire (19).

b) Immunophénotypage lymphocytaire

L'immunophénotypage des lymphocytes par cytométrie en flux est impératif pour établir le diagnostic de LLC, il permet d'objectiver la clonalité lymphocytaire et d'établir un profil immunophénotypique caractéristique de ces cellules leucémiques.

Une restriction isotypique dans l'expression des chaînes légères d'immunoglobulines (Ig) Kappa ou Lambda constitue en effet un marqueur indirect de clonalité.

Les cellules de LLC, issues de la lignée lymphocytaire B, ont un profil immunophénotypique particulier : elles expriment les marqueurs CD19, CD5, CD23 et présentent une expression diminuée pour le CD22, le CD79b et des chaînes légères Kappa ou Lambda. Le FMC7 est habituellement non exprimé.

Le score de Matutes, outil simple d'orientation dans le diagnostic de la LLC, attribue des points selon le profil d'expression des marqueurs suivant :

Tableau 1 : Score du Royal Marsden Hospital (Matutes et Moreau) selon l'expression de différents marqueurs par la population lymphoïde anormale.

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

Si un score de Matutes de 4 ou 5 est fortement en faveur d'une LLC, un score entre 0 et 2 permet d'éliminer une LLC.

Un score calculé à 3 nécessite d'autres explorations : en effet, 5% des LLC ont un score de Matutes inférieur à 4, il convient d'utiliser dans ces cas particuliers des marqueurs complémentaires afin de conforter le diagnostic tels que le CD20, le CD43, le CD81, le CD200, le CD10 ou ROR1 (20).

c) Examens biochimiques

Ces examens complémentaires permettent de rechercher des signes de stade avancé de LLC et doivent être réalisés au diagnostic :

- Electrophorèse des protéines sériques : 10% des patients au diagnostic présentent une hypogammaglobulinémie ou un pic d'Ig monoclonale
- Test direct à l'antiglobuline ainsi que le reste du bilan d'hémolyse.
- Dosage de β 2-microglobuline et LDH : augmentés dans les fortes masses tumorales
- Créatinine, bilan hépatique

D'autres examens sont réalisés au diagnostic en cas de score de Matutes égale à 3 (caryotype, FISH et/ou recherche de cycline D1) et peuvent jouer un rôle dans le pronostic et la prise en charge thérapeutique de la LLC ; ils seront détaillés plus tard.

D. Place de l'imagerie

Le rôle de l'imagerie dans la prise en charge de la LLC reste à définir, si la tomographie par émission de positons (TEP) est recommandée en cas de suspicion de transformation en syndrome de Richter (complication en lymphome de haut grade dans un contexte de LLC) (21), les autres examens radiologiques ne sont actuellement pas recommandés. La tomodensitométrie (TDM) ou scannographie, n'est généralement pas réalisée au diagnostic ou en suivi de la LLC (22).

6. Diagnostic différentiel

A. Formes frontières de la LLC

Il faut évoquer une forme frontière de la LLC lorsque les aspects cytologiques et immunophénotypiques sont compatibles avec des cellules de LLC, mais avec un nombre de lymphocytes B monoclonaux inférieur à $5 \times 10^9/L$.

On distingue deux entités selon la présence ou non de signes tumoraux :

- Le Lymphome Lymphocytaire (LL) avec phase leucémique et syndrome tumoral associé, sans cytopénie par envahissement médullaire.
- La Lymphocytose B monoclonale (MBL) : nouvelle entité de la classification OMS de 2016, est définie quant à elle par la présence de lymphocytes monoclonaux sans syndrome tumoral, manifestations auto-immunes ou autres cytopénies.

On définit les « *High count MBL* » (HcMBL) lorsque les cellules de LLC sont comprises entre 0.5 et $5 \times 10^9/L$, et les « *Low count MBL* » (LcMBL) lorsque qu'elles sont inférieures à $0.5 \times 10^9/L$.

On considère que toutes les LLC sont précédées d'une MBL, mais toutes les MBL n'évoluent pas en LLC. Ainsi, les HcMBL ont un risque d'évolution en LLC d'environ 1 à 2% par an et nécessitent donc une surveillance accrue (23).

B. Autres syndromes lymphoprolifératifs B

Si la présentation clinique des différents syndromes lymphoprolifératifs B (SLP-B) est très hétérogène et peu discriminante, l'examen microscopique du frottis et l'immunophénotypage lymphocytaire sont généralement suffisants dans le diagnostic différentiel de la LLC.

Dans les LLC atypiques avec score de Matutes à 3, des examens complémentaires peuvent néanmoins être recommandés pour préciser le diagnostic. La figure 3 présente la démarche diagnostique en cytométrie en flux pour le diagnostic différentiel des principaux SLP-B avec dissémination sanguine.

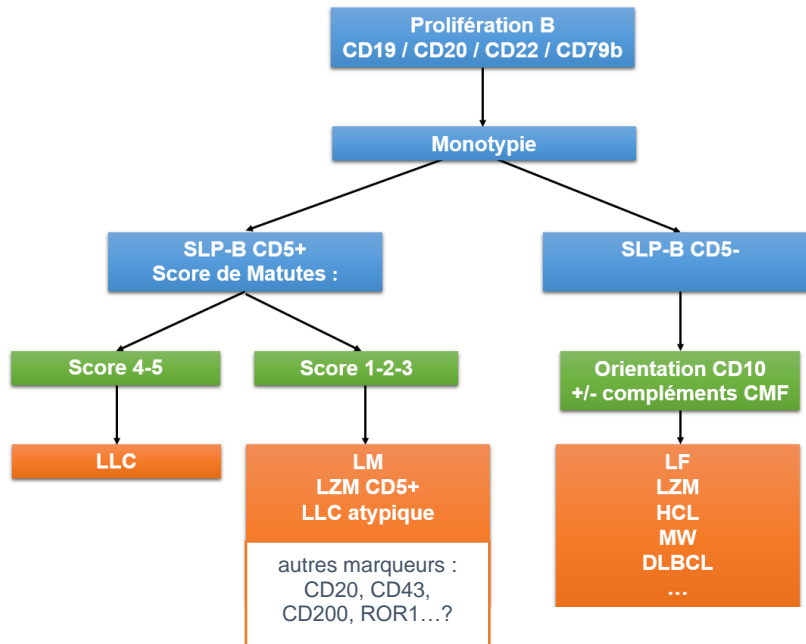


Figure 5 : Démarche diagnostique en cytométrie en flux des principaux syndromes lymphoprolifératifs B, Debord et al (24).

SLP-B = Syndrome lymphoprolifératif B / LLC = Leucémie lymphoïde chronique / LM = Lymphome du manteau / LZM = Lymphome de la zone marginale / HCL= Leucémie à tricholeucocytes / LF = Lymphome folliculaire / DLBCL = Lymphome diffus à grandes cellules / MW = Maladie de Waldenström.

À côté des techniques de cytométrie en flux, le diagnostic peut être affiné par l'apport de données cliniques, cytogénétiques, moléculaires et anatomopathologiques.

7. Facteurs pronostiques au diagnostic

A. Scores pronostiques cliniques

Deux scores cliniques coexistent dans la stratification du risque chez le patient atteint de LLC : la classification de Rai et celle de Binet. Ces deux scores reposent à la fois sur des critères cliniques simples à évaluer et sur des examens biologiques de routine. Ils permettent une évaluation rapide du pronostic du patient (1).

La classification de Rai, développée au États-Unis, se base sur le principe d'accumulation progressive de cellules néoplasiques, avec initialement une lymphocytose suivie par l'apparition d'adénopathies, d'une hépato-splénomégalie, et pour finir par une infiltration médullaire entraînant une anémie et une thrombopénie.

La classification selon Binet, développée en France, est basée sur l'implication ou non de cinq sites lymphoïdes potentiels, facilement accessibles à la palpation lors de l'examen clinique, incluant les régions cervicales, axillaires, inguinales, splénique et hépatique (stade Binet A si < 3 sites, et stade B \geq 3 sites) ainsi que la présence d'une anémie ou d'une thrombopénie (stade Binet C quels que soient les sites atteints). La survie médiane des patients en stade A est similaire à celle de la population générale.

Tableau 2 : Les différents stades clinique de la LLC selon Rai et Binet et leur médiane de survie associée.

Stades selon Rai	Stades selon Rai modifiés		Survie médiane
0	Bas risque	Lymphocytose (sang ou moelle) seule	150 mois
1	Risque intermédiaire	Lymphocytose et adénopathie	101 mois
2		Lymphocytose et splénomégalie et/ou hépatomégalie	71 mois
3	Haut risque	Lymphocytose et anémie (hémoglobine < 110 g/l)	19 mois
4		Lymphocytose et thrombopénie (plaquettes < 100 G/l)	19 mois
Stades selon Binet			
A	Bas risque	Adénopathies (< 3 aires ganglionnaires)	Comme population générale
B	Risque intermédiaire	Adénopathies (\geq 3 aires ganglionnaires)	84 mois
C	Haut risque	Hémoglobine < 100 g/l ou plaquettes < 100 G/l	24 mois

Avec l'arrivée de nouveaux biomarqueurs, cette division en 3 groupes pronostiques s'est avérée insuffisante. Les nouvelles thérapeutiques dans la LLC requièrent aujourd'hui une meilleure stratification du pronostic afin d'optimiser la prise en charge des patients (25).

B. Marqueurs sériques

L'augmentation de la bêta-2 microglobuline (un des composants du complexe HLA de classe I sur les cellules nucléées) et de la thymidine kinase (protéine intracytoplasmique impliquée dans la synthèse d'ADN) sont les deux paramètres sériques les plus robustes, prédictifs des formes agressives, et associés à une survie globale diminuée. Ils gardent encore aujourd'hui leur intérêt dans l'évaluation du pronostic du patient (27).

C. Cytogénétique

La recherche d'anomalies cytogénétiques peut être réalisée dans le sang. Certaines anomalies sont retrouvées dans environ 80% des cas au diagnostic : il s'agit de la délétion d'une partie du chromosome avec la del(13q), del(11q), del(17p) et la trisomie 12. Ces anomalies auront un impact dans le pronostic de la maladie (28) :

- La del(13q) est l'anomalie chromosomique la plus fréquente (>50% des patients) et est associée à un pronostic favorable.
- La del(17p) est retrouvée chez 7% des patients, associée à la perte du gène suppresseur de tumeur *TP53*, elle est de pronostic défavorable.
- La del(11q) est retrouvée chez 18% des patients, souvent associée à une altération du gène *ATM*, son pronostic est généralement défavorable (29).
- La trisomie 12 est retrouvée chez 16% des patients et est associée à un pronostic intermédiaire.

Enfin, un caryotype complexe est également un marqueur de mauvais pronostic.

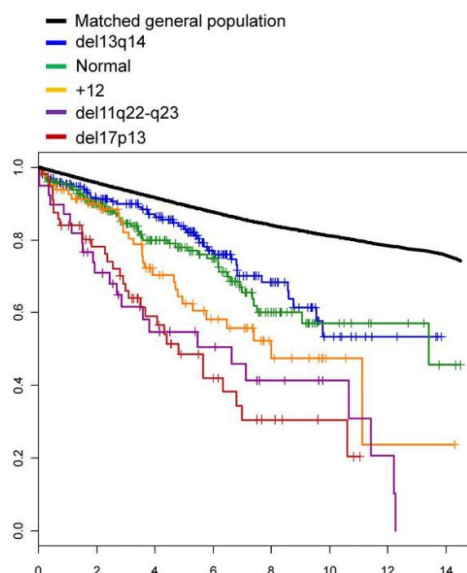


Figure 6 : Survie globale chez des patients atteints de LLC, selon les anomalies cytogénétiques au diagnostic, Rossi et al (30).

En abscisse le nombre d'années suivant le diagnostic, en ordonnée, le pourcentage de patients ayant survécu. La délétion 13q14 est associée à un pronostic plutôt favorable tandis que les délétions 11q22-q23 et 17p13 sont associées à un pronostic défavorable.

D. Biologie moléculaire

Dès la fin des années 90, plusieurs études ont rapporté que les patients présentant des degrés élevés de mutations somatiques des gènes codant pour la partie variable de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (*IGHV*), avaient une survie globale augmentée, en comparaison avec des patients au statut *IGHV* non muté (31).

Le statut *IGHV* muté est défini comme une différence de plus de 2 % par rapport à la séquence nucléotidique germinale (par technique Sanger ou NGS), il est aujourd'hui un marqueur pronostique indépendant de la survie globale du patient (28).

La détection d'une mutation du gène *TP53*, par séquençage Sanger, a également été associée à un pronostic plus péjoratif et à une résistance aux traitements par immunochimiothérapie (32). Si la mutation *TP53* est généralement associée à la *del(17p)*, environ 3% des patients sans *del(17p)* en FISH présentent une mutation de *TP53* et ont un pronostic similaire, défavorable (33). Par ailleurs, des mutations sous clonales (<10%) non détectées par technique Sanger peuvent être mise en évidence dans environ 15% des cas par technique de séquençage haut débit (NGS). Ces mutations sous clonales présentent le même impact prédictif qu'une mutation clonale. Il convient donc de toujours rechercher la mutation *TP53* par NGS, quel que soit le profil cytogénétique du patient.

Enfin, les séquenceurs à haut débit de nouvelle génération ont permis, comme détaillé précédemment, une meilleure compréhension de la leucémogénèse dans la LLC. Et certaines mutations sont considérées comme des marqueurs pronostiques importants, on peut citer :

- *NOTCH1*, présente dans 4 à 20% des LLC au diagnostic, principalement chez les patients au statut *IGHV* non muté et dans la trisomie 12, est associée à une

survie globale inférieure, indépendamment des autres marqueurs pronostiques (34).

- *SF3B1*, présente jusqu'à 21% des LLC au diagnostic, principalement chez les patients avec une *del(13q14)* est également associée à une diminution de la survie globale, indépendamment des autres marqueurs pronostiques (35).

E. Marqueurs en cytométrie en flux

Certains marqueurs exprimés par les cellules de LLC en cytométrie en flux sont associés à un mauvais pronostic et à une survie globale moindre :

- *ZAP-70* (*zêta associated protein 70*) est une protéine intra-cytoplasmique de 70 kDa, exprimée par les lymphocytes T et NK. Elle favorise les réactions de phosphorylation impliquées dans les voies de signalisation. On retrouve l'expression de *ZAP-70* dans 40 à 50 % des LLC et elle serait prédictive d'une évolution vers des formes plus agressives, comme ce qui a été mentionné pour les LLC *IGVH* non mutées, en raison notamment de l'augmentation de la réactivité du BCR (36). La mauvaise reproductibilité inter-laboratoires de ce marqueur a limité son utilisation en routine.
- *CD 38* est une glycoprotéine exprimée à certaines étapes de la maturation des cellules B. C'est également un marqueur de mauvais pronostic lorsqu'il est exprimé par les cellules de LLC (37).

Isolément, ces deux marqueurs sont néanmoins insuffisants pour établir un pronostic individuel chez le patient.

Enfin, plus récemment, l'expression de *CD49d*, une sous unité d'alpha-intégrine, ayant un rôle dans l'interaction entre la cellule B et son microenvironnement, a été décrite comme étant le marqueur en cytométrie le plus prédictif de la survie globale du patient, indépendamment du statut *IGVH* et des anomalies retrouvées en FISH (35).

F. CLL International Prognostic Index (CLL-IPI)

La découverte de nouveaux marqueurs biologiques associés au pronostic des patients a fortement augmenté ces dernières années. Cependant, le faible nombre de modèles proposés montrant une utilisation combinée de ces marqueurs a retardé leur application en pratique générale. L'index pronostic international de la LLC (CLL-IPI) a ainsi vu le jour suite à un travail d'analyse de données issues d'essais cliniques randomisés européens et américains, regroupant des paramètres cliniques, biologiques et génétiques largement disponibles en routine (39).

Le CLL-IPI repose sur 5 paramètres principaux : l'âge du patient, le stade clinique selon Rai ou Binet, le statut de la mutation *TP53* (seul ou associé à une del 17p), le statut mutationnel *IGVH* et le taux de β_2 -microglobuline sérique. Il permet d'identifier 4 sous-groupes de patients selon leur pronostic.

Développé initialement pour prédire la survie globale des patients mais utilisé principalement pour prédire le délai avant d'initier un traitement, il n'a cependant pas été étudié chez les patients bénéficiant des nouvelles thérapies ciblées et la valeur pronostique de ces différents marqueurs est ainsi amenée à évoluer avec l'émergence des nouvelles thérapies dans la LLC (40).

Tableau 3 : *Index pronostic international de la LLC (CLL-IPI)*

Facteurs pronostics	Points
Del 17p (FISH) / mutation <i>TP53</i>	4
Statut <i>IGVH</i> non muté	2
β_2 -microglobuline sérique > 3.5 mg/L	2
Binet stade B-C / Rai > 0	1
Âge > 65 ans	1

Score CLL-IPI cumulatif	Risques	SST à 5 ans
0-1	Faible	78%
2-3	Intermédiaire	54%
4-6	Elevé	32%
7-10	Très élevé	0%

SST à 5 ans : Pourcentage de patients ayant survécu sans traitement à 5 ans.

8. Bases thérapeutiques

A. Molécules

a) Chimiothérapies

Pendant des décennies, les seuls traitements disponibles ayant un effet sur la LLC étaient les agents alkylants (Chlorambucil, Bendamustine, Cyclophosphamide). Le Chlorambucil en monothérapie, de par sa faible toxicité, était le traitement le plus fréquemment utilisé et permettait un meilleur contrôle des symptômes de la LLC, sans toutefois augmenter de manière significative la survie globale des patients (41).

La Fludarabine, un analogue de la purine permettant d'inhiber l'ADN polymérase, a permis d'augmenter les taux de rémissions cliniques par rapport aux agents alkylants, sans améliorer la survie globale des patients. L'association de la Fludarabine avec le Cyclophosphamide, tout en étant bien toléré, a en revanche permis d'améliorer la survie sans progression des patients (42). Cette association est restée jusqu'à l'arrivée des anticorps monoclonaux le traitement de choix de 1^{ère} ligne dans la prise en charge de la LLC chez le patient jeune.

b) Ac monoclonaux

1. Anti-CD20

Le CD20 est un antigène exprimé à la surface des lymphocytes B, de leur stade pré-B jusqu'à leur stade mature.

Les anticorps monoclonaux anti-CD20 ont une activité anti-lymphocytaire B qui s'effectue via trois mécanismes principaux (43) :

- L'induction directe de l'apoptose, ou *programmed cell death* (PCD) par la voie mitochondriale, avec l'activation de la Caspase 3.

- La cytotoxicité dépendante du complément (CDC) par activation de la voie du complément, responsable des effets indésirables précoces dus à la libération de cytokines lors de la lyse des cellules lymphomateuses.
- La cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant (ADCC) : la liaison de la portion Fc de l'anticorps (anti-CD20) au récepteur Fc γ R exprimé à la surface des cellules immunitaires cytotoxiques, telles que les cellules NK, les monocytes/macrophages et les granulocytes, va entraîner leur activation et une lyse lymphocytaire B.

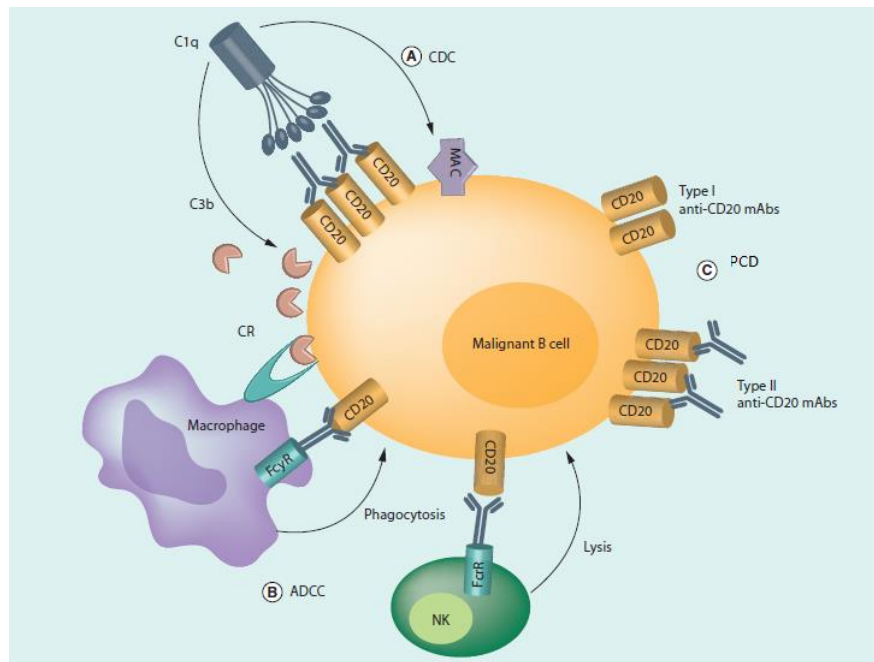


Figure 7 : Mécanismes d'action des anticorps monoclonaux anti-CD20, Bagacean et al. (44).

(A) Cytotoxicité dépendante du complément (CDC) : le C1q se fixe sur la portion Fc des deux molécules d'IgG de l'anti-CD20, entraînant une cascade d'activation protéolytique, avec la génération du complexe d'attaque membranaire (MAC) menant à la mort cellulaire. **(B)** Cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant (ADCC) : L'activation de la cascade du complément génère de grandes quantités de molécules C3b qui se lient au récepteur 1 du complément (CR1) exprimé sur les macrophages et induisent la phagocytose. Les anticorps monoclonaux vont également se fixer aux Fc γ RII/III des macrophages et cellules NK, induisant leur recrutement, la phagocytose et un relargage de granulations cytotoxiques responsables de la lyse cellulaire. **(C)** Induction directe de l'apoptose (PCD) par activation de la voie caspase-dépendante par les anti-CD20 de type 1.

Les anticorps anti-CD20 sont répartis en deux groupes en fonction de leur mécanisme d'action : le Rituximab et l'Ofatumumab sont des anti-CD20 de type I avec une action principalement liée à la CDC et à l'ADCC tandis que l'Obinutuzumab est un anti-CD20 de type II avec une activité de type ADCC et PDC sans action de type CDC (45).

Rarement utilisés en monothérapie, les anti-CD20 sont aujourd'hui très largement utilisés dans des protocoles d'immunochimiothérapie (ICT) dans le traitement de la LLC. Le Rituximab, associé à la Fludarabine et au Cyclophosphamide (FCR) est le gold-standard dans le traitement de 1^{ère} ligne chez les patients de moins de 65 ans atteints de LLC, sans mutation *TP53* (46). Ce protocole est limité principalement par les effets secondaires de la Fludarabine : neutropénie, leucémie aigüe myéloïde secondaire ou syndrome myélodysplasique notamment.

L'association Rituximab et Bendamustine (BR) de par sa moindre toxicité et son efficacité comparable au FCR est quant à elle largement utilisée chez les patients de plus de 65 ans (47).

Enfin, l'association Obinutuzumab et Chlorambucil est aujourd'hui un des traitements de 1^{ère} ligne pour les patients dit « *unfit* » (48).

L'immunochimiothérapie est en revanche contre indiquée chez les patients présentant des aberrations génétiques à haut risque comme la del(17p) ou la mutation *TP53*. En effet, la fréquence des mutations de *TP53* augmente sous protocole d'immunochimiothérapie : ces traitements comprennent des médicaments qui induisent des dommages de l'ADN susceptibles d'entraîner des résistances à l'immunochimiothérapie (14).

2. Anti-CD52 (Alemtuzumab)

L'Alemtuzumab est un anticorps humanisé dirigé contre le CD52, qui est exprimé par les lymphocytes B et T, malins ou non. Le mécanisme d'action est lié à l'ADCC et au CDC. Il est principalement utilisé chez les patients à haut risque moléculaire (mutation *TP53*) et était le traitement de choix jusqu'à l'arrivée des nouvelles thérapies ciblées chez les patients en rechute ou réfractaires aux traitements de 1^{ère} ligne (49). L'immunodéplétion qu'il induit a réduit son champ d'utilisation.

3. Autres anticorps monoclonaux

L'immuno-oncologie s'est considérablement développée ces dernières années parallèlement à l'amélioration des connaissances des mécanismes d'échappement immunitaire des cellules tumorales. L'utilisation des anticorps monoclonaux est en pleine expansion et dépasse largement le domaine de l'onco-hématologie.

À côté des anticorps cytolytiques précédemment décrits, d'autres classes d'Ac monoclonaux sont en développement avec des mécanismes d'action variables : Ac antagonistes (exemple des Check-point inhibiteurs anti-PD-1, anti-PDL-1), Ac conjugués ou Ac bispécifiques (50).

Les « *immunes-checkpoints* » sont des molécules exprimées au niveau de la cellule tumorale ou de son microenvironnement tumoral, et participent à l'échappement immunitaire de la tumeur. L'interaction entre le récepteur PD-1, présent sur les lymphocytes B et T, et son ligand PD-L1 exprimé par les cellules tumorales et les cellules présentatrices d'antigène (cellules immunitaires du microenvironnement tumoral), entraîne une inhibition des lymphocytes T effecteurs, favorisant l'échappement immunitaire tumoral.

Ces mécanismes à l'origine de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales sont encore imparfaitement connus, mais plusieurs altérations moléculaires sont mises en

cause (51). Des inhibiteurs de PD1/PD-L1 (Nivolumab, Atezolizumab...) ont ainsi vu le jour et sont actuellement utilisés comme nouvelles cibles potentielles en oncologie (52).

Concernant la LLC, l'expression de PD-L1 a été observée essentiellement par des cellules situées dans les centres de prolifération comme les pro-lymphocytes ou les para-immunoblastes, en revanche elle n'a pas été rapportée dans les cellules tissulaires de LLC (53). La place des inhibiteurs de PD-1 et PD-L1 reste donc anecdotique dans la LLC à l'heure actuelle mais leur potentiel à restaurer une immunité T anti-tumorale pourrait être intéressant (54,55).

D'autres anticorps comme le cirmtuzumab (anti-ROR1), ou le blinatumomab, anticorps bi-spécifiques antiCD3-antiCD19 sont en cours d'étude dans la LLC ou le syndrome de Richter (56–58).

ROR1 est un récepteur membranaire fortement exprimé par les cellules de LLC. Son interaction avec le ligand WNT5A augmente la prolifération cellulaire. Le cirmutuzumab a été évalué dans des LLC en rechute seul ou en association avec l'ibrutinib. Un essai est actuellement en cours (56).

Les anticorps bi-spécifiques (CD3-CD19) permettent de rapprocher les lymphocytes B et T. Ils induisent une cytotoxicité auprès des lymphocytes B leucémiques et une expansion lymphocytaire T par levée d'inhibition induite par la LLC. Des essais thérapeutiques sont actuellement en cours, notamment dans le syndrome de Richter (57).

Actuellement la place de ces nouvelles thérapeutiques dans la LLC n'a pas été établie, mais elles pourraient constituer à l'avenir de nouvelles options thérapeutiques en cas d'échec des traitements de première et deuxième ligne.

c) Inhibiteurs du BCR

Comme dit précédemment, l'activation chronique du BCR joue un rôle primordial dans la prolifération et la survie cellulaire dans la LLC. Cette activation de la voie de signalisation du BCR peut se faire via de nombreuses tyrosine kinases : la Bruton Tyrosine Kinase (BTK), la spleen tyrosine kinase (syk), ZAP70, PI3K ou les kinases de la famille Src. Ces kinases associées au BCR (BAKs) sont des cibles thérapeutiques potentielles, et les inhibiteurs de BTK ou de PI3K delta ont révolutionné la prise en charge thérapeutique des pathologies lymphoprolifératives B (59). De plus, la cible de ces BAKs dans des modèles murins suggère l'importance des BAKs dans le dialogue entre la cellule de LLC et son microenvironnement : les inhibiteurs de BAK, en plus de contrôler la prolifération et la survie cellulaire, pourraient donc avoir un rôle dans la régulation du microenvironnement tumoral (60).

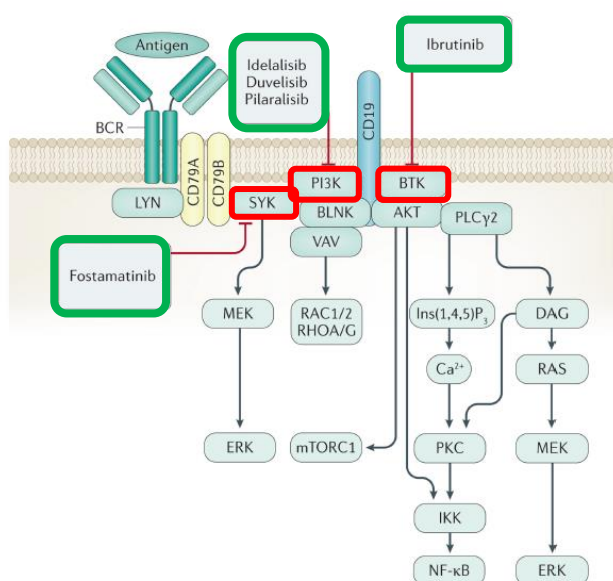


Figure 8 : Principales voies de signalisation associées au BCR, Kipps et al. (4).

L'activation de la tyrosine kinase SYK va entraîner une cascade de phosphorylation appelée « signalosome ». Le « signalosome » inclut de nombreuses voies de signalisation, dont le BTK, la PI3K, AKT, PLCγ2, BLNK, et aboutit à l'activation de différentes voies moléculaires, comme le facteur nucléaire NF-κB, le complexe 1 de la rapamycine (mTORC1) ainsi que des voies de signalisation associées à la matrice extracellulaire (ERK). Ces voies de signalisation sont autant de cibles thérapeutiques dans la prise en charge de la LLC avec notamment l'ibrutinib comme inhibiteur de BTK et l'idelalisib comme inhibiteur de PI3Kδ. Les principales cibles thérapeutiques de la voie du BCR sont encadrées en rouge, et leurs molécules correspondantes en vert.

1. Inhibiteurs de BTK

Un des principaux mécanismes impliqués dans la progression des cellules B normales en cellules tumorales concerne la voie d'activation du BCR par la protéine BTK. L'activation oncogénique de NF- κ B ainsi que d'autres signaux impliqués dans la survie cellulaire peuvent notamment entraîner une protéine BTK significativement plus active dans les cellules de LLC que dans les cellules B normales (61).

Les inhibiteurs de la voie du BTK ont prouvé leur efficacité dans des études pré-cliniques et cliniques, notamment chez les patients réfractaires ou en rechute aux protocoles d'immunochimiothérapie et chez les patients avec facteur pronostic péjoratif : délétion 17p, mutation *TP53*, statut *IGVH* non muté (62).

L'Ibrutinib est un inhibiteur sélectif et irréversible de BTK, le premier à avoir été autorisé sur le marché dans la prise en charge de la LLC. En plus d'inhiber la voie de signalisation du BCR, il induit une diminution de l'expression de CXCR4 par les lymphocytes B. L'administration d'Ibrutinib induit une diminution de la prolifération et de l'adhérence des cellules de LLC et limite les effets protecteurs du microenvironnement vis-à-vis des cellules tumorales, entraînant ainsi une redistribution sanguine des cellules leucémiques et une diminution rapide des adénopathies (63).

L'Ibrutinib a changé le pronostic des patients avec lésions génétiques associées à la résistance à la chimiothérapie (mutation *TP53* notamment) et plusieurs études ont également montré la supériorité de l'Ibrutinib sur l'immunochimiothérapie en 1^{ère} ligne thérapeutique (64,65). Sa place dans la prise en charge thérapeutique de la LLC, en monothérapie ou en association ne cesse d'augmenter et est amenée à évoluer dans les prochaines années.

Deux mutations principales ont été rapportées en cas de résistance à l'ibrutinib : la mutation *BTK*^{C481S}, la plus fréquente, et la mutation *PLCG2* (Cγ2). Elles permettent une activation du BCR indépendamment du BTK (66).

Les inhibiteurs de BTK de deuxième génération, Acalabrutinib et Zanubrutinib, ont une meilleure affinité envers la protéine BTK, diminuant significativement la toxicité du traitement, mais gardent le même mécanisme d'action et ne peuvent donc pas être utilisés en cas de résistance à l'ibrutinib (67). Leur utilisation dans la pratique courante reste à préciser. Des inhibiteurs non covalents de BTK sont en cours de développement, ils présentent des résultats encourageants chez les patients résistants à l'ibrutinib (68).

2. Inhibiteurs de PI3K

Les PI3K sont des enzymes impliquées dans de nombreux processus intracellulaires dont la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. L'une d'entre elles, la PI3Kδ joue un rôle majeur dans la voie de signalisation du BCR (69).

L'Idelalisib est un inhibiteur de la forme delta de PI3K. Son utilisation en association avec le Rituximab est approuvée après l'échec d'un traitement de 1^{ère} ligne ou en 1^{ère} ligne chez des patients avec une mutation de *TP53* sans autres alternatives thérapeutiques. Ses effets secondaires potentiellement graves, hépatiques et infectieux, ont conduit à limiter son utilisation.

Le Duvelisib est un autre inhibiteur de PI3Kδ, mais également de PI3Kγ. L'apport thérapeutique de l'inhibition de la sous-unité gamma de PI3K reste inconnu à ce jour.

Le Duvelisib est utilisé dans les formes réfractaires ou en rechutes chez les patients ayant déjà reçu au moins deux lignes de traitements.

d) Inhibiteurs de la voie du BCL-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs impliqués dans le processus de prévention de l'apoptose : ces voies de survie cellulaire jouent ainsi un rôle important dans l'oncogénèse et la chimiorésistance. Le blocage de la fonction protéique Bcl-2 conduit à l'apoptose des cellules de LLC et constitue donc une option thérapeutique.

