



HAL
open science

Étude par cytométrie en flux de marqueurs de réponse au traitement dans le cadre de la LLC

Guillaume Couillez

► **To cite this version:**

Guillaume Couillez. Étude par cytométrie en flux de marqueurs de réponse au traitement dans le cadre de la LLC. Sciences pharmaceutiques. 2022. dumas-04044655

HAL Id: dumas-04044655

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04044655>

Submitted on 24 Mar 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



**UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
UFR de Pharmacie d'Amiens**

Année 2022

**THESE D'EXERCICE POUR LE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 06 Octobre 2022

Par Guillaume COUILLEZ

Né le 25 Septembre 1995

**ÉTUDE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE MARQUEURS DE
REPOSE AU TRAITEMENT DANS LE CADRE DE LA LLC**

Président du Jury : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd, CHU Amiens, UPJV

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur BOYER Thomas, CHU Amiens, UPJV

Membres du jury : Monsieur le Professeur MAROLLEAU Jean-Pierre,
CHU Amiens, UPJV

Monsieur le Professeur GARCON Loïc, CHU Amiens, UPJV

Madame le Docteur MONTES Lydia, CHU Amiens, UPJV

Monsieur le Docteur MOREL Pierre, CHU Amiens



**UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE
UFR de Pharmacie d'Amiens**

Année 2022

**THESE D'EXERCICE POUR LE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 06 Octobre 2022

Par Guillaume COUILLEZ

Né le 25 Septembre 1995

**ÉTUDE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE MARQUEURS DE
REPOSE AU TRAITEMENT DANS LE CADRE DE LA LLC**

Président du Jury : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd, CHU Amiens, UPJV

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur BOYER Thomas, CHU Amiens, UPJV

Membres du jury : Monsieur le Professeur MAROLLEAU Jean-Pierre,
CHU Amiens, UPJV

Monsieur le Professeur GARCON Loïc, CHU Amiens, UPJV

Madame le Docteur MONTES Lydia, CHU Amiens, UPJV

Monsieur le Docteur MOREL Pierre, CHU Amiens

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Saïd KAMEL

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Laboratoire de Biochimie et de Biologie endocrinienne et osseuse)

Monsieur le Professeur,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

J'espère que ce travail saura retenir votre intérêt.

Soyez assuré de mon sincère respect et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre MAROLLEAU

*Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Hématologie - Transfusion)
Chef du service d'Hématologie clinique et de thérapie cellulaire
Chef du Pôle « Oncopôle »*

Monsieur le Professeur,

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à mon jury de thèse. J'espère que ce travail saura retenir votre intérêt.

Soyez assuré de mon sincère respect et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Loïc GARÇON

*Professeur des Universités - Praticien Hospitalier (Hématologie - Transfusion)
Chef du service d'Hématologie biologique
Chef du service de Génétique constitutionnelle*

Monsieur le Professeur,

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à mon jury de thèse.

Merci pour l'intérêt que vous portez à ce travail. Merci pour votre écoute, votre disponibilité et votre accompagnement tout au long de mon internat.

Soyez assuré de mon plus profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Madame le Docteur Lydia MONTES

Chef de clinique (Service d'Hématologie clinique et de thérapie cellulaire)

Je te remercie pour l'honneur que tu me fais en acceptant de participer à mon jury de thèse.

Merci pour l'intérêt que tu portes à ce travail.

Je tiens à t'exprimer toute ma gratitude et mon respect.

Monsieur le Docteur Pierre MOREL

Praticien Hospitalier (Service d'Hématologie clinique et de thérapie cellulaire)

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à mon jury de thèse. Merci pour l'intérêt et votre aide dans la réalisation de ce projet.

Soyez assuré de mon sincère respect et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Thomas BOYER

Maître de conférence des Universités - Praticien Hospitalier (Service d'Hématologie biologique)

Je te remercie Thomas pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, ainsi que pour la supervision de ce travail et l'opportunité que tu m'as offerte de présenter nos résultats lors de mon premier congrès. Ce fut un plaisir de partager ce projet avec toi. Merci pour ton accompagnement, ta disponibilité, ta réactivité, tes nombreux conseils et enfin tes raboutages apportés à ce manuscrit.

A mes parents et à ma famille

Merci à vous, maman, papa, pour m'avoir toujours soutenu depuis le début de cette aventure. Malgré mes petits hauts et bas, vous avez toujours été là quand il le fallait. Merci pour tout votre amour, votre présence et votre magnifique soutien. J'espère vous rendre fiers. Sans vous, rien de tout cela n'aurait été possible.

Je remercie également mes grands-parents, ainsi que tout le reste de ma famille, c'est un réel bonheur de pouvoir passer du temps en votre compagnie, que ce soit au cours des anniversaires, des fêtes, des vacances. Je vous aime !

A Floriane

Ma Floupi, merci d'être toi et pour toutes tes petites attentions. Je te remercie infiniment pour ton soutien et pour tes encouragements au quotidien. Quel que soit les circonstances et l'endroit, je sais que tu es là pour moi. A tous nos beaux moments passés, mais surtout futurs !

A ma belle-famille

Pour m'avoir formidablement accueilli dans votre famille, c'est un réel plaisir de partager des moments avec vous.

Aux copains lillois et à la TeamPharma,

Je remercie tous les copains de promo, notamment ceux de la TeamPharma (Alex, Camille, Eugénie, Gwendo, Hugo, Jojo, Juliette, Laure, Ludivine, Marilou, Thomas) pour toutes ces années partagées, les fous rires, les soirées, les journées BU/SDT, les anniversaires. Malgré la distance pour certains, merci pour tous ces beaux souvenirs.

Enfin, comment ne pas citer les loulous de l'EF ? Ces nombreuses fléchettes, bibines, séances de sport ont contribué à rendre ces années de fac plus exceptionnelles !

A mes cointernes et collègues du CBH

Je remercie mes cointernes que j'ai eu la chance de rencontrer durant ces différents semestres réalisés, et qui ont donné naissance à de belles amitiés. Je me souviendrai notamment très longtemps de ce premier « semestre », que de souvenirs mémorables !

Je remercie également l'ensemble des membres du service d'hématologie biologique, du secteur de cytogénétique et du laboratoire d'immunologie du CHU d'Amiens, biologistes et techniciens, pour leur sympathie et ces moments de convivialité et d'échanges.

Petit clin d'œil à Elodie, Ludivine, Murielle et Valentin pour leur contribution respective dans ce travail, ainsi qu'aux techniciennes d'immuno pour m'avoir laissé faire mes petites acquisitions sur leur navios de compét'.

Aux copains amiénois et « colocataires » de l'internat

Pour toutes ces rencontres, ces nombreuses soirées, ces BBQ et ces fûts vides, sans oublier les pizzas de Coco du jeudi. Tous ces bons moments resteront liés à ce début d'aventure amiénoise.

Je remercie également mon ancien voisin de la chambre 24 qui, depuis la maternelle dans la « Cité de Gayant », n'est jamais si loin...

Aux perdus-de-vues d'école, du ping, de la fac' et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à mon aventure,

Malgré les chemins qui nous ont séparés, les souvenirs restent dans le cœur à jamais.

Du fond du cœur, mille mercis !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	12
LISTE DES ABBREVIATIONS	14
LA LEUCEMIE LYMPHOIDE CHRONIQUE.....	16
1. Définition et classification.....	16
2. Epidémiologie	19
3. Facteurs de risques	20
a. Susceptibilité génétique	20
b. Facteurs environnementaux.....	20
c. Antécédents médicaux	20
4. Classifications, marqueurs et score pronostiques	21
a. Classifications clinico-biologiques.....	21
b. Marqueurs biologiques.....	23
c. Score pronostique.....	29
5. Complications de la LLC.....	31
6. Stratégie thérapeutique.....	32
a. Indication de traitement.....	32
b. Bilan pré-thérapeutique	33
c. Arsenal thérapeutique	34
d. Arbres décisionnels.....	38
e. Évaluation de la réponse	39
CONTEXTE ET OBJECTIFS.....	42
1. Statut mutationnel <i>IGVH</i>	42
2. LLC et BCL2	44

3. Objectifs	47
MATERIELS ET METHODES	48
1. Constitution de la cohorte et recueil de données.....	48
2. Protocole et automate	49
3. Analyse et stratégie de fenêtrage	50
a. Tube 1	51
b. Tube 2	52
4. Détermination du statut mutationnel du gène <i>IGVH</i>	52
5. Lignée cellulaire surexprimant Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl	53
6. Analyse statistique	53
RESULTATS	54
1. Caractéristiques de la cohorte	54
2. Étude du profil B naïf/B mémoire et comparaison avec le statut mutationnel <i>IGVH</i>	56
3. Réponse au Venetoclax et expression protéique de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl	58
DISCUSSION.....	62
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	66
BIBLIOGRAPHIE	68
ANNEXE I : CARACTERISTIQUES IMMUNOPHENOTYPIQUES DES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS B CHRONIQUES ⁶	78
ANNEXE II : RECOMMANDATIONS FRANCAISES POUR LE TRAITEMENT DE LA LLC ⁷⁴	80
ANNEXE III : CRITERES DE DEFINITION DE LA REPONSE APRES TRAITEMENT DANS LA LLC ²	82
ANNEXE IV : PROTOCOLE DE CONGELATION DES CELLULES MONONUCLEES	84
ANNEXE V : PROTOCOLES DE PRISE EN CHARGE DES PRELEVEMENTS CRYOPRESERVES ET DE MARQUAGE.....	86
ANNEXE VI : CARACTERISTIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES DE LA COHORTE DE VALIDATION.....	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Frottis sanguin d'un patient atteint de LLC	16
Figure 2. Définition des 5 aires lymphoïdes selon la classification de Binet	22
Figure 3. Survie globale des patients LLC selon les stades de la classification de Binet	22
Figure 4. Impact des principales anomalies cytogénétiques sur la probabilité de survie	25
Figure 5. Courbe de survie de Kaplan-Meier mesurant l'impact du nombre d'anomalies cytogénétiques sur la probabilité de survie	25
Figure 6. Courbe de survie de Kaplan-Meier comparant les patients avec un clone à statut <i>IGVH</i> muté vs. statut <i>IGVH</i> non muté	27
Figure 7. Estimation de la survie sans progression en fonction du statut mutationnel après un traitement de première ligne par RFC	27
Figure 8. Proportion de BCR stéréotypés parmi les répertoires d'Ig de patients LLC	28
Figure 9. Catégorisation des marqueurs cytogénétiques et moléculaires pronostics dans la LLC	28
Figure 10. Disparité mutationnelle dans la LLC	29
Figure 11. Courbe de survie de Kaplan-Meier en fonction des sous-groupes CLL-IPI	30
Figure 12. Chronologie du développement des différents traitements de la LLC	34
Figure 13. Représentation schématique d'une cellule de LLC avec les principales cibles médicamenteuses	37
Figure 14. Chronologie de l'approbation réglementaire des principaux médicaments dans la LLC parallèlement à la survie des patients malades	37
Figure 15. Schéma illustrant les principales étapes de la lymphopoïèse B	43
Figure 16. Schéma illustrant l'origine des clones <i>IGVH</i> mutés et non mutés	44
Figure 17. Schéma simplifié illustrant l'action de membres de BCL2 au niveau de la membrane mitochondriale	45
Figure 18. Schéma illustrant le mécanisme d'action du venetoclax	46
Figure 19. Stratégie de fenêtrage initiale commune aux différents panels	50
Figure 20. Stratégie de fenêtrage du tube 1 et profil B naïfs/mémoires	51
Figure 21. Stratégie de fenêtrage du tube 2 et expression de Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1	52
Figure 22. Répartition des traitements de première ligne adoptés dans la cohorte	55
Figure 23. Répartition des différents subsets identifiés au sein de la cohorte	56
Figure 24. Comparaison des données selon le traitement par venetoclax	60

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Calcul du score de Matutes	17
Tableau II. Évaluation d'un patient au diagnostic de LLC selon les recommandations de l'IWCLL-2018	18
Tableau III. Classification clinico-biologique de Rai	21
Tableau IV. Classification clinico-biologique de Binet	22
Tableau V. Critères de définition de l'état de la maladie (indolente ou active) selon l'IWCLL-2018	23
Tableau VI. Indications de traitement selon les sous-groupes CLL-IPI	30
Tableau VII. Prophylaxie infectieuse selon le traitement initié	32
Tableau VIII. Bilan pré-thérapeutique selon les recommandations du groupe FILO	33
Tableau IX. Marqueurs utilisés pour l'acquisition du tube 1	49
Tableau X. Marqueurs utilisés pour l'acquisition du tube 2	49
Tableau XI. Caractéristiques biologiques et cliniques des patients inclus dans la cohorte	54
Tableau XII. Tableau de contingence entre les résultats obtenus par CMF et par biologie moléculaire	57
Tableau XIII. Répartition des 98 patients selon le profil obtenu par CMF et le statut <i>IGHV</i> par biologie moléculaire	57
Tableau XIV. Caractéristiques biologiques et cliniques des patients dont le tube n°2 a pu être analysé	58
Tableau XV. Comparaison des données entre patients traités et non traités	59
Tableau XVI. Comparaison des données selon l'évaluation de la MRD par CMF	61

LISTE DES ABBREVIATIONS

AMM = Autorisation de mise sur le marché

BCR = Récepteur des lymphocytes B

CHUAP = Centre Hospitalo-Universitaire Amiens-Picardie

CMF = Cytométrie en flux

DLBCL = Lymphome B diffus à grandes cellules

ERIC = European Research Initiative in CLL

FILO = French Innovative Leukemia Organization

FC = Fludarabine-cyclophosphamide

GA101 = Obinutuzumab (GAZYVARO®)

iBTK = inhibiteurs de la Bruton Tyrosine Kinase

IC = Intervalle de confiance

ICT = Immunochimiothérapie

IGVH-M = statut muté du gène *IGVH*

IGVH-NM = Statut non muté du gène *IGVH*

IWCLL = International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia

LLC = Leucémie lymphoïde chronique

LNH-B = Lymphome non-hodgkinien

MBL = Lymphocytose B monoclonale

MFI = Moyenne des intensités de fluorescence

MRD = Maladie résiduelle

NFS = Numération de la formule sanguine

NGS = Next Generation Sequencing

OMS = Organisation mondiale de la santé

RR = Risque relatif

RS = Syndrome de Richter

RT-qPCR = Réaction de polymérisation en chaîne quantitative après rétro-transcription

SG = Survie globale

SGN = Brentuximab-vedotin

SLL = Lymphome lymphocytique

SSP = Survie sans progression

TDL = Temps de doublement des lymphocytes

LA LEUCEMIE LYMPHOÏDE CHRONIQUE

1. Définition et classification

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) appartient au groupe des syndromes lymphoprolifératifs chroniques. C'est une hémopathie maligne qui se caractérise par l'accumulation et la prolifération de lymphocytes B monoclonaux matures dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) puis le sang et possiblement la moelle osseuse.

Le diagnostic est établi selon les critères biologiques proposés par l'IWCLL (« International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia »)^{1,2}, qui la définit comme la présence d'une lymphocytose B monoclonale persistante (d'au moins 3 mois) et à une concentration sanguine supérieure à 5 G/L.

Le diagnostic de la LLC est évoqué devant la découverte fortuite d'une hyperlymphocytose sur un bilan biologique. La découverte devant la présence d'adénopathies bilatérales est plus rare.

Les lymphocytes de la LLC possèdent une morphologie (aspect mature avec chromatine mottée et rapport nucléocytoplasmique proche de 1, figure 1) et un immunophénotypage particuliers. Le frottis sanguin peut mettre en évidence des ombres de Gumprecht, correspondant à des cellules altérées lors de l'étalement sanguin. Par ailleurs, le taux de prolymphocytes (cellules de plus grande taille et immatures) doit rester en deçà de 55% de lymphocytes de forme prolymphocytoïde, le diagnostic de leucémie prolymphocytaire B étant alors retenue. Il a d'ailleurs été proposé en 2016 qu'une LLC avec un contingent prolymphocytaire $\geq 10\%$, que l'on nomme « LLC prolymphocytoïde », serait en faveur d'une forme plus sévère, avec une survie sans progression (SSP) et une survie globale (SG) diminuées.³

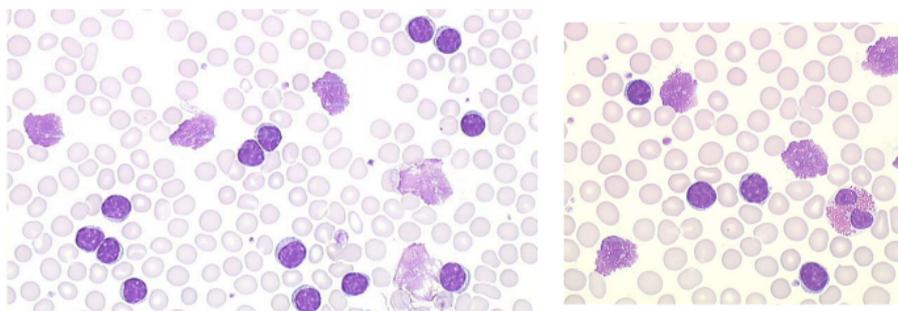


Figure 1 : Frottis sanguin d'un patient atteint de LLC avec présence de lymphocytes matures et d'ombre de Gumprecht (Microscopie optique x50).

L'immunophénotypage lymphocytaire est l'examen clé du diagnostic.

Les lymphocytes tumoraux expriment à la fois le marqueur pan-leucocytaire (CD45) et les marqueurs pan-B (CD19 et CD20), mais ont une expression diminuée voire absente du CD22, du CD79b et de l'immunoglobuline monoclonale de surface (chaîne légère kappa ou lambda). Enfin, ils coexpriment 2 marqueurs aberrants : le CD5 et le CD23. L'analyse d'expression de ces différents marqueurs par cytométrie en flux permet de calculer le score de Matutes (ou score du Royal Marsden Hospital, tableau I). Le diagnostic de LLC étant retenu lorsque ce score est supérieur ou égal à 4 (sur 5).^{4,5}

Cotation	1 point	0 point
CD5	+	-
CD23	+	-
CD22 ou CD79b	Expression diminuée	Expression forte
FMC7	-	+
Monotypie de l'Ig de surface	Expression faible	Expression forte

Tableau I : Calcul du score de Matutes.^{4,5}

En cas de doute sur l'aspect morphologique ou immunophénotypique, l'analyse d'autres marqueurs tels que le CD10, le CD43, le CD200 et le CD81 permettent d'aiguiller le diagnostic (*annexe I*)⁶ :

- Le CD10 sera négatif dans le cas de cellules leucémiques de LLC, mais positif dans le cas du diagnostic d'autres LNH-B comme le lymphome folliculaire (LF).
- Le CD43 sera surexprimé dans le cas d'une LLC, positif dans le lymphome à cellules du manteau (LCM), mais négatif dans le lymphome folliculaire (LF) et le lymphome de la zone marginale splénique (LZMS).⁷
- Le CD200 sera surexprimé dans la LLC et la leucémie à tricholeucocytes (HCL), mais cette fois négatif le lymphome à cellules du manteau (LCM).⁸
- Le CD81 est négatif dans la LLC mais s'exprime dans d'autres LNH-B.⁹

Par ailleurs, l'IWCLL a établi la liste des examens complémentaires à réaliser lors du diagnostic (tableau II).²

Analyses	Recommandations
Analyses pour établir le diagnostic	
Numération et Formule sanguine	Toujours
Immunophénotypage lymphocytaire	Toujours
Évaluation minimale avant traitement	
Score ECOG	Toujours
Numération et Formule sanguine	Toujours
BOM et/ou myélogramme	Uniquement si indication (cytopénie inexpliquée)
Bilan biochimique	Toujours
Electrophorèse des protéines sériques	Toujours
Test direct à l'antiglobuline	Toujours
Radiographie des poumons	Toujours
Bilan sérologique infectieux	Toujours
Analyses additionnelles avant traitement	
Analyses cytogénétiques sur sang périphérique (caryotype et FISH)	Toujours
Statut mutationnel <i>IgVH</i>	Toujours
Statut mutationnel <i>TP53</i>	Toujours
Dosage $\beta 2$ -microglobuline sérique	Désiré
Scanner TAP	Uniquement si indication
IRM, PET-scan	Uniquement si indication
Echographie abdominale	Possible

Tableau II : Évaluation d'un patient au diagnostic de LLC selon les recommandations de l'IWCLL-2018.²

Dans sa classification des néoplasies lymphoïdes (classification de 2008, révisée en 2016), l'OMS associe la LLC à deux autres entités qui lui sont proches : la lymphocytose B monoclonale et le lymphome lymphocytaire.¹⁰

La lymphocytose B monoclonale (ou MBL, Monoclonal B-cell Lymphocytosis) est définie par un contingent lymphocytaire B monoclonal inférieur à 5 G/L dans le sang périphérique en l'absence d'une lymphadénopathie et de cytopénies liées à une infiltration médullaire.¹¹ Dans le cas de la présence d'une cytopénie par infiltration médullaire, celle-ci définit le diagnostic de LLC indépendamment du nombre de lymphocytes B clonaux du sang périphérique ou de la présence d'une lymphadénopathie. La MBL évoluera en LLC à un taux de 1 à 2%/an.¹² Selon le taux du clone sanguin circulant, on distingue deux sous-types de MBL : les MBL à faible taux avec moins de 0,5 G/L de lymphocytes B clonaux (LC-MBL) et qui semblent être stable dans le temps aux MBL avec plus de 0,5 G/L (HC-MBL) correspondant à un stade pré-LLC.^{13,14}

Le lymphome lymphocytaire (ou SLL, Small Lymphocytic Lymphoma), quant à lui, se définit par la circulation sanguine d'un clone B monoclonal inférieur à 5 G/L avec la présence d'une

lymphadénopathie et en l'absence de cytopénie causée par une infiltration médullaire. Le diagnostic est permis par l'analyse histologique de la biopsie ganglionnaire ou par cytométrie en flux avec calcul du score de Matutes après dilacération.