Le Navitoclax, un inhibiteur sélectif de Bcl-2 et Bcl-2 like (Bcl-XL) ayant démontré une efficacité clinique dans certains cancers hématologiques, a été la première thérapie ciblée à exploiter ce potentiel thérapeutique en inhibant de manière directe cette voie impliquée dans la survie cellulaire. Cependant la thrombopénie concomitante causée par l'inhibition de BCL-XL a limité son utilisation (70).

Le Vénétoclax, inhibiteur sélectif de Bcl-2, de par sa moindre toxicité et la réponse durable qu'il induit, est aujourd'hui un des traitements de choix dans la prise en charge thérapeutique de la LLC en rechute, y compris chez les patients présentant des facteurs de mauvais pronostic de type del17p et/ou mutation *TP53* (71). Des mutations (*G101V*, *D103Y*) peuvent être observées chez des patients en rechute sous Vénétoclax, elles entraînent une diminution de la fixation des inhibiteurs de Bcl-2.

e) CAR-T cells

Les cellules CAR-T sont des cellules T d'un patient, modifiées par génie génétique : une spécificité tumorale est imposée à la cellule CAR-T par introduction d'un gène synthétique, codant pour un récepteur du domaine de liaison à l'antigène cible (ex : le CD19 dans les hémopathies B) fusionné au domaine d'activation de la cellule T. Cette modification permet de reprogrammer des cellules T pour cibler l'antigène sélectionné situé à la surface des cellules tumorales (72).

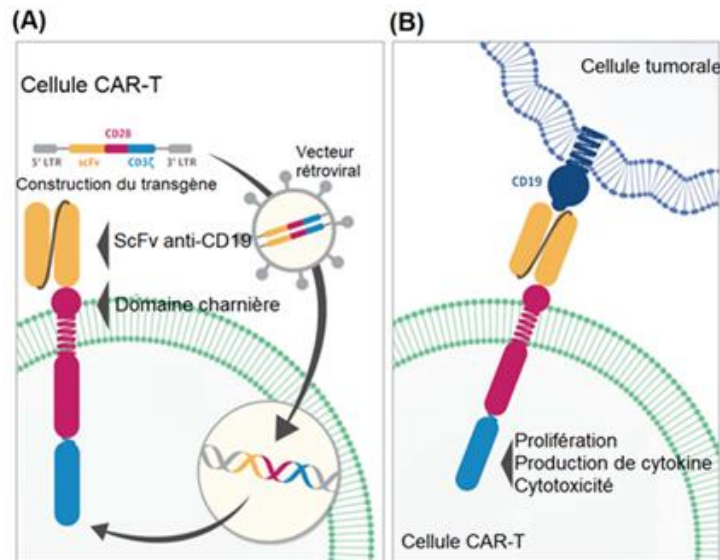


Figure 9 : Principe et structure d'un récepteur antigénique chimérique, Locke et al (73).

(A) : Structure d'un récepteur antigénique chimérique (CAR) avec transgène codant pour un récepteur du domaine de liaison à l'antigène CD19. **(B)** : Reconnaissance et activation de la cellule CAR-T par la cellule tumorale.

L'application des CAR-T cells dans la LLC est pour l'instant limitée aux essais cliniques chez des patients avec facteurs de mauvais pronostic en rechute ou réfractaires aux traitements (74,75). Les résultats des premiers essais cliniques ont démontré des rémissions complètes chez environ 29% des patients, des chiffres moindres que ceux observés dans la leucémie aiguë lymphoblastique B (LAL-B) et les DLBCL, probablement expliqués par le microenvironnement tumoral et une plus grande masse tumorale (76).

Une autre explication à cette moindre sensibilité serait l'immunosubversion induite par le clone tumoral de LLC. En effet, les lymphocytes T de LLC ont des capacités d'expansion et de cytotoxicité moindre, ce qui limite l'activation des CAR-T cells après transduction (77). Le développement de CAR-T cells allogéniques issus de donneurs sains pourrait être bénéfique dans ce contexte (75). Une association avec l'ibrutinib pourrait également être intéressante.

Grâce à son impact sur le système immunitaire, et notamment en orientant les lymphocytes T autologues vers un profil de sécrétion cytokinique de type Th2, l'ibrutinib pourrait favoriser l'expansion et la cytotoxicité des CAR-T cells (78,79).

Les études utilisant les CAR-T cells dans la LLC ont été réalisées sur un faible nombre de patients et ne permettent pas encore d'évaluer parfaitement l'impact des aberrations génétiques individuelles dans la réponse aux CAR-T cells. Mais les patients avec mutation de *TP53* seraient de moins bons répondeurs aux CAR-T cells (74).

Enfin, la place des CAR-T cells dans la prise en charge de la LLC reste encore à évaluer. Chez les patients en rechute ou réfractaires après inhibiteurs du BCR et inhibiteurs de BCL2 ou chez les patients présentant un syndrome de Richter, elles pourraient constituer une alternative à l'allogreffe de CSH ou être utilisées en complément (75).

B. Stratégies thérapeutiques

a) Paramètres à considérer

Dans la pratique générale, les patients de pronostic favorable (Binet A, Rai 0) sans signe de progression de la maladie, justifient un simple suivi régulier. En effet, en terme de survie, l'instauration d'un traitement précoce n'a jamais montré de bénéfice chez ces patients (80).

Il est actuellement recommandé d'initier un traitement en cas de phase active de la maladie, c'est-à-dire en présence de symptômes ou de signes de progression de la LLC.

Au moins un des critères suivants doit être présent : (1)

- Mise en évidence d'un envahissement médullaire : aggravation d'une anémie et/ou d'une thrombopénie. Outre le seuil (taux d'hémoglobine inférieur à 10 g/dL et/ou plaquettes inférieur à $100 \times 10^9/L$) c'est surtout la cinétique de progression des cytopénies qui doit être retenue comme critère d'initiation d'un traitement.
- Présence d'une splénomégalie importante (rate palpable à plus de 6cm sous le rebord costal), symptomatique ou d'évolution rapide.
- Présence d'adénopathies de grande taille (>10cm de diamètre), symptomatiques ou progressives.
- Un temps de doublement lymphocytaire < 6 mois (extrapolable d'une période d'observation plus courte de 2-3 mois) ou une augmentation de plus de 50% de l'hyperlymphocytose sur une période de 2 mois.
- Complications auto-immunes : anémie hémolytique et purpura thrombopénique immunologique.
- Toute autre atteinte extranodale symptomatique ou fonctionnelle (cutanée, rénale, pulmonaire, médullaire)
- Présence de symptômes généraux en lien avec la maladie :
 - Perte de plus de 10% du poids en moins de 6 mois
 - Augmentation significative de la fatigue sans autres causes (échelle de performance ECOG >1)
 - Fièvre >38.0° C pendant plus de 2 semaines sans signes infectieux.
 - Sueurs nocturnes pendant plus d'1 mois sans signes infectieux.

Enfin, bien que l'hyperleucocytose puisse parfois être très importante, le phénomène de leucostase reste très rare et le décompte lymphocytaire en valeur absolue n'est pas un critère d'initiation du traitement.

b) Traitements de première ligne

Avec l'émergence des thérapies ciblées, le groupe de travail français FILO a émis en 2020 des recommandations dans la prise en charge thérapeutique de la LLC (81) (Récemment mise à jour en septembre 2021, figure 10). La prise en charge thérapeutique tient compte de l'éligibilité à un traitement par Fludarabine (définie généralement par l'absence de comorbidités significatives et d'insuffisance rénale : débit de filtration glomérulaire >60mL/min) et de la présence ou non d'une altération de *TP53*.

Chez les patients éligibles à la Fludarabine, le traitement de référence est l'association de 6 cures de FCR (Fludarabine, cyclophosphamide, rituximab) pour les sujets de moins de 65 ans ou 4 cures de FCR puis 2 injections de Rituximab pour les plus de 65 ans. En cas d'anomalies génétiques défavorables, l'Ibrutinib peut être prescrit en première ligne.

Chez les patients non éligibles à la Fludarabine, plusieurs options sont possibles : un protocole classique par ICT avec l'association Bendamustine et Rituximab (BR) ou l'association Chlorambucil Obinutuzumab (G-CLB) ; un protocole sans chimiothérapie « *chemofree* » avec l'Ibrutinib en monothérapie voire l'association Obinutuzumab et Vénétoclax.

En cas de présence d'anomalies génétiques défavorables, il est recommandé de privilégier les protocoles sans chimiothérapie aux protocoles d'ICT.

En cas d'altération de *TP53*, soit environ 10% des patients nécessitant un traitement de première ligne, les protocoles d'ICT sont inefficaces et l'Ibrutinib est indiqué comme traitement de première ligne. On pourra proposer l'Idelalisib associé au Rituximab, le Vénétoclax seul ou l'Acalabrutinib en cas de contre-indication à l'Ibrutinib.

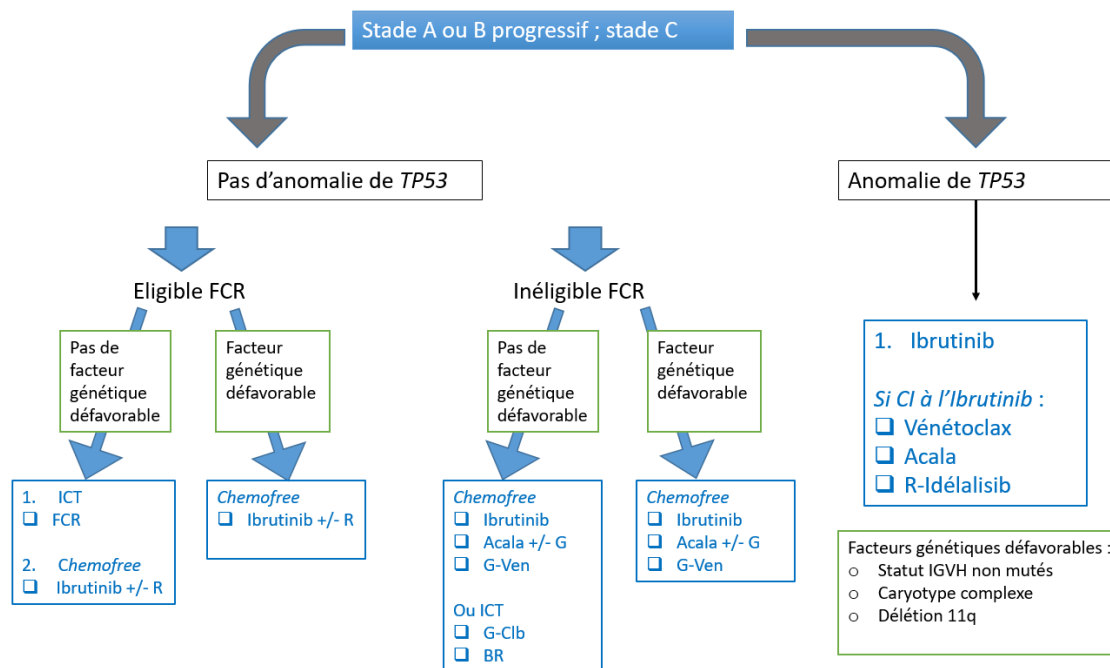


Figure 10 : Recommandations du groupe FILO dans le traitement de 1ère ligne de la LLC, septembre 2021.

FCR = fludarabine + cyclophosphamide + rituximab ; ICT = Immuno-chimiothérapies ; R = rituximab ; BR = bendamustine + rituximab ; Acala = acalabrutinib ; G = obinutuzumab ; Clb = chlorambucil ; Ven = venetoclax ; Chemofree = sans chimiothérapie.

c) Traitements de deuxième ligne

La rechute ne constitue pas à elle seule un critère pour démarrer un traitement de deuxième ligne, les paramètres à considérer sont les mêmes que ceux utilisés pour initier un traitement de première ligne. On distingue principalement trois situations, les rechutes après ICT, les rechutes sous inhibiteur de BTK (iBTK) et les rechutes sous inhibiteur de Bcl-2 (iBCL2) :

- Les rechutes après ICT :

L'étude RESONATE a permis à l'Ibrutinib de constituer le traitement de choix en cas de rechute sous ICT, quel que soit le statut *IGVH* ou *TP53* (82). Plus récemment l'étude MURANO a également montré la supériorité de l'association du Rituximab + Vénétoclax par rapport aux ICT dans le traitement de la rechute (83).

- Les rechutes après iBTK :

Elles peuvent être liées à la progression de la maladie mais également à l'intolérance au traitement. Il conviendra de rechercher des mutations de *BTK* et *PLCG2* susceptibles d'expliquer une résistance à l'Ibrutinib.

Le Vénétoclax, associé ou non au Rituximab, est généralement le traitement de choix après progression sous Ibrutinib (84).

Chez le patient jeune avec altérations de *TP53*, la transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques peut également être proposée (85).

- Les rechutes après iBCL-2 :

En cas de progression sous Vénétoclax, l'Ibrutinib ou l'Idélasilib associé au Rituximab constituent les traitements de choix.

Enfin, en cas d'échec des inhibiteurs de BTK et du Vénétoclax, il n'y a pas de consensus thérapeutique. Différentes options peuvent être évaluées : l'allogreffe de CSH, l'association Idélasilib + Rituximab, une ICT en l'absence d'anomalie *TP53*. Il peut également être proposé aux patients d'être inclus dans des essais cliniques pour bénéficier de nouvelles thérapies innovantes (nouvelles molécules, CAR-T cells, check-point inhibiteur, Ac bispécifiques...).

d) Greffe allogénique

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques constituait initialement une option thérapeutique chez les patients à haut risque définis historiquement par l'absence de réponse ou une rechute précoce inférieure à 12 mois suivant un traitement par chimiothérapie incluant au moins un analogue de la purine. Étaient également considérés à haut risque les patients porteurs d'une mutation *TP53* ou d'une del(17p) (86).

Ces recommandations concernant la place de l'allogreffe dans la LLC datent de 2007 et ne prenaient pas en compte l'arrivée des thérapies ciblées comme l'ibrutinib et le Vénétoclax, qui ont grandement modifié le pronostic des patients à haut risque. Les protocoles de greffe sont aujourd'hui généralement définis au cas par cas, selon le protocole de l'essai clinique. Néanmoins, l'intérêt de l'allogreffe est désormais admis en cas de rechute sous au moins une thérapie ciblée chez les patients à haut risque (87).

L'âge, les comorbidités, l'arrivée de nouvelles approches thérapeutiques dans les essais cliniques, comme les CAR-T cells, ainsi que la place croissante de la mesure de la maladie résiduelle (*Minimal residual disease* ou MRD) sont autant d'éléments à prendre en compte et qui devront être explorés dans de futures études prospectives afin de préciser la place de la greffe allogénique dans la LLC à l'heure actuelle.

9. Évaluation de la réponse au traitement

La réponse au traitement est évaluée principalement selon des critères cliniques (adénopathies, hépato/splénomégalie, symptômes généraux) et biologiques (taux de lymphocytes, teneur en hémoglobine et numération plaquettaire) plus ou moins associés à un myélogramme en cas de cytopénies ou de toute autre suspicion de progression de la maladie (1).

Pour définir la réponse au traitement, les recommandations 2018 de l'iwCLL distinguent deux groupes de paramètres à évaluer. Le groupe A évalue la réponse tumorale et inclut l'évaluation de la masse ganglionnaire, hépatique, splénique ainsi que le taux de lymphocytes circulants et la présence de symptômes généraux. Le groupe B évalue la réponse biologique associée au système hématopoïétique, et comprend le taux plaquettaire, le taux d'hémoglobine et l'étude du myélogramme (recherche d'infiltration lymphocytaire >30%).

L'évaluation de la réponse au traitement doit se faire au moins 2 mois après la réponse maximale au traitement : phase au cours de laquelle aucune amélioration supplémentaire n'est observée pendant plus de 2 mois.

Différents niveaux de réponse ont ainsi été définis par l'iwCLL (tableau 4) : rémission complète (*complete remission* : CR), rémission partielle (*partial remission* : PR), maladie en progression (*progressive disease* : PD). On parle de réponse stable lorsqu'un patient ne répond ni aux critères de rémission partielle ou complète, ni aux critères définissant une progression de la maladie.

Tableau 4 : Définitions des niveaux de réponse au traitement dans la LLC, iwCLL guidelines 2018 (1).

Groupe	Paramètres	CR Rémission complète	PR Rémission partielle	PD Maladie progressive
A	Adénopathies	Aucune > 1,5cm	Diminution >50% (depuis le diagnostic)	Augmentation >50% (depuis le diagnostic)
	Hépatosplénomégalie	Rate < 13cm, foie normal	Diminution >50% (depuis le diagnostic)	Augmentation >50% (depuis le diagnostic)
	Symptômes constitutionnel	Aucun	Présence	Présence
	Taux de lymphocytes circulants	Normal	Diminution >50% (depuis le diagnostic)	Augmentation >50% (depuis le diagnostic)
B	Taux de plaquettes	>100 X 10 ⁹ /L	>100 X 10 ⁹ /L ou ↗ >50% depuis le diag	Diminution >50% du taux de base
	Hémoglobine	>11,0 g/dL	>11,0g/dL ou ↗ >50% depuis le diag	Perte >2g/dL du taux de base
	Moelle osseuse	Normocellulaire, sans cellules de LLC	Présence de cellule de LLC (ou myélogramme non réalisé)	Augmentation >50% de la populations de LLC sur myélogramme successif

De plus, l'évaluation de la maladie résiduelle minimale (*minimal residual disease* : MRD) constitue une catégorie de réponse supplémentaire occupant une place de plus en plus importante pour l'évaluation de la réponse aux thérapeutiques. Quatre niveaux de rémission peuvent ainsi être définis 3 mois après la fin du traitement : CR MRD+, CR MRD-, PR MRD+ et PR MRD-, avec pour critère de jugement un seuil de maladie résiduelle de 0.01% mesuré en cytométrie en flux ou en biologie moléculaire (1).

II-Place de l'évaluation de la maladie résiduelle dans le suivi de la LLC

1. Définition de la maladie résiduelle

D'un point de vue biologique l'obtention d'une RC repose sur des critères cytologiques et est caractérisée par la présence d'un taux de lymphocytes dans le sang périphérique $< 4 \times 10^9/L$ et/ou dans la moelle $< 30\%$ des éléments médullaires. Elle ne permet cependant pas d'affirmer l'éradication totale du clone leucémique de LLC du fait du manque de sensibilité de l'hémogramme et du myélogramme pour la détection d'évènements rares.

La MRD est un concept défini par la persistance de cellules malignes en dessous du seuil de détection obtenu par les techniques conventionnelles, dans le cadre d'une prise en charge thérapeutique pour le patient. La présence de cellules pathologiques résiduelles peut refléter une réponse partielle au traitement, une émergence de résistance au traitement, voire une rechute de la maladie.

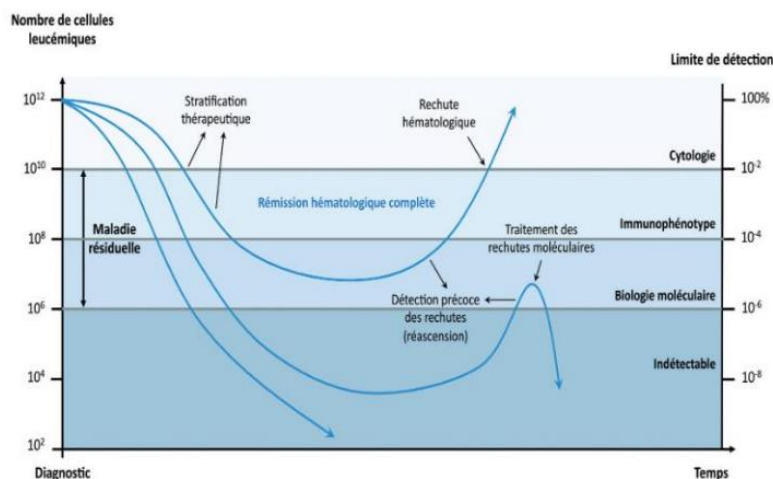


Figure 11 : Concept de maladie résiduelle (MRD), N. Duployez et al. (88).

Cette figure illustre la relation entre évolution de la MRD et risque de rechute dans les hémopathies, ainsi que les niveaux de performance des différentes techniques pour la détection des cellules leucémiques.

Les recommandations iwCLL de 2018 intègrent ainsi de nouvelles catégories de critères de réponses - « RC ou RP avec MRD négative ou positive », afin de confirmer ou infirmer la rémission de façon plus précise que par les techniques cytologiques classiques (1). On parle de maladie résiduelle indétectable lorsqu'il n'a pas été mis en évidence de cellules malignes par l'une de ces techniques.

2. Impact clinique

A. Place de la MRD-LLC comme biomarqueur de substitution

Il est aujourd'hui admis que la quantification de la maladie résiduelle est un marqueur prédictif indépendant de la survie sans progression et de la survie globale dans la leucémie lymphocytaire chronique chez les patients traités par ICT (89,90). En effet, en 2012, Böttcher a pu démontrer l'existence dans l'essai clinique CLL8 d'une corrélation entre le résultat de MRD-LLC, la survie sans progression et la survie globale : critères de jugement de référence utilisés dans les études cliniques.

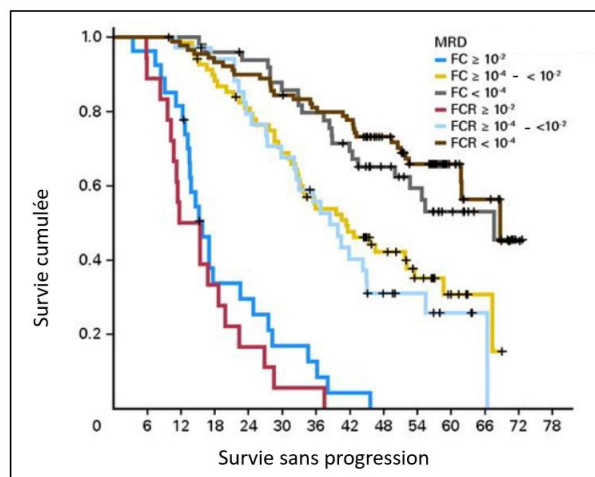


Figure 12 : Survie sans progression et survie cumulée en fonction de la MRD-LLC chez des patients traités par chimiothérapie ou immunochemiothérapie, Böttcher et al. (89).

FC : fludarabine + cyclophosphamide, FRC : fludarabine + cyclophosphamide + rituximab
Le statut de la MRD, ici établi à 1 mois du dernier cycle du traitement, définit le mieux le pronostic du patient, qu'il soit sous chimiothérapie ou immunochemiothérapie.

Ainsi, plusieurs études, dont celles menées par Böttcher et Letestu, ont confirmé que les patients traités par ICT, avec une MRD indétectable dans le sang (89) ou dans la

moelle (91), avaient une amélioration significative de la survie sans progression, indépendamment du stade clinique ou du statut dans la réponse aux traitements. Si d'autres facteurs indépendants de la MRD, comme le statut mutationnel *IGVH* ou la mutation de *TP53*, influent sur la survie sans progression ou la survie globale, le seuil de MRD à 10^{-4} en fin de traitement est maintenant reconnu comme un critère de jugement dans le cadre d'une prise en charge thérapeutique par ICT.

La MRD constitue ainsi un outil d'évaluation de la réponse thérapeutique et un marqueur de substitution de la survie des patients : survie globale (OS) et survie sans progression (PFS).

Ces résultats ont été confirmés depuis par plusieurs essais cliniques randomisés ayant validé le statut de MRD après traitement d'induction comme critère prédictif indépendant de survie (OS et PFS) (89). En Juillet 2016, la MRD-LLC a ainsi été approuvée par l'Agence de Médecine Européenne (EMA) comme un critère de jugement intermédiaire dans les essais cliniques de phase 3 randomisés et contrôlés (92).

Cependant, si la corrélation entre la survie sans progression et le statut de la MRD du patient est aujourd'hui parfaitement établie chez les patients traités par ICT (93), certaines limites subsistent : ces corrélations ont été établies par un seul groupe de recherche (GCLLSG), basée sur 3 essais cliniques (94) ; l'applicabilité de ces données est donc limitée aux caractéristiques de ces patients et aux protocoles thérapeutiques utilisés dans ces essais. Le statut mutationnel de *TP53* n'a, par exemple, pas été pris en compte. Enfin, l'analyse de la MRD n'a été réalisée qu'à la fin de la phase d'induction des traitements, chez des patients n'ayant jamais reçu de traitement post-induction. L'effet potentiel d'un traitement d'entretien sur la capacité de la MRD à prédire la survie sans progression dans ces cas-là reste donc inconnu (94).

L'utilisation croissante des inhibiteurs du BCR en monothérapie (Ibrutinib, Idelalisib) a remis en cause l'utilisation de la MRD dans le suivi de la LLC. En effet, ces patients sous Ibrutinib ont une survie sans progression très prolongée (62), y compris chez les patients en rechute ou à haut risque de progression (83), bien qu'une MRD négative à 10^{-4} soit très rarement retrouvée. Le groupe de travail FILO (*French Innovative Leukemia Organization*) a rapporté qu'après 3 ans de traitement par Ibrutinib, aucun des patients étudiés n'avait une MRD $<10^{-4}$ dans le sang (66), rendant l'évaluation de la MRD non informative dans ce contexte. En effet, les résultats de l'essai clinique IclCLLe ont montré que les inhibiteurs du BTK comme l'Ibrutinib favorisent la redistribution des cellules tumorales situées dans les ganglions lymphatiques vers la circulation sanguine, à l'origine de résultats de MRD positives (66) sans corrélation avec la survie.

Néanmoins, le développement du Vénétoclax, ciblant le Bcl-2, a permis de confirmer l'intérêt de la MRD comme marqueur de substitution pour prédire la survie. L'utilisation du Vénétoclax dans la LLC permet en effet d'atteindre des taux de MRD $<10^{-4}$, que ce soit en monothérapie, dans 20 à 30% des cas (84), ou de manière encore plus significative lorsqu'il est associé au Rituximab avec une MRD négative à 10^{-4} dans la moelle osseuse retrouvée chez 61% des patients (95).

L'étude MURANO, comparant l'efficacité de l'association VR (Vénétoclax Rituximab) à un traitement de référence par ICT, a ainsi permis d'établir pour la première fois un lien entre MRD indétectable et survie sans progression chez des patients traités par l'association Vénétoclax-Rituximab. L'étude montre qu'une MRD indétectable à 9 mois est prédictive d'une réponse durable à long terme, ceci, même après arrêt complet du traitement, confirmant l'intérêt de l'analyse de la MRD dans les essais cliniques évaluant les traitements incluant le Vénétoclax (96).

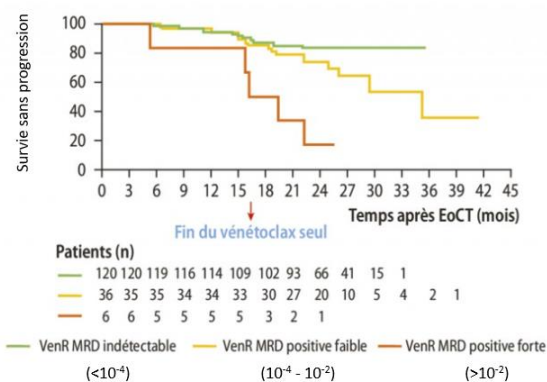


Figure 13 : Survie sans progression en fonction du statut MRD des patients traités par Vénétoclax, Etude MURANO, Kater et al. (96).

EoCT « End of combined therapy » Après arrêt de l'association Vénétoclax/Rituximab
VenR = Association Vénétoclax + Rituximab.

Dans l'étude MURANO, dont l'étude de la MRD a été réalisée après 6 cures de Vénétoclax/Rituximab avant un entretien pendant 18 mois par Vénétoclax seul, une MRD indétectable à 10^{-4} est prédictive d'une réponse durable à long terme, y compris après l'arrêt du Vénétoclax seul.

Plusieurs études ont ainsi étudié le lien entre MRD et survie sans progression chez des patients traités par thérapie ciblée, confirmant l'intérêt de la MRD comme marqueur de substitution intermédiaire à la survie globale et à la survie sans progression. Néanmoins, la prise en charge de la LLC étant en pleine évolution avec la perspective de nouvelles combinaisons, une corrélation entre la MRD et la survie des patients nécessitera d'être validée pour chaque nouvelle association.

B. La place de la MRD-LLC dans la démarche thérapeutique

La place de l'ICT a grandement diminué dans la prise en charge thérapeutique de la LLC ces dernières années, la supériorité de l'Ibrutinib a été démontrée face aux associations de référence (FCR, BR) (97), et l'Ibrutinib, ainsi que d'autres thérapies ciblées, représenteront probablement les traitements de choix en première ligne, seuls ou en association. Dans ce contexte, l'étude de la MRD semble intéressante, elle pourrait permettre d'orienter la démarche thérapeutique : choisir les associations les plus efficaces, afin de limiter l'usage des chimiothérapies mais également d'adapter voire d'arrêter complètement certains traitements au long cours.

L'étude de phase II ICLL07-GAI du FILO a ainsi évalué l'intérêt d'une stratégie thérapeutique guidée par la MRD : le résultat de la MRD conditionnant le schéma thérapeutique et la durée de la chimiothérapie. Les patients avec MRD positive à 9 mois (M9) après 6 cures de d'Obinutuzumab-Ibrutinib (GI) justifiaient de 4 cures de Fludarabine-Cyclophosphamide-Obinutuzumab (FCG) jusqu'au 16^{ème} mois (M16) associées à l'Ibrutinib, tandis que les patients avec MRD négative en rémission clinique poursuivaient avec l'Ibrutinib seul jusque M16 (98).

Concernant les thérapies ciblées, l'étude CLARITY a également étudié l'intérêt du résultat de la MRD dans le conditionnement du schéma thérapeutique (voir figure 14) (99).

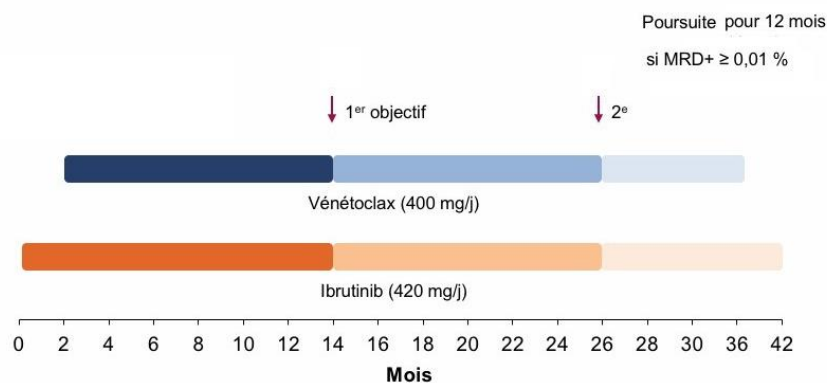


Figure 14 : Adaptation de la stratégie thérapeutique selon le statut de la MRD, étude CLARITY, Hilmen et al. (99).

Dans l'étude CLARITY, visant à étudier la réponse au long cours de l'association Ibrutinib Vénétoclax chez des patients avec une LLC réfractaire ou en rechute, un arrêt du traitement combinant Ibrutinib et Vénétoclax à M14 est décidé en cas de MRD indétectable à 10^{-4} à M8 ; ou à M26 en cas de MRD indétectable à 10^{-4} à M14 ou M26.

Peu de données sont actuellement disponibles concernant l'utilisation de la MRD pour prédire la rechute. De la même manière, la place de la MRD reste à préciser dans les stratégies thérapeutiques visant à l'éradication de la maladie (allogreffe de moelle osseuse, voire éventuellement dans le futur les thérapies par CAR T-cells).

Récemment, une étude menée par Porter et al. a montré qu'aucun des patients traités par CAR-T cells anti CD19, avec une MRD indétectable à 1 et 3 mois de l'injection, n'était en rechute, mais également que 28% des patients avec une MRD positive restaient en rémission clinique (76), d'autres études seront nécessaires afin de clarifier le rôle de la MRD dans le suivi des thérapies incluant des CAR-T cells.

Avec la démocratisation des thérapies ciblées et l'arrivée des nouvelles thérapies innovantes, les méthodes d'évaluation de la MRD pourraient être amenées à évoluer dans les prochaines années.

3. Méthodes d'évaluation de la MRD-LLC

Dans la LLC, deux techniques de référence peuvent être utilisées dans l'évaluation de la maladie résiduelle : la cytométrie en flux multiparamétrique et la biologie moléculaire. Ces deux techniques d'évaluation de la MRD font désormais partie intégrante des critères de réponse au traitement de la LLC définis par l'iwCLL.

A. MRD-LLC en biologie moléculaire

L'évaluation de la MRD en biologie moléculaire repose sur la détection et la quantification d'un réarrangement du gène de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (*IGH*) spécifique du clone tumoral (100). Le statut mutationnel des *IGH* reste identique tout au long de la LLC et constitue donc un bon marqueur de suivi de MRD. Différentes techniques peuvent être utilisées avec des niveaux de performance variables.

La PCR à amorce consensus *IGH* repose sur l'utilisation d'amorces consensus s'appariant avec des régions conservées du génome, proche de la région hypervariable CDR3. Cette technique permet ainsi de quantifier et d'identifier un clone tumoral. En effet, en cas de clone tumoral, il sera retrouvé un unique produit de PCR, alors que dans un contexte polyclonal des produits de PCR de longueur variable seront

obtenus. Cette technique de réalisation simple présente comme principal inconvénient une sensibilité variable selon les patients du fait de la zone mutée (101).