2. Epidémiologie

En 2018, en France, deux tiers des hémopathies nouvellement diagnostiquées étaient lymphoïdes (30 000 sur 45 000 cas)¹⁵, les sous-types d'hémopathies les plus couramment retrouvés étant les suivants :

- Le myélome/plasmocytome (5 400 cas)
- Le lymphome B diffus à grandes cellules (5 100 cas)
- La leucémie lymphoïde chronique (4 700 cas)
- Les syndromes myélodysplasiques (4 700 cas)
- Les leucémies aiguës myéloïdes (3 400 cas).^{15,16}

La LLC touche deux fois plus fréquemment les hommes que les femmes (sexe ratio H/F = 1,9). Il s'agit d'une pathologie essentiellement du sujet âgé, puisque l'âge médian au diagnostic est de 71 ans pour les hommes et de 73 ans pour les femmes. Par ailleurs, l'incidence augmente nettement avec l'âge puisqu'elle passe de 2,0 pour 100 000 entre 40-44 ans à 59,8 pour 100 000 entre 90-94 ans, chez les hommes.¹⁵

D'autre part, une équipe américaine a mis en évidence des distinctions concernant la susceptibilité à cette pathologie en fonction de l'ethnie du patient. Les personnes du groupe «Blanc non hispanique » sont celles ayant un taux d'incidence de la LLC le plus élevé, suivi par les personnes du groupe « Noir » et « Blanc hispanique ». A l'inverse, les personnes du groupe « Asiatique et océanien » sont celles les moins touchées.¹⁷

Concernant la survie globale, des études ont montré qu'elle était meilleure chez la femme que chez l'homme.^{18,19} Sur une cohorte française suivant des patients diagnostiqués entre 1989 et 2004, la survie globale à 5 ans est estimée à 81% chez la femme contre 76% chez l'homme. Les mêmes résultats ont été retrouvés à 10 ans avec une survie globale pour la femme et l'homme de 62% et 53% respectivement. De plus, elle diminue avec l'âge et ceci quel que soit le sexe : chez les hommes, la survie nette à 5 ans passe de 89% chez les 45-55 ans à 64% chez les plus de 75 ans.¹⁸ Toutefois, la survie nette s'améliore, puisqu'elle était de 75% à 5 ans chez les patients diagnostiqués en 1990

contre 91% pour ceux diagnostiqués en 2015.²⁰ Ces tendances françaises sont identiques à celles retrouvées dans une précédente étude suédoise.²¹

3. Facteurs de risques

a. Susceptibilité génétique

Différentes études épidémiologiques ont ainsi souligné que les apparentés au premier degré d'un patient atteint ont entre 2,2 et 7 fois plus de risque de développer une LLC ou un autre LNH-B par rapport à la population générale.^{22,23}

Plus récemment, la différence de risque selon les types de LNH-B a été évalué et les résultats montrent que les apparentés de premier degré d'un patient porteur d'une LLC ont un risque relatif qui est 8,5 fois plus élevé de développer une LLC (intervalle de confiance (IC) à 95% : 6,1-11,7), contre 1,9 fois pour un autre LNH-B (IC à 95% : 1,5-2,3).²⁴

A ce jour, grâce à différentes études d'association pangénomique (GWAS), plusieurs variants portant sur des loci contenant des gènes tels que *BCL2*, *BAK1*, *IRF4*, *IRF8*, *CDKN2B*, *FARP2*, *EOMES*, *CASP10* et *POT1* ont été associés à un risque significatif de développement de la LLC. La localisation de ces différents loci au niveau des gènes impliqués dans l'apoptose suggère un mécanisme biologique initiateur.²⁵⁻³⁰

b. Facteurs environnementaux

Une étude rétrospective a démontré que parmi différentes professions, les coiffeurs, les agriculteurs, les ouvriers en industrie de production de pesticides et les personnes vivant au sein d'une exploitation agricole ont un risque accru de développer une LLC par rapport à la population générale. A l'inverse, l'exposition solaire et le tabagisme semblent apparaître comme des facteurs protecteurs.^{31,32}

c. Antécédents médicaux

La présence d'un terrain atopique (incluant l'allergie, l'asthme ou l'eczéma) et les antécédents de transfusion sanguine apparaissent comme étant protecteurs vis à vis de l'apparition

de la LLC. De façon opposée, l'infection par le virus de l'hépatite C est associée à un risque accru de survenue d'une LLC, comme décrit précédemment dans d'autres LNH-B.^{32,33}

4. Classifications, marqueurs et score pronostiques

a. Classifications clinico-biologiques

Il existe aujourd'hui deux systèmes de classification qui permettent de répartir les patients en différents groupes ayant des évolutions cliniques distinctes. Tous deux se basent sur des critères simples et peu coûteux : l'examen physique, ainsi que des analyses biologiques de routine et ne nécessitent pas d'études d'imagerie.

La première classification a été décrite en 1975 par Rai et demeure très utilisée aux Etats-Unis.³⁴ Elle se compose de cinq stades découpés selon la lymphocytose, les cytopénies et l'importance du syndrome tumoral (tableau III).

En 1981, Binet a proposé une nouvelle classification hiérarchisant les patients en 3 stades et qui est encore largement utilisée en Europe.³⁵ Celle-ci est basée sur le nombre de zones lymphoïdes impliquées, définies par la présence de ganglions lymphatiques ≥ 1 cm de diamètre ou d'une organomégalie, ainsi que sur l'existence ou non d'une anémie ou d'une thrombopénie (tableau IV, figure 2).

Pronostic	Stade	Critères de définition	Pourcentage des malades au diagnostic	Survie médiane (années)
Bon pronostic	Stade 0	Lymphocytose > 4 G/L	31%	> 10
Pronostic intermédiaire	Stade I	Lymphocytose + adénopathies	35%	9
Pronostic intermédiaire	Stade II	Lymphocytose + hépato- ou splénomégalie. Les adénopathies peuvent ne pas être présentes.	26%	5
Mauvais pronostic	Stade III	Lymphocytose + Hb < 110 g/L. Les organomégalies peuvent être ou ne pas être présentes.	6%	2
Mauvais pronostic	Stade IV	Lymphocytose + plaquettes < 100 G/L. Les organomégalies et l'anémie peuvent être ou ne pas être présentes.	2%	2

Tableau III : Classification clinico-biologique de Rai.³⁴

Pronostic	Stade	Critères de définition	Pourcentage des malades au diagnostic	Survie médiane (années)
Bon pronostic	Stade A	Hb > 100 g/L Plaquettes > 100 G/L Moins de 3 aires lymphoïdes atteintes (*)	63%	> 10
Pronostic intermédiaire	Stade B	HB > 100 g/L Plaquettes > 100 G/L Atteintes d'au moins 3 aires lymphoïdes	30%	5
Mauvais pronostic	Stade C	Hb < 100 g/L et/ou plaquettes < 100 G/L, quel que soit le nombre d'aires lymphoïdes atteintes (*)	7%	2

Tableau IV : Classification clinico-biologique de Binet.³⁵

(*) Les aires lymphoïdes sont au nombre de 5 : cervicales ; axillaires ; inguinales ; splénomégalie et hépatomégalie.

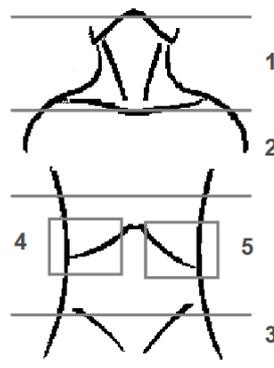


Figure 2 : Définition des 5 aires lymphoïdes selon la classification de Binet³⁵ :

1 = cervicales ; 2 = axillaires ;
3 = inguinales ; 4 = l'hépatomégalie ; 5 = la splénomégalie.

Ces classifications clinico-biologiques se montrent très efficaces pour discriminer les formes sévères de la LLC. Plus récemment, cela a de nouveau été démontré dans de nombreuses études, notamment la capacité de prédiction de ces différents stades sur la SG (figure 3).^{36,37} Au moment du diagnostic, la majorité des patients (60 à 70%) sont au stade A de Binet et moins de 10% au stade C.

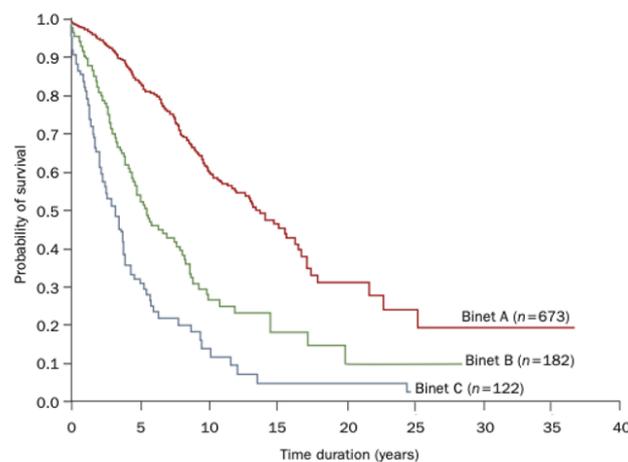


Figure 3 : Survie globale des patients LLC selon les stades de la classification de Binet.^{35,38} (d'après une étude barcelonaise de 977 patients)

Afin d'améliorer la distinction entre les patients avec une LLC de forme indolente et ceux avec une forme active pouvant poser l'indication de traitement, l'IWCLL a proposé différents critères d'évolutivité listés dans le tableau V. La présence de l'un de ces critères suffit pour définir une maladie active. Pour les patients ayant une maladie indolente et sans signes d'évolutivité (notamment en stade A de la classification de Binet), l'espérance de vie sera comparable à celle de la population générale de même âge et de même sexe.

Active disease criteria by the IWCLL	
1.	Evidence of progressive marrow failure as manifested by the development of, or worsening of, anemia and/or thrombocytopenia. Cut-off levels of Hb <10 g/dL or platelet counts of <100 000/ μ L are generally regarded as indication for treatment. However, it should be pointed out that in some patients platelet counts of <100 000/ μ L may remain stable over a long-period of time; this situation does not automatically require therapeutic intervention.
2.	Massive (i.e., ≥ 6 cm below the left costal margin) or progressive or symptomatic splenomegaly.
3.	Massive nodes (i.e., ≥ 10 cm in longest diameter) or progressive or symptomatic lymphadenopathy.
4.	Progressive lymphocytosis with an increase of $\geq 50\%$ over a 2-month period, or lymphocyte doubling time (LDT) of less than 6 months. LDT can be obtained by linear regression extrapolation of absolute lymphocyte counts (ALC) obtained at intervals of 2 weeks over an observation period of 2– 3 months; patients with initial blood lymphocyte counts of <30 000/ μ L may require a longer observation period to determine the LDT. Factors contributing to lymphocytosis other than chronic lymphocytic leukemia (e.g., infections, steroid administration) should be excluded.
5.	Autoimmune complications including anemia or thrombocytopenia poorly responsive to corticosteroids.
6.	Symptomatic or functional extranodal involvement (e.g., skin, kidney, lung, spine).
7.	Disease-related symptoms as defined by any of the following : <ol style="list-style-type: none"> Unintentional weight loss > 10% within the previous 6 months Significant fatigue (i.e., ECOG PS 2 or worse; cannot work or unable to perform usual activities) Fevers > 100.5°F or 38.0°C for 2 or more weeks without evidence of infection Night sweats for > 1 month without evidence of infection

Tableau V : Critères de définition de l'état de la maladie (indolente ou active) selon l'IWCLL-2018.²

b. Marqueurs biologiques

Devant le nombre croissant de marqueurs biologiques pronostiques mis en évidence dans la LLC, cette liste ne se veut pas exhaustive mais récapitule les principaux paramètres reconnus et encore d'actualité.³⁹

- Marqueurs sériques :

Historiquement, le **temps de doublement des lymphocytes** (TDL) fut l'un des premiers éléments mis en évidence comme ayant un impact pronostic. En comparaison au taux initial, un doublement des lymphocytes obtenu en moins de 12 mois semble associé à une forme plus agressive de la maladie avec une diminution de la SSP et de la SG.⁴⁰⁻⁴² Selon les recommandations de l'IWCLL, pour une numération lymphocytaire d'au moins 30 G/L, avoir un TDL inférieur à 6 mois est le témoin d'une maladie active et pose l'indication à la mise en place d'un traitement.²

Le niveau de la **β_2 -microglobuline sérique** (β_2 -M), marqueur utilisé comme reflet de la masse tumorale, est corrélé à des caractéristiques péjoratives de la maladie notamment pour des valeurs de β_2 -M > 3,5 mg/L.⁴²⁻⁴⁵

De plus, dans une récente analyse rétrospective de 595 patients atteints de LLC et non traités, des taux de β_2 -M plus faibles étaient indépendamment associés à un taux plus élevé de rémission complète après une chimiothérapie à base de fludarabine ou une immunochimiothérapie (ICT) associant fludarabine-rituximab-cyclophosphamide (RFC), un délai plus long avant l'échec du traitement, ainsi qu'à une survie globale plus longue.⁴⁶

- Marqueurs immunophénotypiques :

En cytométrie en flux, les niveaux d'expression membranaire du **CD38** et intracytoplasmique de **ZAP-70** au niveau des cellules leucémiques ont été utilisés par le passé comme marqueurs pronostiques mais ont été abandonnés de nos jours.

- Marqueurs cytogénétiques :

Les recommandations de l'IWCLL indiquent la nécessité de réaliser un bilan cytogénétique à minima avant l'initiation d'un traitement.² Des anomalies sont détectées chez plus de 80% des patients.⁴⁷⁻⁴⁹

Dans une étude portant sur 325 patients atteints de LLC, principalement non traités, parmi les anomalies les plus fréquemment observées, sont retrouvées des délétions du bras long du chromosome 13 (del13q) ou du chromosome 11 (del11q) chez 55% et 18% des patients respectivement ; une délétion du bras court du chromosome 17 (del17p) est détectée chez 16% des patients et une trisomie 12 (+12) est mise en évidence chez 7% des patients.⁴⁸ Dans cette même

étude, cinq catégories pronostiques ont été proposées et ont été confirmées par la suite par d'autres équipes.^{47,50,51} Par ordre croissant, le pronostic était le plus défavorable chez les patients présentant une del17p, suivi d'une del11q, d'une trisomie 12 et d'un caryotype diploïde normal, tandis que les patients présentant une del13q comme seule anomalie présentaient le meilleur pronostic. La survie globale médiane des cinq groupes était de 32, 79, 114, 111 et 133 mois et la survie médiane sans traitement était de 9, 13, 33, 49 et 92 mois, respectivement (figure 4).⁴⁸

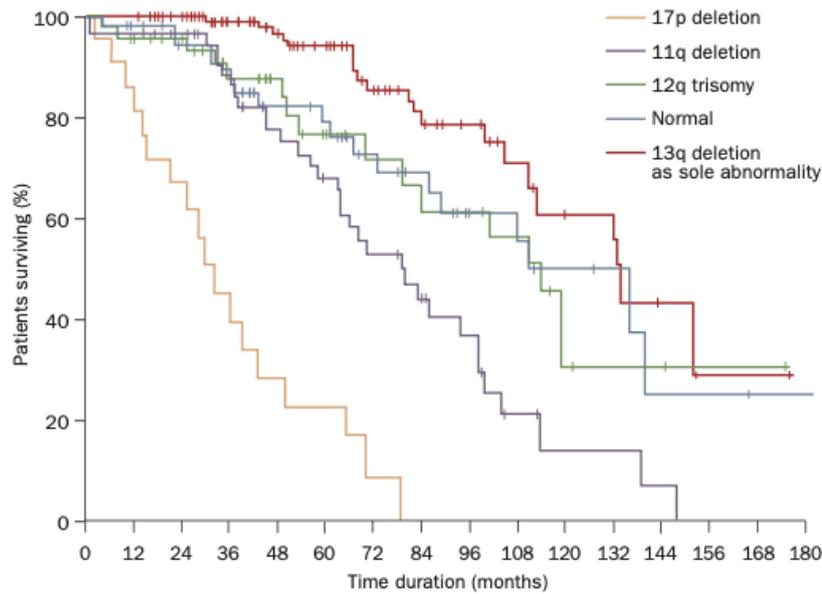


Figure 4 : Impact des principales anomalies cytogénétiques sur la probabilité de survie à partir de la date du diagnostic chez les patients atteints de LLC.⁴⁸

Le **caryotype conventionnel** permettra enfin d'identifier les caryotypes complexes (>3 anomalies cytogénétiques) ou très complexes (>5 anomalies) associés à des formes plus sévères de la maladie (figure 5).⁵²⁻⁵⁴

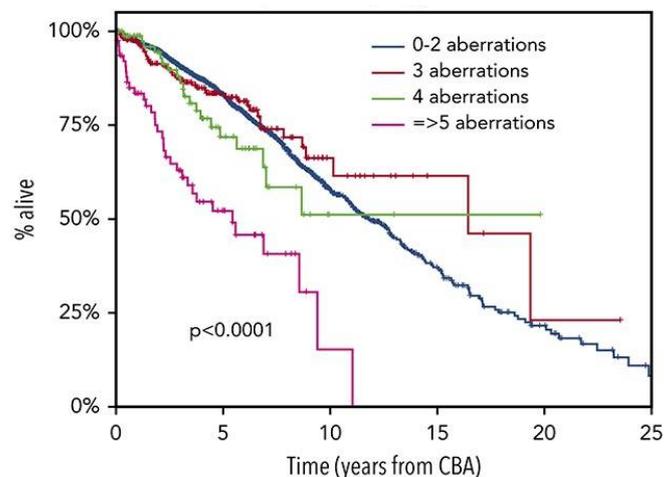


Figure 5 : Courbe de survie de Kaplan-Meier mesurant l'impact du nombre d'anomalies cytogénétiques sur la probabilité de survie à partir du bilan cytogénétique effectué au diagnostic.⁵⁴

Actuellement en cytogénétique, seule la recherche de la délétion 17p (comportant le locus du gène *TP53*) est obligatoire avant traitement, puisqu'elle oriente le choix thérapeutique. Il est cependant recommandé d'y associer la recherche de la délétion 11q (impliquant le gène *ATM*).

- Marqueurs moléculaires :

La **détermination du statut mutationnel du gène *IGVH*** et l'étude mutationnelle de ***TP53*** sont des analyses essentielles dans tout bilan pré-thérapeutique d'une LLC.²

Au cours de la lymphopoïèse B et de la différenciation des lymphocytes B normaux, diverses modifications des gènes codant pour le BCR (récepteur des lymphocytes B) se produisent, notamment au cours du processus d'hypermutation somatique, sur le gène codant pour les parties variables des chaînes lourdes des immunoglobuline *IGVH*.⁵⁵ Ainsi, après séquençage de la partie codante de ce gène dans les cellules lymphomateuses et par comparaison à une base de données de séquences issues de cellules germinales n'ayant pas subi d'hypermutation somatique, un pourcentage d'homologie est obtenu. Comme recommandé par l'ERIC (« European Research Initiative in CLL »), en utilisant un seuil de 98%, le clone B est alors classé en deux types : soit muté (*IGVH-M*, < 98% d'homologie), soit non muté (*IGVH-NM*, > 98% d'homologie).⁵⁶⁻⁵⁹

Il a été montré que les patients avec un clone *IGVH-NM* ont une médiane de survie inférieure par rapport aux patients *IGVH-M* (figure 6).^{60,61} Le statut non muté *IGVH* correspond ainsi à une forme de LLC plus agressive. De plus, la détermination de ce statut s'est montrée utile pour prédire la réponse à l'ICT de première ligne associant le rituximab, la fludarabine et la cyclophosphamide (RFC), le caractère non muté étant associé à une résistance à la fludarabine (figure 7).⁶²

De manière intéressante, alors qu'il existe un caractère évolutif du caryotype avec l'accumulation courante de nouvelles anomalies cytogénétiques, le statut *IGVH* semble rester constant dans le temps.

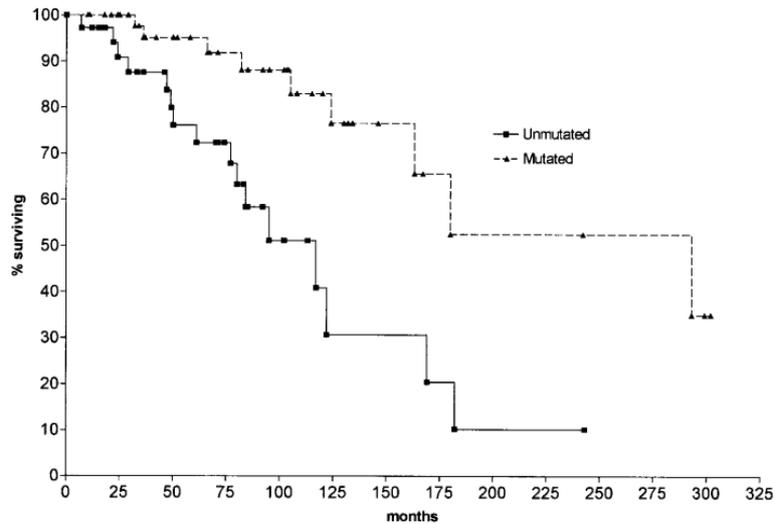


Figure 6 : Courbe de survie de Kaplan-Meier comparant les patients avec un clone à statut *IGHV* muté vs. statut *IGHV* non muté.

Médiane de survie du groupe non muté : 117 mois; médiane de survie du groupe muté : 293 mois.
La différence est significative ($p=0,001$).⁶⁰

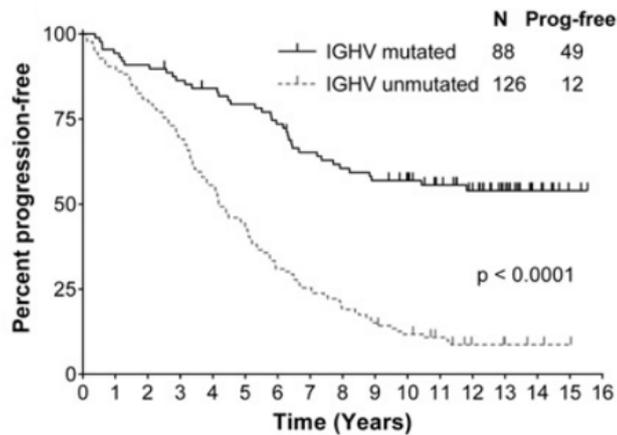


Figure 7 : Estimation de la survie sans progression en fonction du statut mutationnel après un traitement de première ligne par rituximab-fludarabine-cyclophosphamide.⁶²

D'après les dernières données, avec l'analyse des séquences VH du gène *IGHV* et les séquences en acides aminés du CDR3, il est possible d'identifier la présence de BCR « similaires » ou « stéréotypés » (*subset*) chez 30% des patients.^{58,63} Actuellement 19 « *subsets majeurs* » sont retrouvés chez 12% des patients, alors que les « *subsets mineurs* » sont estimés à environ une centaine et sont présents chez 18% des patients (figure 8).^{64,65} De façon intéressante, l'apport pronostique de certains *subsets* a pu être établi : ainsi les *subsets*#1, #2 et #8 sont plutôt de pronostic défavorable, au contraire du *subset*#4 qui est de pronostic favorable (figure 9).⁶⁵

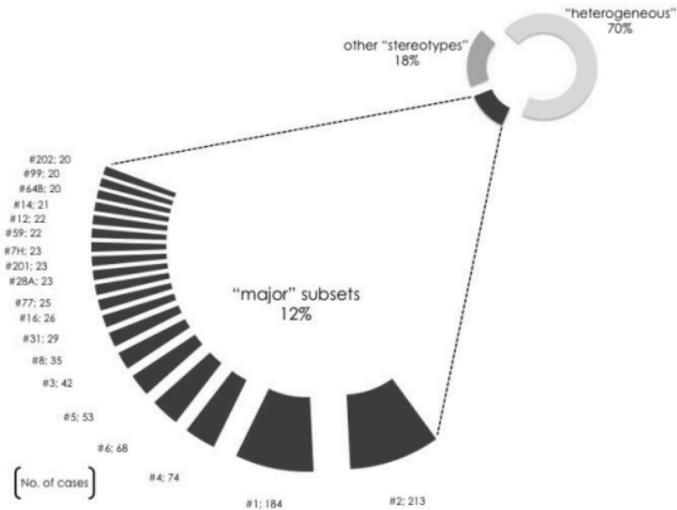


Figure 8 : Proportion de BCR stéréotypés parmi les répertoires d'Ig de patients LLC. Représentation des fractions de patients atteints de LLC avec un stéréotype majeur (« major subsets »), ceux avec un stéréotype mineur (« minor subsets ») et ceux n'ayant pas de séquence stéréotypée (« heterogeneous »).⁶⁴

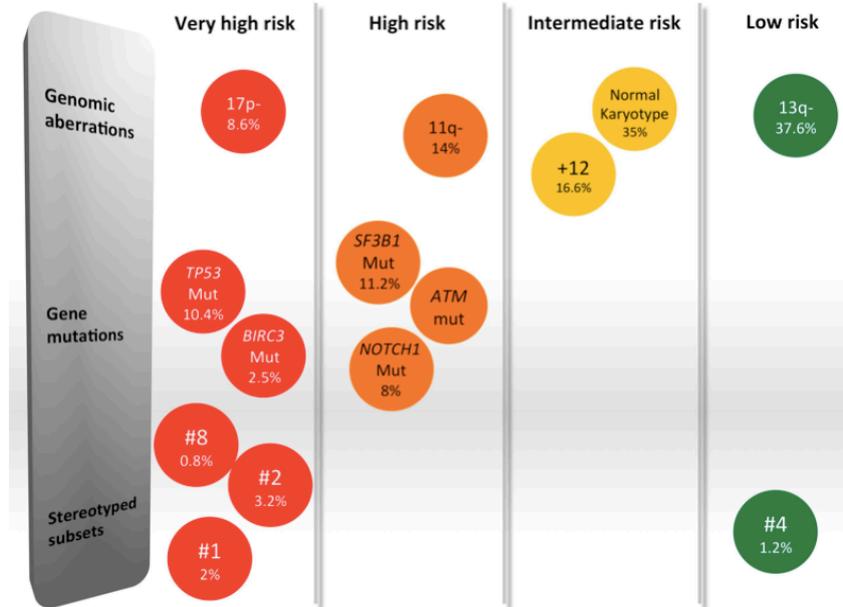


Figure 9 : Catégorisation des marqueurs cytogénétiques et moléculaires pronostics dans la LLC.⁶⁵

Les nouvelles techniques de séquençage comme le NGS (Next Generation Sequencing) ont permis ces dernières années d'identifier de nombreuses anomalies génomiques (figure 10) touchant des gènes jouant un rôle dans des voies importantes de signalisation : le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (*TP53*, *ATM*), la signalisation de Notch (*NOTCH1*), l'inflammation (*MYD88*) ou encore l'épissage de l'ARN (*SF3B1*).⁶⁶⁻⁶⁸

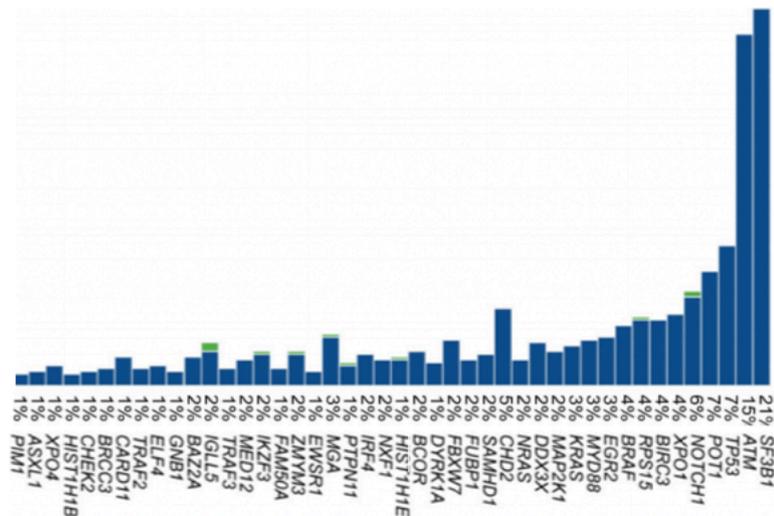


Figure 10 : Disparité mutationnelle dans la LLC.

Graphique présentant la fréquence de mutation de différents gènes retrouvés dans une cohorte de 538 patients atteints de LLC au diagnostic.⁶⁹

Des études suggèrent une association significative entre ces mutations et certaines anomalies cytogénétiques. C'est notamment le cas des anomalies impliquant *TP53*, puisque les mutations du gène *TP53* sont identifiées sur l'autre copie du gène chez près de 90 % des patients avec del17p.^{70,71}

Tout comme la délétion 17p, la présence d'une mutation de *TP53*, toutes deux regroupées dans les dernières études de survie sous le terme d'anomalies de *TP53* (ou *TP53abn*), ont un impact défavorable sur la réponse au traitement (notamment les combinaisons thérapeutiques à base de fludarabine), ainsi que sur l'évolution de la LLC avec une diminution de la survie globale et de la survie sans traitement.^{48,70,72,73} A ce jour, la découverte d'une anomalie de *TP53* est une contre-indication à l'utilisation d'ICT à base de fludarabine et nécessite l'emploi d'une thérapie ciblée.⁷⁴

c. Score pronostique

Dans la pratique quotidienne, la classification clinico-biologique de Binet permet de stratifier facilement les patients en plusieurs stades évolutifs de la maladie avec des estimations de survie médiane significativement différentes.³⁵ Cependant, devant l'existence d'un grand nombre de biomarqueurs décrits et fournissant des informations pronostiques supplémentaires,^{39,75} différentes équipes ont essayé d'établir des scores prédictifs en ne sélectionnant que les paramètres qui impactent de façon indépendante la SG et/ou la SSP. Face à un nombre pléthore de publications,^{36,76} seul le score pronostic international **CLL-IPi** sera abordé ci-dessous.³⁷

Ce score a été construit pour réduire les informations pronostiques à quelques paramètres essentiels et cliniquement pertinents, combinant à la fois des informations cliniques, biologiques et génétiques.

Il utilise une gradation pondérée de cinq facteurs pronostiques indépendants :

- La présence d'une anomalie de *TP53* : del17p et/ou mutation de *TP53*
- Le statut mutationnel du gène *IGVH*
- Le dosage de β 2-microglobuline sérique
- Le stade clinique
- L'âge du patient

Le score CLL-IPI permet de classer les patients en quatre sous-groupes avec des survies globales à 5 ans différentes (figure 11, tableau VI).³⁷ Il a depuis été validé dans diverses cohortes et son utilisation dans la pratique quotidienne a pour but d'identifier les patients à haut risque.⁷⁷⁻⁷⁹

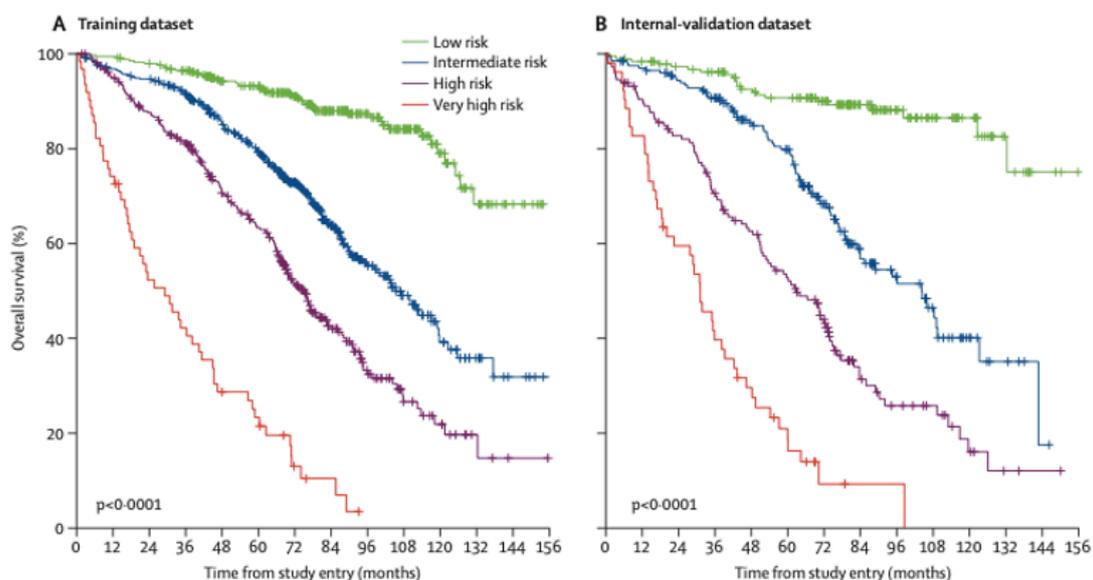


Figure 11 : Courbe de survie globale de Kaplan-Meier en fonction des sous-groupes CLL-IPI.³⁷
 (a) Données sur la cohorte de création du score comprenant 2308 patients atteints de LLC. (b) Données sur la cohorte de validation comprenant 1164 patients.

Sous-groupe	SG à 5 ans	Impact clinique potentiel
Faible risque	93,2%	Ne pas traiter
Risque intermédiaire	79,3%	Ne pas traiter, sauf si la maladie est réellement symptomatique
Haut risque	63,3%	Traitement indiqué sauf si la maladie est asymptomatique
Très haut risque	23,3%	Traitement indiqué, ne pas utiliser de chimiothérapie mais plutôt des thérapies ciblées ou inclusion dans des essais cliniques

Tableau VI : Indications de traitement selon les sous-groupes CLL-IPI.³⁷

5. Complications de la LLC

Au cours de l'évolution de la maladie, différentes manifestations peuvent apparaître et nécessiter la mise en place d'un traitement. Ces complications retrouvées dans la LLC sont de trois types :

- Auto-immunes :

Les cytopénies retrouvées dans la LLC seront soit provoquées par une insuffisance médullaire médiée par un envahissement par des cellules lymphomateuses, soit par un mécanisme auto-immun (avec un test de Coombs positif).

On estime que les cytopénies auto-immunes toucheront entre 10 et 15% des patients au cours du suivi, avec par ordre de prévalence :

- L'anémie hémolytique auto-immune (AHA) : 2 à 7% des cas ;
- La thrombopénie auto-immune périphérique : 2 à 3,5% ;
- L'érythroblastopénie auto-immune : < 1% ;
- La neutropénie auto-immune : < 1%.

Le syndrome d'Evans est défini par l'association d'une anémie et d'une thrombopénie auto-immunes.

- Infectieuses :

Elles représentent la principale cause de décès (30%) des patients atteints de LLC. Le risque d'infection affecte tous les stades de la LLC et cette complication peut avoir deux origines, soit un déficit immunitaire secondaire à la toxicité des traitements immunosuppresseurs, soit à cause de l'hypogammaglobulinémie, fréquemment retrouvée chez les patients malades.⁸⁰

Le tableau VII résume les dernières recommandations émises par le groupe français FILO (« French Innovative Leukemia Organization ») en matière de prophylaxie anti-infectieuse selon le type de traitement instauré.⁷⁴

Type of Treatment	Prophylaxis
Fludarabine-based or bendamustine Anti-CD20 antibodies	Pneumocystis prophylaxis (cotrimoxazole or atovaquone), Zoster prophylaxis (valaciclovir) Zoster prophylaxis (valaciclovir), B-hepatitis prophylaxis (tenofovir or entecavir) if anti-Hbc antibodies are present and/or the PCR is positive
Ibrutinib	Avoid concomitant corticosteroids or immunosuppressive therapy No recommendation for systematic pneumocystis and zoster prophylaxis No recommendation for systematic fungal prophylaxis Refer to hepatologist if anti-Hbc antibodies are present and/or the PCR is positive
Idelalisib	Pneumocystis prophylaxis (cotrimoxazole or atovaquone) CMV reactivation monitoring (antigenemia or monthly PCR)
Venetoclax	No recommendation for systematic pneumocystis and zoster prophylaxis

Tableau VII : Prophylaxie infectieuse selon le traitement initié.⁷⁴

Enfin, La stratégie vaccinale s'applique à tous les patients atteints de LLC. Le programme de vaccination doit être initié le plus tôt possible, idéalement dès le diagnostic et avant de commencer un traitement spécifique, afin d'augmenter l'efficacité de la réponse.

Les vaccins recommandés sont : le vaccin contre la grippe, le vaccin antipneumococcique et le vaccin contre *Haemophilus influenzae*.

- Transformation en lymphome de haut grade :

Le syndrome de Richter (RS) correspond au développement d'un lymphome agressif dans le contexte d'une LLC. Le variant majoritaire est le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL-RS) qui survient dans 95% des cas ; et plus rarement le lymphome de Hodgkin (Hodgkin-RS) retrouvé dans 5% des cas de transformation. L'incidence annuelle du RS est estimée à 0,5% pour les patients LLC non traités et peut atteindre 1% lorsqu'ils sont traités. Le délai médian de transformation depuis le diagnostic de LLC est de 23 mois.^{81,82}

6. Stratégie thérapeutique

Le pronostic de la LLC est très hétérogène. En effet, on estime qu'environ un tiers des patients resteront stables avec une survie non affectée par la maladie ; un autre tiers évoluera progressivement avec une indication de traitement ; et enfin le dernier tiers nécessitera un traitement dès le diagnostic.

a. Indication de traitement

Les critères actuellement reconnus pour l'initiation du traitement sont ceux proposés par l'IWCLL en 2018, à savoir les critères d'évolutivité.² La maladie sera considérée comme active lorsqu'au moins l'un de ces critères est présent (tableau 5).

Ainsi les patients ayant une forme indolente de la maladie et sans signes d'évolutivité (classés en stade A ou B de Binet) ne nécessiteront que d'une simple surveillance à la fois biologique et clinique semestrielle voir annuelle, ainsi que d'une abstention thérapeutique. A l'inverse, les patients présentant une maladie active (stade B avec signes d'évolutivité ou stade C de Binet) bénéficieront de la mise en place d'un traitement.^{2,74}

b. Bilan pré-thérapeutique

Lorsque l'indication de traitement est posée et dans l'optique de proposer au patient la meilleure option thérapeutique, un bilan pré-thérapeutique avec une évaluation clinico-biologique complète est à réaliser.

L'ensemble de ces examens sont récapitulés dans les recommandations françaises du groupe FILO (tableau VIII) qui viennent en complément de celles de l'IWCLL.²

	Mandatory	Recommended
Clinical evaluation		
ECOG PS	X	
Constitutive symptoms	X	
Number and size of lymphadenopathies	X	
Hepatomegaly and/or splenomegaly	X	
Tonsil hypertrophy	X	
Skin evaluation and biopsy if suspicious skin lesion	X	
Oncogeriatric examination for frail elderly patients	X	
Biological standard tests		
Complete blood count and reticulocyte count	X	
LDH, haptoglobin and direct antiglobulin test	X	
Blood group (if not known)	X	
Serum creatinine level and glomerular filtration rate	X	
Transaminases, bilirubin, gamma-GT	X	
LDH and beta-2 microglobulin	X	
Serum protein electrophoresis	X	
HIV, B and C hepatitis serology	X	
Cryopreservation of blood cells (tumour library)		
Cytogenetics		
Karyotype		X
FISH	X	
17p deletion	X	X
11q deletion		X
13q deletion		
Trisomy 12		
Molecular biology		
IGHV mutational status	X	
TP53 mutations by NGS	X	
Imaging		
CT scan of chest, abdomen and pelvis		X

Tableau VIII : Bilan pré-thérapeutique selon les recommandations du groupe FILO.⁷⁴

c. Arsenal thérapeutique

Reposant historiquement sur l'utilisation d'agents cytotoxiques, le traitement de la LLC n'a que très peu évolué durant de nombreuses années (figure 12). Ces deux dernières décennies avec l'amélioration des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques impliqués, de nombreux essais cliniques évaluant à la fois l'efficacité de biothérapies puis de thérapies ciblées sont venus bouleverser les schémas habituels et proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées à chaque patient.⁸³

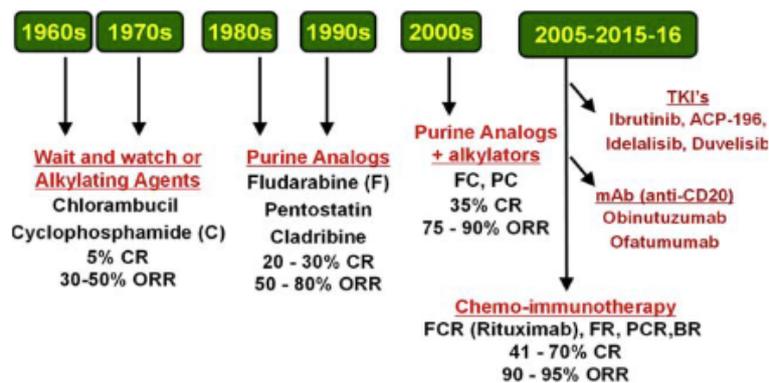


Figure 12 : Chronologie du développement des différentes modalités de traitement de la LLC.⁸³

- Agents cytotoxiques :

Dans les années 2000, l'association de **fludarabine** et de **cyclophosphamide** (FC) a montré une amélioration du taux de réponse globale (ORR) et de la SSP par rapport à la fludarabine en monothérapie.⁸⁴

- Anti-CD20 :

Le début d'une nouvelle ère dans le traitement de la LLC a été atteint avec l'arrivée des anticorps monoclonaux ciblant le CD20, marqueur spécifiquement retrouvé à la surface des lymphocytes. Le chef de fil de cette catégorie, le **rituximab**, a démontré toute son utilité dans différents essais (notamment l'américain CALGB 9712 et l'allemand CLL8) dont les résultats ont été publiés entre 2003 et 2010. L'association RFC a fait mieux que la chimiothérapie seule (FC) en terme de SSP et de SG, ce qui ouvrit la porte à la combinaison RFC comme traitement de référence de la LLC.⁸⁵⁻⁸⁷ Cependant, malgré l'augmentation de l'efficacité de cette association, la présence d'une anomalie impactant *TP53* (del17p ou *TP53* muté) et le statut *IGHV*-NM conserve un impact pronostique négatif sur la SSP et la SG.⁸⁸

En parallèle du rituximab, d'autres anti-CD20 ont été développés dans la dernière décennie. C'est notamment le cas de l'**obinutuzumab** (aussi dénommé GA101)⁸⁹ qui bénéficie actuellement de plusieurs essais thérapeutiques l'utilisant en combinaison avec différentes thérapies ciblées.⁹⁰

- Thérapies ciblées :

- Agents ciblant le BCR :

En partant du constat que certaines caractéristiques du récepteur des cellules B (BCR) sont reconnues comme marqueurs pronostiques, tels que le statut mutationnel *IGVH* ou l'étude de la stéréotypie, la signalisation cellulaire impliquant le BCR apparaît comme une cible potentielle contre les cellules de la LLC.⁹¹⁻⁹³

L'**idelalisib** fut la première thérapie orale, active spécifiquement sur l'isoforme δ de la PI3K exprimée par les leucocytes.⁹⁴ En interférant sur les interactions entre les cellules de LLC et le microenvironnement, elle promeut l'apoptose des cellules de LLC sans l'induire chez les cellules T et NK physiologiques. A noter que l'efficacité de l'idelalisib associé à un anti-CD20 n'est pas influencée par la présence de marqueurs pronostiques génétiques défavorables (tel que le statut *IGVH-NM* et/ou présence d'une anomalie de *TP53*).^{95,96}

Une autre grande classe thérapeutique très active dans les hémopathies lymphoïdes B sont les inhibiteurs de la Bruton tyrosine Kinase (ou iBTK). Le chef de file de ces iBTK est l'**ibrutinib**, qui s'y fixe de façon irréversible. Cette molécule, administrée par voie orale, a montré dans un essai de phase 2 publié en 2015, une efficacité qui était jusqu'alors sans précédent pour le traitement de patients atteints de LLC avec anomalies de *TP53* et préalablement non traités ou en rechute/refractaire.⁹⁷ Enfin, très récemment les résultats définitifs de l'essai E1912 comparant l'**ibrutinib-rituximab** (IR) à l'ICT de première intention (RFC) en traitement de première ligne ont conclu à la supériorité de l'IR sur la RFC, quel que soit le statut *IGVH*.⁹⁸

L'utilisation des iBTK s'accompagne d'effets indésirables non négligeables, à type de fibrillation atriale ou d'un risque hémorragique augmenté.⁹⁹⁻¹⁰¹

De ce fait, des iBTK « de seconde génération » ont été développés pour réduire ces effets indésirables en diminuant les différentes liaisons non spécifiques. C'est par exemple le cas de l'**acalabrutinib** (ACP-196). Dans un essai de phase 3 le comparant à l'ibrutinib en monothérapie dans le traitement de seconde ligne de LLC avec del17p ou del11q, l'acalabrutinib a montré sa non-

infériorité après un suivi de 41 mois, avec une diminution des effets indésirables, notamment cardiaques.¹⁰²

- Inhibiteur de BCL2 :

La découverte de protéines impliquées dans ces programmes de survie et de mort cellulaire telles que celles de la famille BCL2, ainsi que la mise en évidence d'un déséquilibre entre ses membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques,¹⁰³ explique la volonté de cibler ces derniers afin de rétablir une certaine homéostasie.^{104,105}

Le **venetoclax**, un BH3-mimétique antagonisant spécifiquement la protéine anti-apoptotique Bcl-2, est le représentant de cette classe qui a obtenu son AMM dans la LLC. Dans un essai de sureté et d'efficacité de phase 1/2 dont les résultats ont été publiés en 2016, le venetoclax en monothérapie s'est montré actif à toutes les doses chez des patients atteints de LLC en rechute ou réfractaires avec des marqueurs pronostics négatifs.¹⁰⁶ Parmi les 116 patients l'ayant reçu, 92 (soit 79%) ont obtenu une réponse, dont 20% une réponse complète. L'estimation de la SSP à 15 mois pour les groupes recevant la dose de 400 mg était de 69%. L'utilisation du venetoclax a été marquée par un risque accru de survenue d'un syndrome de lyse tumorale lors de l'utilisation de ce médicament à forte dose. Par conséquent, un schéma d'escalade de dose hebdomadaire (20, 50, 100, 200 et 400 mg) sur 4-5 semaines a été mis en place pour prévenir ces incidents.^{106,107}

D'autre part, l'association **venetoclax-rituximab** (VR) a été comparée à l'immunochimiothérapie bendamustine-rituximab (BR) dans l'étude MURANO chez des patients atteints de LLC en rechute ou refractaires.¹⁰⁸ Il en ressort un avantage durable en termes de SSP et SG dans le bras VR par rapport au bras BR, après un suivi de 5 ans. La médiane de SSP était de 53,6 mois pour le bras VR contre 17,0 mois pour le bras BR.