L'ASO-qPCR (*allele specific oligonucleotide* PCR) est une technique de PCR quantitative plus sensible et largement utilisée dans le suivi de la MRD de nombreuses pathologies lymphoïdes (102). Le principe reste identique avec la recherche et la quantification du clone tumoral grâce au suivi d'un réarrangement spécifique du gène des *IGH*.

Elle nécessite cependant la fabrication d'amorces spécifiques du clone tumoral de chaque patient avant la mise en place de toute thérapeutique, ce qui soulève plusieurs problèmes (103) :

- La présence d'une oligoclonalité, ou de réarrangements secondaires en cours de traitement, peut fortement compliquer le suivi de la MRD lorsque cette technique est utilisée.
- L'affinité des amorces pour les cellules polyclonales étant variable, un bruit de fond avec une amplification de séquences comparables chez des cellules normales peut diminuer la sensibilité de la technique.
- Manque de reproductibilité avec une spécificité et une sensibilité de la technique variable selon chaque patient.

La figure 15 illustre le principe de la technique de RQ-PCR.

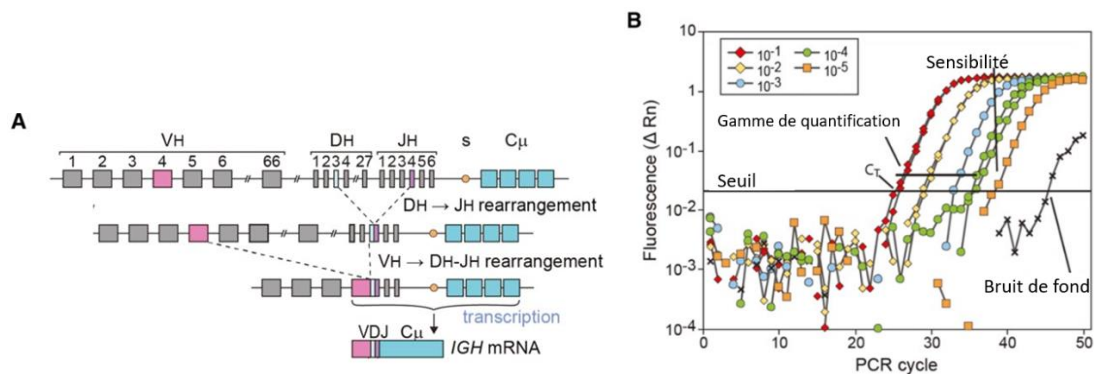


Figure 15 : Principes de base de l'analyse de la MRD par RQ-PCR, Van Dongen et al. (104).

(A) Schéma d'un réarrangement du gène IGH, donnant lieu à un exon V-D-J avec des régions de jonction très diverses, différentes selon chaque cellule B individuelle. (B) Principes d'interprétation d'une MDR par RQ-PCR en prenant en compte le seuil de positivité, la gamme de quantification et le bruit de fond résiduel limitant la sensibilité.

La « nested » ASO-qPCR repose sur le même principe et permet d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la PCR, au détriment de la quantification du clone tumoral. Elle implique généralement deux réactions d'amplifications séquentielles, chacune d'entre elles utilisant une paire d'amorces différentes. Le produit de la première réaction d'amplification est utilisé comme matrice pour la seconde PCR et la deuxième paire d'amorces est placée à l'intérieur de la première. L'utilisation de deux paires d'amorces permet une augmentation de la sensibilité, l'amélioration de la spécificité découle de l'utilisation de deux amorces distinctes ayant la même cible (105).

Le séquençage à haut débit (NGS) permet aujourd'hui d'atteindre une sensibilité théorique de l'ordre de 10⁻⁶ dans le domaine de la MRD. Cette technique utilise des ensembles d'amorces consensus dégénérées (amorces utilisables chez tous les patients) afin d'amplifier l'ensemble des réarrangements des gènes *IGVH* dans un mix de cellules lymphoïdes. Couplé à un séquenceur à haut débit, elle permet une détection précise d'un éventuel clone tumoral (106).

Cette technique permet de s'affranchir des principales limites de l'ASO-qPCR, à savoir la nécessité d'avoir des amorces spécifiques pour chaque patient ainsi que du risque de faux négatifs lors du suivi, en cas d'évolution sous clonale (107). Si la perspective d'utilisation du NGS en routine était encore lointaine il y a quelques années, principalement à cause de son accessibilité et son prix, la démocratisation des séquenceurs à haut débit dans de nombreux centres hospitaliers permet aujourd'hui d'envisager l'utilisation du NGS dans l'évaluation de la MRD LLC.

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différentes techniques de biologie moléculaire utilisés dans la MRD LLC

Techniques	Sensibilité	Quantification	Avantages	Inconvénients
PCR à amorces consensus IGVH	10 ⁻³	Non	Rapide Standardisé Simple à réaliser	Sensibilité patient dépendant
ASO-qPCR	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	Standardisé	Méthode fastidieuse Amorces spécifiques pour chaque patient
« Nested » ASO-qPCR	10 ⁻⁶	Non	Sensibilité	Méthode fastidieuse Séquençage individuel des gènes
Séquençage haut débit (NGS)	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	Sensibilité Simple à réaliser	Difficulté d'accès Coût Temps de rendu de résultats

B. MRD-LLC en Cytométrie en flux

a) La cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) est une technique de mesure de populations cellulaires en suspension. L'échantillon cellulaire (sang, moelle ou autre liquide) est préalablement marqué par des Ac monoclonaux conjugués à des fluorochromes dirigés contre des antigènes membranaires ou intracellulaires. Une étape de lyse érythrocytaire est ensuite réalisée avant analyse au cytomètre.

Le cytomètre se compose de trois systèmes : un système « fluïdique », un système « optique » et un système « électronique » (Figure 16).

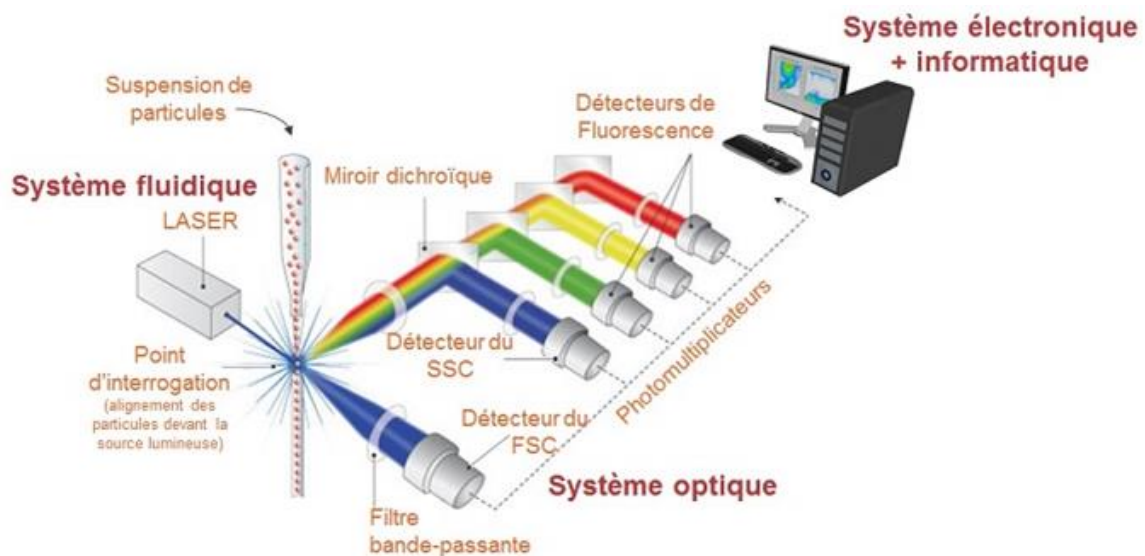


Figure 16 : Fonctionnement d'un cytomètre (source : URCACyt, Université de Reims).

Le fonctionnement d'un cytomètre en flux nécessite la combinaison d'un **système fluïdique** permettant d'introduire et de canaliser les cellules dans un liquide de gaine afin de les faire passer une par une devant un faisceau lumineux, c'est la focalisation hydrodynamique ; d'un **système optique** avec une source d'excitation lumineuse (les lasers sont généralement utilisés) permettant la révélation de la fixation de l'anticorps sur l'antigène spécifique, par excitation du fluorochrome ; d'un **système électronique** pour convertir les signaux optiques en signaux électroniques, les numériser, et les analyser ensuite sur ordinateur.

Les cellules sont entraînées dans le flux d'un liquide de gaine afin de passer une par une devant un faisceau laser et être analysées individuellement. Ce phénomène est appelé focalisation hydrodynamique.

Lors du passage d'une cellule devant un faisceau laser (source d'excitation lumineuse), différents types de signaux lumineux sont ensuite émis : un signal de diffusion permettant de discriminer les cellules selon la taille et la complexité cellulaire et un signal de fluorescence.

- La lumière diffractée dans l'axe du faisceau laser permet d'évaluer la taille de la cellule (paramètre *Forward Scatter* ou FS).
- La lumière diffractée, mesurée à 90°, permet d'évaluer la complexité/granularité de la cellule (paramètre *Side Scatter* ou SS).

- Le signal de Fluorescence correspond à « l'autofluorescence » des cellules à laquelle s'ajoute le signal émis par l'excitation du fluorochrome couplé à l'anticorps. Dans le cadre de l'immunophénotypage des leucocytes, ces Ac sont dirigés contre des glycoprotéines appelées « *Cluster de Différenciation* » (CD). La fluorescence émise sera analysée, donnant des informations sur l'expression antigénique caractérisant les différentes sous-populations cellulaires.

Les différentes longueurs d'ondes sont ensuite triées et séparées par un système de miroirs dichroïques, puis recueillies par des photomultiplicateurs (PMT).

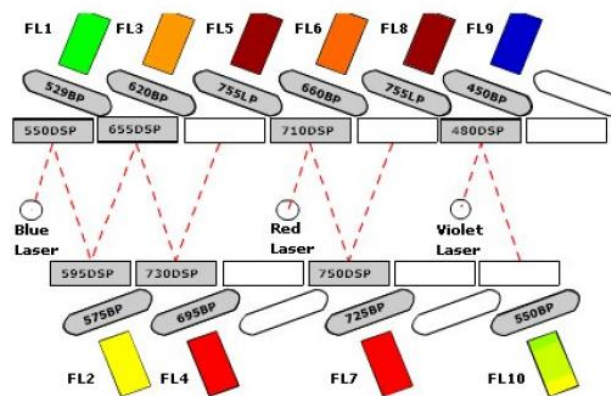


Figure 17 : Représentation schématique d'un banc optique (Documentation Navios® fournisseur Beckman Coulter, Service formation - Juillet 2014)

Représentation schématique du banc optique d'un cytomètre Navios 10 couleurs (3 lasers bleu, rouge et violet) avec système de filtres optiques et photomultiplicateurs en « boulevard ».

Les signaux lumineux sont ensuite convertis en signaux électriques exploitables au niveau informatique. Les données recueillies sont représentées sous forme de graphes mono ou bi-paramétriques.

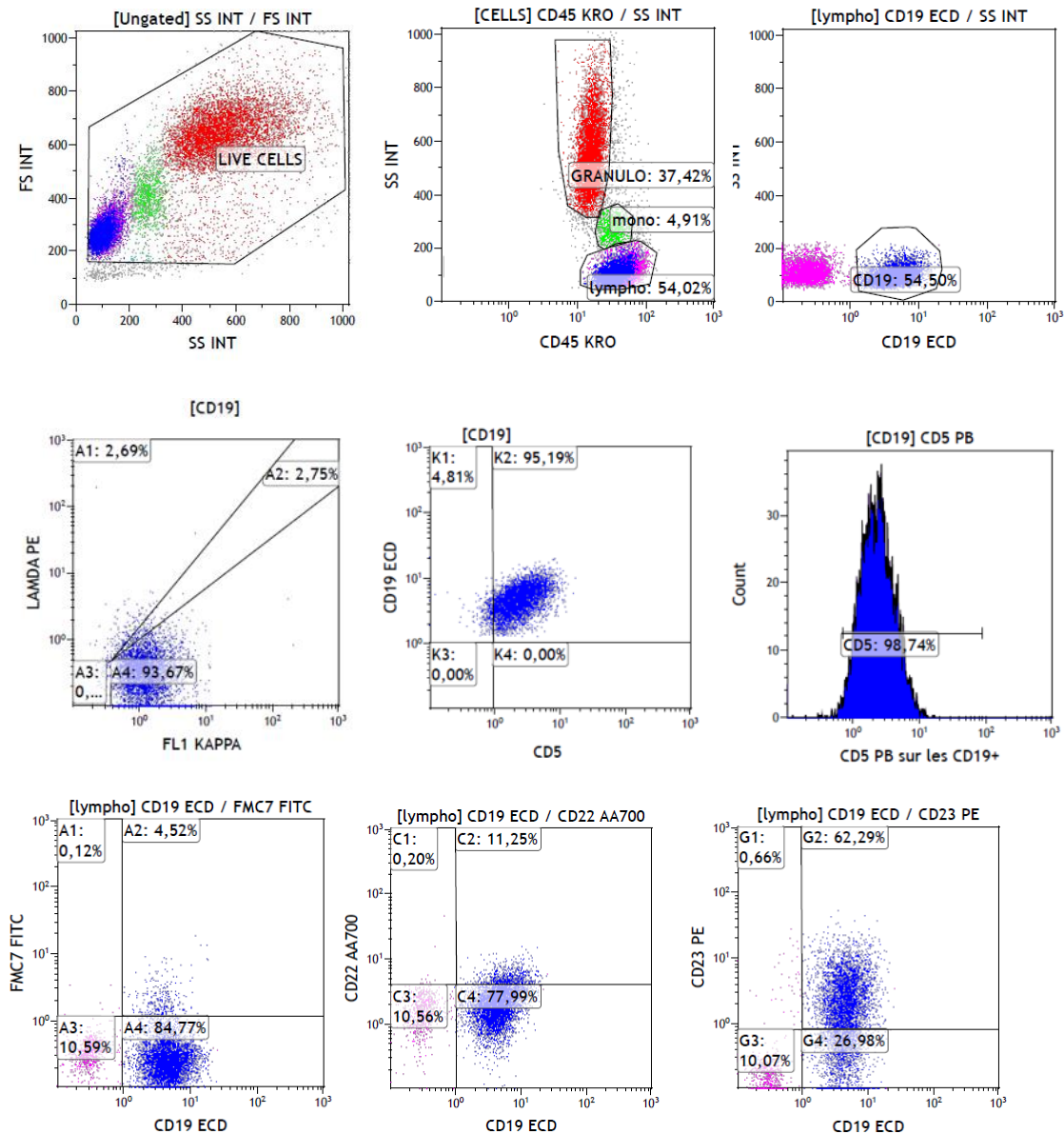


Figure 18: Exemples d'histogrammes obtenus en CMF dans une LLC.

FS = Forward scatter : discrimination selon la taille / SS = Side scatter : discrimination selon la complexité/granularité de la cellule. Succession d'histogrammes bi-paramétriques et d'un histogramme monoparamétrique (CD5/Count).

Les différentes populations cellulaires sont séparées en fonction de leur taille (FS), leur structure interne (SS), leur expression pour les différents clusters de différenciations (CD). Sont colorisés en rouge les granuleux, en vert les monocytes, en bleu les lymphocytes B CD19+ et en rose les lymphocytes T et NK CD19-.

Mise en évidence d'une population lymphocytaire B CD5+, CD23+, monotypique Kappa et CD22 de faible intensité, FMC7 négatif. (Données CH de Valenciennes).

L'avènement de la cytométrie multiparamétrique a permis de multiplier les marquages cellulaires grâce au développement de cytomètres avec plusieurs lasers, augmentant ainsi le nombre de fluorochromes analysés.

Les fluorochromes utilisés ont des spectres d'émission de fluorescence distincts mais ceux-ci peuvent se chevaucher (Figure 19). Ce phénomène de chevauchement peut se produire lorsque deux spectres d'émission de fluorescence sont proches. Ces « fuites de fluorescence » peuvent ainsi perturber l'interprétation des signaux.

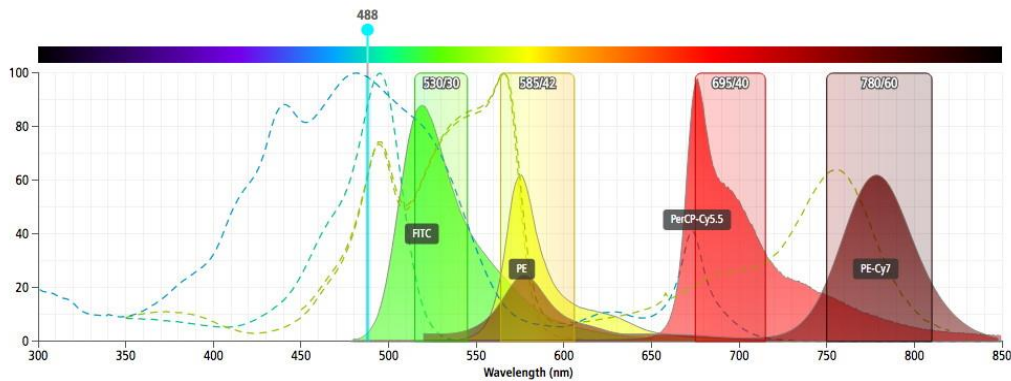


Figure 19 : Recouvrement des spectres d'émissions de fluorescence de différents fluorochromes (©Becton Dickinson, Spectra Viewer).

Spectres de fluorescence pour les fluorochromes FITC, PE, PerCP-Cy5.5 et PE-Cy7. Les spectres d'émissions diffèrent entre fluorochromes mais des zones de chevauchement existent, pouvant poser des difficultés dans l'interprétation des signaux, notamment pour les spectres d'émission proches comme pour le FITC et le PE.

Le réglage des compensations consiste à soustraire mathématiquement des signaux non-spécifiques de fluorescence de fluorochrome interférant dans les canaux adjacents : la proportion de « fuite de fluorescence » captée par un détecteur voisin par rapport à l'émission de fluorescence détectée par le PMT est constante pour chaque fluorochrome.

Outre le réglage des compensations, la stabilité des réglages des cytomètres doit être vérifiée régulièrement. Il est recommandé de passer quotidiennement des microsphères fluorescentes permettant de vérifier les tensions des photomultiplicateurs (PMT) et de contrôler la conformité optique et fluide du cytomètre.

b) Principe de la MRD-LLC en cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) constitue à l'heure actuelle la technique de prédilection pour la recherche de cellules résiduelles de LLC après traitement. Différents points sont à prendre en compte pour une évaluation optimale de la MRD-LLC en CMF.

- Nature de l'échantillon

La MRD LLC peut être réalisée sur le sang ou la moelle, les prélèvements étant acheminés dans des tubes anticoagulés avec de l'héparinate de sodium ou de l'EDTA (Acide éthylène diamine tétra acétique), le délai d'acheminement recommandé est inférieur à 48h.

Contrairement à d'autres hémopathies où l'étude de la maladie résiduelle se fait généralement dans la moelle osseuse, en France, en dehors de l'apparition ou de la persistance de cytopénies, l'étude de la MRD-LLC est le plus souvent réalisée dans le sang, et l'infiltration ganglionnaire et médullaire reste généralement inexplorée. Le sang constitue en effet le prélèvement de choix pour l'étude de la MRD dans la LLC, en raison de son accessibilité (prélèvement peu invasif) et de la sensibilité de la technique : l'évaluation de la MRD sur sang étant le plus souvent au moins aussi sensible que la MRD sur moelle (108).








Néanmoins, il a été reconnu que les Ac monoclonaux utilisés en thérapeutique peuvent entraîner une clairance des cellules tumorales circulantes sans cibler les cellules tumorales situées dans les organes hématopoïétiques (moelle osseuse, ganglions lymphatiques). C'est pourquoi l'iwCLL indique qu'une MRD sur moelle reste néanmoins nécessaire dans les 3 mois suivant un traitement par Alemtuzumab ou Rituximab (109). L'interprétation de la MRD devrait ainsi prendre en compte le traitement du patient mais aussi le site du prélèvement pour rester critique face à une MRD indétectable (110). En effet, des différences dans les taux de MRD mesurés

entre le sang et la moelle peuvent constituer des critères prédictifs de la durée de réponse au traitement (110) ; une MRD négative sur moelle pouvant correspondre à une réponse plus profonde.

Cependant, peu d'études ont évalué l'impact d'un résultat de MRD positive sur moelle et négative sur sang en terme de survie dans les essais évaluant les thérapies ciblées. La MRD-LLC dans la moelle a été étudiée principalement dans des protocoles post-ICT (protocoles FMP2007 et 2010 et LLC2007 SA du groupe FILO). Seule une MRD supérieure à 0.01% sur moelle et négative sur sang au seuil de 10^{-4} est prédictive d'une moindre survie (91). De plus, une MRD positive sur moelle au seuil de 10^{-4} n'a été observée que dans 17% des cas où la MRD sur sang était négative (91). Ainsi, l'étude de la MRD sur moelle reste limitée et ne se fera probablement pas en dehors des études cliniques. Elle présente donc peu d'intérêt chez les patients traités par ICT mais restera nécessaire dans la validation de l'approche MRD des nouvelles thérapeutiques.

- Panels utilisés

Les panels proposés et utilisés dans les essais cliniques des groupes français FILO et européens ERIC ont évolué ces dernières années passant de « quatre couleurs » à « six couleurs » et plus récemment, à des techniques de haute performance à plus de « huit à dix couleurs ». L'évolution des cytomètres et des panels a ainsi permis d'atteindre des niveaux de sensibilité théorique de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} , avec une bonne corrélation avec les techniques moléculaires (111) ; le seuil de détection recommandé par l'iwCLL étant de 10^{-4} , soit une cellule de LLC pour 10 000 leucocytes analysés.

Protocoles nationaux	Indication/objectif de la MRD dans le protocole	Marqueurs	Performances de la technique
4 couleurs - Techniques moyenne résolution			
FC oral sujets jeunes en 1 ^{er} ligne Auto-greffe vs chimiothérapie sujets jeunes en 1 ^{er} ligne	Etude ancillaire	5 tubes  CD45-CD14-CD19-CD3 Kappa-Lambda-CD19-CD5 CD81-CD22-CD19-CD5 CD43-CD79b-CD19-CD5 CD20-CD38-CD19-CD5 1 tube  CD20-CD79b-CD19-CD5	Limite de détection 10⁻⁴ MRD⁺ ≥ 0,01%
6 couleurs-Techniques sensibles			
FMP2007 CLL2007 SA	Objectif secondaire	2 tubes  CD3-CD38-CD5-CD19-CD79b-CD20 CD81-CD22-CD5-CD19-CD43-CD20 4 tubes  CD45-CD14-CD5-CD19-CD45-CD3 Kappa-Lambda-CD5-CD19-CD81-CD3+14 CD43-CD22-CD5-CD19-CD81-CD3+14 CD43-CD79b-CD5-CD19-CD81-CD3+14	Limite de détection 10⁻⁵ MRD⁺ ≥ 0,001%
8 et 10 couleurs-Techniques très haute sensibilité			
FMP2010 ICLL07 GAI ICLL01 BOMP RICAC-PMM	FMP2010 : Critère de réponse comme objectif principal – paramètre de substitution à la PFS ICLL01BOMP : Objectif secondaire ICLL07 GAI/ RICAC PMM : Critère décisionnel pour les indications thérapeutiques	1 tube  CD19-CD20-CD5-CD43-CD79b-CD81 + 2 marqueurs  1 tube [3, 4] 8 couleurs 9 marqueurs CD20-CD45-CD81-CD22+CD79b-CD5-CD19-CD200-CD43 1 tube [11] 10 couleurs 11 marqueurs Kappa-Lambda-CD3+CD14-CD19-CD5 CD81-CD22-CD43-CD20-CD45	Limite de détection 10⁻⁶ MRD⁺ ≥ 0,0001% 

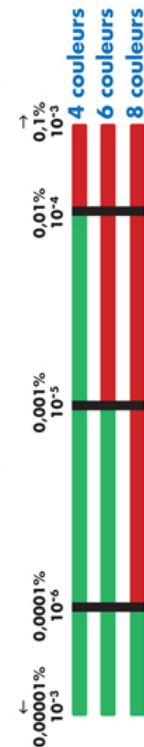


Figure 20 : Evolution des panels d'étude de la MRD LLC par CMF, Letestu et al. (112).

Initialement, les techniques 4 couleurs étaient étudiées à visée observationnelles, l'arrivée de techniques plus sensibles a permis l'évaluation de la MRD comme objectif secondaire dans les essais cliniques jusqu'à devenir un critère de jugement principal dans les essais cliniques actuels, grâce à l'avènement de cytomètres à 8 et 10 couleurs de très haute sensibilité.

Ces panels sont composés de marqueurs lymphocytaires permettant de caractériser les cellules de LLC (CD5, CD19, CD20, CD22, CD23, CD43, CD79b, CD81) et peuvent être complétés par des marqueurs d'exclusion pour les autres populations leucocytaires dans le cadre de la stratégie de gating (Tableau 6).

Tableau 6 : Rappel sur les profils d'expression cellulaire des principaux marqueurs d'identification utilisés dans le panel MRD-LLC

Marqueurs	Ly B	Ly T	LLC	Intérêts
CD81	+	++	+/-	Forte expression par les lymphocytes T, exprimé par les NK, monocytes et certains granulocytes
CD19	++	-	+	Marqueur pan-lymphocytaire B
CD20	++	-	+/-	Le CD20 est un marqueur d'expression tardif du lymphocyte B faiblement exprimé dans la cellule de LLC.
CD200	+	-	++	Marqueur d'immaturité lymphocytaire, exprimé par les cellules de LLC dans plus de 80% des cas
CD79b	+	-	+/-	Marqueurs B, faiblement exprimé dans les cellules de LLC et B immatures.
CD22	+	-	+/-	Marqueur précoce de la lignée B, faiblement exprimé dans la LLC.
CD43	-	++	+	Marqueurs T surexprimé dans la LLC
CD5	-	++	+	Marqueur lymphocytaire T, classiquement coexprimé par les cellules B de LLC.

La stratégie d'identification repose sur les différences d'expression relative entre les cellules de LLC et les autres populations lymphocytaires normales.

L'utilisation de cytomètres de haute résolution tend à privilégier l'utilisation d'un seul tube permettant l'étude simultanée de 8-10 marqueurs d'intérêt, avec un temps d'acquisition plus court et un nombre d'éléments étudiés important.

- Traitement de l'échantillon

Une lyse érythrocytaire est nécessaire afin de limiter les interférences liées à la présence des globules rouges, comme l'adhésion non spécifique des anticorps de marquage. Cette lyse peut être réalisée avant ou après marquage. Une lyse après marquage permet de respecter l'intégrité des épitopes, mais nécessitera un plus grand nombre d'anticorps marqués, ceux-ci pouvant réagir de manière non spécifique aux éléments érythrocytaires. Une lyse avant marquage permet de limiter le marquage aux seuls leucocytes, réduisant les volumes d'anticorps nécessaires et le coût de l'analyse (113).

C'est pourquoi la lyse avant marquage est recommandée par la Société Européenne d'Analyse Cellulaire Clinique (ESCCA) dans le cadre d'étude de la MRD (114). Une lyse macrovolume (*Bulk Lyse*), non agressive, permettant de lyser les éléments érythrocytaires, tout en préservant les cellules leucémiques est généralement utilisée. Différents types de lyse peuvent être utilisés : lyse maison à base de chlorure d'ammonium (NH₄Cl) ou lyses commerciales comme la Versalyse® de chez Beckman Coulter (BC) ou la FACS™ Lysing solution de chez Becton Dickinson (BD). Le choix du réactif de lyse est important : elle doit à la fois préserver les cellules d'intérêt et respecter la densité antigénique des marqueurs de surface.

- Nombre d'éléments à analyser

La mesure de la maladie résiduelle repose sur la présence et la mise en évidence d'évènements rares. Idéalement ces évènements sont présents, répartis de façon homogène et mesurés de manière spécifique. Ils obéissent à la loi de Poisson : avec un coefficient de variation (CV) du nombre de cellules n définissant la population rare, inversement proportionnel à la racine carrée de ce nombre n ($CV = 100/\sqrt{n}$) (tableau 7). Plus on souhaite réduire la variabilité de la technique, plus le nombre de cellules à analyser doit être grand. De la même manière, la limite de sensibilité d'une technique (capacité à rendre un résultat positif lorsque des cellules anormales sont présentes) dépend principalement de la quantité de cellules analysées. Une augmentation du nombre d'évènements à collecter permet donc de diminuer le risque de « faux négatifs ».

Cependant, le nombre de cellules à analyser pose quelques limites : le volume sanguin, l'augmentation des données numériques à traiter puis à interpréter, la consommation de réactifs et le temps nécessaire de l'analyse. Il faut donc trouver le compromis entre le nombre d'évènements à collecter et la variabilité des résultats.

Les valeurs sur fond rouge du tableau 7 présentent des niveaux d'acquisition difficiles à atteindre en routine dans le cadre d'une analyse par CMF. Le compromis admis dans la recherche de la MRD-LLC est l'analyse d'au moins 500 000 cellules, avec un CV acceptable permettant de rendre un résultat positif à 0,01%, soit une sensibilité de l'ordre de 10^{-4} (108).

Tableau 7 : Nombre théorique de cellules nécessaires à analyser en fonction du pourcentage de cellules cibles présentes dans l'échantillon et le coefficient de variation de la technique Letestu, JFPC-AFC 2018 (115)

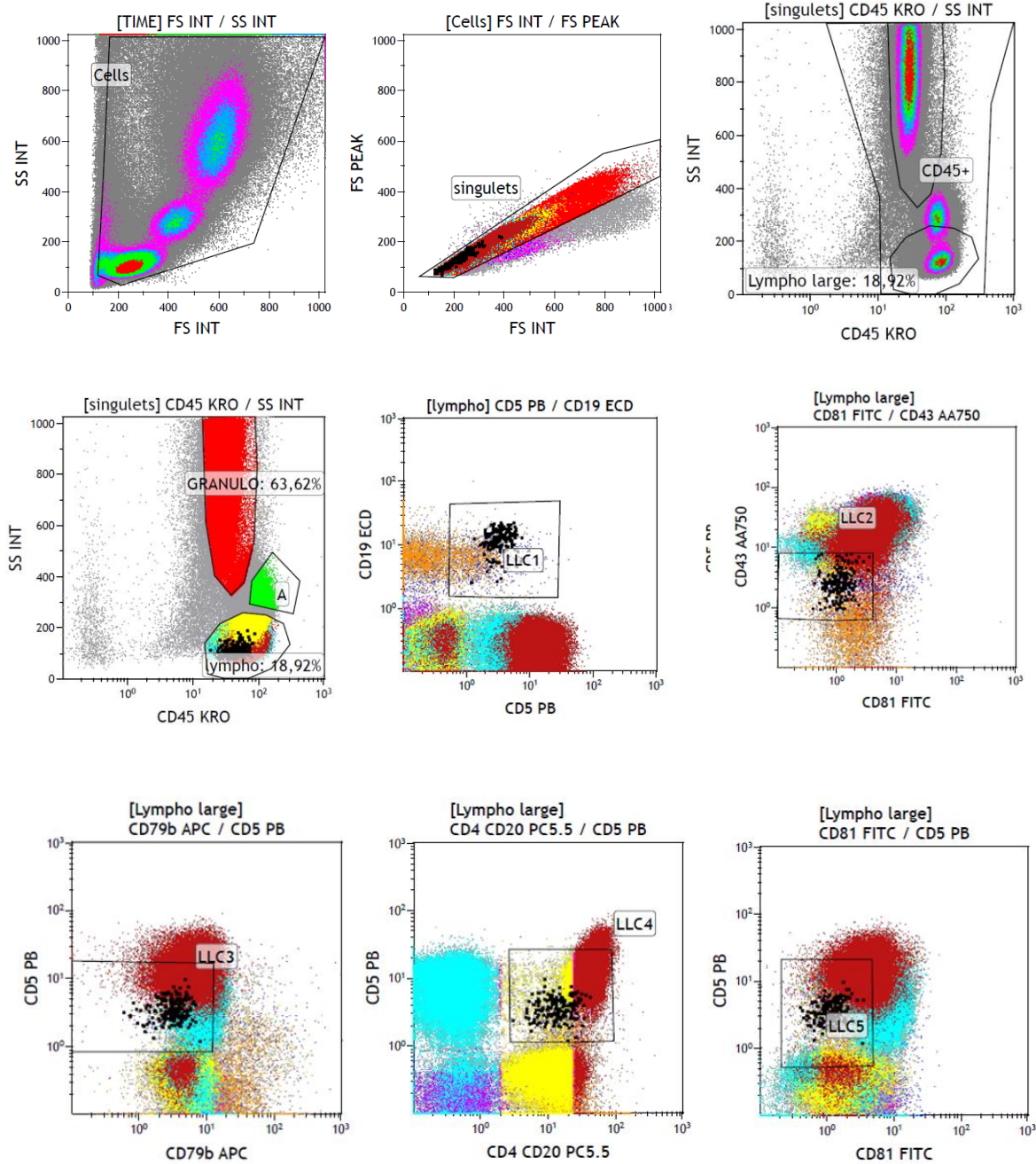
CV	5%	10%	14%	20%	22.4%	31.6%	
Nbre de cellules cibles	400	100	50	25	20	10	
%	Fqce 1/p	Nbre d'événements à collecter					
0.01	10000	4x10 ⁶	10 ⁶	500.000	250.000	200.000	100.000
0.001	100000		10x10 ⁶	5x10 ⁶	2.5x10 ⁶	2x10 ⁶	10 ⁶
0.0001	1000000			50x10 ⁶	25x10 ⁶	20x10 ⁶	10x10 ⁶

- Stratégie d'analyse dans la MRD-LLC

La stratégie d'analyse consiste à fenêtrer la population d'intérêt sur une succession d'histogrammes bi-paramétriques afin de caractériser les cellules de LLC. Le positionnement des fenêtres d'identification se base sur l'expression ou l'intensité d'expression des marqueurs d'intérêt à la surface des différentes populations cellulaires. Une booléenne d'identification permet de mesurer le nombre de cellules de LLC résiduelles parmi les leucocytes totaux.

Un exemple de MRD-LLC positive est présenté ci-dessous avec la stratégie de fenêtrage utilisée au Centre Hospitalier de Valenciennes. Une succession d'histogrammes bi-paramétriques conditionnés sur la population lymphocytaire permet de définir le profil phénotypique de la population d'intérêt. Une fenêtrage booléenne MRD combinant les événements contenus dans chacune des fenêtres LLC 1 à LLC9 permet de visualiser et de quantifier le phénotype étudié.

Après vérification des compensations, contrôle de marquages et nettoyage de l'acquisition (élimination des débris, globules rouges mal lysés et doublets) le résultat de la maladie résiduelle correspond au nombre d'éléments de la fenêtre MRD sur le nombre de leucocytes totaux (CD45+). Dans l'exemple présenté, la MRD est calculée à 190 éléments de phénotype LLC sur 476 542 leucocytes soit 0.04% des lymphocytes totaux.



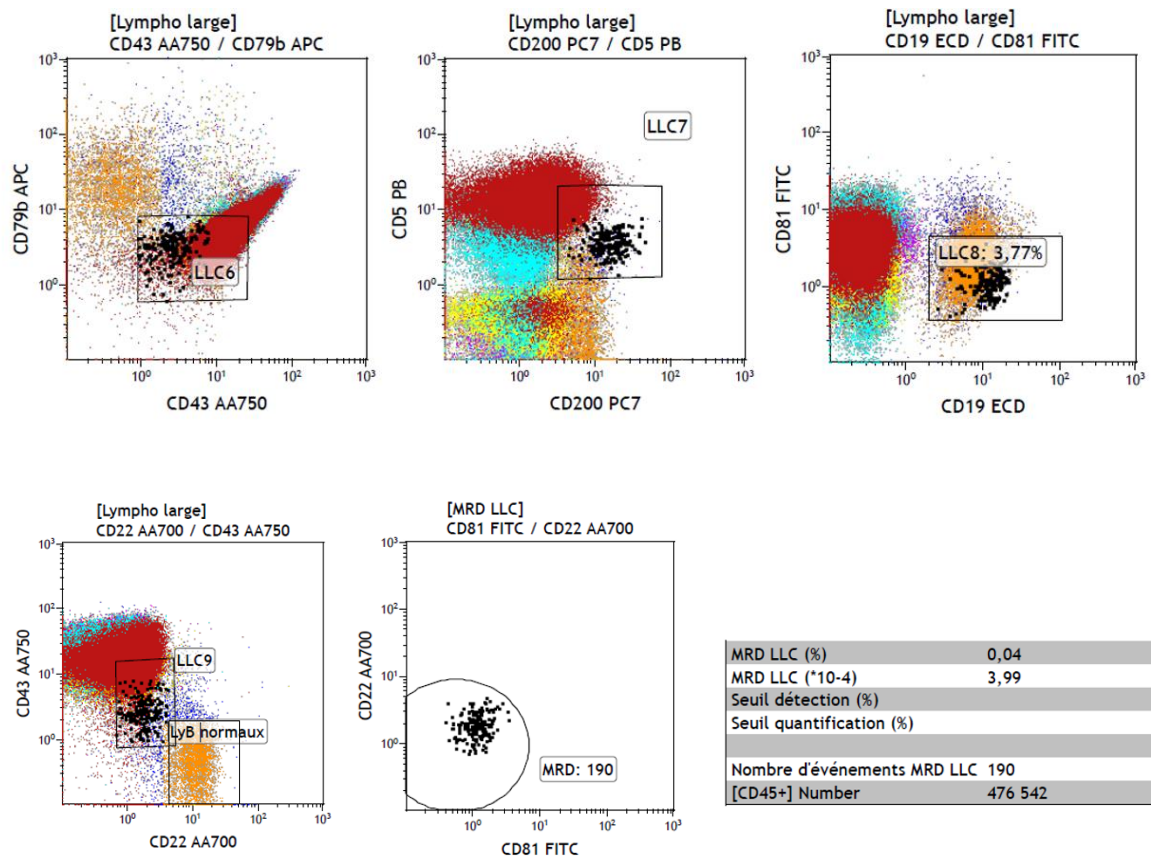


Figure 21 : Stratégie de réanalyse d'une MRD-LLC (données du CH de Valenciennes).

Une fenêtre booléenne MRD combinant les événements contenus dans chacune des fenêtres LLC1 à LLC9 permet de visualiser et de quantifier le phénotype étudié. Sur cet exemple, les cellules de LLC sont représentées en noir et le résultat de MRD en % est obtenu en calculant le rapport du nombre de cellules de LLC contenues dans la fenêtre MRD sur le nombre de leucocytes totaux CD45+ analysés.

Le panel utilisé au Centre Hospitalier de Valenciennes inclut les marqueurs suivants : CD81-FITC (clone JS64), CD56-PE (clone N901 (NKH-1)), CD19-ECD (clone J3-119), CD4+CD20-PC5.5 (clones UHCT1/13B8.2), CD200-PC7 (clone OX-104), CD79b-APC (clone CB3-1), CD22-AA700 (clone SJ10.1H11), CD43-AA750 (clone DFT1), CD5-PB (clone BL1a), CD45-KRO (clone J33). Le choix du panel s'est basé sur les recommandations des groupes FILO et ERIC afin de permettre une bonne séparation des différentes populations cellulaires et l'identification précise des cellules de LLC. Le choix s'est également basé sur la disponibilité de certains anticorps déjà utilisés au laboratoire pour d'autres hémopathies afin de limiter le nombre de spécificités d'Ac (coûts élevés et péremptions courtes des réactifs de CMF).

- Interprétation des résultats

Trois types de situations peuvent être observés selon que le nombre N de cellules identifiées LLC (fenêtre MRD) se situe de part et d'autre de la limite de détection de la technique (LOD) et de la limite de quantification (LOQ) : $N > LOQ$, $LOD < N < LOQ$, ou $N < LOD$.

La limite de détection correspond à la valeur minimale à partir de laquelle on peut affirmer que le nombre de cellules est suffisamment élevé pour ne pas être attribué au bruit de fond cellulaire mais bien à la présence de cellules marquées positivement.

La limite de quantification correspond à la valeur au-delà de laquelle le nombre de cellules détectées peut être quantifié de manière précise, fiable et reproductible entre les différents opérateurs.

Ainsi, pour un même échantillon, si le nombre de cellules pathologiques résiduelles est inférieur à la limite de détection, on observera une grande variabilité inter-opérateurs, alors qu'une valeur de maladie résiduelle supérieure à la limite de quantification permet une meilleure reproductibilité des résultats (20).

Le calcul théorique de la limite de détection et de la limite de quantification peut être calculé en fonction d'un multiple de l'écart-type du bruit de fond moyen. D'après l'Agence Nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail (ANSES) (116), un facteur de 2 ou 3 fois l'écart type pour la limite de détection permet un indice de confiance $>95\%$. Pour la LLC, les limites généralement admises sont de 20 cellules d'intérêt pour la LOD et 50 cellules pour la LOQ (20).

Ainsi, le résultat de la MRD-LLC tiendra compte du nombre d'évènements obtenus dans la fenêtre MRD, lui-même directement dépendant du nombre de cellules analysées.

- >50 cellules = MRD quantifiable. Le résultat sera exprimé sous forme de pourcentage qui devra être supérieur au seuil technique (seuil 10^{-4} pour la technique du CHV, conformément aux recommandations de l'iwCLL).
- 20-50 cellules = MRD détectable non quantifiable. Les cellules anormales sont en nombre suffisant pour être détectées, mais l'incertitude de mesure liée à leur faible nombre ne permet pas leur quantification (bruit de fond, fixation non spécifique, fuite de fluorescence, distorsion de signal...). On parlera de MRD détectable mais non quantifiable.
- 0-20 cellules = MRD indétectable au seuil de sensibilité de la technique. Le faible nombre de cellules détectées ne permet pas de discriminer le bruit de fond (limite de spécificité de la technique) d'éventuelles cellules de LLC résiduelles : c'est la limite de détection du test ou LOD.

Dans l'exemple proposé en figure 21, 190 éléments ont été identifiés dans la fenêtre MRD sur un total de 476 542 leucocytes acquis, soit une MRD positive et quantifiable estimée à 0.04% des leucocytes totaux.

Au CHV, des études sur dilutions successives ont permis de valider un seuil de sensibilité de l'ordre de 10^{-4} pour l'évaluation de la MRD-LLC avec une limite de détection de l'ordre de 10^{-5} , soit la plus faible concentration cellulaire à partir de laquelle on parvient encore à détecter des cellules. A noter qu'au moment de notre étude, le seuil de 500 000 évènements acquis n'était pas systématiquement appliqué. La figure 22 illustre les résultats obtenus sur dilutions successives.

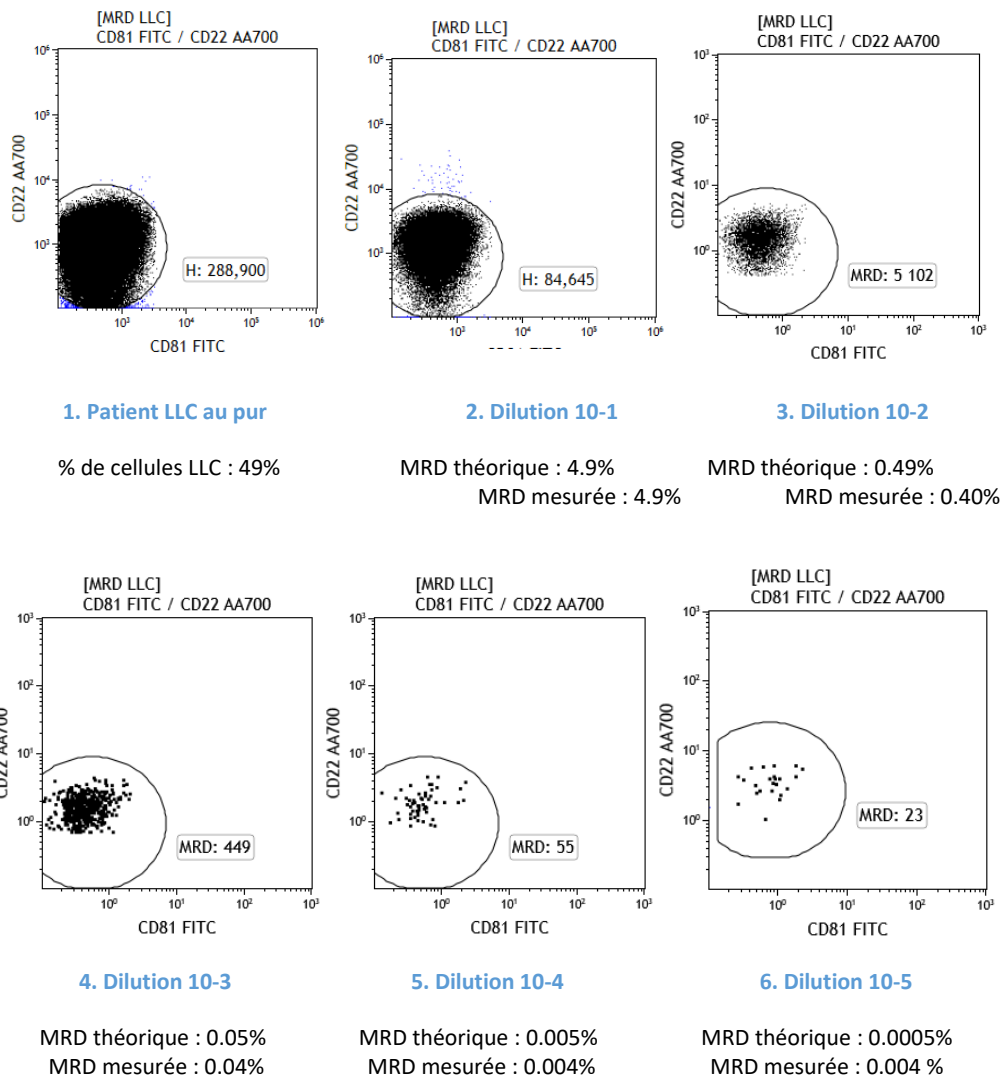


Figure 22 : Dilutions successives d'un échantillon de patient atteint de LLC (données du CH de Valenciennes).

La fenêtre MRD de l'histogramme 6 correspondant à la dilution au 10^{-5} représente la limite de détection de la technique. Jusqu'au seuil de 10^{-4} la MRD mesurée est quantifiable (MRD mesurée proche de la MRD théorique). Au-delà de 10^{-4} , la MRD reste détectable au seuil de 10^{-5} mais non quantifiable (imprécision de la MRD mesurée par rapport à la MRD théorique en raison du bruit de fond).

C. Limites et comparaison des deux approches

Si la technique de CMF constitue la technique de prédilection pour l'évaluation de la MRD-LLC en raison de son coût modéré, son rendu de résultat rapide, sa relative simplicité et son applicabilité à un grand nombre de laboratoires, elle souffre cependant de certaines limites. L'évaluation de la maladie résiduelle en cytométrie en flux nécessite de travailler sur des échantillons « frais » : un délai de réalisation de maximum 48h après le prélèvement est recommandé. Si ce délai est généralement

respecté, une vigilance sera néanmoins nécessaire pour les centres qui traitent des échantillons provenant de services cliniques éloignés géographiquement du laboratoire de cytométrie.

La cellularité du prélèvement est également importante ; le nombre de cellules analysées au cytomètre conditionnant le niveau de sensibilité de la technique. Ainsi, un prélèvement paucicellulaire ne permettra pas toujours d'acquérir plus de 500 000 évènements comme recommandé. Cependant, l'utilisation de cytomètres de très haute sensibilité tend à privilégier l'utilisation d'un seul tube avec 8-10 marqueurs d'intérêt, ce qui permet l'acquisition d'un nombre d'évènements suffisant en un temps plus court.

Enfin, les techniques de cytométrie en flux souffrent actuellement d'un défaut de standardisation inter-centres. Il n'existe à ce jour pas de protocole standardisé définissant les modalités de traitement de l'échantillon, le choix du panel d'anticorps à utiliser (spécificités, clones...), la stratégie de réanalyse. Si les recommandations actuelles tendent à préconiser un tube unique, les essais cliniques réalisés depuis 15 ans et les récentes enquêtes réalisées au niveau national montrent une grande hétérogénéité dans les pratiques, soulignant un besoin de standardisation.

Les niveaux de sensibilité des techniques sont variables : allant de $10^{-2}/10^{-3}$ pour les premières techniques de quantification à la recherche d'une monotypie Kappa/Lambda ; à 10^{-4} pour les études utilisant un panel 4 couleurs, jusqu' à des niveaux de sensibilité supérieurs à 10^{-5} pour les techniques de très haute résolution (117). Les performances semblent ainsi inégales entre les centres et les stratégies de réanalyse non standardisées.

Si les techniques de RQ-PCR nécessitent des quantités d'échantillons moindres et plus stables dans le temps, avec notamment la possibilité d'utiliser des prélèvements congelés (idéal dans les études rétrospectives), leur coût, les contraintes techniques

et humaines qu'elles engendrent, ainsi que leur moindre disponibilité, compliquent leur réalisation en routine. La démocratisation du NGS pourrait modifier les pratiques mais pose de nombreuses questions, outre son prix et sa disponibilité, c'est la quantité d'ADN à séquencer pour arriver au seuil de sensibilité théorique de 10^{-6} associé au défi que représente le traitement bio-informatique de toutes ces données qui limite sa place dans les essais cliniques.

Tableau 8 : Comparatif des différentes techniques utilisées dans l'études de la MRD-LLC, Rawstron, ASH 2018 (118).

	CMF	ASO-qPCR	NGS
Sensibilité : limites de détection/quantification	$10^{-4} - 10^{-5}$	$10^{-4} - 10^{-5}$	$10^{-5} - 10^{-6}$
Techniques générique/personnalisée	Générique	Personnalisée	Générique
Évaluation Pré-traitement	Préférable	Requise	Requise
Accessibilité	Centres Hospitaliers	Centre de référence	Centre privé/Centre de référence
Essais standardisés	ERIC	Euro-MRD	/
Validation	Accepté par l'EMA, validé dans plusieurs essais cliniques prospectifs et standardisés.		Non validé dans les essais cliniques
Qualités	Accessibilité Rapide	Analyse objective Réalisation sur ADN congelé	Analyse objective Sensibilité théorique élevée
Inconvénients	Echantillons "frais" Analyse subjective	Amorces spécifiques pour chaque patient	Prix Accessibilité Méthode non validée

Si ces techniques sont complémentaires pour l'évaluation de la MRD-LLC, la cytométrie en flux reste à l'heure actuelle la méthode la plus accessible, la moins coûteuse avec un délai de rendu de résultat plus rapide, rendant son utilisation en routine beaucoup plus répandue.

Pourtant, la démocratisation des thérapies ciblées dans la stratégie thérapeutique de la LLC et les modulations d'expression des marqueurs cellulaires qu'elles peuvent entraîner, ajoutent de nouveaux défis dans la stratégie de réanalyse et l'interprétation des résultats de cytométrie.

III. Impact des nouvelles thérapeutiques sur l'immunophénotypage des cellules de LLC

Bien que le phénotype des cellules tumorales de LLC soit prévisible et relativement stable par rapport à d'autres hémopathies, il peut néanmoins évoluer naturellement au cours de la maladie, que le patient soit traité ou non (119). À ces évolutions phénotypiques liées à la progression de la maladie s'ajoute des modulations phénotypiques liées aux thérapeutiques (120). En effet, l'avènement récent de l'immunothérapie et des thérapies ciblées nécessite une adaptation dans les pratiques du cytométriste puisqu'il a été montré que ces traitements pouvaient entraîner des modulations phénotypiques à la surface des cellules tumorales de LLC.

1. Thérapeutiques anti-CD20

L'immunothérapie anti-CD20 conduit à une perte d'expression du CD20 et une profonde déplétion lymphocytaire B circulante touchant à la fois les cellules LLC et les cellules B bénignes. Les cellules B matures bénignes sont par ailleurs plus sensibles au Rituximab que les cellules de LLC et absentes dans le sang périphérique pendant une période d'environ 9 mois. Ces observations autorisent l'identification d'échantillons de patients traités dans un délai de 9 mois après le traitement (121).

Plusieurs études ont étudié les mécanismes responsables de la perte d'expression du CD20 chez les patients atteints de LLC (122,123). Des essais réalisés in vivo avant et après ajout de Rituximab montrent que, lorsque les cellules sont mélangées avec du Rituximab, elles deviennent négatives pour le CD20 à cause du « masquage » du CD20 par le Rituximab (Figure 23).

Ces résultats ont été vérifiés sur des échantillons de patients traités par Rituximab, où les cellules de LLC étaient identifiées par le CD19 mais négatives pour le CD20. Tous les échantillons avaient été testés positifs pour le CD20 avant traitement (123).

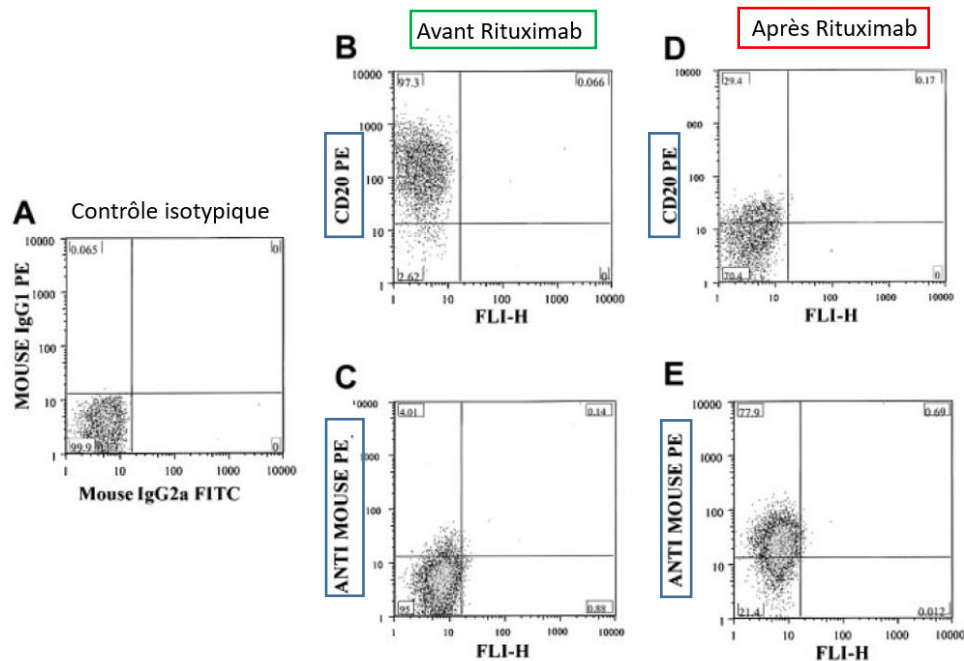


Figure 23 : Détection ex vivo du CD20 et du Rituximab à la surface des cellules de LLC, Jilani et al. (123).

La figure illustre la perte d'expression du CD20 (D) à la surface des cellules de LLC sur des essais réalisés ex vivo avant et après ajout de Rituximab. Le CD20 était détecté dans la fenêtre des lymphocytes avant ajout de Rituximab (B). Les histogrammes (C) et (E) visualisent la fixation des Immunoglobulines de souris dirigées contre le Rituximab avant et après ajout de la molécule. L'histogramme (E) illustre ainsi la fixation du Rituximab à la surface des cellules de LLC. L'histogramme (A) représente la fluorescence non spécifique observée avec les témoins isotypiques.

Néanmoins, Jilani montre ensuite que pour la majorité des patients traités de l'étude, la perte d'expression du CD20 semble plus liée à une immunomodulation (« *down modulation* ») qu'à un masquage du CD20 par le Rituximab. La perte de positivité du CD20 et du Rituximab à la surface des cellules de LLC étant observée après ajout de plasma, cela suggère la présence de composants plasmatiques capables d'activer une voie de signalisation conduisant à la sous expression du CD20 et à la perte de liaison du Rituximab (123,124).

On retrouve une plus forte intensité d'expression du Rituximab et du CD20 en intracytoplasmique qu'en surface, suggérant que la perte d'expression du CD20 observée en surface soit liée en partie à une internalisation (Figure 24).

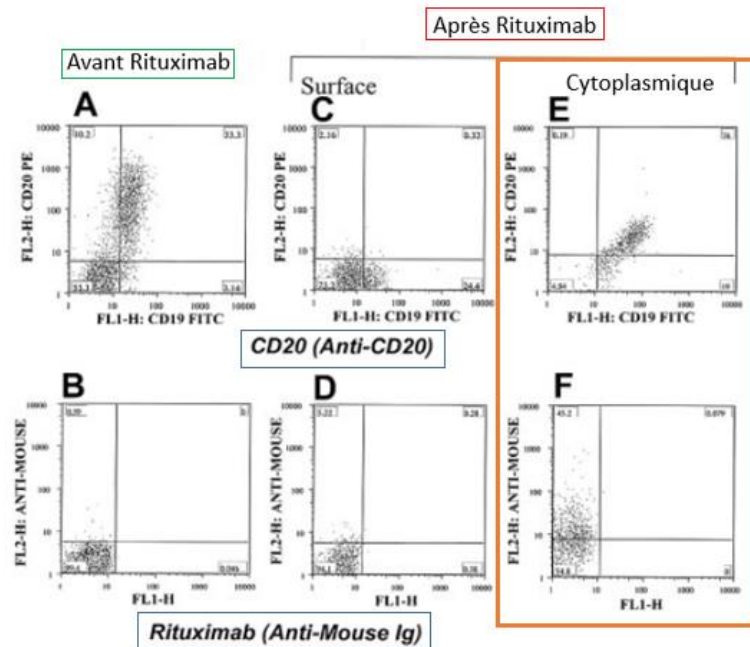


Figure 24 : Internalisation du CD20 et du Rituximab au cours d'un traitement par Rituximab, Jilani et al. (123).

Avant traitement, les cellules de LLC sont positives pour le CD20 (A) et négatives pour le Rituximab (B). À 24 heures de l'initiation du traitement, on observe une négativation de l'expression du CD20 en surface (C) et une absence de Rituximab en surface (D) tandis que les histogrammes (E) et (F) illustrent l'expression intracellulaire du CD20 et du Rituximab dans ces cellules de LLC, confirmant l'internalisation des complexes CD20/Rituximab en cas de traitement par Rituximab.

On sait aujourd'hui que ce phénomène d'internalisation du CD20 est la conséquence de la phagocytose induite par la fixation du Rituximab sur les récepteurs FcγRIIb des cellules B (125).

Néanmoins, les mécanismes sont complexes et l'internalisation n'explique pas à elle seule la perte d'expression du CD20 à la surface des LLC. En effet, dans l'étude de Jilani, pour la majorité des cellules de LLC traitées, le CD20 et le Rituximab n'étaient pas exprimés en intracytoplasmique, la perte d'expression du CD20 en surface n'était donc pas liée dans ce cas à un phénomène d'internalisation. Une modulation d'expression de l'ARNm du CD20 par le Rituximab pourrait également être impliquée

dans la perte d'expression du CD20. En revanche, l'hypothèse de l'émergence de clones CD20 négatif semble peu probable (124).

L'utilisation du CD20 dans le panel de MRD-LLC nécessite ainsi de prendre en compte systématiquement le traitement du patient dans la stratégie de réanalyse des données de CMF afin d'adapter le fenêtrage de la population cible. La figure 25 illustre un exemple de perte d'expression du CD20 chez un patient traité par ICT + Rituximab.

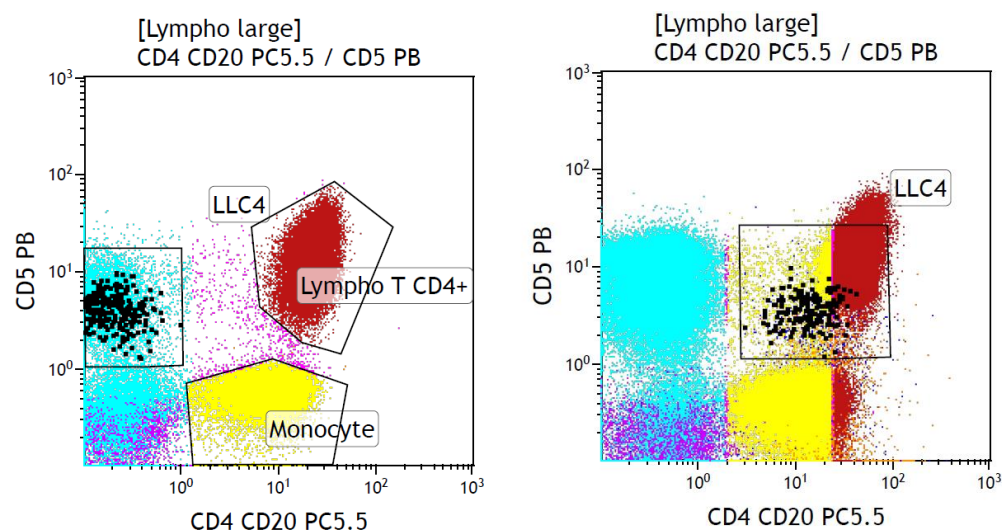


Figure 25 : Histogrammes bi-paramétriques d'échantillons de LLC traitées (données du CH de Valenciennes).

La population LLC est colorisée en noire. Les autres populations correspondent aux lymphocytes T CD4+ (rouge), lymphocytes T CD8+ (turquoise) et monocytes (jaune). Sur l'histogramme de droite, le patient n'a pas reçu de thérapeutique anti-CD20. Sur l'histogramme de gauche, le patient a bénéficié d'une cure récente de FCR se traduisant en CMF par une perte d'expression du CD20 à la surface des cellules de LLC.

Une perte d'expression du CD20 a également été observée avec les autres thérapeutiques anti-CD20 tels que l'Obinutuzumab, anti-CD20 de classe 2 utilisé au CH de Valenciennes. Cependant, dans le cas de Obinutuzumab, la liaison de l'immunoglobuline au FcγRIIb n'entraînerait pas l'internalisation du CD20, comme décrit avec le Rituximab (126).

À côté de la perte d'expression du CD20, les profils d'expression des marqueurs CD81, CD22 et CD5, également utilisés pour l'identification des cellules de LLC, ne semblent pas affectés par un traitement par Rituximab (127).

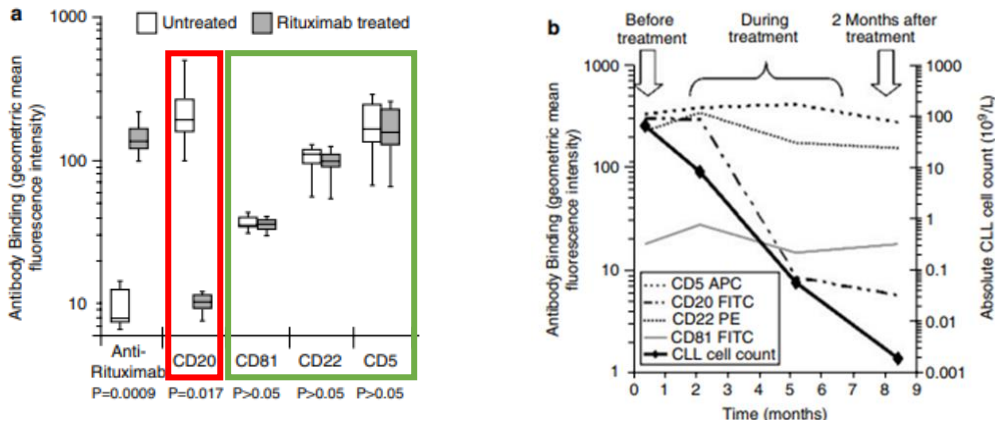


Figure 26 : Profil d'expression des différents marqueurs utilisés dans le suivi de la LLC chez des patients traités par Rituximab, Rawstron et al. (127).

Le graphique (a) illustre les intensités moyennes de fluorescence (MFI) à la surface des cellules de LLC pour les marqueurs CD20, CD81, CD22 et CD5. Les MFI correspondant aux marqueurs CD81, CD22 et CD5 sont stables sous traitement, tandis qu'une perte d'expression du CD20 est observée après traitement. Le graphique (b) montre une décroissance rapide de l'expression du CD20 dès le deuxième mois de traitement.

En revanche, le Rituximab serait responsable d'une perte d'expression du CD19 par les lymphocytes B « normaux ». Cette diminution rapide d'expression du CD19 n'est pas liée à une éventuelle lymphopénie B puisqu'elle n'est pas associée à une mort cellulaire (128). Elle s'accompagne par ailleurs d'une augmentation relative de l'expression de CD19 intracellulaire. Les mécanismes sont complexes et non entièrement élucidés, mais la perte du CD19 en surface par les cellules B serait également dépendante du fragment Fc des IgG, et nécessiterait la présence de cellules riches en FcγR tels que les monocytes qui exprimeraient le CD19 à leur surface suite à un traitement par Rituximab par un mécanisme de type trogocytose (échange de molécules membranaires entre deux cellules en contact). Ces observations faites sur des cellules B normales nécessiteraient d'être évaluées sur cellules de LLC.

La figure 27 illustre la perte d'expression du CD19 à la surface des cellules B au cours d'un traitement par Rituximab.