Ces dernières décennies ont été marquées par d'immenses progrès dans la compréhension de la biologie de la LLC, qui ont permis le développement de nombreuses classes thérapeutiques. La figure 13 résume, de façon non exhaustive, les principaux mécanismes d'action et molécules actuellement décrites pour le traitement de la LLC. En parallèle de leur approbation réglementaire, l'utilisation progressive des différentes thérapies ciblées a permis une amélioration continue de la survie des patients atteints de LLC et ce, quel que soit l'âge, le sexe (figure 14) et plus précisément dans les sous-groupes de patients qui avaient auparavant un très mauvais pronostic. Les

développements actuels et à venir continueront de limiter l'utilisation des médicaments cytotoxiques classiques et de se rapprocher progressivement d'une thérapie curative de la LLC.

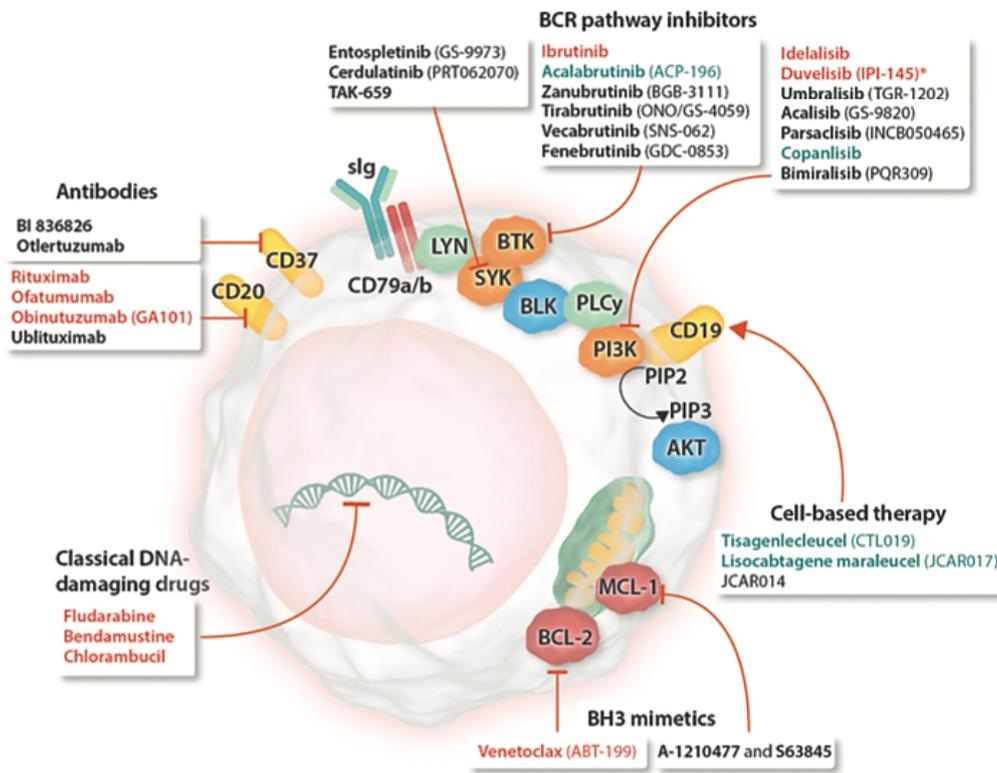


Figure 13 : Représentation schématique d'une cellule de LLC avec les principales cibles médicamenteuses établies et expérimentales, ainsi qu'une classification non exhaustive de molécules (approuvées et expérimentales).¹⁰⁹

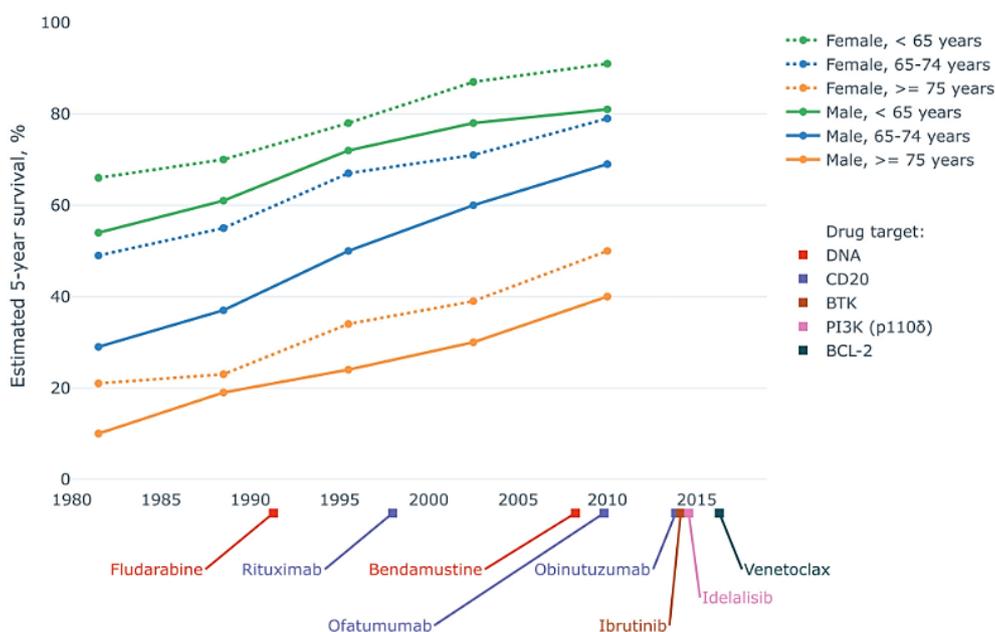


Figure 14 : Chronologie de l'approbation réglementaire des principaux médicaments dans la LLC (par la Food and Drug Administration) parallèlement à l'amélioration de la survie des patients malades.¹⁰⁹

d. Arbres décisionnels

Sont présentées dans l'*annexe II* les dernières recommandations publiées en novembre 2021 par le groupe FILO concernant les algorithmes décisionnels du traitement de première ligne et de la rechute.⁷⁴

L'indication de traitement n'étant pas une urgence thérapeutique, son choix se fera de façon postérieure à la réalisation du bilan pré-thérapeutique. Ainsi, la présence d'une anomalie de *TP53* (del17p ou mutation du gène) constituera le premier critère de sélection puisqu'il est une contre-indication à l'utilisation d'une ICT à base de fludarabine et différenciera les patients qui nécessiteront l'emploi d'une thérapie ciblée (*annexe II-A*).

Ainsi, en l'absence d'anomalie affectant *TP53*, l'éligibilité à la fludarabine sera définie par trois critères : un âge inférieur à 65-70 ans, l'absence de comorbidités importantes (notamment un score gériatrique CIRS < 6) et une fonction rénale adéquate (débit de filtration glomérulaire > 60 mL/min). Pour les patients physiquement éligibles à la fludarabine et en l'absence de facteurs génétiques défavorables (définis par la présence d'un clone à statut *IGVH-NM* ou d'anomalies cytogénétiques de mauvais pronostics), une ICT de type RFC combinant le rituximab, la fludarabine et le cyclophosphamide peut être utilisée, de même qu'un traitement dit « chemo-free » avec ibrutinib.⁹⁸

Pour les patients physiquement inéligibles à la fludarabine, il sera tout logiquement proposé un traitement chemo-free par iBTK. Classiquement, l'ibrutinib sera proposé en première ligne, mais devant l'arrivée récente de l'acalabrutinib, la question du choix entre ces deux iBTK doit se poser du fait d'une diminution des effets indésirables (notamment cardiaques) et d'une efficacité identique avec la molécule de seconde génération.¹⁰² De plus, après avoir obtenu son remboursement, il pourra aussi être proposé le venetoclax qui, associé à l'obinutuzumab, a montré sa bonne efficacité que ce soit chez les patients *IGVH-NM* et *IGVH-M*.⁹⁰

Dans le cas où une anomalie de *TP53* a été détectée (en cytogénétique et/ou par biologie moléculaire), le traitement par ICT sera abandonné du fait de la résistance à la fludarabine, au profit d'un traitement chemo-free. En première intention, l'ibrutinib sera introduit et dans les cas de la présence d'une contre-indication à l'ibrutinib (par cardiotoxicité), d'autres thérapies ciblées en monothérapie peuvent être proposées comme le venetoclax, l'acalabrutinib ou encore l'association de rituximab et d'idelalisib.

Lorsqu'une rechute survient avec nécessité d'introduire un traitement de seconde ligne, le choix dépendra du traitement préalable dont a bénéficié le patient (*annexe II-B*).

e. Évaluation de la réponse

Les critères d'évaluation de la réponse au traitement sont détaillés dans les dernières recommandations de l'IWCLL.² Elle comprend à minima un examen clinique, ainsi qu'un bilan biologique sanguin et permet de classer le patient en **différentes catégories de réponses** :

- La rémission complète (CR)
- La rémission partielle (PR)
- La maladie progressive (PD)
- La maladie stable (SD)

Pour préciser les différentes réponses au traitement, deux groupes de paramètres doivent être évalués et documentés : les paramètres du groupe A évaluent la charge tumorale lymphoïde ; tandis que les paramètres du groupe B évaluent le système hématopoïétique. Ainsi, les différentes catégories de réponses sont définies selon le nombre de paramètres des groupes A et/ou B retrouvés (*annexe III*).

La **rechute** correspond à la preuve de progression de la LLC (réapparition de lymphadénopathies, réascension du taux de lymphocytes, apparition de cytopénies imputables à la LLC) chez un patient ayant précédemment atteint les critères de rémission complète ou de rémission partielle sur une période ≥ 6 mois. **La maladie réfractaire**, quant à elle, est définie comme un échec du traitement ou comme une progression de la maladie dans les 6 mois suivant la dernière dose de traitement.²

Dans le but de déterminer le plus précisément possible la réponse, le concept de **maladie résiduelle** (MRD) est apparu. Proposé désormais par de nombreux laboratoires, l'évaluation de la MRD consiste en la recherche de cellules lymphomateuses circulantes par cytométrie en flux avec utilisation de marqueurs qui lui sont spécifiques.¹¹⁰ Une MRD indétectable (ou MRD-nég) correspond à la détection de moins d'une cellule de LLC pour 10 000 leucocytes analysés (soit une sensibilité de 10^{-4}) dans le sang ou la moelle.² La détection d'une MRD au-dessus de ce seuil de 10^{-4} (ou MRD-pos) est un prédicteur indépendant de la SSP et de la SG chez les patients atteints de LLC traités par immunochimiothérapie.^{111,112}

Actuellement, dans le but d'améliorer la sensibilité de la détection, de nombreux tests cherchent à évaluer l'apport de la biologie moléculaire afin de descendre ce seuil de sensibilité à 10^{-6} .^{112,113}

CONTEXTE ET OBJECTIFS

1. Statut mutationnel *IGVH*

La détermination du statut mutationnel du gène *IGVH* demeure importante avant toute initiation d'un traitement.

Actuellement, la disponibilité de l'analyse en pratique clinique est limitée du fait des installations requises, du niveau d'expertise et du délai de rendu de résultats. La question du coût de l'analyse est un point à ne pas négliger, estimé à 167,40 euros par test selon la liste complémentaire des actes de biologie hors nomenclature de 2022 (code acte hors nomenclature : N420). Ainsi le développement d'une technique alternative au séquençage afin de déterminer le statut mutationnel *IGVH* s'avère nécessaire. Pour obtenir un service rendu acceptable, cette technique devra répondre à l'ensemble des problématiques présentées ci-dessus : disponibilité des automates, facilité de réalisation dans des laboratoires polyvalents, ainsi qu'un coût maîtrisé. Ce dernier point est particulièrement important dans les centres disposant de moins de ressources budgétaires.

Les connaissances fondamentales de la lymphopoïèse B et l'établissement progressif de ces liens avec les données de séquençage issues de l'étude mutationnelle des réarrangements du gène *IGVH*, a permis de préciser les origines de la lymphomagénèse. En effet, de façon physiologique, la cellule souche lymphoïde donne des précurseurs lymphoïdes B qui, à l'issue de leur prolifération et différenciation médullaire, deviendront des lymphocytes B matures naïfs capables de gagner le compartiment sanguin. Dans le sang, ils peuvent circuler jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires pour continuer leur différenciation. Suite à la rencontre avec un antigène dans le centre germinatif du ganglion lymphatique, le lymphocyte B mature naïf subira différentes étapes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique pour aboutir soit à un lymphocyte B mature mémoire, soit à un plasmocyte (figure 15). On distingue donc les lymphocytes B matures naïfs, aussi appelés « pré-centre germinatif », des lymphocytes B matures mémoires ou « post-centre germinatif ».

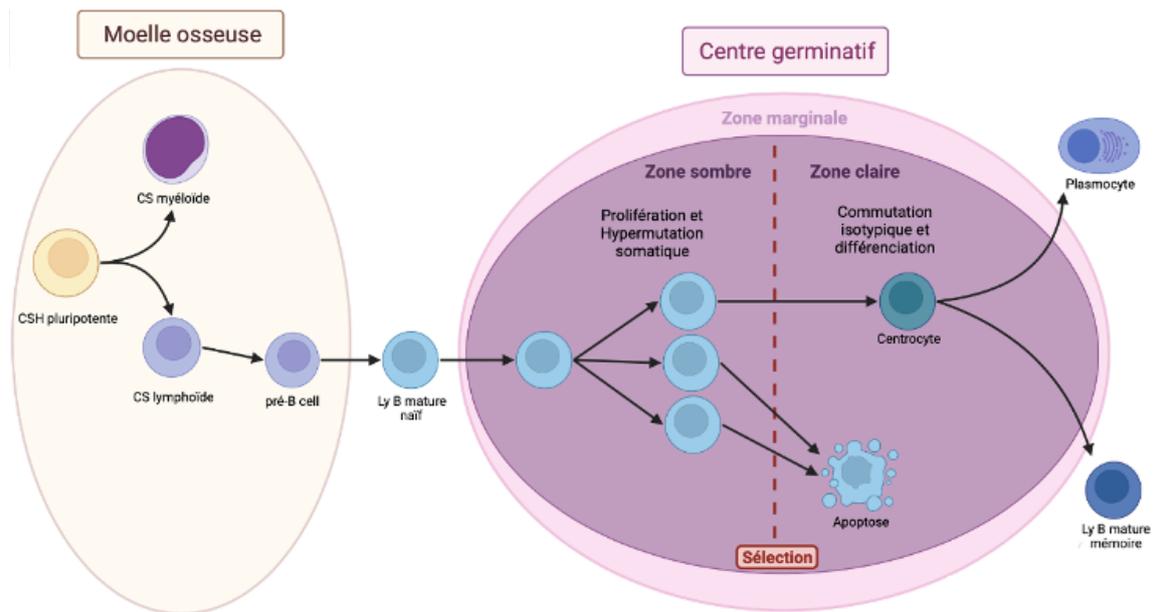


Figure 15 : Schéma illustrant les principales étapes de la lymphopoïèse B.

Au cours de la lymphopoïèse, les mécanismes d'hypermutation somatique et de commutation isotypique aboutissant aux réarrangements de l'*IGVH*, ont lieu dans le centre germinatif.¹¹⁴ Ainsi, le lymphocyte B mature naïf n'ayant pas encore bénéficié de ce remaniement aura une séquence germinale *IGVH* homologue à la séquence germinale et sera considéré non muté puisqu'il présente une homologie supérieure à 98%. A l'inverse, le lymphocyte B mature mémoire a subi, au cours de son passage dans le centre germinatif, différentes étapes aboutissant à un large remaniement de sa séquence codant pour l'immunoglobuline.

Ainsi, le lien entre la lymphopoïèse B et l'origine physiopathologique des statuts *IGVH*-M et *IGVH*-NM des clones de LLC, a pu être établi.^{60,61} Le clone pathologique *IGVH*-NM proviendra de la prolifération d'un lymphocyte B mature naïf (ou pré-centre germinatif), alors que le clone *IGVH*-M proviendra du lymphocyte B mature mémoire (ou post-centre germinatif) (figure 16).

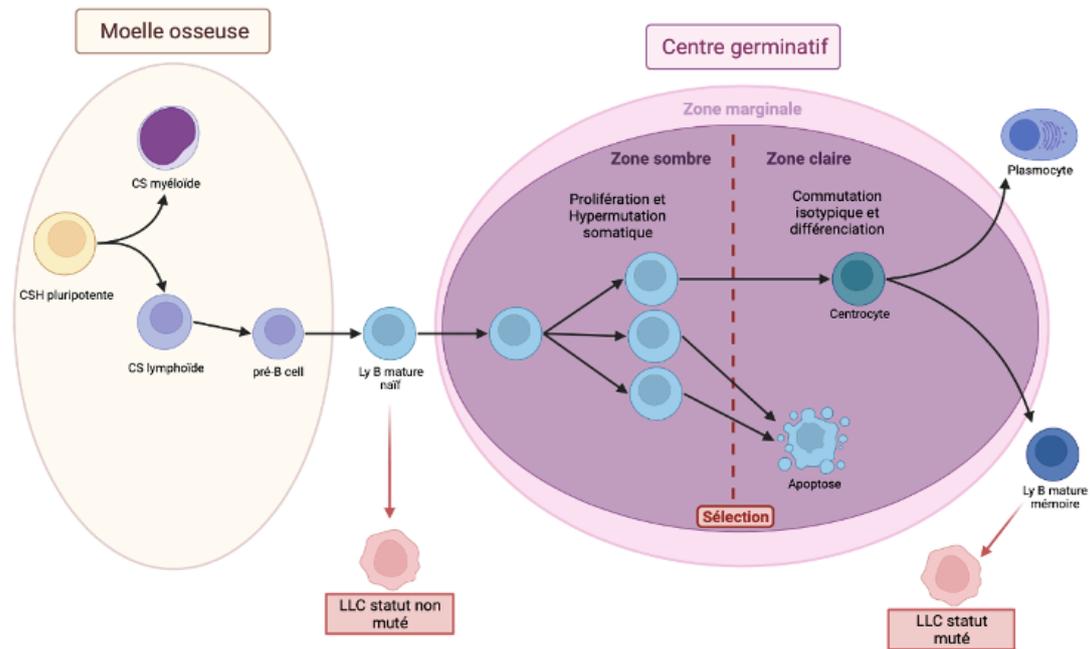


Figure 16 : Schéma illustrant l'origine des clones *IGVH* mutés et non mutés.

De façon intéressante, la distinction rapide de ces deux populations lymphocytaires, est réalisable par l'analyse de deux marqueurs membranaires : l'IgD et le CD27.¹¹⁵

Il est alors possible de connaître la nature naïve ou mémoire des lymphocytes B circulants. Les lymphocytes B naïfs ont un profil IgD+/CD27- et les lymphocytes B mémoires ont un profil IgD-/CD27+.¹¹⁵ Se basant sur le fait que les lymphocytes B naïfs soient *IGVH*-NM et que les lymphocytes B mémoires *IGVH*-M,^{91,92} l'étude du profil d'expression IgD/CD27 doit permettre de retrouver l'origine physiopathologique du clone de LLC et ainsi d'en déterminer le statut mutationnel *IGVH*. Ce profil IgD/CD27 est étudié par cytométrie en flux dans notre étude. En effet, l'utilisation de cette technique présente plusieurs avantages : elle est peu onéreuse, rapide (moins de 2 heures de délai de rendu de résultats) et ne nécessite pas l'utilisation d'un cytomètre de dernière génération, le marquage étant simple.

2. LLC et BCL2

Dès 1996, Robertson *et al.* a mis en évidence une surexpression des gènes codant pour les protéines BCL2 dans les cellules de LLC entraînant une prolongation de la viabilité cellulaire par inhibition de la mort cellulaire programmée.¹¹⁶

De façon intéressante, BCL2 (*B-cell lymphoma 2*) est une famille de protéine comprenant à la fois des membres pro-apoptotiques (tels que BAX, BAK, BIM, BAD, BID) et anti-apoptotiques (tels que Bcl-2,

Bcl-xl, Mcl-1, Bcl-2A1) qui participent à la régulation de l'apoptose.¹⁰³ En réponse à un signal de mort cellulaire, les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK vont s'homodimériser et former un pore dans la membrane mitochondriale externe. Cette perméabilisation (*MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization*) va entraîner un relargage du cytochrome C de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol. Celui-ci participera alors à la formation de l'apoptosome qui entrainera une cascade protéolytique aboutissant à la mort cellulaire (figure 17). Pour réguler ce mécanisme, les membres anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, Bcl-xl ou Mcl-1, vont venir par leur domaine BH3 séquestrer les effecteurs BIM et BID nécessaires à l'homodimérisation de BAX et BAK. Ainsi, la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 rend les cellules de la LLC résistantes à l'apoptose, ce qui entraîne la prolifération et l'accumulation de lymphocytes clonaux à longue durée de vie qui caractérisent la maladie.

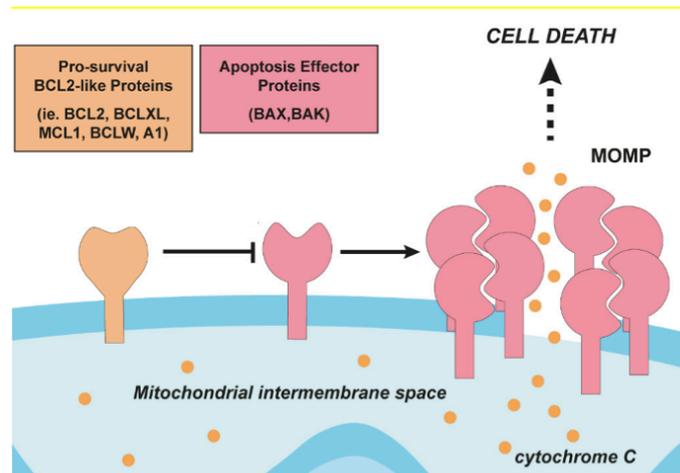


Figure 17 : Schéma simplifié illustrant l'action de membres de BCL2 au niveau de la membrane mitochondriale.