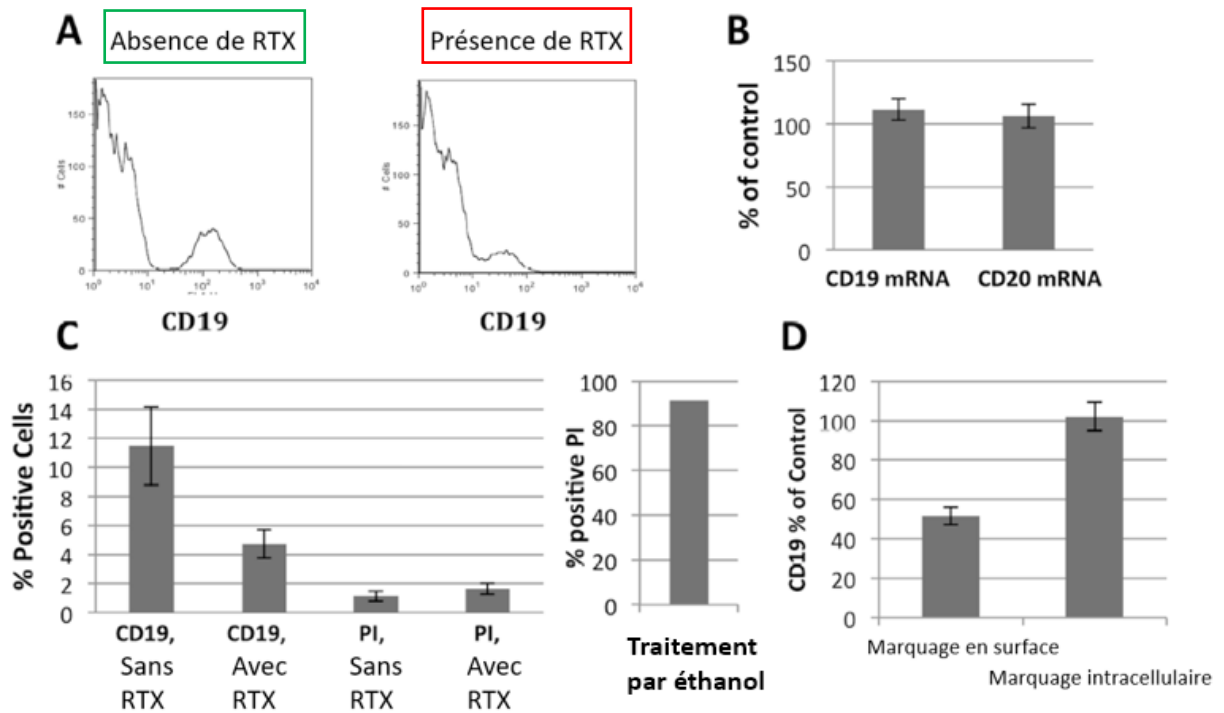


Figure 27 : Perte d'expression du CD19 sous Rituximab, Jones et al.(128).

PI = Iodure de propidium : marqueur de viabilité cellulaire / RTX = Rituximab.

(A) Histogramme de cytométrie représentant l'expression de CD19 à la surface de cellules mononucléées (MNC) avec et sans Rituximab, montrant la baisse d'expression du CD19 en cas d'exposition au Rituximab ; (B) Expression relative d'ARNm CD19 et CD20 par les MNC non modifiée après ajout de Rituximab ; (C) La viabilité cellulaire mesurée à l'aide d'iodure de propidium (avec comme témoin positif un traitement par éthanol fortement positif au PI) n'est pas modifiée en présence de Rituximab. (D) La perte d'expression de CD19 en surface s'accompagne d'une augmentation de l'expression de CD19 en intracellulaire. L'ensemble de ces données soutiennent que la perte d'expression de CD19 sous Rituximab n'est pas due à la mort cellulaire.

Dans notre expérience, des diminutions d'expression du CD19 ont également été observées sur des cellules de LLC au cours d'un traitement par ICT + Rituximab (Figure 28). Ces observations, si elles étaient vérifiées, pourraient limiter l'utilisation du CD19 comme Ac de gating dans la stratégie de réanalyse de la MRD-LLC en cas de traitement par Rituximab. La figure 28 illustre un exemple de diminution d'expression du CD19 observée sur des cellules de LLC après traitement par ICT + Rituximab.

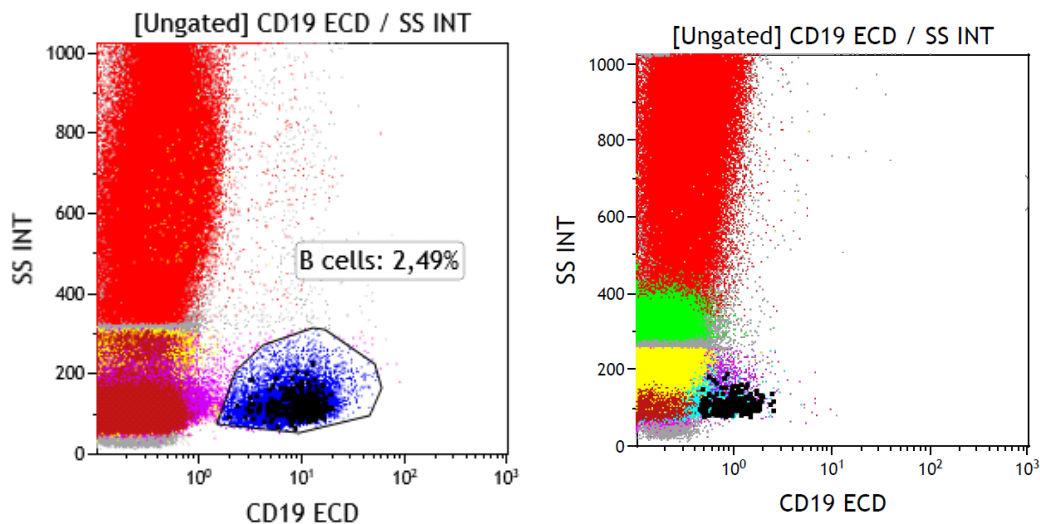


Figure 28 : Modulation de l'expression du CD19 sous Rituximab (données du CH de Valenciennes).

La population LLC résiduelle est colorisée en noire. Les lymphocytes B normaux sont colorisés en bleu. Sur l'histogramme de gauche, le patient n'a pas reçu de Rituximab (dilution de sang de LLC au diagnostic dans un échantillon de sang normal). Sur l'histogramme de droite, le patient a reçu un traitement par Rituximab, le profil d'expression du CD19 est diminué.

Si Böttcher a montré qu'indépendamment du panel utilisé (avec ou sans CD20), les niveaux de sensibilité de MRD-LLC obtenus en cytométrie en flux étaient équivalents à ceux obtenus en biologie moléculaire (ASO-qPCR) (102), Sayala et al. étaient plus critiques sur ce point, déconseillant l'utilisation du CD20 en raison de l'effet du Rituximab sur l'expression phénotypique des cellules B normales (129).

2. Inhibiteurs du BTK

Comme énoncé précédemment, les inhibiteurs de BTK comme l'Ibrutinib entraînent une redistribution des cellules tumorales situées dans les ganglions lymphatiques vers la circulation sanguine, à l'origine de résultats de MRD positives.

L'étude de l'index de prolifération cellulaire, à l'aide de l'expression du marqueur Ki67, permet d'expliquer pourquoi la lymphocytose transitoire entraînée par l'Ibrutinib n'est pas pour autant associée à une prolifération des cellules de LLC (130). Il est observé qu'après deux semaines de traitement par Ibrutinib, l'expression du Ki67 par les cellules de LLC devient inférieure à 0.5% chez tous les patients, traduisant une forte diminution de la prolifération tumorale (Figure 29).

Le pic de lymphocytose périphérique observé une semaine après l'initiation du traitement se situe au moment où l'index de prolifération des cellules de LLC diminue. Or, les panels actuels de cytométrie en flux utilisés en routine n'évaluent pas l'index de prolifération cellulaire : l'interprétation tient compte uniquement de la présence de cellules de LLC circulantes qu'elles soient à l'état quiescent ou qu'elles prolifèrent. Dans ce contexte, le résultat de MRD mesuré en cytométrie en flux est non informatif : un résultat de MRD positive n'étant pas forcément associé à une prolifération tumorale, comme en témoignent les courbes de survie.

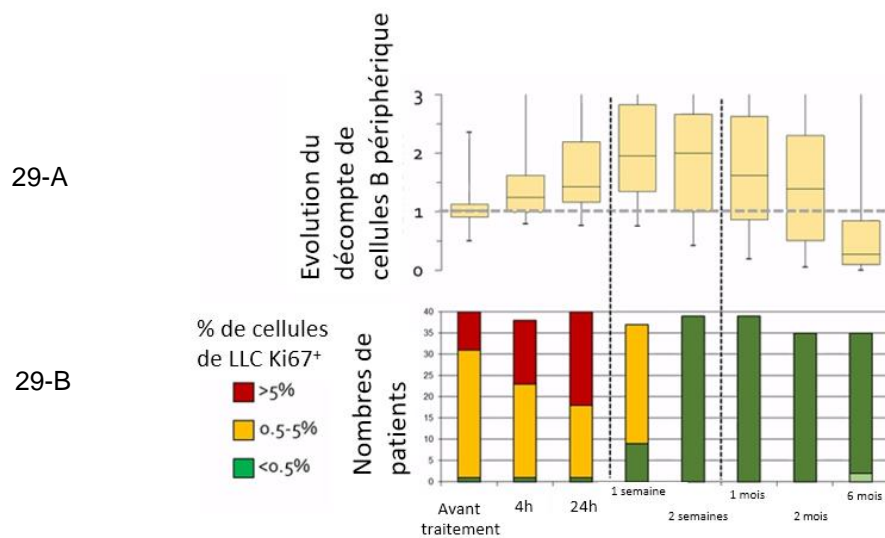


Figure 29 : Cinétique de l'expression du Ki67 par les cellules de LLC chez les patients traités par Ibrutinib, Rawstron, EHA 2018 (131).

La figure 29-A illustre la lymphocytose B transitoire observée après l'instauration d'un traitement par Ibrutinib., avec une redistribution des cellules tumorales des ganglions lymphatiques vers la circulation sanguine.

La figure 29-B représente l'indice de prolifération cellulaire par l'étude du Ki67. Après deux semaines de traitement par Ibrutinib, l'expression du Ki67 par les cellules de LLC devient inférieure à 0.5% chez tous les patients, traduisant une forte diminution de la prolifération tumorale.

Néanmoins, de nombreuses combinaisons de thérapies ciblées associées aux chimiothérapies ou combinaisons *chemo-free* incluant l'Ibrutinib sont en cours d'étude actuellement. Dans ces études la MRD est utilisée comme critère intermédiaire à la survie.

Il est donc important de connaître l'impact de ces thérapeutiques sur l'immunophénotype des cellules de LLC. Ainsi, à côté de la diminution de l'index de prolifération tumorale, il a été observé une modulation d'expression de plusieurs marqueurs associés à la prolifération : CD23, CD38, CD49d, IRF4 et CD5. La diminution d'expression du CD23 observée suit la même cinétique que l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 30).

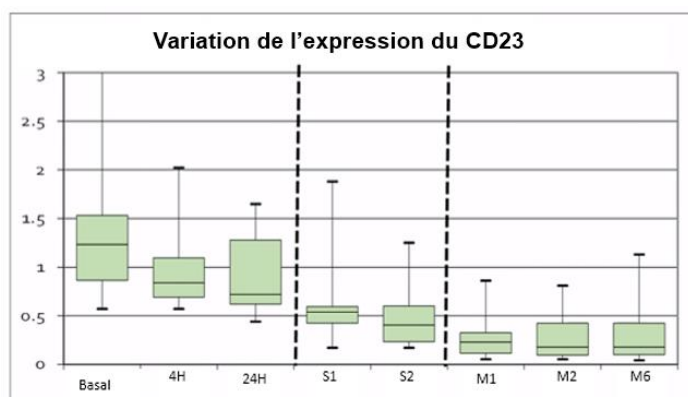


Figure 30 : Profil d'expression relative du CD23 par les cellules de LLC au cours d'un traitement par Ibrutinib, Rawstron EHA 2018 (131).

Ce diagramme illustre la diminution significative de l'expression du CD23 à une et deux semaines de traitement, diminution qui persiste et se stabilise dans les 6 mois qui suivent le traitement.

À côté des marqueurs associés à la prolifération cellulaire, d'autres marqueurs utilisés dans la stratégie d'évaluation de la maladie résiduelle sont également impactés par une thérapeutique par Ibrutinib (Figures 31 et 32). Pour certains, l'impact semble modéré (diminution de l'index de fluorescence inférieure à 50%) : c'est le cas du CD5, CD19, CD43. Pour d'autres, comme le CD81 et le CD79b, elle semble non significative. Elle est en revanche importante pour d'autres anticorps utilisés dans la stratégie de gating comme le CD20 ou le CD22 (131).

Le CD200, plus récemment intégré dans le panel MRD-LLC 8 couleurs proposé par le groupe FILO (132), est également impacté par ces thérapeutiques : ce point devra être considéré si le CD200 est inclus dans le panel.

Les figures 31 et 32 illustrent les différences d'index de fluorescence observées au cours d'un traitement par Ibrutinib pour ces différents marqueurs.

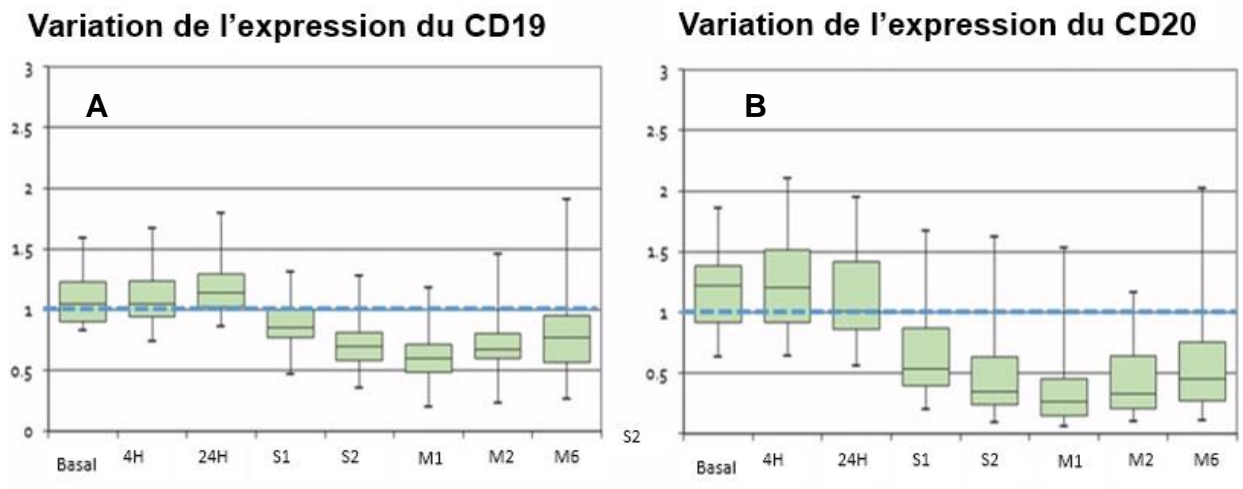


Figure 31 : Profils d'expression relative du CD19 et du CD20 par les cellules de LLC au cours d'un traitement par Ibrutinib, données de l'essai ICI-CLE, Rawstron EHA 2018 (131).

Les figures A et B illustrent la diminution modérée de l'expression du CD19 et la diminution forte de l'expression du CD20.

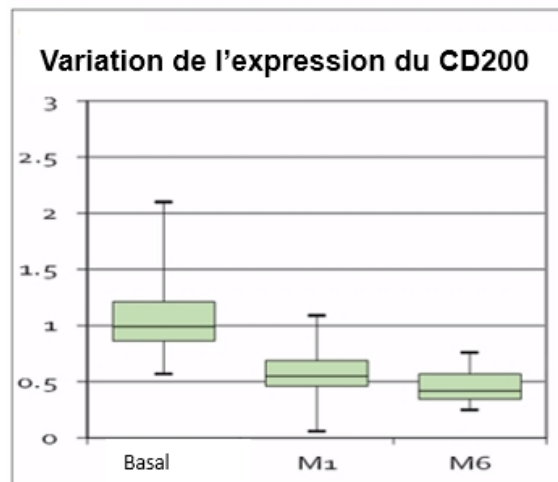


Figure 32 : Profil d'expression du CD200 par les cellules de LLC au cours d'un traitement par Ibrutinib, Rawstron EHA 2018. (131).

Illustration de la diminution de l'expression du CD200 à 1 mois et 6 mois de traitement par Ibrutinib, par rapport au niveau de base avant traitement.

Ces modulations d'expression sous Ibrutinib devront donc être considérées lors de la réanalyse des données afin d'adapter la stratégie de fenêtrage et ne pas fausser le calcul de la MRD.

3. Inhibiteur de BCL-2

La modulation d'expression à la surface des cellules de LLC des différents marqueurs étudiés en CMF n'a été que très peu étudiée chez les patients traités par inhibiteurs de BCL2. En 2018, Rawstron a néanmoins décrit une diminution, par les cellules de LLC, de l'expression du CD19 et de l'HLA-DR pouvant être associée à un traitement par Vénétoclax. Le profil d'expression des autres marqueurs étudiés (CD5, CD81, ROR1, CD20, CD79b et CD43) semble peu impacté par le traitement par Vénétoclax, ces marqueurs restant discriminants pour séparer les différentes populations cellulaires (131).

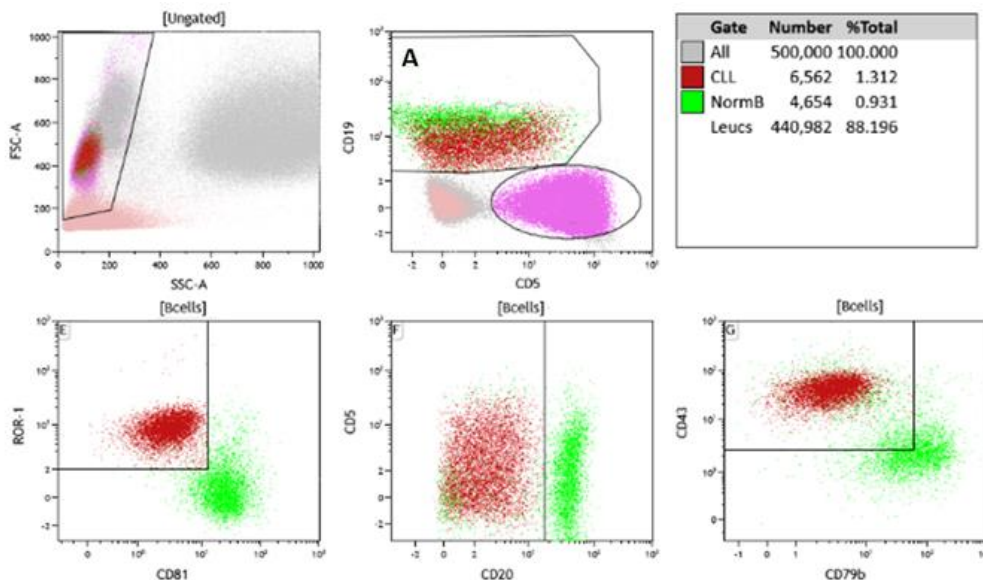


Figure 33 : Expression de différents marqueurs de surfaces de la LLC sous Vénétoclax, Rawstron EHA 2018. (131)

Ces histogrammes obtenus en cytométrie en flux illustrent l'expression de différents marqueurs utilisés dans l'analyse de la maladie résiduelle au cours d'un traitement par Vénétoclax. Sont représentées les expressions des marqueurs CD5, CD19, CD81, ROR1, CD20, CD79b et CD43 à la surface des lymphocytes T CD5+ CD19- (population en rose), des lymphocytes B normaux (en vert) et des cellules de LLC (en rouge). L'histogramme (A) illustre la diminution d'expression du CD19 par la population LLC par rapport à la population B normale.

Il convient donc de rester prudent dans la stratégie de fenêtrage des différentes populations cellulaires en CMF chez les patients traités par Vénétoclax.

4. Reconstitution lymphocytaire après thérapeutique agressive

Le CD5 est un marqueur très important pour l'identification des cellules de LLC au diagnostic et au moment du suivi. En effet, si les cellules de LLC coexpriment très majoritairement le CD5 et le CD19, le pourcentage de cellules B normales exprimant le CD5 est classiquement inférieur à 30% en situation physiologique (133). En revanche, dans certaines situations réactionnelles après thérapeutique intensive, le niveau d'expression du CD5 à la surface des cellules B normales peut atteindre des taux supérieurs à 90% (134). De façon semblable, une surexpression de l'expression du CD43 a également été observée dans ce contexte. La figure 31 illustre les variations d'expression du CD5 à la surface des cellules B après thérapie myéloablative.

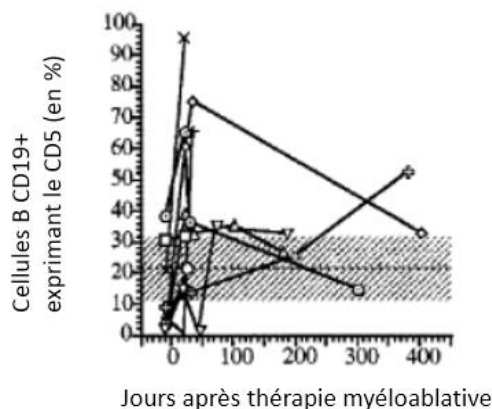


Figure 34 : Pourcentage de cellules B CD19+ exprimant le CD5 après thérapeutique agressive, Bomberger et al (134).

Durant les premières semaines suivant une thérapeutique agressive, le nombre de cellules B « normales » exprimant le CD5 augmente de manière significative, pouvant fausser l'identification d'éventuelles cellules de LLC résiduelles.

Parallèlement, à un stade précoce après traitement, des déséquilibres d'expression des chaînes légères κ et λ peuvent être observés à la surface des cellules B. En effet, en raison de la profonde lymphopénie B, la présence d'une population B réactionnelle oligoclonale en faible proportion peut présenter un impact majeur sur le ratio κ/λ des Ig de surface.

Ainsi, une stratégie de dépistage rapide de MRD couplant l'étude de la coexpression du CD5/CD19 à l'expression des chaînes légères kappa et lambda semble inapplicable dans ce contexte. Seule une stratégie complète d'évaluation de la MRD en cytométrie en flux permettra de s'affranchir de résultats faussement positifs au seuil de 10^{-4} . En effet, l'expression des marqueurs B (CD22, CD79b) et l'expression du CD81 semblent stables sur les cellules B bénignes de régénération après traitement (119) ; l'utilisation d'un panel MRD complet 8-10 couleurs devrait ainsi permettre dans ce cas une identification fiable des cellules de LLC résiduelles.

5. Perspectives : traitement par CAR-T cells et autres immunothérapies

Les essais cliniques utilisant des CAR-T cells vont compliquer l'interprétation des données de MRD en cytométrie en flux. En effet, la majorité des CAR-T cells utilisées dans la LLC ciblent le CD19, antigène de surface utilisé dans la stratégie d'identification initiale des cellules de LLC en CMF.

Encore peu utilisées dans la LLC, les CAR-T cells anti-CD19 ont montré de bons résultats dans d'autres SLP-B comme les lymphomes diffus à grandes cellules (DLBCL). Leurs impacts éventuels sur les données de CMF ont ainsi pu être étudiés dans certaines études. En particulier, dans l'essai ZUMA-1 réalisé chez des patients atteints de DLBCL, une perte d'expression du CD19 a été observée chez environ 40% des patients en rechute après traitement par CAR-T cells anti-CD19 (73). Un effet similaire pourrait être observé chez des patients atteints de LLC traités par CAR-T cells anti-CD19. La question de l'utilisation du CD19 comme marqueur d'identification initiale dans la MRD-LLC devra se poser, à l'instar du CD38 pour les patients sous Daratumumab dans le myélome multiple.

De nouvelles cibles sont également à l'étude pour les CAR-T cells : anti-ROR1, anti-CD23, anti-Kappa, anti-Lambda, qui seront d'autant d'éléments à prendre en compte lors de l'étude de la MRD par CMF (75).

Enfin, l'utilisation de la MRD-LLC en CMF dans différents essais évaluant l'ajout de l'ibrutinib aux thérapies par CAR-T cells devrait compliquer davantage l'interprétation des données de cytométrie (79,135). Le travail de réanalyse nécessitera de tenir compte à la fois de l'effet de l'ibrutinib et de l'effet des CAR-T cells sur les marqueurs utilisés en cytométrie.

À côté des CAR-T cells, le développement d'autres Ac monoclonaux (anti-CD19, anti-CD23, anti-CD22, anti-CD79b) ou Ac bispécifiques (anti-CD3 et anti-CD19) pourrait également bouleverser les pratiques du cytométriste dans l'analyse de la MRD.

Parmi eux, le Tafasitamab est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD19 en cours d'essai chez des patients LLC réfractaires ou en rechute (136). De la même manière que ce qui a été observé pour le CD20 avec le Rituximab, il entraîne une perte d'expression du CD19, rendant impossible le suivi de la MRD LLC en cas de stratégie d'identification initiale ciblant uniquement ce marqueur (Figure 35).

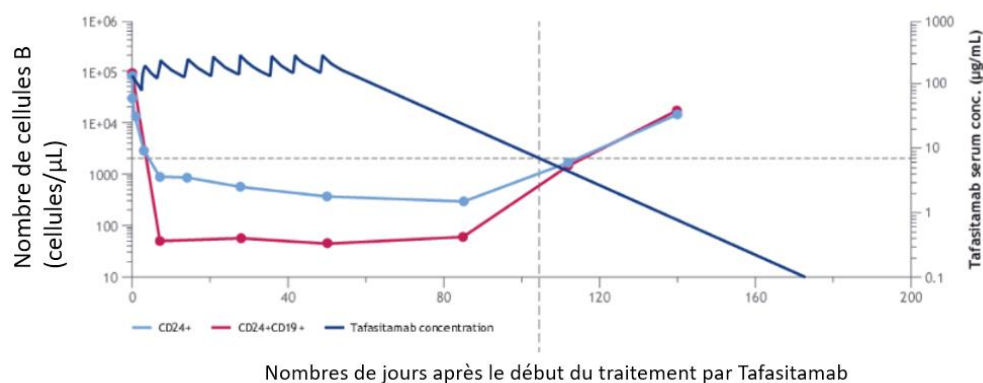


Figure 35 : Évaluation de l'expression du CD19 au cours d'un traitement par Tafasitamab, Boxhammer et al. (137).

Sur cette figure le taux de lymphocytes B CD24+ (bleu clair) est mesuré après initiation d'un traitement par Tafasitamab. Dès l'instauration du traitement, on retrouve une lymphopénie B significative représentée par la décroissance de la courbe bleu clair.

La décroissance plus marquée de la courbe rouge, représentant les lymphocytes B comarqués CD19+ CD24+ traduit la perte d'expression du CD19 à la surface des lymphocytes B résiduels, induite par le Tafasitamab.

Au-delà de 3 mois de traitement, lorsque la concentration sérique de Tafasitamab diminue en deçà de 7 µg/ml, le CD19 est de nouveau normalement exprimé à la surface des cellules B.

Compte tenu du nombre impressionnant d'anticorps monoclonaux actuellement en développement, (plus de 800 dont 88 en phase 3) nul doute que l'immunothérapie devrait continuer à prendre une place importante en clinique et dans la LLC en particulier (50).

Dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle en cytométrie en flux, le biologiste devra ainsi adapter ses pratiques et sa stratégie de réanalyse pour s'affranchir au mieux de l'interférence de ces thérapeutiques sur les données de CMF.

IV- Axes d'optimisation de la MRD-LLC en cytométrie en flux

Si les techniques de MRD-LLC ont largement évolué depuis plus de 15 ans, des améliorations restent nécessaires afin d'optimiser les performances des protocoles actuels, de standardiser les résultats inter-sites et de s'adapter aux contraintes engendrées par l'impact des thérapeutiques ciblées sur les données de cytométrie.

1. Aspects préanalytiques

La stabilité pré-analytique de la technique de MRD-LLC est relativement correcte avec un délai maximal recommandé de traitement des échantillons de 48h après le prélèvement. Néanmoins, si ce délai est facilement respecté lorsque le service clinique est situé sur le même site que le laboratoire de cytométrie, il s'avère parfois plus difficile à atteindre si le laboratoire traite les échantillons provenant de plusieurs sites parfois éloignés géographiquement. Au-delà de 48h la stabilité n'est pas assurée et une perte cellulaire peut être observée, touchant à la fois les cellules leucémiques de LLC et les autres éléments leucocytaires, avec potentiellement une diminution des performances de la technique. Il est ainsi important que les cliniciens aient connaissance des horaires du laboratoire de cytométrie (secteur spécialisé fonctionnant généralement du lundi au vendredi en période de jour) et en tiennent compte en évitant notamment les prélèvements acheminés tardivement les vendredis soir ou veilles de jour férié. Une optimisation du circuit de transport et de réception des tubes peut également être réalisée ainsi qu'une adaptation des horaires du secteur de cytométrie les vendredis ou veilles de jour férié

2. Protocole technique

A. Standardisation du protocole

En 2007, Rawstron et al ont proposé la mise en place d'un protocole standardisé incluant une étape de lyse macrovolume utilisant une lyse douce au Chlorure d'ammonium pendant 10 minutes, une centrifugation des leucocytes 5 minutes à 300g, deux lavages en solution de PBS (tampon phosphate salin) enrichi en sérum albumine bovine (SAB), une étape de marquage par un volume d'Ac préalablement titré d'une suspension cellulaire de 1.10^6 leucocytes pendant 20 minutes à 4°C à l'obscurité. Deux étapes de lavage sont ensuite requises avant remise en suspension (108).

Il a ainsi pu être montré qu'en analysant le même échantillon, au même moment dans différents centres, les variations observées dans le traitement de l'échantillon n'ajoutaient pas de variations significatives supplémentaires à celles observées dans l'analyse des données. En pratique, même si les protocoles utilisés entre les laboratoires de cytométrie sont relativement proches, des variations peuvent persister, notamment dans le type de lyse utilisé, le volume d'anticorps choisi pour le marquage, les temps d'incubation et les protocoles de centrifugation.

B. Adaptation du protocole et stratégies de marquage alternative

Si une standardisation du protocole initial semble nécessaire, des adaptations peuvent s'avérer utiles pour tenter de s'affranchir de l'impact de certaines thérapeutiques et mieux interpréter les données de cytométrie.

a) Étape de perméabilisation

La perméabilisation des cellules est une étape nécessaire en cytométrie lorsque l'antigène étudié est présent au niveau intracellulaire et non exprimé à la surface des cellules. Cette étape permet aux anticorps utilisés pour le marquage de se fixer à l'antigène cible.

Concernant la LLC, l'étape de perméabilisation est rarement utilisée en routine. Elle peut être intéressante pour l'étude de l'expression de ZAP-70, marqueur à visé pronostique pouvant être exprimé au niveau intracytoplasmique dans les cellules de LLC (138). Mais la faible reproductibilité inter-laboratoires de l'expression intracellulaire de ZAP-70 a limité son utilisation en pratique courante.

Cependant, l'étude intracellulaire de ces marqueurs pourrait constituer une piste intéressante en cas d'immunothérapie conduisant à une internalisation de certains marqueurs. En effet, une perte d'expression voire une disparition de certains marqueurs de surface primordiaux dans la stratégie de gating des analyses de MRD LLC tel que le CD19 ou le CD20 a pu être observée après traitement par Rituximab (123,128). Une étape de perméabilisation préalable permettrait ainsi de mieux cibler les populations d'intérêt. Ces stratégies pourraient justifier l'utilisation d'anticorps intracytoplasmiques se liant à un épitope cytoplasmique comme l'anticorps monoclonal L26 dirigé contre un épitope intracellulaire du CD20 (139).

Ainsi, à l'heure du développement des immunothérapies (Ac monoclonaux, Ac bispécifiques, CAR-T cells ciblant des antigènes de surface), une étape de perméabilisation préalable permettrait peut-être de mieux cibler des antigènes masqués et/ou internalisés.

Ces effets sont néanmoins à nuancer. En effet, si Jilani et al. ont montré qu'une internalisation du CD20 après traitement par Rituximab pouvait être observée chez certains patients atteints de LLC, beaucoup de cellules de LLC n'exprimaient pas le CD20 en intracytoplasmique. L'internalisation du CD20 n'explique donc que partiellement la perte d'expression du CD20 en surface (123). De plus, la perméabilisation de l'échantillon nécessite une étape de pré-traitement supplémentaire et peut entraîner quelques difficultés pour l'analyse des données en CMF (dommages cellulaires, augmentation de l'autofluorescence des cellules,

marquages de sites non spécifiques, interférences avec d'autres antigènes de surface), compliquant l'analyse des données de MRD (140).

b) Utilisation de nanocorps

Les nanocorps sont des dérivés d'anticorps comprenant une unique chaîne lourde, présents naturellement chez les camélidés, et composés de fragments d'anticorps à domaine variable unique (VHH) qui exposent une longue région 3 (CDR3) déterminante pour la complémentarité de la liaison du paratope à l'antigène, permettant la reconnaissance d'épitopes cryptiques (141).

Leur faible poids moléculaire leur offre une bien meilleure biodisponibilité. Cette technologie prometteuse pourrait ainsi résoudre en partie les problèmes des anticorps monoclonaux « classiques ».

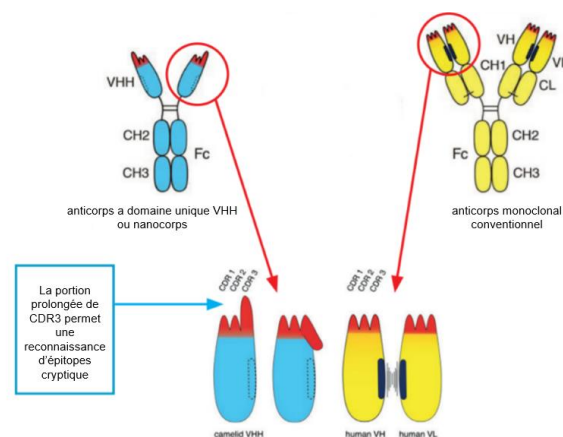


Figure 36 : Principe des anticorps à chaînes lourdes de camélidés, Bannas et al (141).

Si leur utilisation reste principalement à visée thérapeutique, comme le développement récent de nanocorps anti-CD19 dans les hémopathies B (142), une utilisation détournée en cytométrie en flux est possible. En effet, leur capacité à reconnaître des épitopes masqués pourrait permettre de contourner le problème de « masquage » d'antigènes d'intérêt induit par certaines immunothérapies dirigées contre des marqueurs de surface comme le CD19 ou le CD20.

Comme précisé précédemment, certains marqueurs utilisés en cytométrie en flux dans la stratégie d'identification des cellules de LLC peuvent être masqués dans le cadre d'immunothérapies. Des interférences du même type ont été observées dans le suivi en cytométrie en flux des patients atteints de Myélome Multiple traités par Daratumumab, Ac monoclonal anti-CD38. Chez ces patients, une stratégie de marquage alternatif utilisant le Jk36, un nanocorps anti-CD38, permet une détection fiable du CD38 chez des patients traités par thérapeutique anti-CD38 (143). De la même manière, le développement de différentes thérapeutiques anti-CD19 (Ac monoclonal anti-CD19, Ac bispécifique, CAR-T cells) et leurs interférences sur les données de cytométrie en flux pourraient conduire à une utilisation de ces nanocorps pour l'identification des cellules de LLC en CMF.

Ces stratégies restent néanmoins difficiles à mettre en place et ne permettent pas de s'affranchir complètement de l'interférence des immunothérapies sur les données de cytométrie. En effet, la perte d'expression de certains marqueurs résulte d'un mécanisme mixte impliquant un masquage de l'épitope par l'Ac monoclonal utilisé en thérapeutique, mais aussi d'une régulation négative de la synthèse de la protéine. La stratégie de gating initiale ne pourra donc pas reposer dans ce cas uniquement sur l'antigène ciblé par ces thérapeutiques.

c) Evaluation de l'index de prolifération cellulaire

L'utilisation combinée de la maladie résiduelle à l'évaluation de la prolifération des cellules de LLC pourrait permettre de mieux évaluer l'efficacité thérapeutique.

Une estimation de l'index de prolifération cellulaire peut être réalisée en incorporant du bromodésoxyuridine (BrdU) ou du Ki67.

Ki67 est un marqueur de la prolifération cellulaire bien connu depuis de nombreuses années. Son niveau d'expression varie en fonction du cycle cellulaire, il augmente dans le noyau lors des phases G1, S, G2 du cycle cellulaire et lors de la mitose et on

ne le retrouve pas en phase G0 chez les cellules quiescentes (144). Ki 67 est donc généralement largement surexprimé dans les cellules cancéreuses.

Il peut être utilisé dans le domaine de l'hématologie afin d'évaluer la prolifération des cellules de LLC sous certaines thérapies. Ainsi, nous avons déjà vu précédemment que si la MRD était rarement indétectable chez les patients sous Ibrutinib, l'expression de Ki67 était faible voire presque nulle après plusieurs semaines de traitement, pouvant expliquer l'efficacité de l'Ibrutinib pour éradiquer les cellules de LLC en division et les durées de survie prolongée des patients (130).

Inversement, pour le Vénétoclax, s'il permet d'obtenir une MRD indétectable chez de nombreux patients grâce à son mode d'action pro apoptotique, il ne s'accompagne pas d'une diminution de l'expression du Ki67 dans les cellules de LLC (145). Ces observations peuvent justifier la nécessité d'associer ces différentes thérapies afin d'éradiquer les différentes sous populations de cellules de LLC.

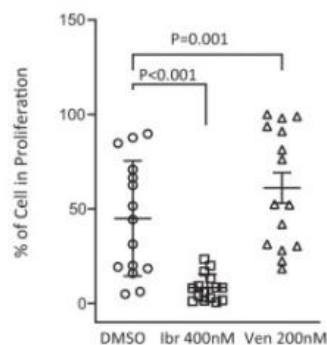


Figure 37 : Effet de l'Ibrutinib et du Vénétoclax sur la prolifération cellulaire dans la LLC, Lu et al (145).

DMSO = Diméthylsulfoxyde (groupe témoin) / Ibr = Ibrutinib / Ven = Vénétoclax

L'étude de la prolifération cellulaire permet de mieux comprendre les mécanismes d'action des différentes thérapies. Après 7 jours de traitement, l'Ibrutinib induit une forte diminution de la prolifération cellulaire, contrairement au Vénétoclax.

Si l'étude de l'index de prolifération est utile dans le domaine de la recherche afin de permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des différents traitements, son utilisation en routine pourrait apporter plus de précisions sur l'efficacité d'un traitement et aiderait à l'interprétation des données de MRD.

Cette approche reste cependant difficile à mettre en place en pratique : un grand nombre d'évènements étant nécessaire pour suivre la variation du pourcentage de prolifération de ces cellules.

3. Panels

A. Choix des marqueurs

- *Standardisation dans le choix des anticorps d'intérêt :*

Un travail d'harmonisation a été réalisé dans les pratiques européennes mais une récente étude de pratique au niveau national révèle encore de grandes disparités inter-sites (16).

Au niveau européen, en 2007 Rawstron et al. ont proposé un panel 4 couleurs standardisé (Figure 20, panel ERIC 5 tubes, 4 couleurs) présentant de très bonnes performances (Sensibilité de 98.8% et Spécificité de 91.1% au seuil de 10^{-4}) et une très faible variabilité inter-laboratoires (108). Ce panel présentait comme principal inconvénient de nécessiter plusieurs tubes, avec un temps d'acquisition plus long, un nombre d'évènements acquis parfois insuffisant dans chacun des tubes, ainsi qu'une consommation en réactifs plus élevée. En 2013 le groupe ERIC (*European Research Initiative on CLL*) a émis des recommandations sur un protocole harmonisé de cytométrie en flux multiparamétrique 6 couleurs efficace au seuil de 10^{-4} (Figure 20, panel 2 tubes, 6 couleurs) afin de limiter le coût, réduire la quantité d'échantillon nécessaire, ainsi que le temps d'acquisition et de réanalyse : protocole largement implémenté dans les différents centres et constamment optimisé avec la généralisation des cytomètres de très haute résolution (133). Ce panel a néanmoins été validé uniquement dans le cadre de protocoles d'ICT, incluant un Ac monoclonal (Rituximab ou alemtuzumab) ou dans un contexte d'auto ou d'allo-greffe.

L'étude de la MRD avec ce protocole 6 couleurs n'a pas été évaluée dans le cadre des nouvelles thérapeutiques ciblées (Inhibiteurs de BTK ou Vénétoclax notamment). En 2016, avec l'avènement des cytomètres 8-10 couleurs, ce même groupe ERIC proposait une combinaison de 6 anticorps recommandés dans un seul tube (CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b et CD81) permettant d'atteindre une limite de détection de 10^{-5} , panel applicable quelles que soient les spécificités réactifs/instruments et suffisamment flexible pour ajouter et valider de nouveaux marqueurs d'intérêt (111). L'utilisation d'un seul tube permet pour un même niveau de sensibilité et de spécificité d'améliorer la limite de détection de la technique en augmentant le nombre d'évènements acquis. L'ajout du CD22 au CD20 présent dans le panel semblait redondant et était sans impact sur la capacité de la technique à détecter les cellules de LLC en cas d'expression typique de marqueurs comme le CD5, CD79b, CD43 et CD81 (111).

En 2018, les groupes de travaux européens ERIC et ESCCA (*European Society for Clinical Cell Analysis*), ont étudié les pratiques dans 150 laboratoires européens permettant d'établir une liste de 14 antigènes « requis » ou « recommandés » dans la démarche diagnostique de la LLC afin d'améliorer la reproductibilité inter-centres (20). À l'issue de ce travail, les marqueurs « requis » au diagnostic incluaient le CD19, le CD5, le CD20, le CD23, kappa et lambda, tandis que les marqueurs recommandés, dans le cadre notamment d'un diagnostic différentiel étaient le CD43, CD79b, CD81, CD200, CD10 et ROR1. Cependant ces antigènes n'ont pas tous été évalués dans le cadre d'études prospectives. Par ailleurs, ces recommandations s'appliquent pour le diagnostic de la LLC et n'ont pas été évaluées en suivi dans le cadre de la MRD.

Au niveau national, un groupe de travail MRD-LLC a été créé au sein de l'Association Française de Cytométrie. Certains protocoles 8-10 couleurs ont été proposés à l'échelle nationale (groupe FILO et journées pratiques de formation en cytométrie par l'association française de cytométrie : JPFC-AFC). En 2014, Letestu et al. proposait ainsi un panel 8 couleurs, 9 marqueurs (CD20, CD45, CD81, CD22+CD79b, CD5, CD19, CD200, CD43) permettant d'atteindre une limite de détection de l'ordre de 10^{-6} équivalente aux techniques de biologie moléculaire. Néanmoins, une enquête nationale réalisée en 2019 sur la MRD-LLC et l'étude des pratiques dans les centres de cytométrie en France, révèle que près de la moitié des centres français n'atteignent pas la limite de sensibilité requise de 0.01% définie par l'iwCLL (146).

La majorité des centres français disposent actuellement de cytomètres 8-10 couleurs permettant de mettre en œuvre des techniques de MRD de très haute sensibilité. Actuellement, les différents centres utilisent généralement leurs propres panels « maison » et si les marqueurs ciblant le CD5, le CD19 et le CD20 sont presque toujours utilisés, le choix des autres marqueurs dépendra principalement des habitudes du laboratoire et de leur disponibilité/coût. Un travail de standardisation des panels semble nécessaire au niveau national. La création du groupe MRD-LLC au sein de l'AFC devrait permettre la mise en œuvre, au sein des centres français, de techniques de MRD plus performantes, développées et validées par le groupe MRD-LLC du FILO.

- *Ajout d'Anticorps d'exclusion :*

À côté des Ac d'intérêt permettant l'identification des cellules de LLC (CD19, CD20, CD5, CD43, CD79b, CD81...), les panels utilisés dans la MRD-LLC peuvent inclure des Ac dirigés contre des marqueurs d'exclusion. Ces Ac d'exclusion permettent de limiter la contamination cellulaire par d'autres populations leucocytaires comme les lymphocytes T : évènements identifiés dans la fenêtre CD19 mais fixant du CD3.

En effet, la contamination peut augmenter le bruit de fond et impacter sur la limite de détection de la technique.

Si la contamination dans la MRD-LLC a été initialement décrite avec les cellules T (le CD5 utilisé dans le diagnostic étant un marqueur pan T), elle peut également être observée avec les monocytes, et de façon moindre avec les cellules NK. C'est ainsi que certains panels utilisés dans les essais cliniques (protocole RICAC-PMM /ICLL07 GFAI) intègrent le CD3 et le CD14 afin de faciliter l'exclusion des lymphocytes T CD3+ et des monocytes CD14+ lors de l'analyse cytométrique (147,148). De façon alternative le CD56 peut être utilisé pour séparer les cellules NK (108). À noter que les polynucléaires basophiles riches en Fc γ récepteurs peuvent fixer de façon non spécifique des Ac de marquage et peuvent ainsi « contaminer » les fenêtres d'identification. Ces cellules sont classiquement CD123+ CD25+ et expriment les marqueurs myéloïdes CD13, CD33, CD11b. L'utilisation du CD33 comme marqueur d'exclusion permettrait de s'affranchir à la fois des monocytes CD33+ et des basophiles.

Cependant, à côté de la contamination, le nombre d'évènements acquis détermine la limite de détection de la technique. Avec le développement de techniques de MRD très sensibles (panels supérieurs à 6-8 couleurs), il a été montré que la limite de détection de la technique est déterminée essentiellement par le nombre d'éléments acquis : un nombre minimum de 500 000 évènements étant recommandé (108). En effet, pour atteindre une limite de sensibilité de 0.01%, et si la taille minimale de la population étudiée est de 50 éléments (seuil défini de quantification pour la MRD-LLC) une acquisition d'au moins 500 000 évènements sera nécessaire. Dans les essais réalisés (108,133), le niveau de contamination mesuré était inférieur à 0.01% indiquant que le facteur limitant était ici le nombre d'éléments acquis.

L'ajout de CD3 dans le panel ne paraît donc pas indispensable si une acquisition sur 500 000 événements est réalisée, ce qui est généralement permis dans les stratégies actuelles utilisant un tube unique. L'utilisation de CD3 pourrait cependant s'avérer utile en cas de combinaisons ne contenant pas le CD81/CD43 dans le panel ou lorsque la limite de détection cible souhaitée se situe en dessous du seuil de 10^{-4} (111).

- *Place des autres marqueurs :*

En complément des marqueurs historiques « requis » pour l'identification des cellules de LLC, d'autres marqueurs peuvent présenter un intérêt en raison de leur spécificité et/ou leur stabilité sous traitement, permettant ainsi de contourner les problèmes d'immunomodulation induite par certaines thérapeutiques.

▪ CD22

Le CD20 est exprimé par les cellules B « normales » et les cellules de LLC, mais l'expression du CD20 par les cellules de LLC est généralement plus faible, permettant une bonne séparation des cellules de LLC des cellules B normales (133).

La problématique des immunothérapies par anti-CD20 dans le cadre de l'évaluation de la MRD par cytométrie en flux s'est donc rapidement posée. Dès 2006 Rawstron proposait un panel permettant de s'affranchir du CD20 chez les patients traités par Rituximab, en le remplaçant par le CD22, autre marqueur B dont l'expression ou l'accessibilité de l'anticorps n'est pas modifiée par les anti-CD20 (127). L'utilisation d'un panel adapté 4 couleurs combinant le CD22 au CD81, associés au CD5/CD19 par rapport au panel initial CD19/CD5/CD79b/CD20 permet ainsi une bonne séparation des cellules de LLC par rapport aux lymphocytes B matures et aux progéniteurs B (Figure 38), avec un niveau de sensibilité équivalent pour l'identification des cellules de LLC résiduelles, au seuil de 10^{-4} (127).

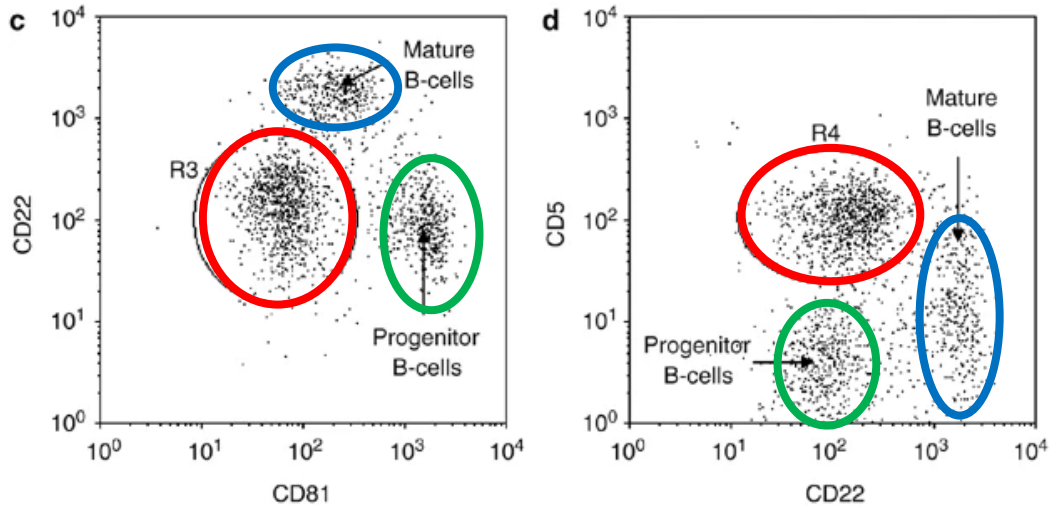


Figure 38 : Analyse de la combinaison CD81/CD22/CD19/CD5 pour la séparation des cellules de LLC des progéniteurs et lymphocytes B matures, Rawstron et al (127).

Sur ces histogrammes bi-paramétriques ciblés sur la population CD19+, sont représentées en rouge les cellules de LLC (CD22 faible CD81 faible CD5+) en bleu les lymphocytes B matures (CD22+ fort, CD81+, CD5 négatif ou faiblement positif) et en vert les progéniteurs B (CD22 faible, CD81 fort, CD5 négatif).

Cependant, l'expression du CD22, parfois franchement diminuée sur les cellules de LLC, a limité son utilisation comme marqueur de gating chez les patients traités par Rituximab. Il semble par ailleurs que l'utilisation du CD20 dans la stratégie de séparation des cellules de LLC n'affecte pas ou peu la sensibilité de la technique, y compris chez les patients traités par immunothérapie anti-CD20. En 2009 Böttcher avait ainsi montré que l'utilisation de panels incluant le CD20 chez des patients traités par ICT couplée au Rituximab permettait d'obtenir des résultats de MRD-LLC par RQ-PCR et en CMF sensiblement comparables à l'utilisation de panels sans CD20 (102).

- CD40

Le CD40 est un autre marqueur exprimé modérément par les lymphocytes B matures et par les cellules de LLC, et absent des autres sous-populations lymphoïdes (149). Il peut donc constituer une cible intéressante comme antigène de gating pour la constitution d'un panel MRD-LLC chez des patients traités par Rituximab ou par Ibrutinib, pour qui l'expression du CD19 à la surface des cellules de LLC est diminuée

sous traitement. Récemment, Goshaw a ainsi validé l'utilisation d'un anti-CD40 comme marqueur de gating, en remplacement des anti-CD19 et anti-CD20, pour la détection des cellules de LLC (150).

- CD24

Le CD24 est un autre antigène pouvant être utilisé pour l'identification des cellules B. Il présente l'inconvénient d'être également exprimé par les polynucléaires neutrophiles et les précurseurs myéloïdes. Ce manque de spécificité vis-à-vis des cellules B ne le positionne pas comme candidat privilégié pour la stratégie de gating, il a néanmoins déjà été étudié comme remplaçant potentiel au CD19 en cas d'évaluation de la MRD sous thérapie anti-CD19 (151).

- ROR1

Le récepteur tyrosine kinase-like « *orphan receptor-1* » (ROR1) est une glycoprotéine membranaire de surface exprimée durant l'embryogénèse jouant un rôle dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire (152). Chez l'adulte il est exprimé par les hématogones et les cellules de LLC (mais également par les cellules leucémiques de nombreux SLP-B).

Ces propriétés ont fait de ROR1 une cible thérapeutique intéressante dans la LLC : le Cirtuzumab, anticorps monoclonal anti ROR1, permet d'inhiber la voie de signalisation ROR1 et d'interrompre le processus d'activation des cellules leucémiques. Cet anticorps est actuellement en phase d'essai (153).

Mais son intérêt principal reste en cytométrie en flux où son utilisation comme marqueur positif des cellules de LLC ne cesse d'augmenter dans le diagnostic et lors du suivi de la MRD (154,155).

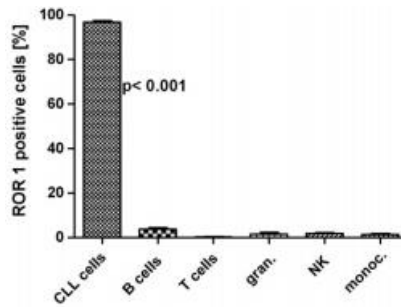


Figure 39 : Expression de ROR1 dans le sang par les cellules de LLC et les différentes cellules hématopoïétiques, Uhrmacher et al (156).

ROR1 est fortement exprimé par les cellules de LLC et est classiquement absent des autres populations leucocytaires matures circulantes, ce qui en fait un bon marqueur pour l'évaluation de la MRD LLC sur sang.

Contrairement au CD200, son expression n'est à priori pas modifiée en cas de traitement par ICT ni par l'Ibrutinib (131,155) ce qui pourrait favoriser son utilisation avec l'utilisation croissante des thérapies ciblées (Figure 40).

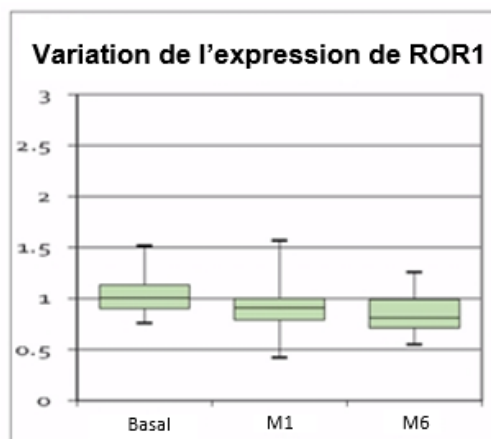


Figure 40 : Profil d'expression relative de ROR1 par les cellules de LLC au cours d'un traitement par Ibrutinib, Rawstron EHA 2018 (131).

Ce diagramme illustre la stabilité de l'expression de ROR1 à la surface des cellules de LLC à 1 mois et 6 mois de traitement par Ibrutinib.

En revanche, l'expression de ROR1 par les hématogones devra être prise en compte dans la MRD-LLC sur moelle osseuse (157).

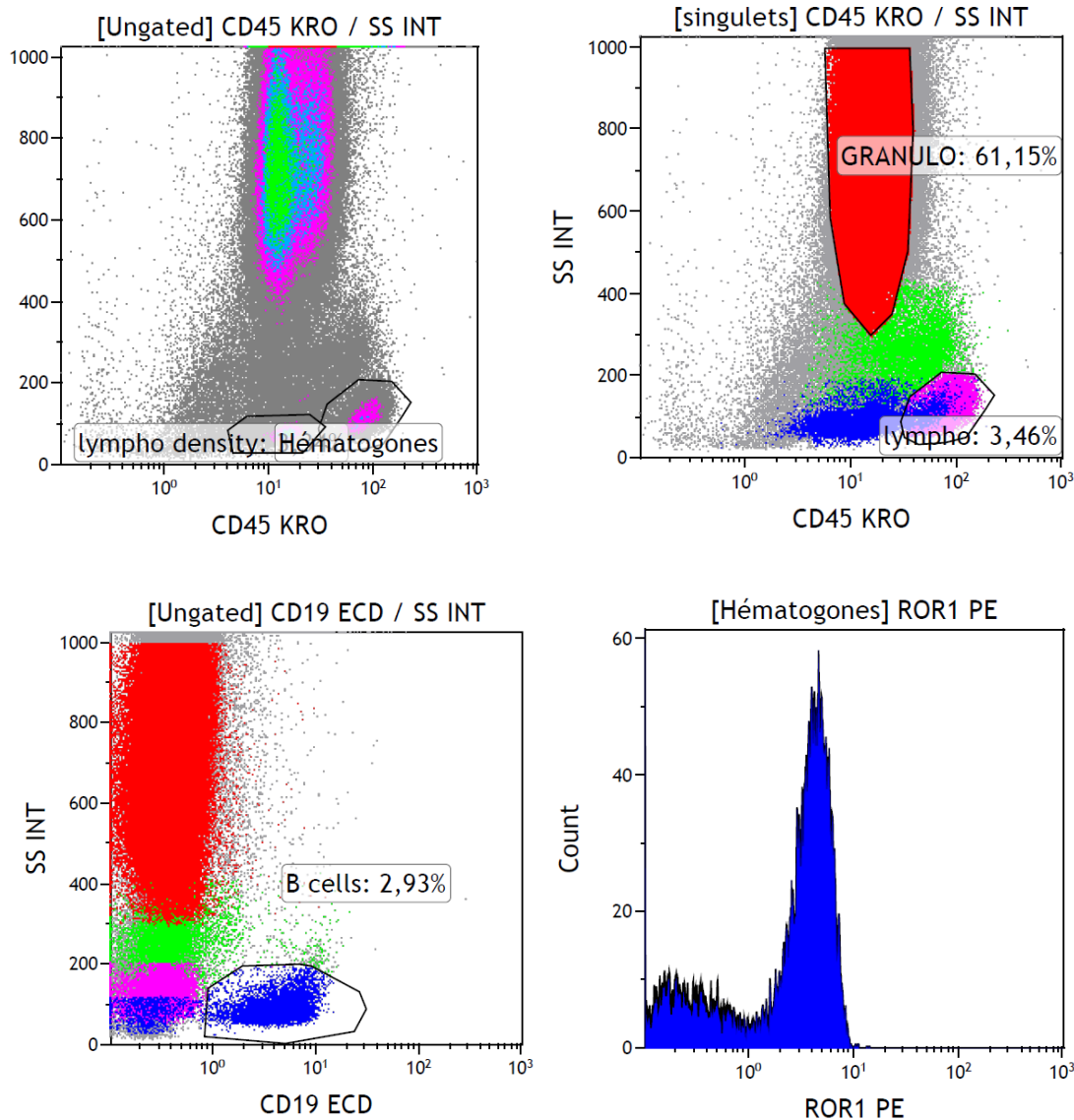


Figure 41 : Expression de ROR1 à la surface des hématogones (données du CH de Valenciennes).

Les hématogones sont CD45 intermédiaire (histogramme CD45/SS) et CD19+. (Histogramme CD19/SS).

Les essais réalisés localement, au CH de Valenciennes, sur des moelles de régénération riches en hématogones n'ont cependant pas montré de contamination des précurseurs B exprimant ROR1 sur les données de MRD-LLC. En effet, l'absence d'expression du CD5 et l'expression forte du CD81 à la surface des hématogones permettent de les discriminer facilement des cellules de LLC.

- CD160

Le CD160, ou « *NK-cell-activating receptor* » est un marqueur « d'épuisement » cellulaire T. Il est exprimé de manière aberrante par les cellules de LLC et dans d'autres hémopathies B malignes, mais n'est pas exprimé par les lymphocytes B normaux. Il est donc un bon marqueur pour le diagnostic et le suivi de la maladie dans la LLC, raison pour laquelle son utilisation a été validée dans l'évaluation de la maladie résiduelle (158). Il pourrait être impliqué dans la physiopathologie de la LLC en activant la voie de signalisation de la PI3k (159).

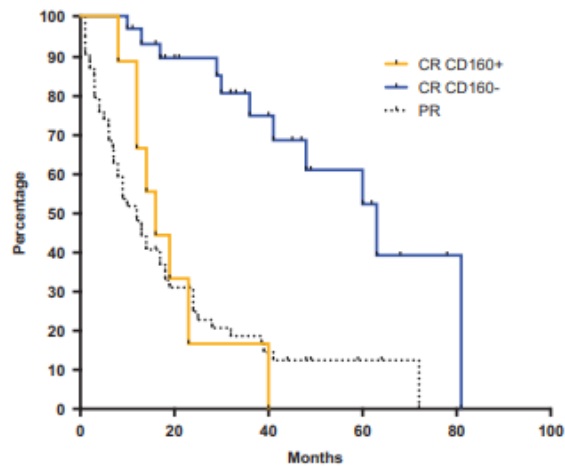


Figure 42 : Survie sans progression selon le statut clinique et de la MRD incluant le CD160, Farren et al (158).

CR = Rémission complète / PR = Rémission partielle

Les patients en rémission clinique après une première ligne d'ICT ont une survie différente selon le statut de la MRD incluant le marqueur CD160. Une MRD positive est associée à un pronostic plus péjoratif y compris en cas de rémission clinique.

L'utilisation du CD160 est néanmoins limitée dans la pratique quotidienne par sa relative labilité, on note en effet une altération significative de l'expression du CD160 par les cellules leucémiques au-delà de 48h (160). À ce jour, du fait de son usage encore récent en cytométrie, les modulations d'expression du CD160 au cours des différentes thérapies dans la LLC n'ont pas encore été étudiées.

- HLA-DR

HLA-DR est fortement exprimé à la fois à la surface des lymphocytes B normaux et des cellules de LLC. Son expression est par ailleurs stable sous Ibrutinib (131). Ces caractéristiques le placent comme candidat intéressant pour cibler les cellules de LLC en cas de traitement par thérapie ciblée, notamment lorsque l'expression des autres marqueurs pourrait être impactée.

Une stratégie de gating utilisant le CD19 couplé à ROR1 et HLA-DR pourrait s'avérer utile : peu de modulations phénotypiques ayant été rapportées avec ROR1 et HLA-DR chez les patients LLC traités par ces thérapeutiques.

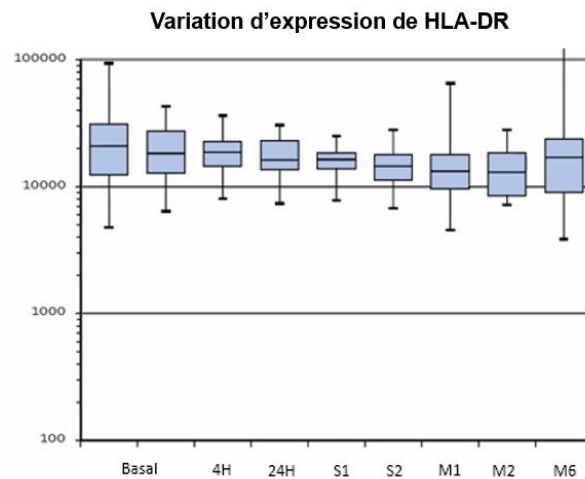


Figure 43 : Expression de HLA-DR à la surface des cellules de LLC après traitement ciblant le BCR, d'après Rawstron (131).

L'expression d'HLA-DR à la surface des cellules de LLC reste stable sous inhibiteur de BCR.

Avec le développement des cytomètres de très haute résolution, la stratégie de gating initiale ne devra probablement pas se limiter à l'utilisation d'un seul anticorps dirigé contre le CD19 mais pourrait coupler plusieurs anticorps (exemple : CD19, ROR1, HLA-DR) afin de contourner les problèmes d'immunomodulation induits par les nouvelles thérapeutiques et éviter les résultats faussement négatifs.

- *Couplage d'Anticorps par un même fluorochrome :*

Le couplage d'anticorps marqués par un même fluorochrome permet d'augmenter le nombre de marqueurs étudiés en cytométrie en flux sur un même tube. Un cytomètre 8 couleurs peut ainsi étudier simultanément 9 marqueurs si 2 marqueurs sont couplés au même fluorochrome. Cela peut constituer une stratégie intéressante pour augmenter le nombre de marqueurs étudiés simultanément sur un même tube et gagner en sensibilité.

Le couplage du CD160 avec ROR1 a été étudié, il permettrait de s'affranchir des défauts de ROR1, à savoir son expression par les hémotogones dans la moelle, et des limites du CD160 précédemment discutées. La combinaison de ces deux marqueurs tumoraux spécifiques, du fait de leur très bonne sensibilité et spécificité, pourrait être utile à l'avenir dans l'évaluation de l'efficacité des nouvelles thérapies ciblées et thérapies innovantes dans la LLC comme les anticorps bispécifiques et les CAR-T cells (161).

Un couplage de deux anticorps ciblant une même population cellulaire permet potentiellement de mieux discriminer les populations cellulaires. Le fait de cibler une même population (cellules LLC par exemple) par deux anticorps permet de modifier le ratio de fluorescence de cette population par rapport à une autre population cellulaire (Lymphocytes T ou Lymphocytes B normaux) et gagner en capacité de différenciation cellulaire.

Dans la stratégie de recherche de la MRD LLC, Letestu a proposé un couplage d'anticorps anti CD79b et CD22 afin de gagner en pouvoir discriminant entre les cellules B, les cellules T et les cellules de LLC : le ratio d'intensité de fluorescence obtenu entre les différentes sous populations permet de mieux séparer les populations (115).

La figure 44 illustre la stratégie d'identification couplant le CD22 et le CD79b proposée par Letestu.

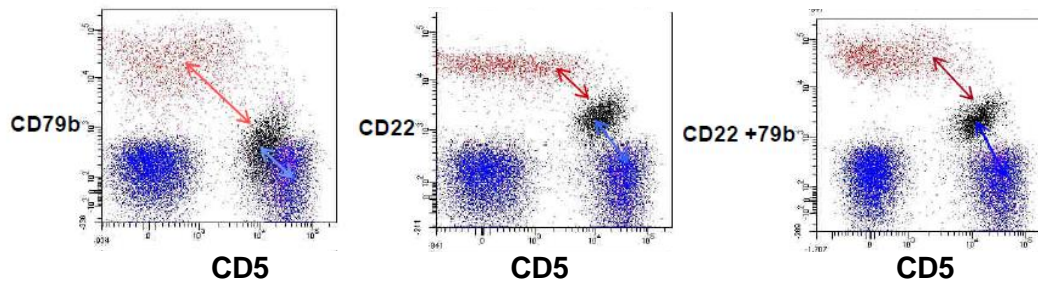


Figure 44 : Utilisation du CD22 couplé au CD79b dans la stratégie d'identification des cellules résiduelles de LLC, Letestu (JFPC-AFC 2018) (115).

En rouge, les cellules B normales expriment fortement le CD22 et le CD79b, en bleu les lymphocytes T expriment le CD5 et n'expriment pas le CD22 et le CD79b. En noir la population LLC exprime faiblement le CD22 et le CD79b. Utilisés séparément le CD79b ne permet pas de bien discriminer les cellules de LLC des lymphocytes T, et le CD22 ne permet pas de bien séparer les cellules de LLC des lymphocytes B normaux. L'utilisation d'anticorps couplés au même fluorochrome permet d'être plus discriminant.

Un couplage d'anticorps marqués par le même fluorochrome peut être réalisé pour des anticorps dirigés contre des marqueurs antithétiques, ne pouvant coexister sur une même population cellulaire à l'état normal. C'est le cas par exemple d'un marqueur T (le CD3), couplé à un marqueur B (le CD19). Ces deux marqueurs ne peuvent pas être coexprimés sur une même population cellulaire. L'utilisation d'histogrammes bi-paramétriques permettra de séparer les différentes populations cellulaires et d'étudier ces marqueurs de façon indépendante.

Si l'intérêt de cette technique de couplage d'anticorps réside dans l'augmentation du nombre de marqueurs étudiés dans un même tube, les principaux inconvénients relevés sont la multiplication des coûts engendrés par l'augmentation du nombre d'anticorps utilisés, la nécessité de trouver des anticorps compatibles sur un même fluorochrome mais également la complexité d'analyse engendrée par la multiplication du nombre de marqueurs à interpréter.