Le venetoclax, un inhibiteur sélectif de la protéine Bcl-2, va venir se fixer sur le domaine de liaison BH3 et ainsi libérer les effecteurs pro-apoptotiques BIM et BID. En inhibant les domaines BH3 surexprimés dans la LLC, le venetoclax empêche leur séquestration par Bcl-2 et participe, via le retour de la MOMP médiée par BAX et BAK, au rétablissement d'une certaine homéostasie entre survie et mort cellulaire (figure 18).^{106,117}

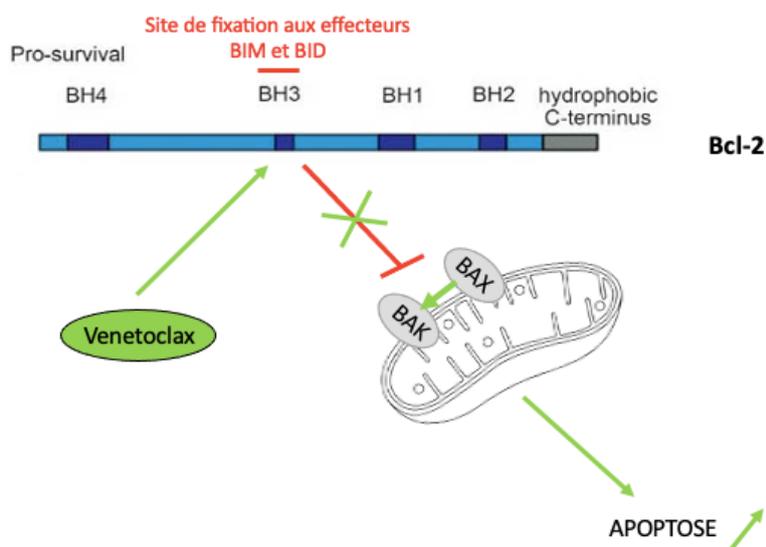


Figure 18 : Schéma illustrant le mécanisme d'action du venetoclax.

Cependant, malgré les résultats encourageants du venetoclax,^{74,90,108} un certain nombre de cas de patients non répondeurs ou en rechute sont rapportés.¹¹⁷ Ainsi, différents mécanismes de résistance ont été mis en évidence :

- Surexpression d'autres membres de la famille BCL2 non ciblés par le venetoclax, tels que Mcl-1 et Bcl-xl,^{117,118}
- Dérégulation du métabolisme énergétique mitochondrial consistant en une augmentation de l'activité de phosphorylation oxydative (OXPHOS) due à l'expression altérée des composants de la voie de signalisation AMPK,¹¹⁷
- Acquisition de la mutation Gly101Val de *BCL2* diminuant l'affinité du venetoclax pour le domaine BH3.¹¹⁹

Le mécanisme qui va nous intéresser dans la deuxième partie de ce travail est celui consistant au shunt de l'action du venetoclax consistant en la surexpression des protéines Mcl-1 et Bcl-xl non ciblées par ce médicament. Ces différentes surexpressions ont été mises en évidence à la fois au niveau génique par RT-qPCR et au niveau protéique par western-blot.^{117,118} Bien que le gold-standard pour l'analyse quantitative des protéines soit le western-blot, il a été choisi dans ce travail d'analyser l'expression intracytoplasmique de ces protéines par une technique de CMF. En effet, la réalisation d'un western-blot impose différentes manipulations (telles qu'une lyse cellulaire, une étape de transfert et différents lavages) non compatibles avec une activité de routine. La CMF permet de contrecarrer ces problèmes, du fait d'un temps de technique relativement rapide malgré la nécessité de réaliser une perméabilisation membranaire avant marquage dans le cas présent.

Nous souhaitons ici utiliser la cytométrie en flux pour étudier les expressions intra-cytoplasmiques de Mcl-1 et de Bcl-xl en les comparants à celle de Bcl-2. Ces niveaux d'expression seront ensuite mis en confrontation à la réponse obtenue sous venetoclax.

3. Objectifs

Ce travail aura pour but principal d'étudier la corrélation entre le profil IgD/CD27 du clone de LLC, obtenu par cytométrie en flux, et le statut mutationnel *IGVH*, déterminé au préalable par biologie moléculaire.

Dans un second temps, les niveaux d'expression intracytoplasmique de différentes protéines de la famille BCL2 seront étudiés par cytométrie, dans le but de rechercher une association avec la réponse au venetoclax, objectivée par l'évaluation clinique, les résultats d'imagerie et l'évaluation de la MRD.

MATERIELS ET METHODES

1. Constitution de la cohorte et recueil de données

Le projet intitulé CYMARLLC (pour « Marqueurs pronostics de la leucémie lymphoïde chronique par cytométrie en flux ») à l'initiative de cette étude, a été accepté en 2020 par la DRCI sous le numéro de référence **PI2021_843_0064**.

Il s'agit d'une étude rétrospective, non interventionnelle et monocentrique menée entre novembre 2020 et janvier 2022. Les patients sont suivis au sein du service d'Hématologie clinique du CHU Amiens-Picardie (CHUAP) et ont été choisis sur la base d'un diagnostic de LLC/MBL effectué par le laboratoire d'hématologie du CHUAP.

Les analyses ont été effectuées sur des culots cellulaires cryopréservés dans du DMSO 10% (plus 90% de sérum de veau fœtal) après une lyse des hématies selon le protocole interne du laboratoire d'hématologie (*annexe IV*).

Les critères de non-inclusion pour la constitution de cette cohorte sont les suivants :

- Un diagnostic de LLC reposant sur la base d'un score de Matutes égal à 3 ;
- La conservation de prélèvement effectué après initiation d'un traitement ;
- L'absence de détermination du statut mutationnel des *IGVH* par biologie moléculaire.

Pour chaque patient, différentes données clinico-biologiques ont été extraites du Système Informatique du Laboratoire (SIL, DxLab[®], Medasys), ainsi que du logiciel de gestion des dossiers patients du CHUAP (DxCare[®], Medasys) ; et recueillies dans un tableur Excel :

- Renseignements liés au prélèvement : date de prélèvement, service prescripteur, nature du prélèvement, indication de l'analyse ;
- Renseignements cliniques : hémopathie diagnostiquée ; date et âge au diagnostic ; stade Binet au diagnostic et lors du dernier suivi ; initiation ou non d'un traitement et les molécules utilisées ; réponse clinique ;
- Renseignements biologiques : score de Matutes, résultats de cytogénétique (caryotype et FISH), résultats de biologie moléculaire (statut mutationnel du gène *IGVH* et de *TP53*), les résultats d'évaluation de MRD.

2. Protocole et automate

Le protocole de prise en charge des prélèvements allant de leur décongélation au marquage est décrit dans l'*annexe V*. Pour chaque patient, le pool de cellules décongelées a été aliquoté en deux tubes comprenant chacun 1 million de cellules. Le tube 1 a permis l'étude du profil IgD/CD27 des cellules de LLC correspondant au premier objectif de ce travail. Le second a servi à l'étude de l'expression intracellulaire des protéines BCL2. Les anticorps utilisés pour ces différents marquages sont décrits dans les tableaux IX et X.

	Tube 1				
	FITC	PE	APC	AA750	KO
Marquage	CD5	IgD	CD19	CD27	CD45
Volume (µL)	2	5	2	5	5
Clone	REA782	Polyclonal	REA675	1A4CD27	J.33
Fournisseur	Miltenyi Biotec™	Agilent™	Miltenyi Biotec™	Beckman Coulter™	Beckman Coulter™

Tableau IX : Marqueurs utilisés pour l'acquisition du tube 1.

	Tube 2					
	BV-421	PE	ECD	PC5.5	APC	KO
Marquage	Bcl-2	Mcl-1	CD19	CD5	Bcl-xl	CD45
Volume (µL)	5	2	5	5	2	5
Clone	658709	D2W9E	J3-119	BL1a	54H6	J.33
Fournisseur	BioLegend™	Cell Signaling™	Beckman Coulter™	Beckman Coulter™	Cell Signaling™	Beckman Coulter™

Tableau X : Marqueurs utilisés pour l'acquisition du tube 2.

Les autres réactifs utilisés sont :

- Kit de perméabilisation membranaire Fix&Perm® (Life Technologies™)
- Billes Flowcount® (Beckman Coulter™)

Les acquisitions des deux tubes ont été effectuées sur un cytomètre Navios® de Beckman Coulter. Il s'agit d'un cytomètre de flux comportant 3 lasers (rouge, bleu et violet) avec une configuration de 10 couleurs, analysant jusqu'à 12 paramètres simultanément. Pour chacun des tubes préalablement marqués, 100 000 évènements ont été acquis.

3. Analyse et stratégie de fenêtrage

L'analyse des fichiers de données .FCS a été réalisée sur le logiciel Kaluza® de Beckman-Coulter. La stratégie de fenêtrage (aussi appelée « gating »), consiste à analyser des histogrammes bi-paramétriques de type « density-plot ». Cette représentation permet une bonne discrimination des populations d'intérêt, puisque les couleurs chaudes représentent une superposition de points désignant des cellules homogènes en termes d'intensité d'expression.

L'étude de ces deux panels a débuté par la même stratégie d'analyse (figure 19). Dans un premier temps, nous sélectionnons tous les événements acquis en fonction du temps de passage et excluons les doublets et débris cellulaires.

Pour l'analyse des cellules acquises, la suite de la stratégie dépendra du panel utilisé (figures 20 et 21).

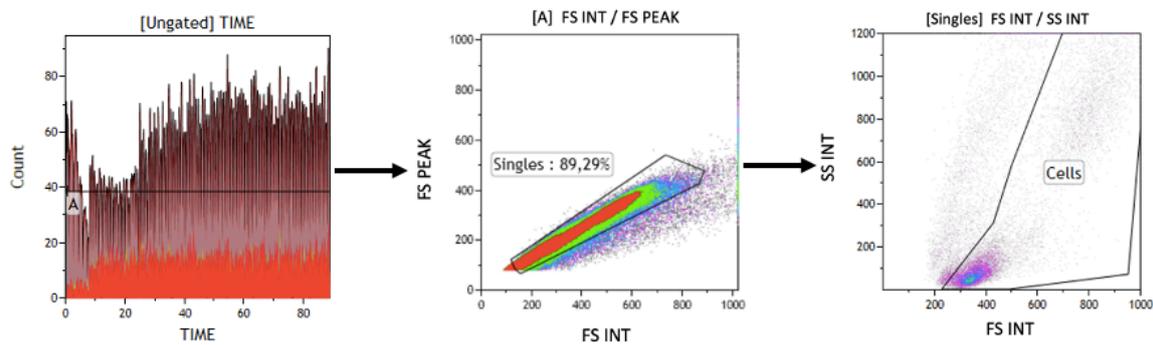


Figure 19 : Stratégie de fenêtrage initiale commune aux différents panels.

a. Tube 1

Tout d'abord, en fonction de l'expression du CD45 et du SS, la population lymphocytaire a été sélectionnée (CD45 fort/SS faible). Ensuite, avec le CD19 et le CD5, trois populations lymphocytaires distinctes ont été identifiées :

- Les cellules de LLC CD19+/CD5+ ;
- Les lymphocytes B résiduels CD19+/CD5- ;
- Les lymphocytes T CD19-/CD5+.

Enfin, selon l'expression de l'IgD et du CD27, le statut naïf (IgD+/CD27-) ou mémoire (IgD-/CD27+) des cellules de LLC a pu être déterminé (figure 20).

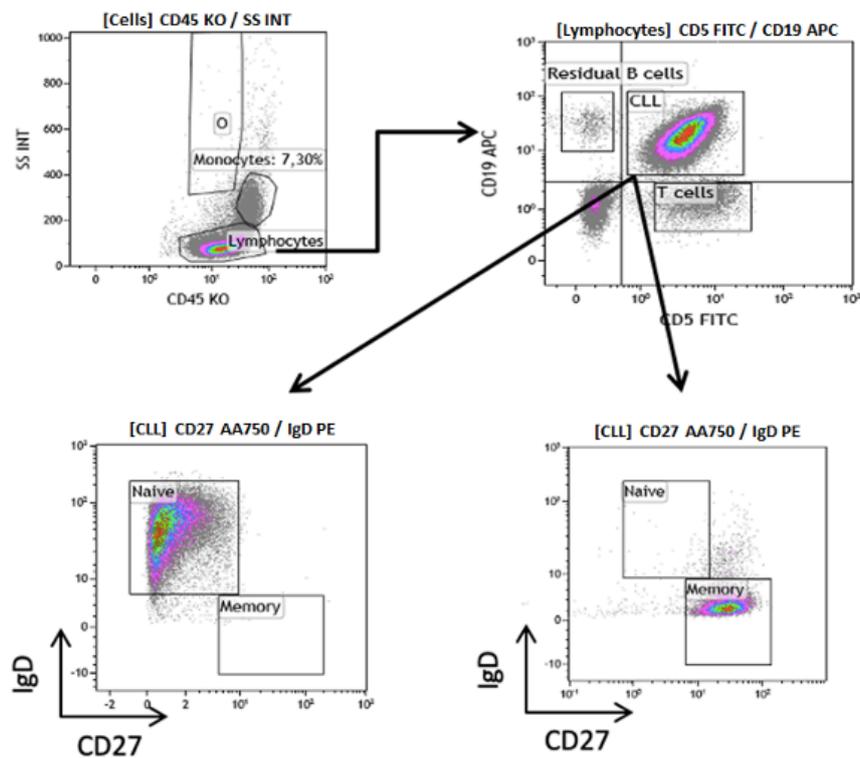


Figure 20 : Stratégie de fenêtrage du tube 1 et profil B naïfs/mémoires par cytométrie en flux multiparamétrique.

A noter que les clones double positifs (IgD+/CD27+) ont été classés comme ayant un profil B mémoire comme décrit dans la littérature.¹¹⁵

b. Tube 2

Après avoir sélectionné les lymphocytes (CD45+/SS faible), les cellules clonales de LLC (CD19+/CD5+) ont été mises en évidence. Puis, sur ces cellules, l'analyse de l'expression intracytoplasmique des trois marqueurs (Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1) a été effectuée (figure 21).

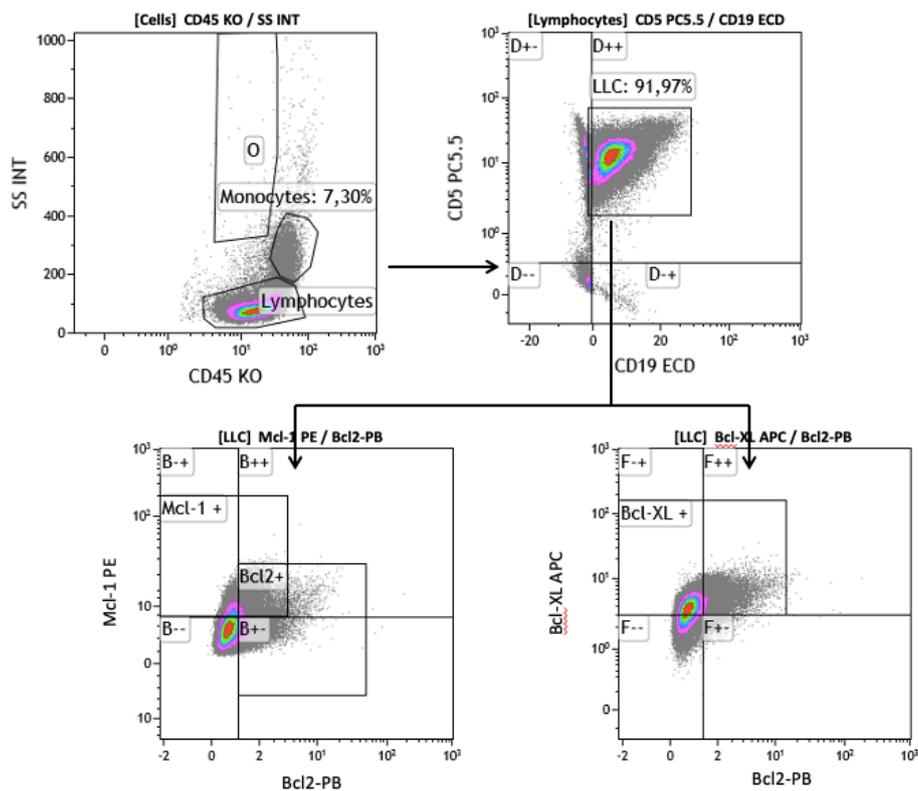


Figure 21 : Stratégie de fenêtrage du tube 2 et expression de Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 par cytométrie en flux multiparamétrique.

4. Détermination du statut mutationnel du gène *IGVH*

L'ensemble des statuts mutationnels des gènes *IGVH* a été déterminé par le laboratoire d'Oncobiologie moléculaire du CHUAP et les résultats recueillis via le logiciel de gestion des dossiers patients (DxCare®, Medasys) ou par l'intermédiaire du système informatique du (SIL, DxLab®, Medasys).

Cette détermination s'effectue une fois le diagnostic de LLC confirmée par l'immunophénotypage lymphocytaire. Il a suffi d'un simple prélèvement sanguin périphérique effectué sur tube EDTA. La technique utilisée pour la détermination du statut mutationnel des gènes *IGVH* réarrangés est réalisée par séquençage Sanger. Une fois la séquence obtenue, celle-ci est comparée à la base de

données de séquence germinale via la solution IGMT/V-Quest développée par l'IGMT (the international ImMunoGeneTics information system®). Cette solution dont l'utilisation est recommandée par l'ERIC, nous permet d'obtenir un pourcentage d'homologie.⁵⁹ Un écart supérieur ou inférieur à 2%, par rapport à la séquence *IGVH* de référence, définit respectivement le statut muté et non muté.

De même, la recherche de BCR stéréotypés, notamment les subsets#2 et #8 est effectuée grâce à l'application ARResT/AssignSubsets codéveloppée par l'ERIC.¹²⁰

5. Lignée cellulaire surexprimant Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl

Les analyses effectuées par CMF nécessitent la présence d'une population témoin (positive et/ou négative) pour permettre la bonne position du seuil d'expression des différents marqueurs et ainsi une meilleure interprétation.

L'analyse du tube 1 n'a pas rencontré de soucis particuliers puisque les différentes populations lymphocytaires permettent de positionner aisément ces seuils.

A l'inverse, pour le tube 2 étudiant l'expression intracytoplasmique de Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1, aucune population ne permettait le positionnement de leur seuil d'expression. De ce fait, avant le marquage et l'acquisition sur les prélèvements d'intérêt, la lignée cellulaire OSU-LLC a été utilisée. Il s'agit d'une lignée de cellules mononuclées sanguines humaines prélevées chez un patient atteint de LLC, puis immortalisées par utilisation de la souche B95-8 du virus EBV et fournie par la banque d'échantillons de l'Université d'État de l'Ohio.¹²¹ Celle-ci surexprime les trois protéines intracytoplasmiques de la famille BCL2 dont l'expression est étudiée dans ce travail (Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1).

6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel R 4.1.3 (R core team inc). Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et le test de corrélation r de Pearson ont été utilisés pour analyser les paramètres quantitatifs.

Les variables qualitatives ont, quant à elles, été testées à l'aide du test du Khi-deux d'indépendance. Une valeur $p < 0,05$ (bilatérale) a été considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS

1. Caractéristiques de la cohorte

98 patients ont été inclus dans cette étude (tableau XI) avec un diagnostic effectué entre 2002 et 2021. L'âge médian au diagnostic était de 65 ans (intervalle allant de 42 à 97 ans). La cohorte comportait davantage d'hommes que de femmes (sex-ratio 1.9/1). Concernant la répartition de ces patients selon la classification de Binet lors du diagnostic : 82,7% (n = 81) étaient en stade A ; 11,2% (n = 11) en stade B et 6,1% en stade C (n = 6). Le statut mutationnel *IGVH* était muté dans 54,1% des cas (n = 53) et non muté dans les 45,9% restants (n = 45). Une anomalie touchant *TP53*, objectivée en cytogénétique par une del17p au caryotype avec un remaniement en FISH et/ou une mutation retrouvée en biologie moléculaire, a été détectée chez 20,4% des patients (n = 20). En janvier 2022 et sur l'ensemble de la cohorte, 58,2% des patients ont bénéficié d'au moins une ligne de traitement (n = 57), comprenant à la fois une ICT et/ou une thérapie ciblée. Au cours du suivi, 7 patients sont décédés (7,1%) toutes causes confondues.

	n = 98
Age médian au diagnostic (années)	65
Sexe ratio H/F	1,9
Stade Binet au diagnostic :	
A	81 (82,7%)
B	11 (11,2%)
C	6 (6,1%)
Statut mutationnel <i>IGVH</i> :	
Muté	53 (54,1%)
Non muté	45 (45,9%)
Anomalies <i>TP53</i>	20 (20,4%)
Traité*	57 (58,2%)
Décès durant le suivi	7 (7,1%)

* = RFC, R-Bendamustine, Ibrutinib, GA101-Venetoclax, GA101-Chloraminophène.

Tableau XI : Caractéristiques biologiques et cliniques des patients inclus dans la cohorte.

Sur les 57 patients ayant bénéficié d'un traitement (figure 22), plus de la moitié ont été traités par une ICT en première ligne. 31,6% ont reçu la combinaison RFC (n = 18), 15,8% l'association rituximab-bendamustine (n = 9) et 10% l'association GA101/chloraminophène (n = 6). Les thérapies ciblées représentent une part non négligeable des traitements instaurés en première ligne, puisque l'ibrutinib a été utilisé chez 14% des patients (n = 8), tout autant que l'association d'un anti-CD20 (obinutuzumab ou rituximab) au venetoclax (n = 8). Les autres traitements retrouvés sont les combinaisons SGN-bendamustine, dexaméthasone-rituximab-cyclophosphamide ou encore R-CHOP. Enfin, 22/57 (38,6%) des patients traités ont rechuté après au moins un traitement de première ligne.