- *Le choix d'un panel complet est-il toujours nécessaire ?*

Si une stratégie utilisant des panels 6-10 couleurs est actuellement recommandée, cette approche implique des données plus complexes à analyser. L'augmentation du nombre d'anticorps étudiés peut induire également une augmentation des coûts qui n'est pas systématiquement justifiée pour des échantillons présentant des taux élevés de MRD. Une stratégie utilisable en routine pourrait consister à disposer d'un panel d'identification rapide incluant le CD5/CD19, kappa et lambda et un panel d'identification complet uniquement en cas de résultat négatif sur le premier panel.

En effet, Rawstron et al. ont ainsi montré que l'utilisation d'un panel CD19/CD5/kappa/lambda présentait une mauvaise valeur prédictive négative (ne permet pas d'exclure une MRD positive en cas de résultat négatif), mais présente en revanche une excellente valeur prédictive positive pour des seuils bien définis (expression du CD5 par plus de 82% des cellules CD19+) (133). Cette stratégie reste discutable en pratique : un seuil de 82% semble non applicable en post transplantation où un taux très élevé de cellules B réactionnelles CD19+ CD5+ peut-être observé (134). De plus, l'utilisation d'un panel restreint CD19/CD5/K/L permet de rendre uniquement un résultat qualitatif, à l'instar du panel complet qui permet d'obtenir un résultat quantitatif grâce à des techniques plus sensibles. L'utilisation de la MRD dans les essais cliniques dans le but de comparer l'efficacité de différents protocoles thérapeutiques nécessite de disposer de techniques quantitatives.

Au total, les recommandations actuelles tendent à privilégier une technique quantitative obtenue à partir d'un panel multi-couleurs de minimum 6-8 couleurs (1). Une démarche d'harmonisation avec une révision des panels utilisés en cytométrie serait aujourd'hui nécessaire dans le suivi de la MRD-LLC afin d'obtenir des résultats inter-laboratoires plus reproductibles

C. Choix d'un panel adapté au site du prélèvement

La réalisation d'une MRD sur moelle nécessite la séparation des cellules de LLC des cellules B normales matures comme cela est réalisé dans le sang, mais nécessite en plus la discrimination des précurseurs B normaux (hématogones) ou cellules plasmocytaires et autres éléments médullaires présentant un profil phénotypique distinct. Ces particularités peuvent justifier l'utilisation d'Ac différents selon le site de prélèvement afin de limiter le bruit de fond ou augmenter la sensibilité de la technique. Néanmoins, le protocole standardisé proposé par l'ERIC en 2013 a pu être validé quel que soit le site de prélèvement (sang, moelle, ganglions lymphatiques) (133).

Par ailleurs, les hématogones et cellules plasmocytaires retrouvés dans la moelle peuvent être facilement séparés des cellules de LLC grâce notamment à l'utilisation du CD5 et du CD81.

Il semble donc qu'une adaptation du panel ne soit pas nécessaire, le point de vigilance se situant sans doute plus dans la stratégie de réanalyse.

D. Cas particulier des LLC de phénotype atypique

Le panel proposé par le groupe ERIC serait applicable dans plus de 95% des cas de LLC typiques et ne justifie pas de pré-traitement de l'échantillon (111). En cas de phénotype atypique observé au diagnostic (exemple des rares cas de LLC CD5 négatif), l'applicabilité de l'évaluation de la MRD devra être évaluée avant traitement.

Le tableau 9 présente les différents phénotypes observés dans la LLC et les implications potentielles pour le diagnostic différentiel et le suivi de la maladie.

Tableau 9 : LLC "atypiques", implications pour le diagnostic différentiel et le suivi de la maladie, Rawstron (20).

Phénotype observé	Pourcentage total des syndromes lymphoprolifératifs	Commentaires
LLC « typique » : CD5+ CD23+ IgS faible, CD20 dim, CD81 dim, CD200+ ROR1+ CD43+	65%	Suivi en MRD-CMF possible
CD5+ CD23+ ≥ 1 autre marqueur « atypique »	20%	Suivi en MRD-CMF à évaluer avant traitement
CD5+ CD23-	15%	

Le tableau 9 illustre les différents phénotypes possibles de LLC pour lesquels se posera la question du diagnostic différentiel avec les autres syndromes lymphoprolifératifs B au diagnostic (lymphome du manteau, lymphome de la zone marginale notamment) et la possibilité d'un suivi en cytométrie en flux.

E. Choix des réactifs

Dans le cadre d'une étude multicentrique évaluant le panel 6 couleurs standardisé du groupe ERIC, des valeurs cibles d'intensité de fluorescence relative ont été déterminées pour les principaux marqueurs utilisés dans la MRD-LLC.

Les ratios de fluorescence sont déterminés pour chaque marqueur en divisant la MFI obtenue sur une population témoin positive par la MFI obtenue sur une population témoin négative. Les valeurs cibles minimales ont été déterminées afin de séparer de façon optimale les cellules de LLC des autres populations cellulaires (111). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Valeurs cibles des principaux marqueurs utilisés dans la MRD-LLC, Rawstron (111).

Antigène	Expression typique dans la LLC	Population contrôle		Intensité de fluorescence relative minimum (recommandé)
		Positive	Négative	
CD5	positive (> 20%)	cellules T CD3+	cellules B CD19+	>30 (>65)
CD20	faible	cellules B CD19+	cellules T CD3+	>10 (>20)
CD43	positive (> 20%)	cellules T CD3+	cellules B CD20+	>15 (>40)
CD79b	faible	cellules B CD20+	cellules T CD3+	>15 (>30)
CD81	faible	cellules T CD3+	Granulocytes	>12 (>20)

En cas de LLC « typique », un marqueur « positif » indique le pourcentage de cellules positives par comparaison avec la population contrôle et une expression « faible » indique au moins 20% de diminution de fluorescence relative de la médiane de fluorescence observée par rapport à la population B polyclonale utilisant le même anticorps. L'intensité de fluorescence relative minimum devrait permettre une séparation des cellules de LLC par rapport aux cellules B normales dans > 95% des cas avec une intensité de fluorescence recommandée permettant une séparation optimale dans > 99% des cas.

Un réactif présentant un index de fluorescence relatif inférieur à la cible définie par l'ERIC ne permet pas une séparation correcte des populations négatives et positives.

Il convient donc à chaque laboratoire de déterminer pour chaque anticorps si l'index de fluorescence obtenu par rapport à la population témoin est supérieur aux cibles recommandées. Le cas échéant, les réactifs ne semblent pas assez discriminants pour bien séparer les cellules de LLC des lymphocytes B normaux ou autres populations cellulaires.

Le choix du fluorochrome est également très important dans l'élaboration d'un panel. Il tiendra compte notamment de son spectre d'excitation et d'émission et des possibilités de chevauchement d'émission de fluorescence (« fuites » de fluorescence) avec les fluorochromes voisins.

La stabilité des fluorochromes est également essentielle, une vigilance accrue devra être apportée aux fluorochromes en tandem comme APC-Cy7 et PE-Cy7 qui peuvent se dégrader et émettre aux longueurs d'ondes des autres détecteurs (APC et PE).

Malgré un réglage correct des compensations, des phénomènes de distorsion de signal (ou effet « *bubble* ») peuvent être observés en cytométrie multiparamétrique, se caractérisant par un étalement du signal en « trompette ». Cet effet de distorsion de signal peut être à l'origine d'un chevauchement des populations négatives avec les populations positives.

Ce phénomène de distorsion de signal s'observe plus avec certains fluorochromes et devra être pris en compte lors de l'élaboration du panel, en particulier pour qu'elles n'interfèrent pas dans le signal des antigènes de gating (CD19 en particulier). La figure 45 illustre ce phénomène de distorsion de signal.

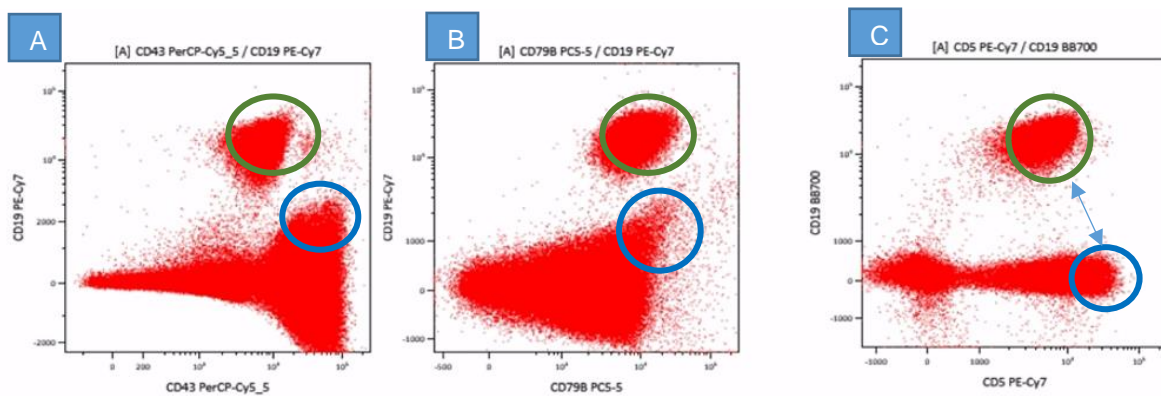


Figure 45 : Images de distorsion du signal observé avec différents fluorochromes, Rawstron EHA 2018 (131) .

Ces histogrammes bi-paramétriques illustrent les images de distorsion de signal pouvant être observées avec certains réactifs. **A** : chevauchement du signal de Per-Cy5_5 dans le canal PE-Cy7 correspondant à l'antigène CD19. **B** : chevauchement du signal PC5-5 dans le canal PE-Cy7. **C** : Absence de distorsion de signal avec le réactif CD19-BB700, permettant une bonne séparation des populations CD19 positives et CD19 négatives.

4. Nombre d'évènements acquis

Une acquisition sur 500 000 évènements est recommandée par l'iwCLL pour l'évaluation d'une MRD-LLC avec une sensibilité de l'ordre de 10^{-4} . Pour atteindre des niveaux de sensibilité de l'ordre de 10^{-5} comme obtenus en biologie moléculaire, une acquisition sur au moins 2×10^6 évènements est nécessaire.

Ce qui représente en pratique au moins 3×10^6 leucocytes à traiter avant marquage, ce qui est plus difficile à obtenir en pratique.

5. Stratégie de réanalyse et rendu de résultats

A. Standardisation de la stratégie de réanalyse

Pour une technique aussi précise que l'évaluation de la MRD, la variabilité analytique de l'analyse manuelle tend à être le principal facteur d'imprécision dans la quantification de la population et constitue un obstacle à la normalisation des tests, même lorsque les panels d'antigènes sont par ailleurs harmonisés ou normalisés.

Outre la vérification des compensations et le nettoyage de l'acquisition avec l'élimination des artéfacts d'acquisition, les débris et les doublets, le fenêtrage des différentes populations d'intérêt revêt une importance particulière.

Dans le cadre du groupe MRD-LLC de l'AFC, le Docteur Rémi Letestu a proposé des aides au fenêtrage du panel MRD-LLC en proposant des seuils de positionnement des fenêtres par rapport aux populations lymphocytaires T et B normales, afin de limiter la subjectivité opérateur au moment de la réanalyse.

La figure 46 illustre le choix de seuils de positionnement des fenêtres pour le fenêtrage des cellules de LLC.

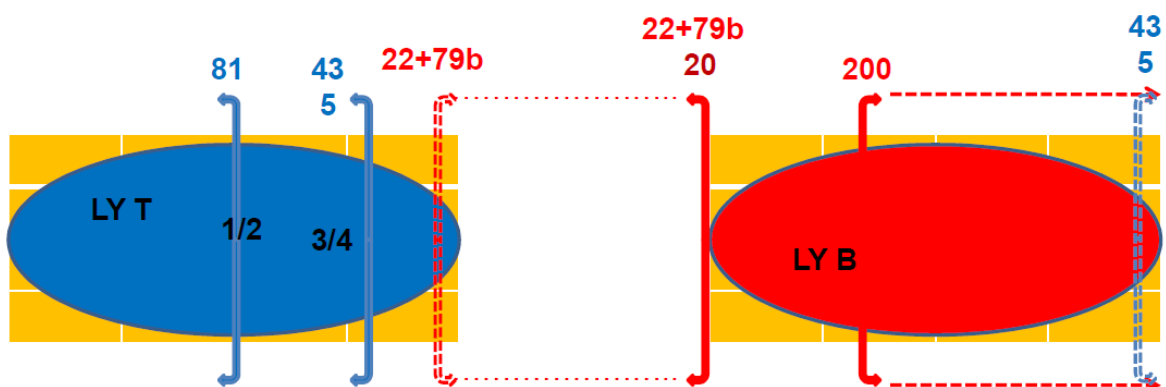


Figure 46 : Aide au positionnement des fenêtres pour le fenêtrage du panel MRD-LLC, Letestu (115).

Proposition de seuils de positionnement des fenêtres, par rapport aux populations lymphocytaires T et B normales, pour les marqueurs CD81, CD43, CD5, CD22+CD79b, CD20, CD200.

L'utilisation d'un masque de réanalyse standardisé et/ou de séances éducationnelles animées par des centres experts devrait également permettre de limiter le biais opérateur. Il semble également nécessaire que, comme pour d'autres hémopathies, des échanges inter-laboratoires puissent être mis en place avec la réalisation d'évaluations externes de qualité (EEQ), toujours inexistantes pour la MRD-LLC.

À l'avenir, l'augmentation du nombre de marqueurs disponibles, l'utilisation de panels de 10-12 couleurs, voire plus, et l'impact des nouvelles thérapeutiques sur les données de CMF devraient encore complexifier la stratégie de réanalyse. L'apport de méthodes d'analyses automatisées peut s'avérer intéressant afin de s'affranchir du biais opérateur.

B. Stratégies d'analyses non supervisées

L'utilisation de méthodes d'analyses automatiques permet de limiter la subjectivité liée à l'interprétation des données de cytométrie. Ces stratégies utilisent des logiciels d'analyse afin d'automatiser l'identification de cellules pathologiques et de s'affranchir de la subjectivité de l'opérateur dans la stratégie de fenêtrage et le choix des clusters à analyser.

Plusieurs logiciels d'analyses de données automatiques ont été développés afin de pallier aux limites des méthodes manuelles d'analyse, notamment en cytométrie de masse, et permettre l'utilisation de plusieurs dizaines de marqueurs par cellules (162). Certains logiciels voient ainsi leurs champs d'utilisation s'étendre progressivement vers la cytométrie en flux multiparamétrique (163).

L'utilisation de ces méthodes d'analyse automatique s'est développée ces dernières années pour l'identification au diagnostic et en suivi des populations d'intérêt.

Le consortium Euroflow a ainsi évalué la MRD-LLC par analyse en composantes principales (APC) pour standardiser et automatiser l'identification des cellules malignes (164). En 2019, Apete a évalué l'utilisation du logiciel flowSOM pour l'évaluation de la MRD-LLC par comparaison à l'approche conventionnelle. Si l'utilisation de méthodes automatiques ne semble pas améliorer la limite de détection ou la précision de la technique pour la quantification des cellules de LLC résiduelles, elle permet de s'affranchir de la subjectivité du cytométriste (165).

Néanmoins, si ces méthodes automatiques permettent de limiter le biais opérateur au moment de la réanalyse, elles se heurtent aux mêmes difficultés que les techniques de CMF conventionnelles (impact notamment des thérapeutiques sur l'expression des marqueurs étudiés en cytométrie en flux sur les cellules normales et pathologiques, viabilité et prolifération cellulaire non évaluées par ces techniques). De plus, un traitement préanalytique des données est indispensable pour éviter de conduire à des non-sens biologiques que l'analyse supervisée pourra corriger. Les deux stratégies doivent donc être utilisées en parallèle pour éviter un maximum de résultats erronés.

V – Discussion

La place de la MRD dans la LLC est un sujet d'actualité en pleine évolution. L'accessibilité des techniques de cytométrie en flux de haute résolution (8 à 10 couleurs ou plus) largement disponibles dans les grands centres hospitaliers français et le bouleversement récent dans la prise en charge thérapeutique de la LLC, avec l'avènement des thérapies ciblées et autres thérapies innovantes, devraient étendre ses champs d'application dans les années à venir.

Actuellement, l'étude de la MRD-LLC en tant qu'analyse biologique reste indiquée uniquement dans le cadre d'essais cliniques : elle peut être considérée comme un critère de jugement intermédiaire dans les essais contrôlés et randomisés étudiant l'efficacité d'un traitement, mais les preuves restent insuffisantes pour se baser uniquement sur l'évaluation de la MRD dans le suivi du patient (166). L'étude de la MRD reste également fondamentale en situation d'allogreffe puisqu'elle est le reflet de l'efficacité ou non dans ce qui reste à l'heure actuelle le seul traitement potentiellement curatif de la LLC (167).

Ce cadre d'application restreint est globalement le reflet des pratiques actuelles observées au Centre Hospitalier de Valenciennes : les demandes de MRD-LLC hors protocoles cliniques restent très limitées. Ces observations contrastent avec le souhait des cliniciens de pouvoir disposer en routine d'une technique d'évaluation de la MRD-LLC quantitative.

Le défaut d'harmonisation et de standardisation des différentes techniques d'analyse, à l'heure d'une démarche qualité omniprésente, ainsi que le manque d'essais cliniques prospectifs randomisés et multicentriques visant à étudier l'impact patient de la MRD limitent encore l'utilisation de la MRD-LLC en routine. Si les panels 4 couleurs

constituent le gold standard historique et ont fait l'objet d'un travail de standardisation, les panels 8-10 couleurs sont désormais disponibles et bénéficieraient d'être harmonisés entre les centres. Le développement de contrôles de qualité dédiés, associés à des séances éducationnelles, permettrait par ailleurs de vérifier les méthodes mises en place dans chaque site.

À cela s'ajoute une nouvelle problématique posée par l'explosion des thérapies ciblées dans la prise en charge thérapeutique. Si elles ont révolutionné le pronostic d'un grand nombre de patients, elles offrent également de nouveaux défis dans l'analyse cytométrique.

Si le modèle du Rituximab avec la perte d'expression en surface du CD20 et du CD19 qu'il induit est bien connu, concernant les autres thérapies ciblées utilisées dans la LLC, comme les inhibiteurs du BCR ou de Bcl-2, leur impact sur les données de cytométrie n'est pas encore parfaitement documenté et il convient de rester prudent lors de l'analyse pour ne pas rendre des résultats erronés en lien avec d'éventuelles interférences (130).

Le développement constant des immunothérapies avec l'arrivée de nouveaux Ac monoclonaux, Ac bispécifiques et CAR-T cells pourrait modifier, dans un avenir proche, les pratiques actuelles de la MRD-LLC en cytométrie. Si l'impact de ces thérapeutiques sur les données de MRD-LLC en cytométrie en flux est actuellement peu documenté, les essais réalisés dans d'autres hémopathies B (anti-CD22 dans la leucémie à tricholeucocytes ou Ac bispécifiques dans la leucémie aiguë lymphoblastique notamment) témoignent en pratique de leur interférence sur les marqueurs de cytométrie. Concernant le suivi de la MRD-LLC après traitement par CAR-T cells anti-CD19, il a surtout été évalué par biologie moléculaire (séquençage des *IGVH* par NGS) (76,79,135).

Avec l'essor de l'immunothérapie et des thérapies ciblées dans le traitement de la LLC, l'interprétation des données de cytométrie devra ainsi tenir compte de ces interférences. Heureusement, des solutions existent pour tenter de s'en affranchir au mieux. Elles peuvent consister à modifier la stratégie de gating, utiliser d'autres marqueurs d'intérêt moins impactés par ces thérapeutiques et/ou modifier le protocole en y intégrant des étapes de perméabilisation ou d'évaluation de la prolifération cellulaire notamment. Ces adaptations nécessitent néanmoins la connaissance du contexte clinique et thérapeutique afin d'adapter la stratégie de réanalyse et veiller à la bonne interprétation des résultats. Elles peuvent également alourdir le protocole technique limitant leur mise en place en routine. De nombreuses questions restent par ailleurs en suspens, une prudence dans l'interprétation des résultats reste dès lors indispensable.

Ce travail bibliographique nous a ainsi permis de cibler différents axes d'amélioration dans la technique de MRD-LLC actuellement mise en place au laboratoire de cytométrie du Centre Hospitalier de Valenciennes.

L'association CD22+CD79b proposée dans le panel du groupe FILO CD20/CD45/CD81/CD22+CD79b/CD5/CD19/CD200/CD43 (115) nous semble pertinente : le CD22 seul est redondant du CD20 et ne permet pas une bonne discrimination de la population LLC. L'ajout du CD200 reste à évaluer. Dans notre pratique, nous n'avons pas observé de réel gain de sensibilité dans le panel utilisé en routine à travailler avec ou sans CD200, Ces résultats doivent néanmoins être confirmés sur d'autres épreuves de dilutions. Des modulations phénotypiques du CD200 ont par ailleurs été observées sous Ibrutinib, limitant potentiellement son utilisation en suivi sous inhibiteur de BTK (131). ROR1 nous semble en revanche très prometteur de par sa spécificité pour les cellules de LLC et sa stabilité sous traitement

dans les essais réalisés. Son utilisation semble par ailleurs tout à fait adaptée sur sang et sur moelle ; les quelques essais de MRD-LLC réalisés localement sur des échantillons médullaires riches en hématogones ne montrent aucune contamination par les précurseurs B. En effet, si les hématogones expriment ROR1 en surface, les autres marqueurs du panel permettent de bien les séparer des cellules de LLC.

Enfin, afin de contourner les problèmes d'immunomodulation induits par les nouvelles thérapeutiques, la stratégie de gating initiale ne devra probablement pas se limiter à l'utilisation d'un seul anticorps dirigé contre le CD19. Comme décrit par Rawstron (131), une stratégie intéressante pourrait combiner ROR1 et HLA-DR au CD19 pour l'identification initiale des cellules de LLC. D'autres combinaisons pourraient également être évaluées incluant d'autres anticorps comme le CD24, le CD40 ou le CD160. Un travail rétrospectif reprenant les données récentes de MRD-LLC obtenues en cytométrie en flux nous permettra de mieux appréhender l'impact de ces différentes thérapeutiques sur les panels utilisés au laboratoire. Ce travail, en cours d'initiation, devrait faire l'objet d'une collaboration inter-sites entre le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille et le Centre Hospitalier de Valenciennes, afin de disposer d'un plus grand nombre de données, notamment dans le cadre de thérapeutiques innovantes. Les résultats de ce travail devraient nous permettre de mieux cibler les marqueurs d'intérêts pour l'identification des LLC en cours de traitement.

À côté des anticorps d'identification, l'ajout d'anticorps d'exclusion au panel ne semble pas justifié pour atteindre un niveau de sensibilité de MRD-LLC de l'ordre de 10^{-4} . Leur utilisation semble cependant recommandée pour atteindre des niveaux de sensibilité de l'ordre de $10^{-5}/10^{-6}$, le bruit de fond pouvant dans ce cas constituer un facteur limitant pour atteindre une limite de détection plus basse. L'ajout de CD3, CD14 ou CD33 au panel existant pourrait alors s'avérer intéressant, notamment en suivi post-

allogreffe où l'approche curative justifie des techniques de haute sensibilité. Dans les autres situations thérapeutiques, il sera important d'évaluer si un niveau de sensibilité supérieur au seuil de 10^{-4} présente un intérêt en termes de survie pour le patient. Des études récentes, étudiant l'impact pronostique de techniques d'évaluation de la MRD de haute sensibilité, semblent indiquer que pour les patients sous ICT toute MRD positive, y compris pour des taux $< 10^{-4}$ présente un impact sur la survie (91). Ces données devront notamment être vérifiées avec les schémas thérapeutiques les plus récents.

En effet, à mesure que les techniques utilisées dans le suivi de la MRD progressent, à la fois en cytométrie mais également en biologie moléculaire à l'heure du NGS, la sensibilité minimale requise est aussi une question qui demeure en suspens. Si le seuil de 10^{-4} reste celui recommandé dans l'utilisation actuelle de la MRD-LLC (recommandations de l'iwCLL de 2020) (109), la volonté d'utiliser la MRD comme outil prédictif d'efficacité du traitement pourrait modifier le seuil de sensibilité requis. Cependant si l'augmentation de la sensibilité au-delà d'un certain seuil semble légitime pour les thérapies visant l'éradication de la maladie (allogreffe, CAR-T cells, anti-CD19), elle pose néanmoins de nombreuses difficultés. Le seuil théorique de 10^{-6} atteint en NGS nécessite des quantités d'ADN très importantes limitant son utilisation en routine dans les laboratoires de biologie moléculaire. Cependant, un seuil théorique de 10^{-6} , n'est pas vraiment réalisable dans la pratique courante. En NGS une analyse d'au moins 10^7 cellules est nécessaire pour atteindre ce seuil, ce qui correspond à analyser entre 5 et 50 μg d'ADN, ce qui est techniquement difficile dans une réaction PCR à l'heure actuelle. En cytométrie, au-delà de la nécessité d'avoir un cytomètre haute résolution d'au moins 10 couleurs, une sensibilité de 10^{-6} nécessite une acquisition de plusieurs dizaines de millions de cellules ce qui engendre des

problèmes en termes de quantité d'échantillon, de durée d'analyse et de traitement des données pour l'acquisition.

Par ailleurs, en cytométrie, la complexité engendrée par la multiplicité des graphes bi-paramétriques à analyser pourrait conduire dans l'avenir au développement en routine de techniques d'analyses non supervisées. Cependant, si ces techniques permettent de standardiser la stratégie de réanalyse et s'affranchir du biais opérateur, elles se heurtent aux mêmes problématiques que la stratégie de cytométrie conventionnelle et ne permettront pas de limiter l'impact des thérapeutiques actuelles sur les données de cytométrie, justifiant ainsi la même prudence dans l'interprétation des résultats. Un traitement pré-analytique des données reste par ailleurs indispensable pour éviter de conduire à des non-sens biologiques que l'analyse conventionnelle pourra corriger.

Par ailleurs, devant des schémas thérapeutiques divers et complexes se pose aussi la question des points de suivi de MRD à définir pour chaque protocole. Le choix est complexe et devra reposer sur la connaissance de la cinétique de la LLC, incluant le temps nécessaire pour atteindre une MRD indétectable et le délai de rechute après une MRD indétectable. Le suivi de la MRD devra se faire au moins deux mois après la fin du traitement en cas de traitement de durée « fixe », pour une utilisation de la MRD comme critère prédictif de la survie globale et de la survie sans progression. En cas de traitement de longue durée, l'évaluation de la MRD devra être réalisée lorsque la meilleure réponse clinique a été obtenue. Des points de suivi « fixes » sont ainsi recommandés et devront être déterminés pour chaque schéma thérapeutique (1).

À l'heure d'une médecine personnalisée, la MRD pourrait à l'avenir jouer un rôle dans le suivi thérapeutique, permettant de poursuivre, modifier ou d'arrêter complètement certaines thérapeutiques, suivant le modèle de la leucémie myéloïde chronique (LMC) où la MRD joue un rôle prépondérant dans l'adaptation du traitement, voire de son

arrêt complet (168,169). Bien qu'encore inenvisageable aujourd'hui (absence d'aberration génétique unique, meilleure sensibilité des techniques de quantification du transcrit BCR-ABL) un modèle similaire pourrait à l'avenir voir le jour dans la LLC. Ensuite, à côté de la tendance à développer des techniques de MRD de plus en plus sensibles, la question de l'intérêt d'une MRD négative pour tous est-elle justifiée ?

La LLC reste une pathologie de la personne âgée, et de nombreux patients ne bénéficieront jamais d'un traitement. Si une MRD indétectable est un facteur indépendant de bon pronostic, cela concerne principalement des patients en rechute ou réfractaires à au moins une ligne de traitement (110). Ainsi, une MRD indétectable ne sera pas toujours souhaitable, en fonction de l'âge du patient et de ses comorbidités mais également du traitement et de sa toxicité : immunochimiothérapie et nouvelles thérapies ciblées. L'ibrutinib par exemple, seul ou en association, devient peu à peu un traitement de choix même en première ligne de la LLC, pour autant, la toxicité de l'ibrutinib parfois importante reste un obstacle dans le parcours thérapeutique du patient et limite son utilisation (170).

Enfin, la valeur de la MRD-LLC « seule » n'a que peu d'intérêt et doit s'inscrire dans une stratégie globale. Au même titre que l'âge, le statut mutationnel *IGVH* et la mutation *TP53*, le statut de la MRD reste un facteur pronostic parmi d'autres dans la LLC. Une mutation de *TP53* serait de mauvais pronostic même en cas de MRD indétectable dans les protocoles d'ICT (171) et les patients mutés *TP53* forment généralement un groupe à part entière dans les essais cliniques visant à évaluer l'efficacité d'un traitement avec le statut de la MRD comme critère de jugement de substitution. Et même s'il est admis qu'une maladie résiduelle indétectable selon les techniques usuelles est en faveur d'un pronostic favorable (110), l'examen clinique, comprenant la recherche d'un syndrome tumoral et de signes généraux en faveur

d'une progression de la maladie, associé à une simple numération formule sanguine restent largement utilisés pour suivre la réponse au traitement dans la LLC.

Un résultat de MRD indétectable au seuil de sensibilité de la technique ne signe pas une éradication de la maladie. Des études allemandes ont montré que chez des patients en rémission prolongée avec MRD indétectable, la persistance d'adénopathies était associée à une moindre survie (110). Le résultat de MRD doit s'intégrer dans le cadre d'un bilan clinique complet.

Par ailleurs, la LLC est une maladie qui peut toucher différents compartiments tels que le sang, la moelle, les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, mais également le liquide céphalorachidien, le rein, les poumons ou la peau (93). Plus qu'une évaluation de la maladie résiduelle sur un seul compartiment, une évaluation de la charge tumorale globale serait plus informative. Concernant les alternatives à la MRD, la recherche d'ADN circulant tumoral est particulièrement prometteuse. Cette technique, déjà utilisée dans le suivi des tumeurs solides et des lymphomes non hodgkinien (172), repose sur la recherche d'ADN tumoral dans le sang. Véritable « biopsie liquide », elle serait le reflet de la charge tumorale globale. Elle pourrait être intéressante dans le suivi de la LLC pour plusieurs raisons : par sa capacité à capturer de manière exhaustive le profil génomique tumoral sous-jacent et à permettre une surveillance de la masse tumorale globale selon les différents sites topographiques du patient, mais également par sa capacité à découvrir de nouvelles altérations génomiques pouvant conférer un avantage au clone tumoral comme des mécanismes de résistances aux traitements (173). Sa bonne corrélation avec la clinique du patient (détection d'une évolution sous clonale lors d'une transformation en syndrome de Richter, augmentation d'ADN circulant tumoral en cas d'apparition d'adénopathies). La recherche d'ADN circulant tumoral pourrait ainsi avoir un rôle complémentaire aux méthodes existantes dans le suivi de la maladie (173).

Dans l'attente d'une accessibilité de ces techniques, l'interprétation d'un résultat de MRD devra s'intégrer dans une prise en charge globale, incluant l'examen clinique du patient et les données de l'imagerie, pour une évaluation précise de la charge tumorale résiduelle (93).

À l'heure d'une médecine personnalisée et de précision, une adaptation de la prise en charge selon chaque patient devra probablement être réalisée. Pour cela, le dialogue clinico-biologique est indispensable pour un rendu de résultat adéquat aux attentes du clinicien pour le patient.

Bibliographie :

1. 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 2018;131(25):2745-60.
2. SPF. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Hémopathies malignes : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. <https://www.santepubliquefrance.fr/docs/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-volume-2-hemopathies-malignes>
3. Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin*. 12 nov 2016;66(6):443-59.
4. Kipps TJ, Stevenson FK, Wu CJ, Croce CM, Packham G, Wierda WG, et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Dis Primer*. 19 janv 2017;3:16096.
5. Schinasi LH, De Roos AJ, Ray RM, Edlefsen KL, Parks CG, Howard BV, et al. Insecticide exposure and farm history in relation to risk of lymphomas and leukemias in the Women's Health Initiative observational study cohort. *Ann Epidemiol*. nov 2015;25(11):803-10.
6. Hendriks RW, Middendorp S. The pre-BCR checkpoint as a cell-autonomous proliferation switch. *Trends Immunol*. mai 2004;25(5):249-56.
7. Herzog S, Reth M, Jumaa H. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. mars 2009;9(3):195-205.
8. Hallek 2020Chronic lymphocytic leukemia 2020 update on diagnosis, risk.pdf.
9. Bosch F, Dalla-Favera R. Chronic lymphocytic leukaemia: from genetics to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. nov 2019;16(11):684-701.
10. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 5 juin 2011;475(7354):101-5.
11. 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*. 22 oct 2015;526(7574):525-30.
12. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 sept 2005;102(39):13944-9.
13. Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, Spizzo R, Nicoloso MS, Rossi S, et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *JAMA*. 5 janv 2011;305(1):59-67.
14. Masson E. Leucémie lymphoïde chronique : de la biologie à la thérapeutique. Disponible sur : <https://www.em-consulte.com/article/1442271/article/leucemie-lymphoide-chronique-de-la-biologie>

15. Landau DA, Clement K, Ziller MJ, Boyle P, Fan J, Gu H, et al. Locally disordered methylation forms the basis of intra-tumor methylome variation in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 8 déc 2014;26(6):813-25.
16. Burger JA, Chiorazzi N. B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Trends Immunol*. 1 déc 2013;34(12):592-601.
17. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 20 oct 2011;118(16):4313-20.
18. Herishanu Y, Pérez-Galán P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 13 janv 2011;117(2):563-74.
19. Cazin B. Leucémie lymphoïde chronique [Internet]. EM-Consulte. <https://www.em-consulte.com/article/821835/leucemie-lymphoide-chronique>
20. Rawstron A, 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 B Clin Cytom*. 10 oct 2017;94.
21. Mj C, Da B, Ga W, Kg R, Si S, Sm S, et al. Use of positron emission tomography-computed tomography in the management of patients with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 17 févr 2014;55(9):2079-84.
22. Muntañola A, Bosch F, Arguis P, Arellano-Rodrigo E, Ayuso C, Giné E, et al. Abdominal computed tomography predicts progression in patients with Rai stage 0 chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 avr 2007;25(12):1576-80.
23. Rawstron AC, Bennett FL, O'Connor SJM, Kwok M, Fenton JAL, Plummer M, et al. Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 7 août 2008;359(6):575-83.
24. Debord C, Wuillème S, Eveillard M, Theisen O, Godon C, Bris YL, et al. Flow cytometry in the diagnosis of mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Int J Lab Hematol*. 2020;42(S1):113-20.
25. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 3 juill 2014;124(1):49-62.
26. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, Eichhorst BF, Bergmann MA, Elter T, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 3 juill 2014;124(1):49-62.
27. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, et al. Serum β 2-Microglobulin and Serum Thymidine Kinase are Independent Predictors of Progression-Free Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia and Immunocytoma. *Leuk Lymphoma*. 1 janv 1996;22(5-6):439-47.
28. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1 avr 2016;43(2):233-40.