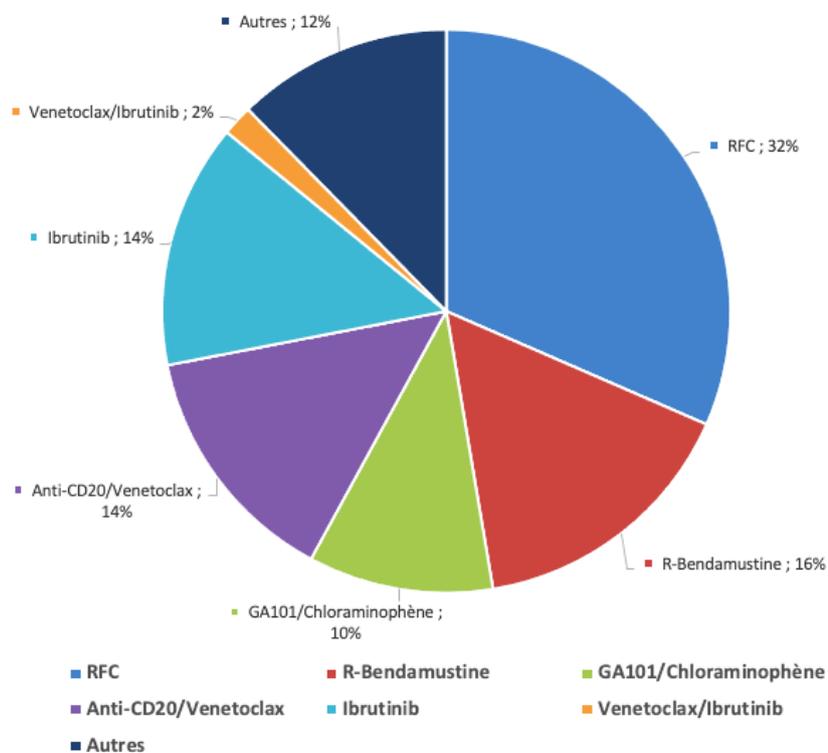


Figure 22 : Répartition des différents traitements de première ligne adoptés dans la cohorte.

Les différentes caractéristiques retrouvées dans cette cohorte (âge médian, sexe-ratio et stade de Binet au diagnostic) sont représentatives de la démographie actuellement acceptée et retrouvée dans les pays occidentaux en ce qui concerne la LLC.

Sur les 98 patients de notre cohorte, seul huit subsets ont été identifiés : deux patients avec le subset#2 (2,04%), un patient avec le #1 (1,02%), un patient avec le #3 (1,02%), un patient avec le #5 (1,02%), un patient avec le #16 (1,02%), un patient avec le #99 (1,02%) et enfin un patient avec le #202 (1,02%) (figure 23).

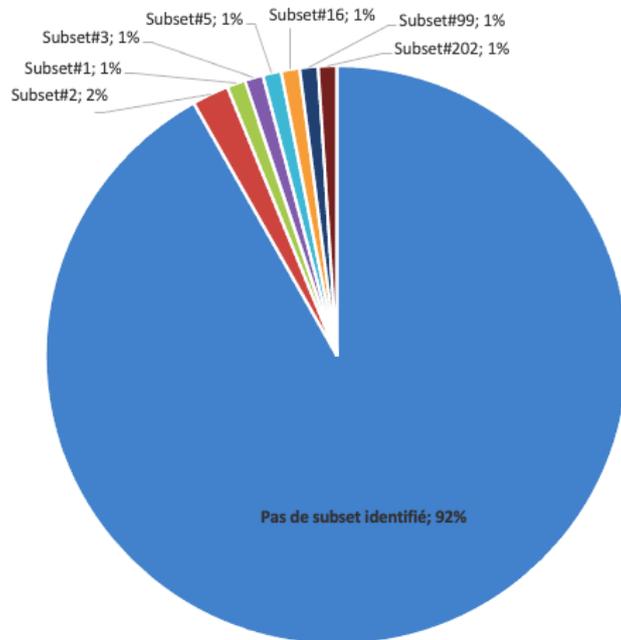


Figure 23 : Répartition des différents subsets identifiés au sein de la cohorte.

2. Étude du profil B naïf/B mémoire et comparaison avec le statut mutationnel *IGVH*

L'ensemble des tubes n°1 techniques ont pu être acquis sur le cytomètre puis réanalysés. Les échantillons décongelés contenaient en moyenne 79% de lymphocytes CD19+/CD5+ correspondant au clone de LLC.

Sur ces 98 prélèvements, 43 présentaient des cellules de LLC avec un profil B naïf IgD+/CD27- (43,9%) et 55 présentaient un profil B mémoire IgD-/CD27+ (56,1%) par CMF (tableau XII). Seuls 2 patients présentaient un profil B mémoire en CMF (IgD-/CD27+), alors que le statut mutationnel *IGVH* était non muté. Ainsi, la concordance entre la détermination du statut mutationnel de l'*IGVH* par biologie moléculaire et le profil CMF était de 100% pour le statut *IGVH*-NM et le profil de cellules B naïves (IgD+/CD27-).

		Profil lymphocytaire (CMF)		
		B naïf	B mémoire	
Statut <i>IGVH</i> (Biologie Moléculaire)	Muté	0	53	53 (54,1%)
	Non muté	43	2	45 (45,9%)
		43 (43,9%)	55 (56,1%)	98

Tableau XII : Tableau de contingence entre les résultats obtenus par CMF et par biologie moléculaire.

En comparant les deux techniques, la prédiction du statut mutationnel *IGVH* par détermination du profil B naïf/B mémoire, via la CMF, obtient une sensibilité de 95,6% ($IC_{95\%} = [85-99]$) et une spécificité de 100% ($IC_{95\%} = [93-100]$). De plus, avec la réalisation d'un test du Khi-deux d'indépendance, il est retrouvé une concordance entre ces deux approches qui est nettement significative ($p < 0,001$) (tableau XIII). Ceci nous permet de conclure sur la bonne performance de l'évaluation du profil B naïf/B mémoire par CMF comme test de prédiction du statut mutationnel *IGVH*.

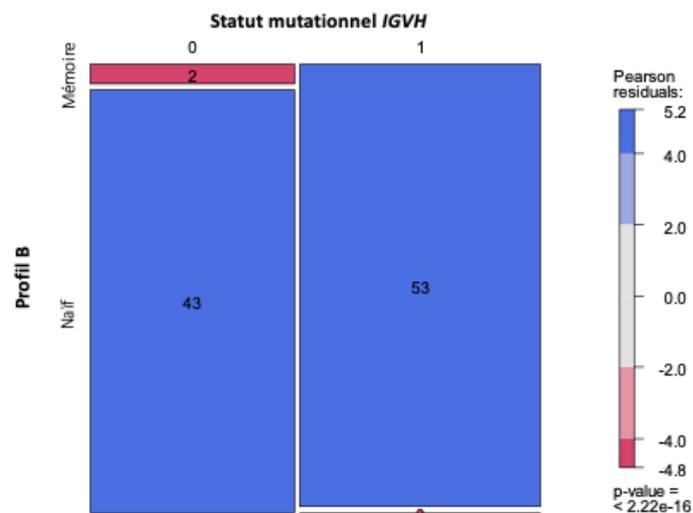


Tableau XIII : Répartition des 98 patients selon le profil obtenu par CMF et le statut *IGVH* par biologie moléculaire.
(0 = *IGVH*-NM ; 1 = *IGVH*-M)

3. Réponse au Venetoclax et expression protéique de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl

Sur les 98 patients inclus dans cette étude, seuls 89 ont bénéficié d'un tube n°2 réanalysable après acquisition. Les 9 prélèvements récusés l'ont été du fait d'une lyse cellulaire et/ou d'un défaut de perméabilisation et de marquage.

Pour ces 89 patients, l'âge médian au diagnostic était de 65 ans (intervalle allant de 42 à 97 ans). Le sexe-ratio est estimé à 1,7 homme pour 1 femme. Concernant la répartition de ces patients selon la classification de Binet lors du diagnostic : 82,0% (n = 73) étaient en stade A ; 11,2% (n = 10) en stade B et 6,8% en stade C (n = 6). Le statut mutationnel *IGVH* était muté dans 57,2% des cas (n = 42) et non muté dans les 52,8% restants (n = 47). Une anomalie touchant *TP53* a été détectée chez 21,4% des patients (n = 19). En janvier 2022 et sur l'ensemble de la cohorte, 58,4% de ces patients ont bénéficié d'au moins une ligne de traitement (n = 52), comprenant à la fois une ICT et/ou une thérapie ciblée ; et 7 patients sont décédés (7,9%) toutes causes confondues (tableau XIV).

	n = 89
Age médian au diagnostic (années)	65
Sexe ratio H/F	1,7
Stade Binet au diagnostic	
:	73 (82,0%)
A	10 (11,2%)
B	6 (6,8%)
C	
Statut mutationnel <i>IGVH</i> :	
Muté	42 (47,2%)
Non muté	47 (52,8%)
Anomalies <i>TP53</i>	19 (21,4%)
Traité*	52 (58,4%)
Décès durant le suivi	7 (7,9%)

Tableau XIV : Caractéristiques biologiques et cliniques des patients dont le tube n°2 a pu être analysé.

Aucune différence significative n'a été retrouvée sur l'expression intracytoplasmique de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl entre les patients traités (tout traitement confondu) et ceux non traités (tableau XV).

n = 89	Traités	Non traités	
	58,40% (n = 52)	41,60% (n = 37)	
%Bcl-2 (médiane)	68,81%	50,46%	p=0,163
%Mcl-1 (médiane)	7,21%	4,62%	p=0,095
%Bcl-xl (médiane)	44,40%	53,48%	p=0,292

Tableau XV : Comparaison des données entre patients traités et non traités.

Durant le suivi, 23,6% des patients ont bénéficié d'un traitement par venetoclax (n = 21). Le pourcentage de clone ayant un profil B naïf déterminé par CMF est significativement plus élevé chez les patients traités par venetoclax (90,51% vs. 6,71%, p=0.011) et inversement pour le profil B mémoire (8,37% vs. 90,75%, p=0,041) (figure 24 : A, B et F). Après analyse de l'expression intracytoplasmique des protéines de la famille BCL2, il est retrouvé, pour les patients traités par venetoclax, une expression augmentée de Bcl-2 (81,29% vs. 52,34%, p<0.001) et de Mcl-1 (12,20% vs. 5,62%, p=0,042), mais pas de Bcl-xl (39,97% vs. 50,73%, p=0.543) (figure 24 : C, D, E et F).

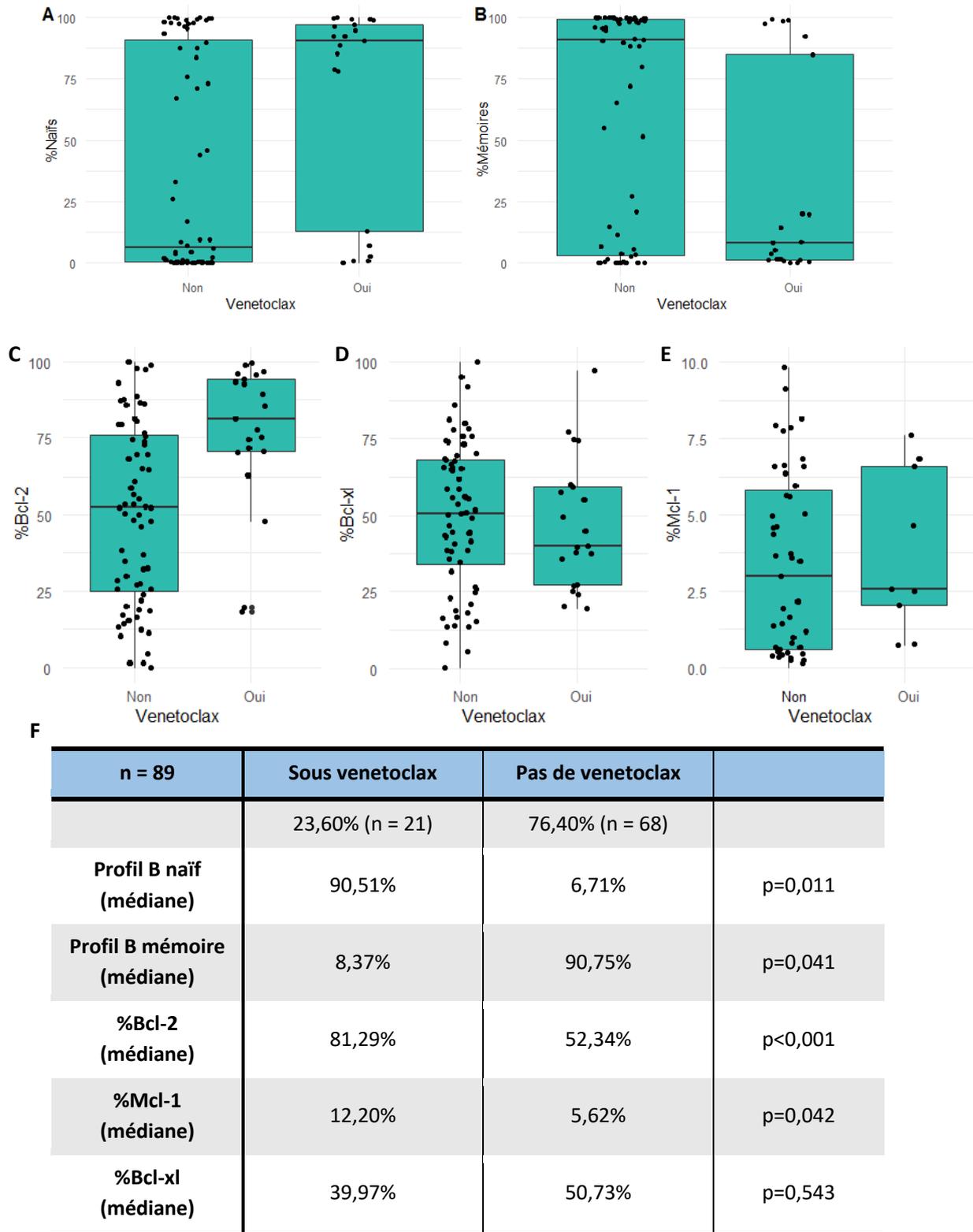


Figure 24 : Comparaison des données selon le traitement par venetoclax.

A et B : Répartition des clones à profil B naïf et B mémoire pour chacun des patients selon qu'ils soient traités ou non par venetoclax ;

C, D et E : Pourcentage de lymphocytes 19+/5+ exprimant le Bcl-2, le Bcl-xl et Mcl-1 selon qu'ils soient traités ou non par venetoclax ;

F : Comparaison statistique de ces données.

52,4% des patients sous venetoclax ont bénéficié d'une évaluation de la MRD à 1 an par CMF (n = 11). Celle-ci s'avère négative dans 54,5% des cas (n = 6) en faveur d'une réponse complète et positive dans les 45,5% restants (n = 5). Les expressions intra-cytoplasmiques de Mcl-1 (3,59% vs. 16,91%, p=0,018) et de Bcl-xl (38,61% vs. 74,47%, p=0,015) se retrouvent augmentées chez les patients avec une MRD positive, sans différence significative pour Bcl-2 (85,18% vs. 85,28%, p=0,584). De plus, en terme de moyenne de fluorescence (MFI), aucun écart significatif n'est retrouvé sur ces différentes protéines entre les groupes « MRD négative » et « MRD positive » (tableau XVI).

n = 11	MRD négative	MRD positive	
	54,55% (n = 6)	45,45% (n = 5)	
%Bcl-2 (médiane)	85,18%	85,28%	p=0,584
%Mcl-1 (médiane)	3,59%	16,91%	p=0,018
%Bcl-xl (médiane)	34,56%	74,47%	p=0,015
MFI Bcl-2 (médiane)	1,56	1,67	p=0,715
MFI Mcl-1 (médiane)	9,49	9,84	p=0,100
MFI Bcl-xl (médiane)	4,11	4,45	p=0,144

Tableau XVI : Comparaison des données selon l'évaluation de la MRD par CMF.

DISCUSSION

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est l'une des hémopathies les plus fréquentes dans les pays occidentaux et a bénéficié de nombreuses avancées thérapeutiques ces dernières années.^{2,16,73} Cependant, son évolution demeure variable d'un patient à un autre.⁷³ Parmi les facteurs pronostiques décrits,^{2,39,54} l'étude du statut mutationnel des chaînes lourdes des immunoglobulines (*IGVH*) en biologie moléculaire demeure importante.⁷³ Son statut non muté est associé à une moins bonne réponse à la polychimiothérapie de première intention (RFC) du fait d'une absence de sensibilité à la fludarabine.⁶⁰⁻⁶²

Dans ce travail, il a été proposé une nouvelle approche de détermination du statut mutationnel *IGVH* par un marquage cellulaire simple en cytométrie en flux (CMF). Cette méthode permettrait à la fois une meilleure disponibilité de ces résultats du fait de la forte diffusion du parc de cytomètre et de la facilité de la technique, un délai de rendu de résultats de seulement 2 heures, ainsi qu'une diminution des coûts liée notamment aux réactifs utilisés.

Nous avons analysé, par CMF multiparamétrique, l'expression du CD27 et de l'IgD sur des prélèvements sanguins congelés issus de patients atteints de LLC au diagnostic, afin de distinguer les lymphocytes B naïfs (*IGVH*-NM, IgD positif/CD27 négatif) des lymphocytes B mémoires (*IGVH*-M, IgD négatif/CD27 positif). Sur 98 prélèvements, seuls 2 patients présentaient un profil B mémoire en CMF (IgD-/CD27+), alors que le statut mutationnel *IGVH* était non muté. Ainsi, la concordance entre ces deux approches est nettement significative ($p < 0,001$). En outre, la prédiction du statut mutationnel *IGVH* par détermination du profil B naïf/B mémoire, via la CMF, obtient une sensibilité de 95,6% et une spécificité de 100%.

Du fait d'un nombre très faible de données concernant l'identification de subsets du BCR (8 sous-types identifiés sur les 98 patients inclus dans la cohorte), aucun lien statistique n'a pu être établi avec les profils d'expression IgD/CD27.

Dans le but de retrouver une explication aux deux cas discordants, les acquisitions et dossiers médicaux de ces patients ont été réanalysés. Pour le premier, du fait de l'absence de culot cellulaire supplémentaire, un nouveau marquage n'a pu être réitéré. De ce fait, seul l'acquisition a été reprise et les mêmes résultats ont été obtenus, à savoir un profil B mémoire (IgD-/CD27+) alors que le statut mutationnel était non muté avec une homologie de 99,5% en biologie moléculaire, sans subset identifié. Pour le second patient, un culot cellulaire congelé supplémentaire était disponible, ce qui a

permis la réalisation d'un nouveau marquage et d'une nouvelle acquisition. De façon étonnante, le profil obtenu sur ce nouveau culot était celui d'un clone à profil B naïf (IgD+/CD27-) qui concordait avec le statut *IGVH*-NM mis en évidence en biologie moléculaire. Se pose alors la question d'une inversion de tube qui aurait pu survenir lors de la congélation, lors du temps de technique ou lors de l'identification durant l'acquisition sur le cytomètre. A l'image du premier patient, aucun subset n'a été identifié pour ce dernier.

Afin de confirmer les résultats obtenus, une cohorte de validation a été constituée. Celle-ci a inclus 50 patients suivis au CHU d'Amiens-Picardie, au CH d'Abbeville, au CH de Valenciennes et au CH de Lens. Les différentes caractéristiques de cette cohorte de validation sont décrites en *annexe VI*. La concordance entre la détermination du statut mutationnel *IGVH* obtenu par biologie moléculaire et le profil CMF était de 100% pour le statut *IGVH*-NM et le profil de cellules B naïves (IgD+/CD27-). Deux patients présentaient un profil B mémoire en CMF (IgD-/CD27+), alors que le statut mutationnel *IGVH* était non muté. La sensibilité calculée dans cette cohorte de validation est de 92% ($IC_{95\%} = [75-98]$) et la spécificité de 100% ($IC_{95\%} = [86-100]$) pour la CMF, ce qui confirme la bonne concordance entre ces deux approches.

Néanmoins, nous devons admettre qu'à l'inverse de la biologie moléculaire, la CMF utilisée comme une approche rapide et accessible financièrement, ne permet pas d'obtenir d'information concernant l'identification de sous-types *VH*. En outre, à l'ère des iBTK et des antagonistes de BCL2, l'importance pronostique du statut mutationnel *IGVH* est à relativiser. Néanmoins, les approches thérapeutiques à base de thérapies ciblées ne sont pas disponibles partout et cette nouvelle approche peut s'avérer très pertinente dans ces situations, ainsi que dans celles où la biologie moléculaire ne peut être réalisée (notamment dans les centres à faibles ressources).

Il faut noter que notre nouvelle approche par CMF ne permet pas d'étudier la diversité sous-clonale de la LLC, tout comme la technologie de séquençage Sanger. A l'inverse, l'utilisation d'une technique NGS au moment du diagnostic, offre la possibilité de détecter les différents sous-clones. Cette information est à prendre en considération puisqu'une récente étude a fait état de clones multiples non apparentés chez environ 24% des patients atteints de LLC, ce qui a été associé à un pronostic plus défavorable.¹²²

Ce travail est, à notre connaissance, la première étude de l'expression intracytoplasmique des protéines BCL2 dans la LLC par CMF multiparamétrique.

Aucune différence significative n'a été retrouvée sur l'expression intracytoplasmique de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl entre les patients traités et ceux non traités, ce qui semble indiquer que les niveaux de ces protéines BCL2 ne semblent pas prédictifs de l'activité de la maladie qui est corrélée à l'instauration d'un traitement.

Plus précisément, sur 89 patients, 23,6% ont bénéficié d'un traitement par venetoclax que ce soit en première, en seconde ou en troisième ligne (n = 21). De façon intéressante, une expression augmentée de Bcl-2 et de Mcl-1 a été retrouvée chez les patients traités par venetoclax, sans différence significative pour Bcl-xl. Ainsi, dès le diagnostic, Bcl-2 et Mcl-1 semblent être surexprimées à la fois chez les patients devenant réfractaires, c'est-à-dire ceux bénéficiant de lignes thérapeutiques supplémentaires après une rechute sous RFC, mais aussi chez les patients dont le bilan pré-thérapeutique retrouve la présence de facteurs génétiques défavorables entraînant l'indication à l'instauration d'une thérapie ciblée en première ligne.

Pour les patients sous venetoclax, il a été mis en évidence une surexpression des protéines Mcl-1 et Bcl-xl dans le groupe des non-répondeurs ou en réponse partielle (MRD positive, n = 5), par rapport à ceux en réponse complète (MRD négative, n = 6). Ces données concordent avec ce qui a déjà été décrit dans la littérature, puisque les protéines Mcl-1 et Bcl-xl sont les deux membres de la famille BCL2 surexprimées chez les patients non-répondeurs au venetoclax.^{117,118} Il s'agit ici de la première mise en évidence par CMF d'une surexpression de Mcl-1 et de Bcl-xl chez des patients atteints de LLC avec une MRD positive à 1 an de l'introduction de venetoclax.

De façon intéressante, il a été préalablement démontré que les patients atteints d'un myélome et présentant une t(11;14) avaient une réponse au venetoclax qui dépendait du ratio d'expression en ARNm de Bcl-2 par rapport à Mcl-1 et à Bcl-xl. En effet, un haut ratio d'expression Bcl-2:Bcl-xl ou de Bcl-2:Mcl-1 obtenu par RT-qPCR définissait les groupes de patients avec le plus haut taux de réponse globale sous venetoclax.¹²³⁻¹²⁵

Ainsi, et à l'image de ce qui a été mis en évidence dans le myélome, la détermination d'un ratio d'expression protéique de Bcl-2 par rapport à Mcl-1 et à Bcl-xl dans la LLC reste à être établi afin de mieux pouvoir prédire le shift protéique à l'origine de cette résistance. Ce ratio, déterminé par CMF, permettrait d'une part, d'identifier rapidement et à moindre coût les patients pour lesquels le profil des protéines de la famille BCL2 serait favorable à l'utilisation du venetoclax. Ceci viendrait en

complément des autres données pour tendre davantage vers une approche thérapeutique personnalisée. D'autre part, son étude au décours de l'évaluation de la MRD pourrait fournir une explication sur le mécanisme à l'origine d'une éventuelle résistance.

Enfin, il a été retrouvé que le venetoclax se retrouve associé au profil B naïf. Ce résultat est cohérent, puisque d'une part, ce médicament est indiqué en première ligne des patients avec des marqueurs génétiques défavorables, comprenant notamment le statut *IGH-NM*⁷⁴ ; et d'autre part, puisqu'il existe une concordance, préalablement démontrée, entre le profil B naïf et la présence d'un statut *IGH-NM*.

A noter que lors de l'analyse de nos différentes acquisitions, nous avons été confrontés à la présence d'un « shift » sur l'expression des protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl. Dans le but de parfaire l'analyse, un lavage par PBS/SVF 1% a été rajouté après le marquage et avant l'acquisition. Celui-ci a légèrement amélioré la distinction de nos populations cellulaires, mais n'a pas permis de faire disparaître totalement ce shift. A ce lavage, un nouveau rééquilibrage de la matrice de compensation a été réalisé mais ce dernier n'a pas permis de régler le problème de « shift ». La dernière solution envisagée consiste en l'utilisation d'un autre clone d'anticorps pour le marquage de nos protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl. Une comparaison des acquisitions pourrait alors être envisagée dans le but de choisir l'anticorps entraînant la meilleure discrimination.

Ces premiers résultats sont tout de même à relativiser du fait d'un manque de puissance statistique due au faible effectif et à l'utilisation de tests non paramétriques. Ainsi, ils devront être confirmés sur un plus grand nombre de patients, notamment pour étudier de façon plus fine l'impact des protéines de la famille BCL2 sur la réponse au venetoclax.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons, d'une part, mis en évidence une nouvelle approche de détermination du statut mutationnel *IGVH* par un marquage cellulaire simple en CMF multiparamétrique. Elle consiste en l'analyse de l'expression du CD27 et de l'IgD au diagnostic de LLC, afin de distinguer les clones lymphocytaires ayant un profil B naïf (*IGVH*-NM, IgD+/CD27-) des clones ayant un profil B mémoire (*IGVH*-M, IgD-/CD27+). La distinction par CMF de la présence d'un profil B naïf ou mémoire est significativement corrélée au statut mutationnel des *IGVH* obtenu par biologie moléculaire et confirmée sur une cohorte de validation. La sensibilité est de 95,6% et la spécificité de 100%. Cette nouvelle approche est facile à mettre en place en routine et ne nécessite l'emploi que de deux marqueurs qui pourraient être incorporés dans le panel diagnostique permettant le calcul du score de Matutes. Elle permettrait ainsi d'orienter rapidement et à faible coût le choix thérapeutique des patients atteints de LLC, notamment dans les centres à faible ressource où la biologie moléculaire n'est pas disponible.

D'autre part, l'expression intracytoplasmique de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl a été analysée pour la première fois par CMF, dans le but d'étudier l'un des mécanismes à l'origine de la résistance au venetoclax. Chez les patients traités par venetoclax, Bcl-2 et Mcl-1 se retrouvent surexprimées, sans différence pour Bcl-xl. De plus, il a été retrouvé chez les patients sous venetoclax avec une MRD positive, une surexpression de Mcl-1 et de Bcl-xl par rapport aux patients en rémission complète.

La suite de ce travail va s'articuler autour de deux grands axes : le premier consistera à confirmer ces résultats sur un plus grand nombre de patients sous venetoclax, ce qui est facilité par l'obtention récente de son AMM en tant que traitement de première ligne des patients ayant des facteurs génétiques défavorables. Par ailleurs, afin d'étudier de façon plus fine l'impact des protéines de la famille BCL2 sur la réponse à ce médicament, le second axe consistera en l'établissement d'une analyse comparative de l'expression des protéines entre le bilan pré-thérapeutique et le bilan annuel de réévaluation pour identifier un ratio d'expression protéique prédictif d'une non réponse et/ou d'une rechute sous venetoclax.

Le Directeur de thèse,
Dr Thomas BOYER

Le Président du Jury,
Pr Saïd KAMEL

BIBLIOGRAPHIE

1. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the iwCLL updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood*. 2008;111(12):5446-5456. doi:10.1182/blood-2007-06-093906
2. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*. 2018;131(25):2745-2760. doi:10.1182/blood-2017-09-806398
3. Oscier D, Else M, Matutes E, Morilla R, Strefford JC, Catovsky D. The morphology of CLL revisited: the clinical significance of prolymphocytes and correlations with prognostic/molecular markers in the LRF CLL4 trial. *Br J Haematol*. 2016;174(5):767-775. doi:10.1111/bjh.14132
4. Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*. 1994;8(10):1640-1645.
5. Moreau EJ, Matutes E, A'Hern RP, et al. Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am J Clin Pathol*. 1997;108(4):378-382. doi:10.1093/ajcp/108.4.378
6. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-3967. doi:10.1182/blood-2007-11-120535
7. Sorigue M. CD43 in the malignant flow cytometry laboratory in 2020. *Expert Rev Hematol*. 2021;14(1):123-136. doi:10.1080/17474086.2021.1856653
8. D'Arena G, De Feo V, Pietrantuono G, et al. CD200 and Chronic Lymphocytic Leukemia: Biological and Clinical Relevance. *Front Oncol*. 2020;10:584427. doi:10.3389/fonc.2020.584427
9. Afacan-Öztürk HB, Falay M, Albayrak M, et al. CD81 Expression in the Differential Diagnosis of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Lab*. 2019;65(3). doi:10.7754/Clin.Lab.2018.180802
10. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569
11. Marti GE, Rawstron AC, Ghia P, et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *Br J Haematol*. 2005;130(3):325-332. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05550.x
12. Rawstron AC, Kwok M, Fenton JAL, et al. Monoclonal B-Cell Lymphocytosis and Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. Published online 2008:9.
13. Rawstron AC, Shanafelt T, Lanasa MC, et al. Different Biology and Clinical Outcome According to the Absolute Numbers of Clonal B-Cells in Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL). *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(Suppl 1):S19-S23. doi:10.1002/cyto.b.20533
14. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC. Monoclonal B-cell Lymphocytosis (MBL): Biology, Natural History, and Clinical Management. *Leukemia*. 2010;24(3):512-520. doi:10.1038/leu.2009.287

15. Le Guyader-Peyrou S, Defosse G, Dantony E, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Vol 2 – Hémopathies malignes. Registres des cancers du réseau Francim. *Santé Publique Fr.* Published online July 2019:169.
16. Sant M, Allemani C, Tereanu C, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood.* 2010;116(19):3724-3734. doi:10.1182/blood-2010-05-282632
17. Li Y, Wang Y, Wang Z, Yi D, Ma S. Racial Differences in Three Major NHL Subtypes: Descriptive Epidemiology. *Cancer Epidemiol.* 2015;39(1):8-13. doi:10.1016/j.canep.2014.12.001
18. Monnereau A, Troussard X, Belot A, et al. Unbiased estimates of long-term net survival of hematological malignancy patients detailed by major subtypes in France. *Int J Cancer.* 2013;132(10):2378-2387. doi:10.1002/ijc.27889
19. Catovsky D, Wade R, Else M. The clinical significance of patients' sex in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2014;99(6):1088-1094. doi:10.3324/haematol.2013.101378
20. Orazio S, Cornet E, Maynadié M, et al. Survie des personnes atteintes de cancer en France métropolitaine 1989-2018 : Leucémie lymphoïde chronique/lymphome lymphocytaire. *Santé Publique Fr.* Published online 2021.
21. Kristinsson SY, Dickman PW, Wilson WH, Caporaso N, Björkholm M, Landgren O. Improved survival in chronic lymphocytic leukemia in the past decade: a population-based study including 11,179 patients diagnosed between 1973-2003 in Sweden. *Haematologica.* 2009;94(9):1259-1265. doi:10.3324/haematol.2009.007849
22. Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol.* 2000;109(4):794-799. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02111.x
23. Capalbo S, Trerotoli P, Ciancio A, Battista C, Serio G, Liso V. Increased risk of lymphoproliferative disorders in relatives of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: relevance of the degree of familial linkage. *Eur J Haematol.* 2000;65(2):114-117. doi:10.1034/j.1600-0609.2000.90183.x
24. Goldin LR, Björkholm M, Kristinsson SY, Turesson I, Landgren O. Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica.* 2009;94(5):647-653. doi:10.3324/haematol.2008.003632
25. Di Bernardo MC, Crowther-Swanepoel D, Broderick P, et al. A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2008;40(10):1204-1210. doi:10.1038/ng.219
26. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC, et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3, and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat Genet.* 2010;42(2):132-136. doi:10.1038/ng.510

27. Slager SL, Rabe KG, Achenbach SJ, et al. Genome-wide association study identifies a novel susceptibility locus at 6p21.3 among familial CLL. *Blood*. 2011;117(6):1911-1916. doi:10.1182/blood-2010-09-308205
28. Slager SL, Skibola CF, Di Bernardo MC, et al. Common variation at 6p21.31 (BAK1) influences the risk of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;120(4):843-846. doi:10.1182/blood-2012-03-413591
29. Berndt SI, Skibola CF, Joseph V, et al. Genome-wide Association Study Identifies Multiple Risk Loci for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(8):868-876. doi:10.1038/ng.2652
30. Berndt SI, Camp NJ, Skibola CF, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun*. 2016;7:10933. doi:10.1038/ncomms10933
31. Boffetta P, van der Hel O, Krickler A, et al. Exposure to ultraviolet radiation and risk of malignant lymphoma and multiple myeloma--a multicentre European case-control study. *Int J Epidemiol*. 2008;37(5):1080-1094. doi:10.1093/ije/dyn092
32. Slager SL, Benavente Y, Blair A, et al. Medical history, lifestyle, family history, and occupational risk factors for chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma: the InterLymph Non-Hodgkin Lymphoma Subtypes Project. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2014;2014(48):41-51. doi:10.1093/jncimonographs/lgu001
33. Marcucci F, Mele A. Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities. *Blood*. 2011;117(6):1792-1798. doi:10.1182/blood-2010-06-275818
34. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-234.
35. Binet JL, Auquier A, Dighiero G, et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. 1981;48(1):198-206. doi:10.1002/1097-0142(19810701)48:1<198::aid-cnrcr2820480131>3.0.co;2-v
36. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;124(1):49-62. doi:10.1182/blood-2014-02-556399
37. International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):779-790. doi:10.1016/S1470-2045(16)30029-8
38. Montserrat E. New prognostic markers in CLL. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. Published online 2006:279-284. doi:10.1182/asheducation-2006.1.279
39. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;8(1):38-47. doi:10.1038/nrclinonc.2010.167

40. Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Viñolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol.* 1986;62(3):567-575. doi:10.1111/j.1365-2141.1986.tb02969.x
41. Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer.* 1987;60(11):2712-2716. doi:10.1002/1097-0142(19871201)60:11<2712::aid-cncr2820601122>3.0.co;2-1
42. Bergmann MA, Eichhorst BF, Busch R, et al. Prospective Evaluation of Prognostic Parameters in Early Stage Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results of the CLL1-Protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Blood.* 2007;110(11):625. doi:10.1182/blood.V110.11.625.625
43. Di Giovanni S, Valentini G, Carducci P, Giallonardo P. Beta-2-microglobulin is a reliable tumor marker in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol.* 1989;81(4):181-185. doi:10.1159/000205558
44. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma.* 1996;22(5-6):439-447. doi:10.3109/10428199609054782
45. Gentile M, Cutrona G, Neri A, Molica S, Ferrarini M, Morabito F. Predictive value of beta2-microglobulin (beta2-m) levels in chronic lymphocytic leukemia since Binet A stages. *Haematologica.* 2009;94(6):887-888. doi:10.3324/haematol.2009.005561
46. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2009;27(10):1637-1643. doi:10.1200/JCO.2008.18.1701
47. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, et al. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2003;121(2):287-295. doi:10.1046/j.1365-2141.2003.04265.x
48. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;343(26):1910-1916. doi:10.1056/NEJM200012283432602
49. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *BioMed Res Int.* 2014;2014:435983. doi:10.1155/2014/435983
50. Shanafelt TD, Witzig TE, Fink SR, et al. Prospective evaluation of clonal evolution during long-term follow-up of patients with untreated early-stage chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2006;24(28):4634-4641. doi:10.1200/JCO.2006.06.9492
51. Zenz T, Kröber A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood.* 2008;112(8):3322-3329. doi:10.1182/blood-2008-04-154070
52. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med.* 1990;323(11):720-724. doi:10.1056/NEJM199009133231105

53. Baliakas P, Iskas M, Gardiner A, et al. Chromosomal translocations and karyotype complexity in chronic lymphocytic leukemia: a systematic reappraisal of classic cytogenetic data. *Am J Hematol*. 2014;89(3):249-255. doi:10.1002/ajh.23618
54. Baliakas P, Jeromin S, Iskas M, et al. Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*. 2019;133(11):1205-1216. doi:10.1182/blood-2018-09-873083
55. Dyer MJS, Oscier DG. The configuration of the immunoglobulin genes in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;16(6):973-984. doi:10.1038/sj.leu.2402528
56. Schroeder HW, Dighiero G. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*. 1994;15(6):288-294. doi:10.1016/0167-5699(94)90009-4
57. Hashimoto S, Dono M, Wakai M, et al. Somatic diversification and selection of immunoglobulin heavy and light chain variable region genes in IgG+ CD5+ chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Exp Med*. 1995;181(4):1507-1517. doi:10.1084/jem.181.4.1507
58. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*. 1998;102(8):1515-1525. doi:10.1172/JCI3009
59. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007;21(1):1-3. doi:10.1038/sj.leu.2404457
60. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1848-1854.
61. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1999;94(6):1840-1847.
62. Thompson PA, Tam CS, O'Brien SM, et al. Fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab treatment achieves long-term disease-free survival in IGHV-mutated chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2016;127(3):303-309. doi:10.1182/blood-2015-09-667675
63. Messmer BT, Albesiano E, Efremov DG, et al. Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2004;200(4):519-525. doi:10.1084/jem.20040544
64. Agathangelidis A, Darzentas N, Hadzidimitriou A, et al. Stereotyped B-cell receptors in one-third of chronic lymphocytic leukemia: a molecular classification with implications for targeted therapies. *Blood*. 2012;119(19):4467-4475. doi:10.1182/blood-2011-11-393694
65. Stamatopoulos K, Agathangelidis A, Rosenquist R, Ghia P. Antigen receptor stereotypy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(2):282-291. doi:10.1038/leu.2016.322
66. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(26):2497-2506. doi:10.1056/NEJMoa1109016

67. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med*. 2011;208(7):1389-1401. doi:10.1084/jem.20110921
68. Damm F, Mylonas E, Cosson A, et al. Acquired initiating mutations in early hematopoietic cells of CLL patients. *Cancer Discov*. 2014;4(9):1088-1101. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0104
69. Landau DA, Tausch E, Taylor-Weiner AN, et al. Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*. 2015;526(7574):525-530. doi:10.1038/nature15395
70. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*. 2010;24(12):2072-2079. doi:10.1038/leu.2010.208
71. Seiffert M, Dietrich S, Jethwa A, Glimm H, Lichter P, Zenz T. Exploiting biological diversity and genomic aberrations in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(6):1023-1031. doi:10.3109/10428194.2011.631638
72. Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, et al. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*. 1994;84(9):3148-3157.
73. Hallek M, Al-Sawaf O. Chronic lymphocytic leukemia: 2022 update on diagnostic and therapeutic procedures. *Am J Hematol*. 2021;96(12):1679-1705. doi:10.1002/ajh.26367
74. Quinquenel A, Aurran-Schleinitz T, Clavert A, et al. Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: Recommendations of the French CLL Study Group (FILO). *HemaSphere*. 2020;4(5):e473. doi:10.1097/HS9.0000000000000473
75. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2016;43(2):233-240. doi:10.1053/j.seminoncol.2016.02.009
76. Letestu R, Lévy V, Eclache V, et al. Prognosis of Binet stage A chronic lymphocytic leukemia patients: the strength of routine parameters. *Blood*. 2010;116(22):4588-4590. doi:10.1182/blood-2010-06-288274
77. Gentile M, Shanafelt TD, Rossi D, et al. Validation of the CLL-IPI and comparison with the MDACC prognostic index in newly diagnosed patients. *Blood*. 2016;128(16):2093-2095. doi:10.1182/blood-2016-07-728261
78. Molica S, Giannarelli D, Mirabelli R, Levato L, Kay NE, Shanafelt TD. Chronic lymphocytic leukemia international prognostic index: a systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2018;131(3):365-368. doi:10.1182/blood-2017-09-806034
79. Delgado J, Doubek M, Baumann T, et al. Chronic lymphocytic leukemia: A prognostic model comprising only two biomarkers (IGHV mutational status and FISH cytogenetics) separates patients with different outcome and simplifies the CLL-IPI. *Am J Hematol*. 2017;92(4):375-380. doi:10.1002/ajh.24660
80. Parikh SA, Leis JF, Chaffee KG, et al. Hypogammaglobulinemia in Newly Diagnosed Chronic Lymphocytic Leukemia: Natural History, Clinical Correlates and Outcomes. *Cancer*. 2015;121(17):2883-2891. doi:10.1002/cncr.29438

81. Parikh SA, Rabe KG, Call TG, et al. Diffuse large B-cell lymphoma (Richter syndrome) in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL): a cohort study of newly diagnosed patients. *Br J Haematol*. 2013;162(6):774-782. doi:10.1111/bjh.12458
82. Rossi D, Spina V, Gaidano G. Biology and treatment of Richter syndrome. *Blood*. 2018;131(25):2761-2772. doi:10.1182/blood-2018-01-791376
83. Rai KR, Jain P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *Am J Hematol*. 2016;91(3):330-340. doi:10.1002/ajh.24282
84. Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007;25(7):799-804. doi:10.1200/JCO.2006.08.3089
85. Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA, et al. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood*. 2003;101(1):6-14. doi:10.1182/blood-2002-04-1258
86. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M, et al. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2005;23(18):4079-4088. doi:10.1200/JCO.2005.12.051
87. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2010;376(9747):1164-1174. doi:10.1016/S0140-6736(10)61381-5
88. Fischer K, Bahlo J, Fink AM, et al. Long-term remissions after FCR chemoimmunotherapy in previously untreated patients with CLL: updated results of the CLL8 trial. *Blood*. 2016;127(2):208-215. doi:10.1182/blood-2015-06-651125
89. Patz M, Isaeva P, Forcob N, et al. Comparison of the in vitro effects of the anti-CD20 antibodies rituximab and GA101 on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol*. 2011;152(3):295-306. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08428.x
90. Al-Sawaf O, Zhang C, Lu T, et al. Minimal Residual Disease Dynamics after Venetoclax-Obinutuzumab Treatment: Extended Off-Treatment Follow-up From the Randomized CLL14 Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2021;39(36):4049-4060. doi:10.1200/JCO.21.01181
91. Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118(16):4313-4320. doi:10.1182/blood-2011-06-338855
92. Wiestner A. Emerging role of kinase-targeted strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:88-96. doi:10.1182/asheducation-2012.1.88
93. Nguyen PH, Niesen E, Hallek M. New roles for B cell receptor associated kinases: when the B cell is not the target. *Leukemia*. 2019;33(3):576-587. doi:10.1038/s41375-018-0366-8

94. Brown JR, Byrd JC, Coutre SE, et al. Idelalisib, an inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase p110 δ , for relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014;123(22):3390-3397. doi:10.1182/blood-2013-11-535047
95. Furman RR, Sharman JP, Coutre SE, et al. Idelalisib and rituximab in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;370(11):997-1007. doi:10.1056/NEJMoa1315226
96. O'Brien SM, Lamanna N, Kipps TJ, et al. A phase 2 study of idelalisib plus rituximab in treatment-naïve older patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2015;126(25):2686-2694. doi:10.1182/blood-2015-03-630947
97. Farooqui MZH, Valdez J, Martyr S, et al. Ibrutinib for previously untreated and relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with TP53 aberrations: a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(2):169-176. doi:10.1016/S1470-2045(14)71182-9
98. Shanafelt TD, Wang XV, Hanson CA, et al. Long-term outcomes for ibrutinib-rituximab and chemoimmunotherapy in CLL: updated results of the E1912 trial. *Blood*. 2022;140(2):112-120. doi:10.1182/blood.2021014960
99. McMullen JR, Boey EJH, Ooi JYY, Seymour JF, Keating MJ, Tam CS. Ibrutinib increases the risk of atrial fibrillation, potentially through inhibition of cardiac PI3K-Akt signaling. *Blood*. 2014;124(25):3829-3830. doi:10.1182/blood-2014-10-604272
100. Caldeira D, Alves D, Costa J, Ferreira JJ, Pinto FJ. Ibrutinib increases the risk of hypertension and atrial fibrillation: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(2):e0211228. doi:10.1371/journal.pone.0211228
101. Caron F, Leong DP, Hillis C, Fraser G, Siegal D. Current understanding of bleeding with ibrutinib use: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv*. 2017;1(12):772-778. doi:10.1182/bloodadvances.2016001883
102. Byrd JC, Hillmen P, Ghia P, et al. Acalabrutinib Versus Ibrutinib in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia: Results of the First Randomized Phase III Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2021;39(31):3441-3452. doi:10.1200/JCO.21.01210
103. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395-419. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.395
104. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*. 2007;26(9):1324-1337. doi:10.1038/sj.onc.1210220
105. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):47-59. doi:10.1038/nrm2308
106. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(4):311-322. doi:10.1056/NEJMoa1513257
107. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol*. 2016;17(6):768-778. doi:10.1016/S1470-2045(16)30019-5