29. Döhner H, Stilgenbauer S, James MR, Benner A, Weilguni T, Bentz M, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1 avr 1997;89(7):2516-22.
30. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, Ciardullo C, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 21 févr 2013;121(8):1403-12.
31. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*. 15 sept 1999;94(6):1848-54.
32. Zenz T, Kröber A, Scherer K, Häbe S, Bühler A, Benner A, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood*. 15 oct 2008;112(8):3322-9.
33. Rossi D, Cerri M, Deambrogi C, Sozzi E, Cresta S, Rasi S, et al. The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 févr 2009;15(3):995-1004.
34. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, Spina V, Fangazio M, Forconi F, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 10 nov 2011;119:521-9.
35. Quesada V, Conde L, Villamor N, Ordóñez GR, Jares P, Bassaganyas L, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 11 déc 2011;44(1):47-52.
36. Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, et al. ZAP-70 Expression as a Surrogate for Immunoglobulin-Variable-Region Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. mai 2003;348(18):1764-75.
37. Ibrahim S, Keating M, Do KA, O'Brien S, Huh YO, Jilani I, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1 juill 2001;98(1):181-6.
38. Al-Rubaie HA, Al-Rawi Z, Almothaffar A. CD49d as Prognostic Marker in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia in Correlation with the Expression of CD38, ZAP-70 and Clinical Binet Stage. *Iraqi Postgrad Med J*. 1 janv 2016;15:486-92.
39. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 1 juin 2016;17(6):779-90.
40. Parikh SA. Chronic lymphocytic leukemia treatment algorithm 2018. *Blood Cancer J*. 3 oct 2018;8(10):93.
41. CLL Trialists' CollaborativeGroup. Chemotherapeutic Options in Chronic Lymphocytic Leukemia: a Meta-analysis of the Randomized Trials. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 19 mai 1999;91(10):861-8.

42. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, Pasold R, Hensel M, Steinbrecher C, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1 févr 2006;107(3):885-91.
43. Masson E. Anticorps monoclonal anti-CD20 (rituximab) dans les maladies hématologiques et les affections auto-immunes. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/51810/anticorps-monoclonal-anti-cd20-rituximab>
44. Bagacean C, Zdrenghea M, Tempescul A, Cristea V, Renaudineau Y. Anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia: from uncertainties to promises. <http://dx.doi.org/10.2217/imt-2015-0015>. Future Medicine Ltd London, UK; 2016 : <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/imt-2015-0015>
45. Robak T. Emerging monoclonal antibodies and related agents for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Future Oncol Lond Engl*. janv 2013;9(1):69-91.
46. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, Fink AM, Busch R, Mayer J, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2 oct 2010;376(9747):1164-74.
47. Eichhorst B, Fink A-M, Bahlo J, Busch R, Kovacs G, Maurer C, et al. First-line chemoimmunotherapy with bendamustine and rituximab versus fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab in patients with advanced chronic lymphocytic leukaemia (CLL10): an international, open-label, randomised, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. juill 2016;17(7):928-42.
48. Goede V, Fischer K, Busch R, Engelke A, Eichhorst B, Wendtner CM, et al. Obinutuzumab plus Chlorambucil in Patients with CLL and Coexisting Conditions. *N Engl J Med*. 20 mars 2014;370(12):1101-10.
49. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, Smith L, Harbison J, Webb J, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood*. 1 mai 2004;103(9):3278-81.
50. Dosset W. Pourquoi tant d'anticorps monoclonaux en thérapeutique et comment appréhender cette profusion ? Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1437460/pourquoi-tant-d-anticorps-monoclonaux-en-therapeut>
51. Burroni B, Broudin C, Damotte D, Laurent C. Les immune-checkpoints dans les hémopathies. *Ann Pathol*. 1 févr 2017;37(1):101-10.
52. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, Arakawa F, Ichikawa A, Niino D, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 5 nov 2015;126(19):2193-201.
53. Xerri L, Chetaille B, Seriari N, Attias C, Guillaume Y, Arnoulet C, et al. Programmed death 1 is a marker of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and B-cell small lymphocytic lymphoma/chronic lymphocytic leukemia. *Hum Pathol*. 1 juill 2008;39(7):1050-8.
54. Papazoglou D, Lesnick CE, Wang V, Kay NE, Shanafelt TD, Ramsay AG. Ibrutinib-Based Therapy Improves Anti-Tumor T Cell Killing Function Allowing Effective Pairing with Anti-PD-L1 Immunotherapy Compared to Traditional FCR Chemoimmunotherapy; Implications for Therapy and Correlative Immune Functional Data from the Phase III E1912 Trial. *Blood*. 29 nov 2018;132:236.

55. Ioannou N, Hagner PR, Towfic F, Gandhi AK, Stamatopoulos K, Patten PEM, et al. Eliciting Anti-Tumor T Cell Immunity in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) with PD-L1/PD-1 Blockade Is Enhanced By Avadomide Immunotherapy through the Triggering of Immunogenic Interferon Signaling. *Blood*. 29 nov 2018;132:237.
56. Fürstenau M, Eichhorst B. Novel Agents in Chronic Lymphocytic Leukemia: New Combination Therapies and Strategies to Overcome Resistance. *Cancers*. 16 mars 2021;13(6):1336.
57. Mhibik M, Gaglione EM, Eik D, Kendall EK, Blackburn A, Keyvanfar K, et al. BTK Inhibitors, Irrespective of ITK Inhibition, Increase Efficacy of a CD19/CD3 Bispecific Antibody in CLL. *Blood*. 27 mai 2021;blood.2020009686.
58. Karvonen H, Niininen W, Murumägi A, Ungureanu D. Targeting ROR1 identifies new treatment strategies in hematological cancers. *Biochem Soc Trans*. 15 avr 2017;45(2):457-64.
59. Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 6 déc 2012;120(24):4684-91.
60. Nguyen P-H, Fedorchenko O, Rosen N, Koch M, Barthel R, Winarski T, et al. LYN Kinase in the Tumor Microenvironment Is Essential for the Progression of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Cell*. 10 oct 2016;30(4):610-22.
61. George B, Mullick Chowdhury S, Hart A, Sircar A, Singh SK, Nath UK, et al. Ibrutinib Resistance Mechanisms and Treatment Strategies for B-Cell Lymphomas. *Cancers*. mai 2020;12(5):1328.
62. Munir T, Brown JR, O'Brien S, Barrientos JC, Barr PM, Reddy NM, et al. Final analysis from RESONATE: Up to six years of follow-up on ibrutinib in patients with previously treated chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol*. déc 2019;94(12):1353-63.
63. Chen S-S, Chang BY, Chang S, Tong T, Ham S, Sherry B, et al. BTK inhibition results in impaired CXCR4 chemokine receptor surface expression, signaling and function in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. avr 2016;30(4):833-43.
64. Shanafelt TD, Wang V, Kay NE, Hanson CA, O'Brien SM, Barrientos JC, et al. Ibrutinib and Rituximab Provides Superior Clinical Outcome Compared to FCR in Younger Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Extended Follow-up from the E1912 Trial. *Blood*. 13 nov 2019 ;134(1). Disponible sur: <https://profiles.wustl.edu/en/publications/ibrutinib-and-rituximab-provides-superior-clinical-outcome-compar>
65. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, Zhao W, Booth AM, Ding W, et al. Ibrutinib Regimens versus Chemoimmunotherapy in Older Patients with Untreated CLL. *N Engl J Med*. 27 déc 2018;379(26):2517-28.
66. 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.
67. Awan FT, Schuh A, Brown JR, Furman RR, Pagel JM, Hillmen P, et al. Acalabrutinib monotherapy in patients with chronic lymphocytic leukemia who are intolerant to ibrutinib. *Blood Adv*. 14 mai 2019;3(9):1553-62.

68. Lewis KL, Cheah CY. Non-Covalent BTK Inhibitors-The New BTKids on the Block for B-Cell Malignancies. *J Pers Med*. 3 août 2021;11(8):764.
69. Brown JR. Phosphatidylinositol 3 Kinase δ Inhibitors: Present and Future. *Cancer J Sudbury Mass*. déc 2019;25(6):394-400.
70. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets | *Nature Medicine*. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/nm.3048>
71. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 28 janv 2016;374(4):311-22.
72. Mancikova V, Peschelova H, Kozlova V, Ledererova A, Ladungova A, Verner J, et al. Performance of anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells in genetically defined classes of chronic lymphocytic leukemia. *J Immunother Cancer*. mars 2020;8(1):e000471.
73. Locke FL, Go WY, Neelapu SS. Development and Use of the Anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy Axicabtagene Ciloleucel in Large B-Cell Lymphoma: A Review. *JAMA Oncol*. 1 févr 2020;6(2):281-90.
74. Turtle CJ, Hay KA, Hanafi L-A, Li D, Cherian S, Chen X, et al. Durable Molecular Remissions in Chronic Lymphocytic Leukemia Treated With CD19-Specific Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells After Failure of Ibrutinib. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 sept 2017;35(26):3010-20.
75. Lemal R. État des lieux dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique Disponible sur: <https://www.edimark.fr/correspondances-onco-hematologie/etat-lieux-traitement-leucemie-lymphoi-chronique>
76. Porter DL, Hwang W-T, Frey NV, Lacey SF, Shaw PA, Loren AW, et al. Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci Transl Med*. 2 sept 2015;7(303):303ra139.
77. Riches JC, Davies JK, McClanahan F, Fatah R, Iqbal S, Agrawal S, et al. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*. 28 févr 2013;121(9):1612-21.
78. Fraietta JA, Beckwith KA, Patel PR, Ruella M, Zheng Z, Barrett DM, et al. Ibrutinib enhances chimeric antigen receptor T-cell engraftment and efficacy in leukemia. *Blood*. 3 mars 2016;127(9):1117-27.
79. Gauthier J, Hirayama AV, Purushe J, Hay KA, Lymp J, Li DH, et al. Feasibility and efficacy of CD19-targeted CAR T cells with concurrent ibrutinib for CLL after ibrutinib failure. *Blood*. 7 mai 2020;135(19):1650-60.
80. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia: a meta-analysis of the randomized trials. CLL Trialists' Collaborative Group. *J Natl Cancer Inst*. 19 mai 1999;91(10):861-8.
81. Quinquenel A, Aurran-Schleinitz T, Clavert A, Cymbalista F, Dartigeas C, Davi F, et al. Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: Recommendations of the French CLL Study Group (FILO). *HemaSphere*. 23 sept 2020 ;4(5). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7523785/>

82. Byrd JC, Hillmen P, O'Brien S, Barrientos JC, Reddy NM, Coutre S, et al. Long-term follow-up of the RESONATE phase 3 trial of ibrutinib vs ofatumumab. *Blood*. 9 mai 2019;133(19):2031-42.
83. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, Eichhorst B, Langerak AW, Owen C, et al. Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 01 2019;37(4):269-77.
84. Jones JA, Mato AR, Wierda WG, Davids MS, Choi M, Cheson BD, et al. Venetoclax for chronic lymphocytic leukaemia progressing after ibrutinib: an interim analysis of a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(1):65-75.
85. Dreger P, Ghia P, Schetelig J, van Gelder M, Kimby E, Michallet M, et al. High-risk chronic lymphocytic leukemia in the era of pathway inhibitors: integrating molecular and cellular therapies. *Blood*. 30 août 2018;132(9):892-902.
86. Dreger P, Corradini P, Kimby E, Michallet M, Milligan D, Schetelig J, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*. janv 2007;21(1):12-7.
87. Roeker LE, Dreger P, Brown JR, Lahoud OB, Eyre TA, Brander DM, et al. Allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia in the era of novel agents. *Blood Adv*. 25 août 2020;4(16):3977-89.
88. Place de la biologie moléculaire pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës - EM consulte. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/968289/article/place-de-la-biologie-moleculaire-pour-le-diagnosti>
89. 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. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 mars 2012;30(9):980-8.
90. Letestu R. PROGNOSTIC IMPACT OF POSITIVE MINIMAL RESIDUAL DISEASE (MRD) BELOW... by Dr. Remi Letestu. Disponible sur: https://library.ehaweb.org/eha/2018/stockholm/215408/remi.letestu.prognostic.impact.of.positive.minimal.residual.disease.28mrd29.html?f=topic=1574*media=3
91. Letestu. Prognostic value of high-sensitivity measurable residual disease assessment after front-line chemoimmunotherapy in chronic lymphocytic leukemia | *Leukemia*. Disponible sur: <https://www.nature.com/articles/s41375-020-01009-z>
92. Ghia P, Rawstron A. Minimal residual disease analysis in chronic lymphocytic leukemia: a way for achieving more personalized treatments. *Leukemia*. juin 2018;32(6):1307-16.
93. Fürstenau M, De Silva N, Eichhorst B, Hallek M. Minimal Residual Disease Assessment in CLL: Ready for Use in Clinical Routine? *HemaSphere*. 9 août 2019;3(5):e287.
94. Dimier N, Delmar P, Ward C, Morariu-Zamfir R, Fingerle-Rowson G, Bahlo J, et al. A model for predicting effect of treatment on progression-free survival using MRD as a surrogate end point in CLL. *Blood*. 1 mars 2018;131(9):955-62.

95. Brander DM, Seymour JF, Ma S, Anderson MA, Choi MY, Kipps TJ, et al. Durability of Responses on Continuous Therapy and Following Drug Cessation in Deep Responders with Venetoclax and Rituximab. *Blood*. 29 nov 2018;132(Supplement 1):183-183.
96. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, Eichhorst B, Langerak AW, Owen C, et al. Fixed Duration of Venetoclax-Rituximab in Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia Eradicates Minimal Residual Disease and Prolongs Survival: Post-Treatment Follow-Up of the MURANO Phase III Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 févr 2019;37(4):269-77.
97. Shanafelt TD, Wang XV, Kay NE, Hanson CA, O'Brien S, Barrientos J, et al. Ibrutinib-Rituximab or Chemoimmunotherapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 1 août 2019;381(5):432-43.
98. Quinquenel A. Résultats définitifs de l'étude FILO ICLL 07-GAI : un taux de MRD négative impressionnant en fin de traitement ! Disponible sur: <https://www.edimark.fr/direct-ash-2018/resultats-definitifs-etude-filo-icll-07-gai-taux-mrd-negative-impressionnant-fin-traitement>
99. Hillmen P, Boucher RH, Webster N, Dalal S, Brock K, Yates F, et al. Continued Long Term Responses to Ibrutinib + Venetoclax Treatment for Relapsed/Refractory CLL in the Blood Cancer UK TAP Clarity Trial. *Blood*. 5 nov 2020;136(Supplement 1):17-8.
100. Ladetto M, Brüggemann M, Monitillo L, Ferrero S, Pepin F, Drandi D, et al. Next-generation sequencing and real-time quantitative PCR for minimal residual disease detection in B-cell disorders. *Leukemia*. juin 2014;28(6):1299-307.
101. 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.
102. Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Brüggemann M, Raff T, Pott C, et al. Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia*. nov 2009;23(11):2007-17.
103. van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*. juin 2003;17(6):1013-34.
104. van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 25 juin 2015;125(26):3996-4009.
105. Voena C, Ladetto M, Astolfi M, Provan D, Gribben JG, Boccadoro M, et al. A novel nested-PCR strategy for the detection of rearranged immunoglobulin heavy-chain genes in B cell tumors. *Leukemia*. oct 1997;11(10):1793-8.
106. Logan AC, Zhang B, Narasimhan B, Carlton V, Zheng J, Moorhead M, et al. Minimal residual disease quantification using consensus primers and high-throughput IGH sequencing predicts post-transplant relapse in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. août 2013;27(8):1659-65.

107. Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VEH, Stow P, Coustan-Smith E, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 20 déc 2012;120(26):5173-80.
108. 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.
109. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner 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.
110. Kovacs G, Robrecht S, Fink AM, Bahlo J, Cramer P, von Tresckow J, et al. Minimal Residual Disease Assessment Improves Prediction of Outcome in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Who Achieve Partial Response: Comprehensive Analysis of Two Phase III Studies of the German CLL Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 nov 2016;34(31):3758-65.
111. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, Villamor N, Letestu R, Nomdedeu J, et al. A complementary role of multiparameter flow cytometry and high-throughput sequencing for minimal residual disease detection in chronic lymphocytic leukemia: an European Research Initiative on CLL study. *Leukemia*. avr 2016;30(4):929-36.
112. Letestu R, Garff-Tavernier ML. Détermination de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans la leucémie lymphoïde chronique : état des lieux des pratiques techniques et perspectives. *Hématologie*. 1 juin 2019;25(2):24-35.
113. Macey MG, McCarthy DA, Milne T, Cavenagh JD, Newland AC. Comparative study of five commercial reagents for preparing normal and leukaemic lymphocytes for immunophenotypic analysis by flow cytometry. *Cytometry*. 1999;38(4):153-60.
114. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):31-9.
115. Letestu R. JPFC-APC 2018. Disponible sur: <https://www.alphavisa.com/jfpc/2018/themes.php>
116. ANSES_GuideValidation.pdf [Internet]. [cité 6 sept 2021]. Disponible sur: https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf
117. Letestu R. PROGNOSTIC IMPACT OF POSITIVE MINIMAL RESIDUAL DISEASE (MRD) BELOW... by Dr. Remi Letestu [Internet]. [cité 16 juin 2021]. Disponible sur: https://library.ehaweb.org/eha/2018/stockholm/215408/remi.letestu.prognostic.impact.of.positive.minimal.residual.disease.28mrd29.html?f=topic=1574*media=3
118. Rawstron AC. Measurable Residual Disease in CLL. *ASH 2018*. :26.
119. Caligaris-Cappio F, Ghia P. Novel insights in chronic lymphocytic leukemia: are we getting closer to understanding the pathogenesis of the disease? *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 sept 2008;26(27):4497-503.

120. Borowitz MJ, Pullen DJ, Winick N, Martin PL, Bowman WP, Camitta B. Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: Implications for residual disease detection: A report from the children's oncology group. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;68B(1):18-24.
121. Böttcher S, Stilgenbauer S, Busch R, Brüggemann M, Raff T, Pott C, et al. Standardized MRD flow and ASO IGH RQ-PCR for MRD quantification in CLL patients after rituximab-containing immunochemotherapy: a comparative analysis. *Leukemia.* nov 2009;23(11):2007-17.
122. Singh V, Gupta D, Almasan A. Development of Novel Anti-Cd20 Monoclonal Antibodies and Modulation in Cd20 Levels on Cell Surface: Looking to Improve Immunotherapy Response. *J Cancer Sci Ther.* nov 2015;7(11):347-58.
123. Jilani I, O'Brien S, Manshuri T, Thomas DA, Thomazy VA, Imam M, et al. Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 15 nov 2003;102(10):3514-20.
124. Pickartz T, Ringel F, Wedde M, Renz H, Klein A, Neuhoff N von, et al. Selection of B-cell chronic lymphocytic leukemia cell variants by therapy with anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Exp Hematol.* 1 déc 2001;29(12):1410-6.
125. Dransfield I. Inhibitory FcγRIIb and CD20 internalization. *Blood.* 30 janv 2014;123(5):606-7.
126. A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies | SpringerLink. Disponible sur: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12325-016-0451-1>
127. 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.
128. Jones JD, Hamilton BJ, Rigby WFC. Rituximab mediates loss of CD19 on B cells in the absence of cell death. *Arthritis Rheum.* oct 2012;64(10):3111-8.
129. Sayala HA, Rawstron AC, Hillmen P. Minimal residual disease assessment in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 1 sept 2007;20(3):499-512.
130. IclCLLe: Assessment of the Mechanism of Action of Ibrutinib (PCI-32765) in B-cell Receptor Pathway Inhibition in CLL. - AdisInsight.
131. Rawstron A. Flow cytometry for Minimal/Measurable Residual Disease Detection. Disponible sur: <https://library.ehaweb.org/eha/2018/stockholm/219103/andy.rawstron.flow.cytometry.for.minimal.measurable.residual.disease.detection.html>
132. Letestu R, Cartron G, Lepretre S, Le Garff-Tavernier M, Solly F, Campos L, et al. Minimal Residual Disease (MRD) By 8-Color Flow Cytometry (Flow-MRD) and IGH Clonospecific Quantitative PCR (ASO RQPCR) Reached Similar Performances for Evaluation of CLL Treatment in a Phase II Clinical Trial: Cross Validation of the Methods. *Blood.* 6 déc 2014;124(21):3307-3307.
133. Rawstron AC, Böttcher S, Letestu R, Villamor N, Fazi C, Kartsios H, et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC)

update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia*. janv 2013;27(1):142-9.

134. Bomberger C, Singh-Jairam M, Rodey G, Guerriero A, Yeager AM, Fleming WH, et al. Lymphoid Reconstitution After Autologous PBSC Transplantation With FACS-Sorted CD34+ Hematopoietic Progenitors. *Blood*. 1 avr 1998;91(7):2588-600.

135. Gill S, Vides V, Frey N, Metzger S, O'Brien M, Hexner E, et al. Prospective Clinical Trial of Anti-CD19 CAR T Cells in Combination with Ibrutinib for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia Shows a High Response Rate. 2018;

136. Woyach JA, Awan F, Flinn IW, Berdeja JG, Wiley E, Mansoor S, et al. A phase 1 trial of the Fc-engineered CD19 antibody XmAb5574 (MOR00208) demonstrates safety and preliminary efficacy in relapsed CLL. *Blood*. 4 déc 2014;124(24):3553-60.

137. Boxhammer. EXPRESSION OF CD19 ANTIGEN ON CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA CELLS AFTER TAFASITAMAB (ANTI-CD19) TREATMENT: PHASE I TRIAL DATA. <https://library.ehaweb.org/eha/2020/eha25th/294589/rainer.boxhammer.expression.of.cd19.antigen.on.chronic.lymphocytic.leukemia.html>

138. Degheidy HA, Venzon DJ, Farooqui MZH, Abbasi F, Arthur DC, Wilson WH, et al. Combined normal donor and CLL: Single tube ZAP-70 analysis. *Cytometry B Clin Cytom*. mars 2012;82(2):67-77.

139. Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MA, van Dongen JJ. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am J Pathol*. juin 1990;136(6):1215-22.

140. Intracellular cytokine detection by flow cytometry in pigs: fixation, permeabilization and cell surface staining : https://safeaccess.unboundmedicine.com/medline/citation/17720184/Intracellular_cytokine_detection_by_flow_cytometry_in_pigs:_fixation_permeabilization_and_cell_surface_staining_

141. Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics. *Front Immunol*. 22 nov 2017;8:1603.

142. Banihashemi SR, Hosseini AZ, Rahbarizadeh F, Ahmadvand D. Development of specific nanobodies (VHH) for CD19 immuno-targeting of human B-lymphocytes. *Iran J Basic Med Sci*. mai 2018;21(5):455-64.

143. Schriewer L, Schütze K, Petry K, Hambach J, Fumey W, Koenigsdorf J, et al. Nanobody-based CD38-specific heavy chain antibodies induce killing of multiple myeloma and other hematological malignancies. *Theranostics*. 2020;10(6):2645-58.

144. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol Baltim Md* 1950. oct 1984;133(4):1710-5.

145. Lu P, Wang S, Franzen CA, Venkataraman G, McClure R, Li L, et al. Ibrutinib and venetoclax target distinct subpopulations of CLL cells: implication for residual disease eradication. *Blood Cancer J*. 18 févr 2021;11(2):39.

146. Letestu R, Garff-Tavernier ML. Détermination de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans la leucémie lymphoïde chronique : état des lieux des pratiques techniques et perspectives. *Hématologie*. 1 juin 2019;25(2):24-35.
147. Tournilhac O, Le Garff-Tavernier M, Tabrizi R, Nguyen-Quoc S, Legrand-Izadifar F, Combes P, et al. RIC Allogeneic Stem Cell Transplantation for High Risk CLL Followed By Preemptive MRD-Based Immunointervention - Final Results from the Phase II ICLL03 Ricac-Pmm Trial (FILO - SFGM-TC French intergroup). *Blood*. 7 déc 2017;130(Supplement 1):4599-4599.
148. Tournilhac O, Le Garff-Tavernier M, Quoc SN, Forcade E, Chevallier P, Legrand-Izadifar F, et al. Efficacy of minimal residual disease driven immune-intervention after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for high-risk chronic lymphocytic leukemia: results of a prospective multicenter trial. *Haematologica*. 11 juin 2020;106(7):1867-75.
149. Lee BO, Moyron-Quiroz J, Rangel-Moreno J, Kusser KL, Hartson L, Sprague F, et al. CD40, but not CD154, expression on B cells is necessary for optimal primary B cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 déc 2003;171(11):5707-17.
150. Goshaw JM, Gao Q, Wardrope J, Dogan A, Roshal M. 14-Color single tube for flow cytometric characterization of CD5+ B-LPDs and high sensitivity automated minimal residual disease quantitation of CLL/SLL. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100(4):509-18.
151. Cherian S, Miller V, McCullouch V, Dougherty K, Fromm JR, Wood BL. A novel flow cytometric assay for detection of residual disease in patients with B-lymphoblastic leukemia/lymphoma post anti-CD19 therapy. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018;94(1):112-20.
152. DaneshManesh AH, Mikaelsson E, Jeddi-Tehrani M, Bayat AA, Ghods R, Ostadkarampour M, et al. Ror1, a cell surface receptor tyrosine kinase is expressed in chronic lymphocytic leukemia and may serve as a putative target for therapy. *Int J Cancer*. 2008;123(5):1190-5.
153. Choi MY, Widhopf GF, Ghia EM, Kidwell RL, Hasan MK, Yu J, et al. Phase I Trial: Cirmtuzumab Inhibits ROR1 Signaling and Stemness Signatures in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cell Stem Cell*. 1 juin 2018;22(6):951-959.e3.
154. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. nov 2019;94(11):1266-87.
155. Proprius MSD, Intoppa S, Milani ML, Mariglia P, Nardacci MG, Peragine N, et al. ROR1 is an accurate and reliable marker of minimal residual disease in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2020;190(6):e346-9.
156. Uhrmacher S, Schmidt C, Erdfelder F, Poll-Wolbeck SJ, Gehrke I, Hallek M, et al. Use of the receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) as a diagnostic tool in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leuk Res*. oct 2011;35(10):1360-6.
157. 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. *Leuk Res*. oct 2011;35(10):1390-4.

158. Farren TW, Giustiniani J, Fanous M, Liu F, Macey MG, Wright F, et al. Minimal residual disease detection with tumor-specific CD160 correlates with event-free survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J.* 23 janv 2015;5:e273.
159. Liu F-T, Giustiniani J, Farren T, Jia L, Bensussan A, Gribben JG, et al. CD160 signaling mediates PI3K-dependent survival and growth signals in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1 avr 2010;115(15):3079-88.
160. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 1 janv 2017;3(1):28-35.
161. Farren TW, Sadanand KS, Agrawal SG. Highly Sensitive and Accurate Assessment of Minimal Residual Disease in Chronic Lymphocytic Leukemia Using the Novel CD160-ROR1 Assay. *Front Oncol.* 2020;10:597730.
162. Weber LM, Robinson MD. Comparison of clustering methods for high-dimensional single-cell flow and mass cytometry data. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* déc 2016;89(12):1084-96.
163. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* juill 2015;87(7):636-45.
164. Pedreira CE, Costa ES da, Lecrevisse Q, Grigore G, Fluxa R, Verde J, et al. From big flow cytometry datasets to smart diagnostic strategies: The EuroFlow approach. *J Immunol Methods.* 1 déc 2019;475:112631.
165. Apete A. Mise en place d'un panel de quantification de la maladie résiduelle par cytométrie en flux multiparamétrique dans la leucémie lymphoïde chronique [Internet]. Université de Lille; 2019. Disponible sur: <https://pepите.univ-lille.fr/ori-oai-search/notice/view/univ-lille-12509>
166. Wierda WG, Rawstron A, Cymbalista F, Badoux X, Rossi D, Brown JR, et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations. *Leukemia.* 24 juin 2021;
167. Dreger P, Döhner H, Ritgen M, Böttcher S, Busch R, Dietrich S, et al. Allogeneic stem cell transplantation provides durable disease control in poor-risk chronic lymphocytic leukemia: long-term clinical and MRD results of the German CLL Study Group CLL3X trial. *Blood.* 7 oct 2010;116(14):2438-47.
168. Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* nov 2010;11(11):1029-35.
169. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* avr 2020;34(4):966-84.
170. Winqvist M, Palma M, Heimersson K, Mellstedt H, Österborg A, Lundin J. Dual targeting of Bruton tyrosine kinase and CD52 induces minimal residual disease-negativity in the bone marrow of poor-prognosis chronic lymphocytic leukaemia

patients but is associated with opportunistic infections – Results from a phase I study. *Br J Haematol.* 2018;182(4):590-4.

171. Catherwood MA, Gonzalez D, Donaldson D, Clifford R, Mills K, Thornton P. Relevance of TP53 for CLL diagnostics. *J Clin Pathol.* mai 2019;72(5):343-6.

172. Roschewski M, Dunleavy K, Pittaluga S, Moorhead M, Pepin F, Kong K, et al. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *Lancet Oncol.* mai 2015;16(5):541-9.

173. Yeh P, Hunter T, Sinha D, Ftouni S, Wallach E, Jiang D, et al. Circulating tumour DNA reflects treatment response and clonal evolution in chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Commun.* 17 mars 2017;8:14756.

|

AUTEUR : Nom : LUPA

Prénom : Quentin

Date de soutenance : 19 Octobre 2021

Titre de la thèse : Intérêts et limites de l'étude de la MRD LLC par cytométrie en flux multiparamétrique à l'heure des thérapies ciblées

Thèse - Médecine - Lille 2021

Cadre de classement : *Hématologie*

DES + spécialité : *Biologie médicale*

Mots-clés : Leucémie lymphoïde chronique, cytométrie en flux, maladie résiduelle, thérapies ciblées.

Résumé :

La Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est la leucémie la plus fréquente dans les pays industrialisés. Si durant de nombreuses années, seuls les patients les plus symptomatiques, au pronostic péjoratif étaient traités, le développement d'anticorps monoclonaux et plus récemment de thérapies ciblées comme les inhibiteurs du BCR et de Bcl-2 a modifié la prise en charge thérapeutique des patients.

Depuis, l'intérêt d'évaluer la maladie résiduelle (MRD) dans la LLC n'a cessé de croître. Véritable outil d'évaluation de la réponse au traitement en cas d'immunochimiothérapie, sa place dans les nouvelles combinaisons thérapeutiques est à préciser. À l'avenir, le statut de la MRD pourrait guider la prise en charge thérapeutique. Ces perspectives restent néanmoins éloignées du cadre d'application existant puisque la MRD n'est actuellement pas indiquée en dehors des essais cliniques.

Deux techniques de référence sont utilisées pour l'étude de la MRD-LLC : la cytométrie en flux (CMF) et la biologie moléculaire ; la CMF constituant actuellement la technique de prédilection pour cette analyse spécialisée. L'avènement de l'immunothérapie et des thérapies ciblées nécessite une adaptation dans les pratiques du cytométriste puisqu'il a été montré que ces traitements pouvaient entraîner des modulations phénotypiques à la surface des cellules de LLC. Les axes d'optimisation de la technique concernent à la fois la standardisation du test, l'amélioration des performances, le choix du panel et les stratégies d'identification à mettre en place pour s'affranchir au mieux des modulations phénotypiques induites par ces nouvelles thérapies. À l'heure d'une médecine de précision, la MRD devra s'intégrer dans le cadre d'une prise en charge personnalisée adaptée à chaque patient.

Composition du Jury :

Président : Pr Myriam LABALETTE

Assesseurs : Pr Agnès CHARPENTIER – Dr Christophe ROUMIER

Directeur de thèse : Dr Claire HEMAR