108. Kater AP, Kipps TJ, Eichhorst B, et al. Five-Year Analysis of Murano Study Demonstrates Enduring Undetectable Minimal Residual Disease (uMRD) in a Subset of Relapsed/Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia (R/R CLL) Patients (Pts) Following Fixed-Duration Venetoclax-Rituximab (VenR) Therapy (Tx). *Blood*. 2020;136(Supplement 1):19-21. doi:10.1182/blood-2020-136109
109. Yosifov DY, Wolf C, Stilgenbauer S, Mertens D. From Biology to Therapy: The CLL Success Story. *HemaSphere*. 2019;3(2):e175. doi:10.1097/HS9.000000000000175
110. Rawstron AC, Fazi C, Agathangelidis A, 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*. 2016;30(4):929-936. doi:10.1038/leu.2015.313
111. Böttcher S, Ritgen M, Fischer K, 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*. 2012;30(9):980-988. doi:10.1200/JCO.2011.36.9348
112. Thompson PA, Wierda WG. Eliminating minimal residual disease as a therapeutic end point: working toward cure for patients with CLL. *Blood*. 2016;127(3):279-286. doi:10.1182/blood-2015-08-634816
113. Ching T, Duncan ME, Newman-Eerkes T, et al. Analytical evaluation of the clonoSEQ Assay for establishing measurable (minimal) residual disease in acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphocytic leukemia, and multiple myeloma. *BMC Cancer*. 2020;20(1):612. doi:10.1186/s12885-020-07077-9
114. Laffleur B, Denis-Lagache N, Péron S, Sirac C, Moreau J, Cogné M. AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget*. 2014;5(5):1118-1131. doi:10.18632/oncotarget.1546
115. Agematsu K. Memory B cells and CD27. *Histol Histopathol*. 2000;15(2):573-576. doi:10.14670/HH-15.573
116. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia*. 1996;10(3):456-459.
117. Guièze R, Liu VM, Rosebrock D, et al. Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. *Cancer Cell*. 2019;36(4):369-384.e13. doi:10.1016/j.ccell.2019.08.005
118. Choudhary GS, Al-Harbi S, Mazumder S, et al. MCL-1 and BCL-xL-dependent resistance to the BCL-2 inhibitor ABT-199 can be overcome by preventing PI3K/AKT/mTOR activation in lymphoid malignancies. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1593. doi:10.1038/cddis.2014.525
119. Blombery P, Anderson MA, Gong J, et al. Acquisition of the Recurrent Gly101Val Mutation in BCL2 Confers Resistance to Venetoclax in Patients with Progressive Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Discov*. 2019;9(3):342-353. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1119

120. Bystry V, Agathangelidis A, Bikos V, et al. ARResT/AssignSubsets: a novel application for robust subclassification of chronic lymphocytic leukemia based on B cell receptor IG stereotypy. *Bioinformatics*. Published online August 6, 2015:btv456. doi:10.1093/bioinformatics/btv456
121. Hertlein E, Beckwith KA, Lozanski G, et al. Characterization of a new chronic lymphocytic leukemia cell line for mechanistic in vitro and in vivo studies relevant to disease. *PLoS One*. 2013;8(10):e76607. doi:10.1371/journal.pone.0076607
122. Stamatopoulos B, Timbs A, Bruce D, et al. Targeted deep sequencing reveals clinically relevant subclonal IgHV rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(4):837-845. doi:10.1038/leu.2016.307
123. Kumar S, Kaufman JL, Gasparetto C, et al. Efficacy of venetoclax as targeted therapy for relapsed/refractory t(11;14) multiple myeloma. *Blood*. 2017;130(22):2401-2409. doi:10.1182/blood-2017-06-788786
124. Touzeau C, Dousset C, Le Gouill S, et al. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(1):210-212. doi:10.1038/leu.2013.216
125. Touzeau C, Maciag P, Amiot M, Moreau P. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2018;32(9):1899-1907. doi:10.1038/s41375-018-0223-9

ANNEXE I : CARACTERISTIQUES IMMUNOPHENOTYPIQUES DES SYNDROMES LYMPHOPROLIFERATIFS B CHRONIQUES⁶

	LLC	B-PLL	LF	LCM	LZM	HCL	LPL	DLBCL	LB
CD19	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD5	+	-	-	+	-/+	-	-	-/+	-
CD10	-	-/+	+	-	-	-/+	-	+/-	+
CD23	+	-	-	-	-	-	-	-/+	-
Ig de surface	Faible	++	++	++	++	++	Faible à moyenne	+/-	+
FMC7	-	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-/+
CD22	Faible/-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD79b	Faible/-	+	+	+	+	+	+	+	+
CD20	Faible	+	+	+	+	+	+	+/-	+
CD25	-/+	-	-	-	+/-	+	+	-/+	-
CD11c	-/+	-	-	-	+/-	+	-	-	-
CD103	-	-	-	-	-/+	+	-	-	-
CD43	++	-	-	-/+	-	-/+	-	-/+	-

Légende :

+ = positif ; - = négatif ; +/- = habituellement positif mais peut être négatif ; -/+ = habituellement négatif mais peut être positif ;

LLC = leucémie lymphoïde chronique ; B-PLL = Leucémie pro-lymphocytaire B ; LF = lymphome folliculaire ; LCM = lymphome à cellules du manteau ; LZM = lymphome de la zone marginale ; HCL = leucémie à tricholeucocytes ; LPL = lymphome lympho-plasmocytaire ; DLBCL = lymphome B diffus à grandes cellules ; LB = lymphome de Burkitt

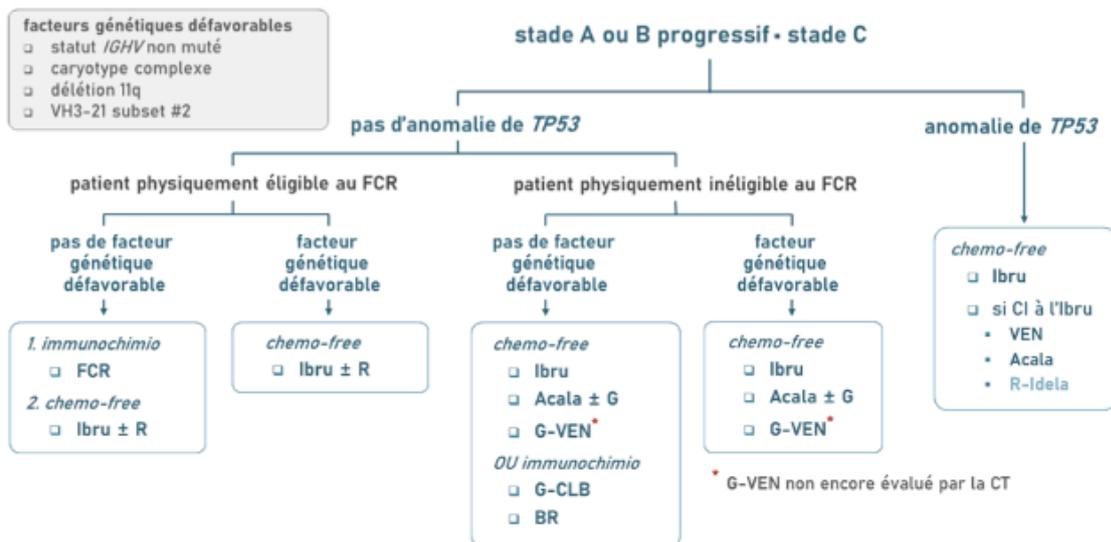
ANNEXE II : RECOMMANDATIONS FRANCAISES POUR LE TRAITEMENT DE LA LLC⁷⁴

Selon le groupe FILO (« French Innovative Leukemia Organization »), recommandations actualisées en Novembre 2021.

(A) traitement de première ligne de la LLC ;

(B) Traitement de la LLC en rechute.

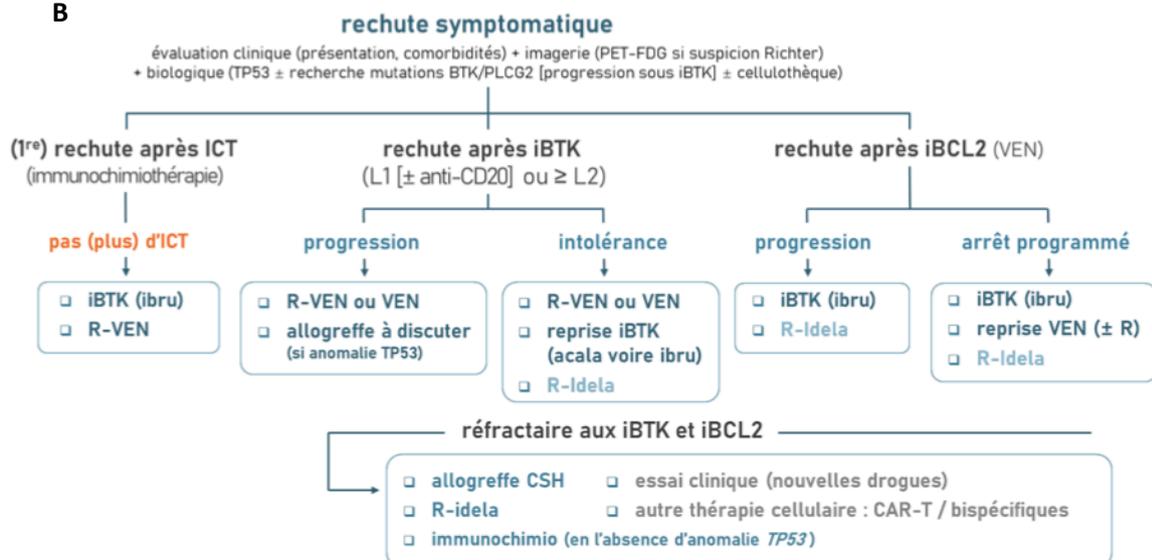
A



chemo-free

- ☐ Ibru
- ☐ si CI à l'Ibru
 - VEN
 - Acala
 - R-Idela

B



ANNEXE III : CRITERES DE DEFINITION DE LA REPONSE APRES TRAITEMENT DANS LA LLC²

Selon les recommandations de l'IWCLL-2018.

Pour définir :

- une **rémission complète (CR)**, tous les critères des groupes A et B doivent être remplis ;
- une **maladie progressive (PD)** : au moins un des critères du groupe A ou du groupe B doit être rempli ;
- une **réponse partielle (PR)** : au moins deux des paramètres du groupe A et un paramètre du groupe B doivent s'améliorer s'ils étaient précédemment anormaux et si un seul paramètre des groupes A et B était anormal avant le traitement, alors un seul doit s'améliorer ;
- une **maladie stable (SD)** : tous les critères doivent être remplis.

Groupe	Paramètre	CR	PR	PD	SD
A	Ganglions (Taille)	Aucun $\geq 1,5$ cm	Taille diminuée $\geq 50\%$	Taille augmentée $\geq 50\%$	Évolution de -49% à +49%
	Taille de la rate et/ou du foie	Taille de la rate < 13 cm ; foie de taille normale	Taille diminuée $\geq 50\%$	Taille augmentée $\geq 50\%$	Évolution de -49% à +49%
	Symptômes B	Absence	Présence	Présence	Présence
	Taux de lymphocytes circulants	< 4 G/L	Diminution $\geq 50\%$ du taux initial	Augmentation $\geq 50\%$ du taux initial	Évolution de -49% à +49%
B	Taux de plaquettes	≥ 100 G/L	≥ 100 G/L ou augmentation $\geq 50\%$ du taux initial	Diminution $\geq 50\%$ du taux initial	Évolution de -49% à +49%
	Hémoglobine	≥ 110 g/L (hors transfusion)	≥ 110 g/L ou augmentation $\geq 50\%$ du taux initial	Diminution ≥ 20 g/L du taux initial	Augmentation < 110 g/L ou baisse < 20 g/L
	Moelle (si infiltration médullaire initiale)	Moelle de richesse normale, absence de cellules de LLC	Persistance de cellule de LLC	Augmentation de l'infiltration	Pas de changement

Légende :

CR = Rémission complète ;
 PR = Rémission partielle ;
 PD = Maladie progressive ;
 SD = Maladie stable

ANNEXE IV : PROTOCOLE DE CONGELATION DES CELLULES MONONUCLEES

- **Préparation des cryotubes :** (réalisé en série et à l'avance) :
 - Décongeler le milieu de congélation Cell freezing medium-DMSO (réf. 0133-SC, Sciencell™) à température ambiante pendant 1 heure ;
 - Sous une hotte, transférer 1mL de milieu de congélation par tube NUNC ;
 - Mettre ces cryotubes préparés au congélateur à -80°C.
- **Préparation des cellules mononuclées à congeler :**
 - Verser le contenu d'un tube EDTA ou ACD de sang patient dans un tube conique de 50mL ;
 - Ajouter dans le tube conique le même volume de RPMI, puis bien homogénéiser ;
 - Dans un autre tube conique de 50mL, mettre 10mL de milieu de séparation des lymphocytes (densité = 1,077) ;
 - Déposer doucement le prélèvement dilué à la surface sans faire de remous (à l'aide d'une pipette pasteur stérile, faire couler le prélèvement le long de la paroi du tube conique incliné à 45°) ;
 - Centrifuger 30 minutes à 400G à température ambiante et sans frein ;
 - Après centrifugation du tube, à l'aide d'une pipette pasteur stérile, récupérer doucement l'anneau de cellules que l'on transféra dans un autre tube conique de 50mL ;
 - Laver les cellules récoltées dans l'anneau avec du RPMI (remplir le tube de RPMI, homogénéiser puis centrifuger 5 minutes à 300G à température ambiante) ;
 - Éliminer le surnageant et remettre le culot en suspension avec 50µL de Citrate-Phosphate-Dextrose et 500µL de SVF ;
 - Diluer au 1/10^{ème} 50µL du culot dans 450µL de RPMI puis énumérer sur le Sysmex XN-1000 ;
 - Calculer la quantité de cellules en fonction de la concentration et du volume du culot :

$$\text{Quantité de cellules} = \text{Concentration mesurée (cell./mm}^3\text{)} * 10 * \text{volume culot (}\mu\text{L)}$$

- **Congélation des cellules mononuclées :**
 - Décongeler à température ambiante le cryotube pendant +/- 20 minutes ;
 - En fonction du nombre de cellules obtenues après Ficoll, calculer le volume à distribuer dans les cryotubes pour avoir 20 millions de cellules dans chaque tube :
$$\text{Volume à distribuer (}\mu\text{L)} = \frac{\text{Nombre de cellules voulues} * \text{Volume de Ficoll (}\mu\text{L)}}{\text{Nombre de cellules totales dans le Ficoll}}$$
 - Identifier le cryotube (Nom, prénom, date de naissance, sang ou moelle osseuse, nombre de cellules dans le tube) et le mettre sur un portoir réfrigéré ;
 - Ajouter le volume de suspension à congeler dans le cryotube (de 20µL à 800µL) et mélanger doucement par aspiration avec le milieu de congélation ;
 - Boucher hermétiquement ;
 - Mettre le cryotube dans le container CoolCell qui est conservé à +4°C. Ce container est prévu pour faire descendre la température des cryotubes de 1 degré par minutes grâce à l'anneau intégré dans celui-ci ;
 - Placer le container directement au congélateur à -80°C ;
 - Laisser au minimum 4 heures à -80°C avant de transférer les cryotubes dans la bonbonne d'azote liquide.

<p>Perméabilisation et marquage intracellulaire</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Reprise du culot dans 100µL de réactif A (fixateur du kit Fix&Perm[®]) - Vortexer ; - Incuber 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ; - Laver par rajout de PBS/SVF 2% jusqu'à remplir le tube ; - Bouchonner le tube et centrifuger 5 min à 300G ; - Éliminer le surnageant par retournement ; - Reprise du culot dans 100µL de réactif B (perméabilisant du kit Fix&Perm[®]) - Vortexer ; - Ajout des marqueurs intracytoplasmiques : <ul style="list-style-type: none"> ✓ Bcl-2-FITC 5µL ✓ Bcl-XI-APC 2µL ✓ MCL-1-PE 2µL - Vortexer ; - Incuber 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière ; - Laver par rajout de PBS/SVF 2% jusqu'à remplir le tube ; - Bouchonner le tube et centrifuger 5 min à 300G ; - Éliminer le surnageant par retournement ; - Remettre le culot en suspension dans 400µL de PBS 1X ; - Effectuer l'acquisition du tube sur le cytomètre en flux rapidement.
-----------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ANNEXE VI : CARACTERISTIQUES CLINICO-BIOLOGIQUES DE LA COHORTE DE VALIDATION

	n = 50
Age médian au diagnostic (années)	65,5
Sexe ratio H/F	2,75
Stade Binet au diagnostic :	
A	46 (92%)
B	2 (4%)
C	2 (4%)
Statut mutationnel <i>IGVH</i> :	
Muté	25 (50%)
Non muté	25 (50%)
Anomalies <i>TP53</i>	5 (10%)
Traité*	28 (58%)

* = RFC, R-Bendamustine, Ibrutinib, GA101-Venetoclax, GA101-Chloraminophène.



Faculté de pharmacie



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté,

je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession.

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens.

De coopérer avec les autres professionnels de santé.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



UFR de Pharmacie
COUILLEZ Guillaume

**ÉTUDE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE MARQUEURS DE REPONSE
AU TRAITEMENT DANS LE CADRE DE LA LLC**

RESUME

Parmi les facteurs pronostiques décrits dans la LLC, l'étude du statut mutationnel *IGVH* en biologie moléculaire est incontournable. Son statut non muté est associé à une moins bonne réponse à la polychimiothérapie de première intention. Le venetoclax, un anti-Bcl-2, permet l'obtention de réponses chez des patients hautement réfractaires. Néanmoins, des résistances à ce traitement émergent par surexpression d'autres protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xl ou Mcl-1. Dans ce travail, nous cherchons, par marquage en CMF, à déterminer rapidement les patients qui pourront bénéficier de RFC et/ou d'un traitement par venetoclax. Nous distinguons, par étude de l'expression du CD27 et de l'IgD en CMF, les lymphocytes B naïfs (*IGVH*-NM, CD27-/IgD+) des lymphocytes B mémoires (*IGVH*-M, CD27+/IgD-). La concordance entre l'évaluation du statut mutationnel *IGVH* par biologie moléculaire et la détermination par CMF est significative, avec une sensibilité à 95,6% et une spécificité à 100% pour le test par CMF. Nous avons étudié l'expression intracytoplasmique de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl par CMF. Chez les 21 patients traités par venetoclax, Bcl-2 et Mcl-1 se retrouvent surexprimés. De même, Mcl-1 et Bcl-xl sont surexprimées chez les patients retrouvant une MRD positive. L'utilisation de cette nouvelle approche par CMF lors du diagnostic permettrait d'orienter le choix thérapeutique chez les patients atteints de LLC à moindre coût et de façon plus large, au vu de l'accessibilité de la technique. Ces premiers résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de patients, notamment pour étudier de façon plus fine l'impact des protéines de la famille BCL2 sur la réponse au venetoclax.

MOTS-CLES

Leucémie lymphoïde chronique (LLC), cytométrie en flux (CMF), lymphocytes B, IgD, CD27, BCL2

JURY

Président du jury : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur BOYER Thomas

Membres du jury : Monsieur le Professeur MAROLLEAU Jean-Pierre

Monsieur le Professeur GARCON Loïc

Madame le Docteur MONTES Lydia

Monsieur le Docteur MOREL Pierre

Jeuudi 6 Octobre 2022, UFR de Pharmacie, UPJV Amiens



UFR de Pharmacie
COUILLEZ Guillaume

**ÉTUDE PAR CYTOMETRIE EN FLUX DE MARQUEURS DE REPONSE
AU TRAITEMENT DANS LE CADRE DE LA LLC**

RESUME

Parmi les facteurs pronostiques décrits dans la LLC, l'étude du statut mutationnel *IGVH* en biologie moléculaire est incontournable. Son statut non muté est associé à une moins bonne réponse à la polychimiothérapie de première intention. Le venetoclax, un anti-Bcl-2, permet l'obtention de réponses chez des patients hautement réfractaires. Néanmoins, des résistances à ce traitement émergent par surexpression d'autres protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xl ou Mcl-1. Dans ce travail, nous cherchons, par marquage en CMF, à déterminer rapidement les patients qui pourront bénéficier de RFC et/ou d'un traitement par venetoclax. Nous distinguons, par étude de l'expression du CD27 et de l'IgD en CMF, les lymphocytes B naïfs (*IGVH*-NM, CD27-/IgD+) des lymphocytes B mémoires (*IGVH*-M, CD27+/IgD-). La concordance entre l'évaluation du statut mutationnel *IGVH* par biologie moléculaire et la détermination par CMF est significative, avec une sensibilité à 95,6% et une spécificité à 100% pour le test par CMF. Nous avons étudié l'expression intracytoplasmique de Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl par CMF. Chez les 21 patients traités par venetoclax, Bcl-2 et Mcl-1 se retrouvent surexprimés. De même, Mcl-1 et Bcl-xl sont surexprimées chez les patients retrouvant une MRD positive. L'utilisation de cette nouvelle approche par CMF lors du diagnostic permettrait d'orienter le choix thérapeutique chez les patients atteints de LLC à moindre coût et de façon plus large, au vu de l'accessibilité de la technique. Ces premiers résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de patients, notamment pour étudier de façon plus fine l'impact des protéines de la famille BCL2 sur la réponse au venetoclax.

MOTS-CLES

Leucémie lymphoïde chronique (LLC), cytométrie en flux (CMF), lymphocytes B, IgD, CD27, BCL2

JURY

Président du jury : Monsieur le Professeur KAMEL Saïd

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur BOYER Thomas

Membres du jury : Monsieur le Professeur MAROLLEAU Jean-Pierre

Monsieur le Professeur GARCON Loïc

Madame le Docteur MONTES Lydia

Monsieur le Docteur MOREL Pierre

Jeudi 6 Octobre 2022, UFR de Pharmacie, UPJV Amiens